



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EN *PSEN1* Y *APOE* ASOCIADAS
A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLÓGA

PRESENTA

NANCY ALEJANDRA CARMONA DÍAZ



DIRECTOR DE TESIS

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

Los Reyes Iztacala, Edo. De México.

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESORA: MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ

VOCAL: PROFESOR: SERGIO VACA PACHECO

SECRETARIO: PROFESORA: PETRA YESCAS GÓMEZ

SUPLENTE: PROFESOR: FELIPE VACA PANIAGUA

SUPLENTE: PROFESORA: IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

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

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS

NANCY ALEJANDRA CARMONA DÍAZ

SUSTENTANTE

ÍNDICE

I	ABREVIATURAS	4
II	RESUMEN	6
III	INTRODUCCIÓN	8
3.1	Antecedentes históricos.....	8
3.2	Epidemiología.....	8
3.3	Concepto de demencia.....	9
3.4	Demencia tipo Alzheimer.....	9
3.5	Características clínicas.....	9
3.6	Neuropatología.....	10
3.7	Etiología.....	12
3.8	Clasificación de la EA.....	12
3.9	Genética.....	12
3.9.1	Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (EOFAD).....	13
3.9.1.1	Proteína Precursora del β -amiloide (PPA).....	13
3.9.1.1.1	Procesamiento PPA.....	14
3.9.1.1.2	Hipótesis de la cascada amiloidea.....	15
3.9.1.2	Presenilinas.....	17
3.9.1.2.1	Localización y estructura de los genes <i>PSEN1</i> y <i>PSEN2</i>	17
3.9.1.2.2	Conservación entre especies.....	19
3.9.1.2.3	Expresión y localización subcelular.....	19
3.9.1.2.4	Estructura de las proteínas, topología y corte endoproteolítico.....	20
3.9.1.2.5	Funciones de las presenilinas.....	22
3.9.1.2.5.1	Presenilinas en el complejo γ -secretasa.....	22
3.9.1.2.5.2	Procesamiento de Notch.....	24
3.9.1.2.5.3	Regulación de β -Catenina.....	24
3.9.1.2.5.4	Homeostasis de calcio.....	25
3.9.1.2.5.5	Función patológica de presenilina en la EA.....	26
3.9.1.2.6	Mutaciones en los genes <i>PSEN1</i> y <i>PSEN2</i>	27
3.9.2	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD).....	29

3.9.2.1	Apolipoproteína E (ApoE)	30
3.9.2.1.1	Localización y estructura del gen	31
3.9.2.1.2	Función y síntesis de la proteína	32
3.9.2.1.3	Estructura de ApoE	33
3.9.2.1.4	Polimorfismo de <i>APOE</i> y EA	36
3.9.2.1.5	ApoE y A β	37
3.10	Otros factores de riesgo	38
IV	JUSTIFICACIÓN	40
V	HIPÓTESIS	40
VI	OBJETIVOS	41
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	42
7.1	Población de estudio	43
7.2	Toma de muestra	43
7.3	Extracción de DNA	43
7.3.1	Análisis espectrofotométrico	44
7.3.2	Análisis de integridad del DNA	44
7.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
7.4.1	<i>PSEN1</i>	45
7.4.2	<i>APOE</i>	46
7.4.3	Análisis de productos de PCR	47
7.5	Secuenciación tipo Sanger del gen <i>PSEN1</i>	48
7.5.1	Purificación de los productos de PCR	48
7.5.2	Reacción de secuenciación	48
7.5.3	Purificación de los productos de secuenciación	49
7.5.4	Secuenciación	50
7.6	Fragmentos polimórficos de longitud de restricción de <i>APOE</i> (RFLP)	50
7.6.1	Digestión enzimática	50
7.6.2	Análisis de productos de restricción	51
7.7	Análisis estadístico	52
VIII	RESULTADOS	53
8.1	Población de estudio	53
8.2	Cuantificación de DNA genómico	55

8.3	Análisis de integridad del DNA.....	55
8.4	Análisis de los productos de PCR de <i>PSEN1</i>	56
8.5	Mutaciones encontradas en el gen <i>PSEN1</i>	57
8.6	Análisis de productos de PCR de <i>APOE</i>	59
8.7	Fragmentos de restricción de <i>APOE</i>	60
8.8	Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>APOE</i>	61
IX	DISCUSIÓN	68
X	CONCLUSIONES	74
XI	PERSPECTIVAS	75
XII	BIBLIOGRAFÍA	76
XIII	ÁPENDICE	84

I ABREVIATURAS

a.a	Aminoácido
A β	Péptido β -amiloide
A β ₄₀	Péptido β -amiloide de 40 aminoácidos
A β ₄₂	Péptido β -amiloide de 42 aminoácidos
APC	Gen supresor de tumores APC-poliposis adenomatosa del colón
APOE	Apolipoproteína E
APOE	Gen de la apolipoproteína E
BACE	Complejo de la β -secretasa
BLGR	Buffer amortiguador para lisis de glóbulos rojos
CAA	Angiopatía amiloide cerebral
Ca ²⁺	Ion Calcio
CTF	Fragmento C-terminal
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano
EOFAD	Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano
FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
GSK-3 β	Proteína glicógeno-sintasa-cinasa 3 β
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
LOFAD	Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio tardío

mL	Mililitros
NFT	Marañas neurofibrilares
NICD	Dominio intracelular de Notch
Ng	Nanogramos
NTF	Fragmento amino-terminal
N-terminal	Amino terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio o razón de momios
p.b.	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEN-2	Potenciador de presenilina 2
PM	Peso molecular
PPA	Proteína Precursora del β -amiloide
<i>PPA</i>	Gen de la proteína precursora amiloide
PSEN1	Proteína Presenilina 1
<i>PSEN1</i>	Gen de la Presenilina 1
PSEN2	Proteína Presenilina 2
<i>PSEN2</i>	Gen de la presenilina 2
r.p.m	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TAU	Proteína Tau
<i>MAPT</i>	Gen de proteínas asociadas a microtúbulos Tau
TCF	Factor nuclear de transcripción
TMD	Dominio transmembranal
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

II RESUMEN

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la demencia como un síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria y no constituye una consecuencia normal del envejecimiento. Clínicamente la Enfermedad de Alzheimer (EA) se manifiesta como un trastorno amnésico progresivo con la subsecuente aparición de déficits cognitivos y neuropsiquiátricos que impiden la función social y las actividades de la vida diaria, progresando a demencia. En 2012 se estimó que en México existen alrededor de 800 mil personas afectadas por demencia, cerca de 350 mil de estos casos se atribuyen a la demencia de tipo Alzheimer. Aunque las causas de La Enfermedad de Alzheimer aún no han sido descubiertas en su totalidad, se sabe que es una enfermedad multifactorial. El péptido β -amiloide ($A\beta$) y la proteína Tau juegan un papel esencial en el desarrollo de la EA. De acuerdo a la edad de inicio de los síntomas, la EA se divide en dos grupos principales: EA de inicio temprano (EOAD); con un inicio <65 años, correspondiente a aproximadamente 10% de los casos y EA de inicio tardío (LOAD); con un inicio ≥ 65 años, correspondiente a aproximadamente 90% de los casos. Genéticamente la EA se puede clasificar en base a los antecedentes familiares como: formas familiares o monogénicas (FAD) (<1%), con un patrón de herencia autosómico dominante, de inicio temprano causada por mutaciones de alta penetrancia en tres genes: gen de la Proteína Precursora del β -amiloide (*PPA*), gen de presenilina 1 (*PSEN1*) y gen de presenilina 2 (*PSEN2*) y como formas poligénicas o multifactoriales o también llamadas formas “esporádicas” y es por lo general de inicio tardío. Las mutaciones en el gen *PSEN1* son la causa más común de la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (EOFAD) y representan aproximadamente entre el 50-70% de los casos de estas formas. La edad de inicio promedio para los portadores de una mutación en el gen de *PSEN1* es de 45 años aunque la enfermedad puede ocurrir desde los 30 años de edad. Por otro lado, el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE*) es el único factor de riesgo genético bien establecido para la EA de inicio tardío, a diferencia de las mutaciones en *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*, el alelo $\epsilon 4$ no es suficiente para causar EA, pero funciona como un modificador de riesgo genético mediante la disminución de la edad de inicio de la EA de una manera dependiente del número de copias de este alelo.

El objetivo de este estudio fue la búsqueda de mutaciones en el gen *PSEN1* y su relación con la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE*. Se analizaron 55 muestras de DNA de pacientes

con diagnóstico probable de demencia tipo Alzheimer, atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Se incluyeron los datos de frecuencias alélicas de 345 controles, ya determinadas para una muestra control de población mestizo mexicana sana, sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas y mayores de 60 años. Todos ellos con firma de consentimiento informado. Se encontraron 6 casos con mutación en el gen *PSEN1*, correspondientes al 30% de EA familiar de inicio temprano, cuatro de los casos presentaron la mutación A431E y dos la mutación E318G. Ambas mutaciones ya reportadas, la A431E con un efecto fundador en población mexicana y la E318G asociada como un polimorfismo de riesgo para la EA en las poblaciones australiana, italiana y finlandesa. El 21% de la muestra total de pacientes con EA presentó el alelo de riesgo $\epsilon 4$ ya sea en su forma homocigota (4.32%) o heterocigota (18.38%), de los cuales se encontró una frecuencia de 0.162 para el alelo $\epsilon 4$, correspondiente a casos de EA de inicio temprano, con una significancia estadística (χ^2 3.97 $p=0.0046061$) (OR 2.53, IC 95% 0.99-6.45) al comparar con controles sanos del mismo rango de edad y una frecuencia de 0.361 en casos de inicio tardío, con una significancia estadística (χ^2 24.91 $p=1 \times 10^{-5}$) (OR 7.47, IC 95% 3.13-17.83) al comparar controles sanos del mismo rango de edad. El análisis de estos genes no solo servirá como una herramienta para confirmar el diagnóstico de esta enfermedad, sino también para brindar un mejor asesoramiento genético en los casos y establecer el riesgo, así como para conocer la frecuencia de estas variaciones en la población mexicana y comprender mejor la fisiopatología de la EA.

III INTRODUCCION

3.1 Antecedentes históricos

En 1906, Alois Alzheimer describió por primera vez una forma de demencia en una paciente llamada Auguste D, de 51 años de edad, originaria de Frankfurt, Alemania, que había mostrado deterioro cognitivo progresivo, síntomas focales, alucinaciones, delirios e incompetencia psicosocial. En la necropsia se encontraron placas, marañas de neurofibrillas y cambios arterioescleróticos cerebrales.

En 1909, Gaetano Perusini publicó su artículo "On histological and clinical findings of some psychiatric diseases of older people", en el cual por sugerencia de Alzheimer, Perusini examinó cuatro casos caracterizados por síntomas clínicos e histopatológicos especialmente. En este artículo, Auguste D se volvió a investigar como el caso n° 1. Perusini presentó los hallazgos histopatológicos detallados junto con 6 ilustraciones mostrando las placas amiloides y las marañas neurofibrilares. En resumen declaró: "El proceso patológico recuerda las principales características de demencia senil, sin embargo, las alteraciones en los casos descritos son de mayor alcance, aunque algunos de ellos representan enfermedades preseniles". (1)

En la 8ª edición (1910) del Handbook of Psychiatry, Kraepelin usó por primera vez el término "Enfermedad de Alzheimer" para describir casos con las características patológicas descritas por Alzheimer y Perusini que aparecían tempranamente y se le consideró como presenil (entre los 45 a los 60 años) (1,2).

3.2 Epidemiología

En 2012 se estimó que en México existen alrededor de 800 mil personas afectadas por demencia, cerca de 350 mil de estos casos se atribuyen a la demencia de tipo Alzheimer, con una prevalencia del 7.4%, y se prevé que para el 2050 alrededor de 3 millones de personas padezcan esta enfermedad. Mientras tanto la tasa de incidencia de la demencia aumenta exponencialmente con la edad, con el aumento más notable entre la séptima y la octava décadas de la vida. Se han reportado tasas de incidencia entre aproximadamente el 0,4% en personas de 65-69 años de edad hasta casi un 10% en personas mayores a 90 años. (3, 4, 5, 6)

El impacto económico de la demencia es enorme, el costo anual por persona con demencia se estima en casi €20,000 mundialmente. Esta estimación excede el costo asumido para pacientes con cáncer o enfermedades cardiovasculares. (4)

3.3 Concepto de demencia

El término demencia es derivado del latín *demens*, es decir, “sin mente”; durante el periodo greco-romano Galeno (130-201 a. C.) identifico la demencia como un desorden mental y en el siglo XVIII, la demencia se describía como un estado de déficit intelectual adquirido, a cualquier edad y por cualquier causa. Fue con Pinel y Esquirol que la demencia senil comenzó a diferenciarse de los otros tipos de demencia y se estableció como una clase de trastorno mental. (7)

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la demencia como un síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. Aunque afecta a personas mayores, la demencia no constituye una consecuencia normal del envejecimiento. (8)

3.4 Demencia tipo Alzheimer

El manual de demencia y estadística de desórdenes mentales de la Asociación de psiquiatría de América (DSM IV) define a la Enfermedad de Alzheimer como la presencia de múltiples déficits cognoscitivos y progresivos, que se manifiestan por el deterioro de la memoria y al menos una de las siguientes alteraciones: afasia, apraxia, agnosia y alteración de la ejecución, provocando un deterioro significativo en la actividad social y laboral. (9)

3.5 Características Clínicas

Clínicamente la Enfermedad de Alzheimer (EA) se manifiesta como una demencia que generalmente se presenta con un trastorno amnésico progresivo con la subsecuente aparición de déficits cognitivos y neuropsiquiátricos que impiden la función social y las actividades de la vida diaria. (10)

En las primeras etapas de la EA, las áreas críticas para la memoria episódica se ven afectadas en las regiones temporales mediales, el deterioro de la memoria de acontecimientos recientes, omisiones inusuales y la dificultad para aprender nueva información son los signos clínicos iniciales.

A medida que la enfermedad progresa es frecuente la afectación visuoespacial, lo que dificulta que el paciente ubique su domicilio, se afecta el lenguaje, y hay dificultad para encontrar la palabra adecuada o el nombre de los objetos (anomia). Aparece una alteración en las funciones ejecutivas, siendo un problema planificar, secuenciar o abstraer actividades de la vida diaria.

Progresivamente el paciente con EA va perdiendo capacidades funcionales perdiendo la autonomía para realizar actividades complejas (como el manejo de finanzas) hasta solo ser capaz de realizar actividades poco significativas y finalmente ser absolutamente dependiente para realizar actividades básicas de la vida diaria, como bañarse, vestirse, comer, etc. (10, 11, 12).

3.6 Neuropatología

La atrofia cortical es la anomalía general característica en el cerebro con Enfermedad de Alzheimer, en muchos casos la atrofia se encuentra mayormente en la porción medial del lóbulo temporal con respecto a otras áreas de la corteza. Al diseccionar el cerebro, los ventrículos laterales se encuentran generalmente dilatados, el hipocampo y amígdala atrofiados y el locus coeruleus tiene a menudo pérdida de pigmento. (13, 14).

Las lesiones primarias en cerebros con EA incluyen placas amiloides, marañas neurofibrilares (NFT's), pérdida neuronal, gliosis y angiopatía amiloide cerebral (CAA). Varias anomalías adicionales se encuentran con mayor frecuencia en cerebros de pacientes con EA, como cuerpos de hirano y degeneración granulovacuolar, ambos localizados en el hipocampo. (13, 14)

Placas amiloides: Son depósitos esféricos extracelulares que van de 10 a 160mm de diámetro compuestos de filamentos de péptido β -amiloide ($A\beta$) insoluble. Dos tipos principales de placas se aprecian en el cerebro con EA, las placas neuríticas (de núcleo denso) que contienen un núcleo central de material amiloide con bandas de fibrillas

orientadas radialmente (Figura 1). En el perímetro del núcleo se encuentran procesos neuronales distróficos que contienen axones dilatados con abundantes cuerpos densos y filamentos helicoidales pareados. Las placas neuríticas están asociadas con astrocitos y microglía. El segundo tipo de placa es la difusa, que es un conjunto amorfo no fibrilar de péptidos A β que carecen de núcleo denso, neuritas distróficas o una reacción glial (13, 14, 15)

Marañas neurofibrilares: Son depósitos intracelulares fibrilares, generalmente aparecen con una morfología de “llama” en los cuerpos celulares y dendritas apicales de las neuronas (Figura 1). Los NFT’s se componen de polímero de la proteína Tau hiperfosforilada en forma de filamentos helicoidales pareados aproximadamente de 15 nm de diámetro y filamentos rectos, contribuyendo a la formación de inclusiones de enredo en los cuerpos celulares, así como estructuras neuríticas cerca del neuropilo y neuritas distróficas asociadas con placas. Los filamentos anormales que comprenden la patología neurofibrilar son altamente insolubles, de tal manera que los NFT’s permanecen en el espacio extracelular tras la degeneración completa de la neurona afectada. (13, 14, 15, 16).

Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC): Se refiere a la deposición de péptidos en las arterias y arteriolas en las leptomeninges y la corteza cerebral. (14).

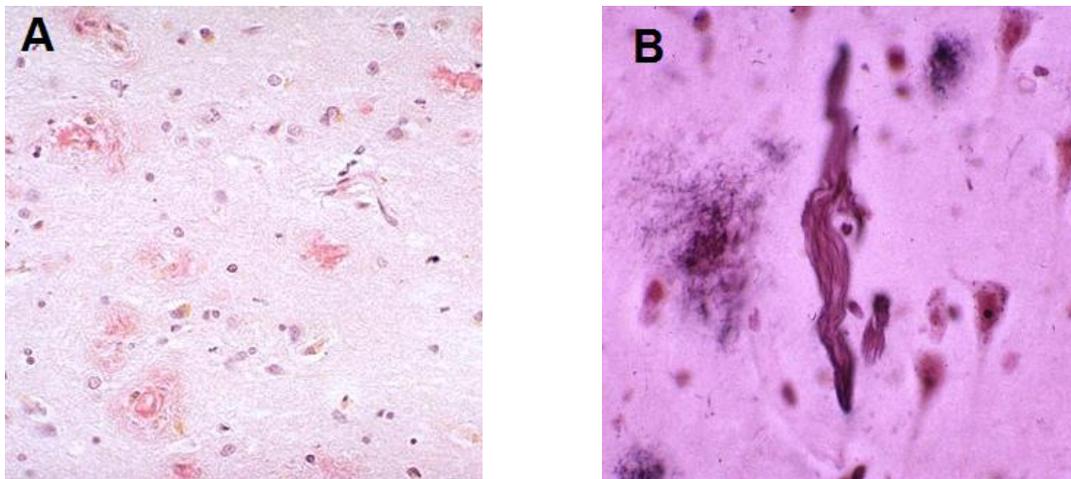


Fig. 1. Se muestran las dos lesiones principales en los cerebros de los pacientes con EA. En A se muestran las placas amiloides y en B las marañas de neurofibrillas. Tomado y modificado de Mott, R *et al.* (14)

3.7 Etiología

Aunque las causas de La Enfermedad de Alzheimer aún no han sido descubiertas en su totalidad, se sabe que es una enfermedad multifactorial. El péptido β -amiloide ($A\beta$) y la proteína Tau juegan un papel esencial en el desarrollo de la EA, pero también se han propuesto varias hipótesis sobre los diversos factores causales de esta enfermedad, tales como la hipótesis colinérgica, hipótesis inflamatorias, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, factores genéticos, factores ambientales y apoptosis (17).

3.8 Clasificación de la EA

De acuerdo a la edad de inicio de los síntomas, la EA se divide en dos grupos principales:

- EA de inicio temprano (EOAD); (inicio < 65 años) aproximadamente 10% de los casos (18, 19, 20, 21).
- EA de inicio tardío (LOAD); (inicio \geq 65 años) aproximadamente 90% de los casos. (18, 19, 20, 21).

Genéticamente la EA se clasifica en dos formas:

- Formas familiares o monogénicas (FAD) (<1%), con un patrón de herencia autosómico dominante, de inicio temprano causada por mutaciones poco frecuentes de alta penetrancia en tres genes principales: gen de la Proteína Precursora del β -amiloide (*PPA*), gen de la Presenilina 1 (*PSEN1*) y gen de la Presenilina 2 (*PSEN2*). (18, 19, 20, 21).
- Formas poligénicas o multifactoriales o también llamada “esporádicas” con una agregación familiar menos aparente o sin ella y por lo general de inicio tardío. (18, 19, 20, 21).

3.9 Genética

Después de la edad, la historia familiar de EA es el factor de riesgo más importante para la EA. El riesgo de desarrollar la enfermedad es más del doble en parientes de primer grado de pacientes con EA, en comparación con la población en general.

Se reconocen entonces dos formas principales de la EA, forma familiar o monogénica y forma poligénica o esporádica (19, 20, 21, 22).

3.9.1 Enfermedad de Alzheimer Familiar de Inicio Temprano (EOFAD)

La Enfermedad de Alzheimer Familiar de Inicio temprano representa menos de 1% de los casos de EA. Se caracteriza por un inicio antes de los 60 años de edad, de transmisión mendeliana y principalmente autosómico dominante, donde hay un riesgo del 50% de heredar el gen mutado. La Enfermedad de Alzheimer Familiar es causada por mutaciones en los genes codificantes de la Proteína Precursora del β -amiloide (*PPA*), Presenilina 1 (*PSEN1*) y Presenilina 2 (*PSEN2*), implicados en la generación del péptido β A. (Tabla 1). (18, 20, 21, 22)

Tabla 1. Genes causantes de Enfermedad de Alzheimer Familiar. Tomada y modificada de Bertram L, et al. (22).

Gen	Proteína	Localización	Mutaciones	Patogenia
<i>PPA</i>	Precursor de la Proteína β -Amiloide	21q21	33	Incremento en la producción de $A\beta$ o relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$
<i>PSEN1</i>	Presenilina 1	14q24	185	Incremento en $A\beta_{42}/A\beta_{40}$
<i>PSEN2</i>	Presenilina 2	1q31	3	Incremento en $A\beta_{42}/A\beta_{40}$

3.9.1.1 Proteína Precursora Amiloide (PPA)

En 1993, George Glenner y Wong Caine aislaron la proteína principal constituyente de amiloide cerebrovascular, a partir de cerebros con EA y cerebros con Síndrome de Down, debido a que los pacientes con Síndrome de Down desarrollan depósitos de amiloide y características neuropatológicas de EA a partir de los 40 años, y determinaron la

secuencia de aminoácidos de los primeros 24 residuos; esta proteína es ahora conocida como β -amiloide (β A) debido a su estructura de hoja plegada β . (20, 23)

El gen codificante de esta proteína es llamado Precursor de la Proteína β -Amiloide (*PPA*), se localiza en la región 21q21.1 en humanos y comprende 19 exones (Figura. 2), de los que se obtienen tres transcritos principales mediante splicing alternativo, resultando en tres proteínas principales de 695, 751 y 770 aminoácidos (22, 24, 25, 27, 28).

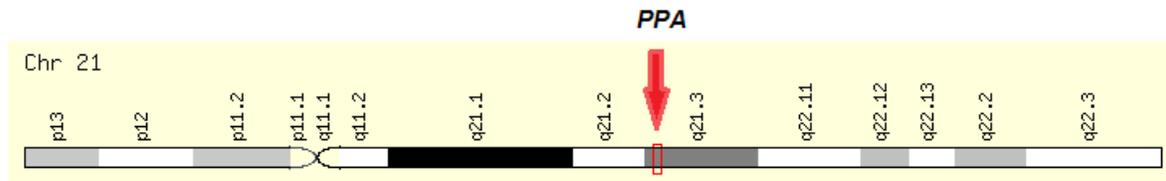


Fig. 2. Localización cromosómica del gen *PPA* en la región 21q21.1. Tomada y modificada de www.ensembl.org.

Aunque *PPA* ha sido objeto de numerosos estudios, su función fisiológica sigue siendo en gran parte indeterminada. Se ha sugerido que juega un papel en el crecimiento de neuritas y sinaptogénesis, tráfico de proteínas a lo largo del axón neuronal, transducción de la señal transmembrana, la adhesión celular y el metabolismo del calcio. (24, 26)

Mutaciones dominantes en *PPA*, representan aproximadamente el 15% de los casos de EA familiar de inicio temprano, con más de 30 mutaciones descritas. (28)

3.9.1.1.1 Procesamiento de *PPA*

La *PPA* de longitud completa es una proteína transmembrana tipo I. La *PPA* se sintetiza en el retículo endoplásmico y se transfiere a través del Aparato de Golgi, desde el cual puede ser transportada en vesículas secretoras a la superficie celular donde se escinde, ya sea por α -secretasa para producir una molécula soluble o por β -secretasa para producir el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos, el cuál es insoluble y se acumula (Figura 3). (20, 23, 24, 25, 26, 27)

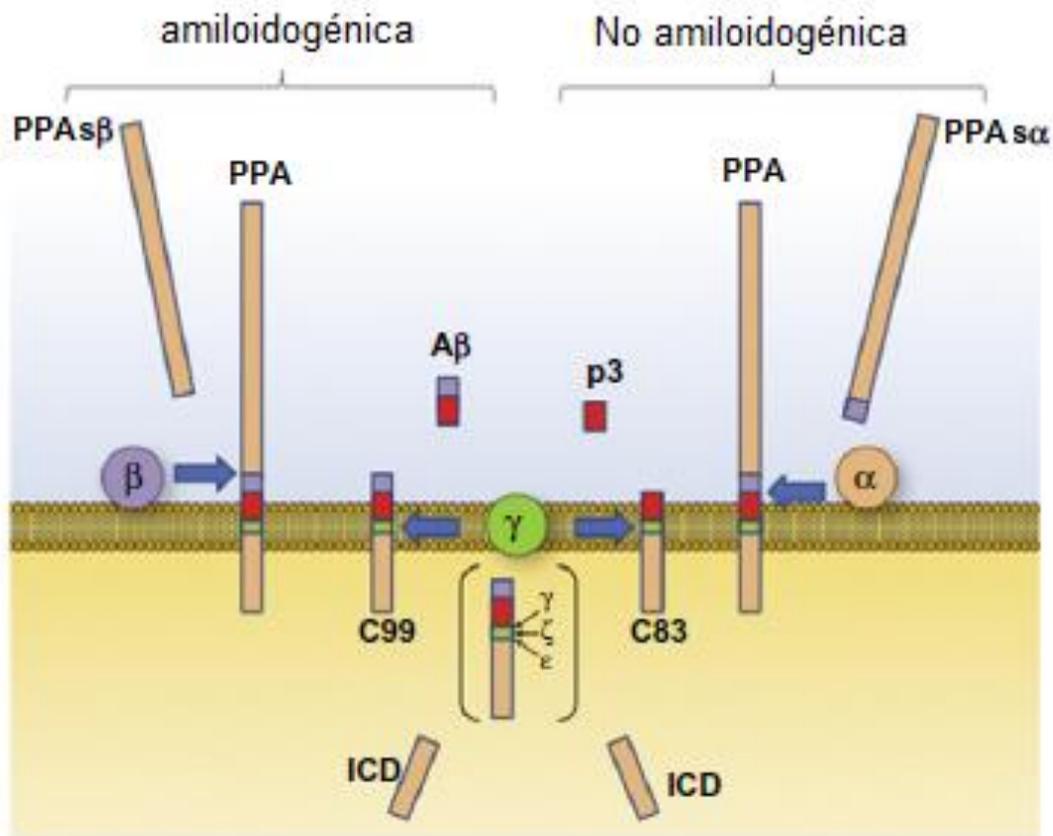


Fig. 3. Procesamiento de PPA. En la vía no amiloidogénica, α -secretasa escinde a PPA dentro del dominio $A\beta$ entre los residuos 16 y 17, generando fragmentos PPA's α y C83. El corte de esta posición impide la formación del péptido $A\beta$. El fragmento C83, es cortado después por γ -secretasa y produce el péptido P3. En la vía amiloidogénica, el complejo β -secretasa (BACE), escinde en el dominio N-terminal de $A\beta$, generando PPA's β y el fragmento C99. Al actuar γ -secretasa sobre C99, libera los péptidos $A\beta$ de 40 y 42 aminoácidos. Tomada y modificada de Walsh D. M. *et al.* (23)

3.9.1.1.2 Hipótesis de la cascada amiloidea

En 1992, John Hardy postuló la hipótesis de la cascada amiloidea (Figura 4), en la que mutaciones en *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*, modifican la homeostasis de $A\beta$, resultando en un acumulo y deposición del mismo, lo que provoca que se deposite y forme las placas seniles, así como, la presencia de las marañas neurofibrilares, el daño vascular, la muerte celular y la demencia, continúen como resultado directo de esta deposición (29).

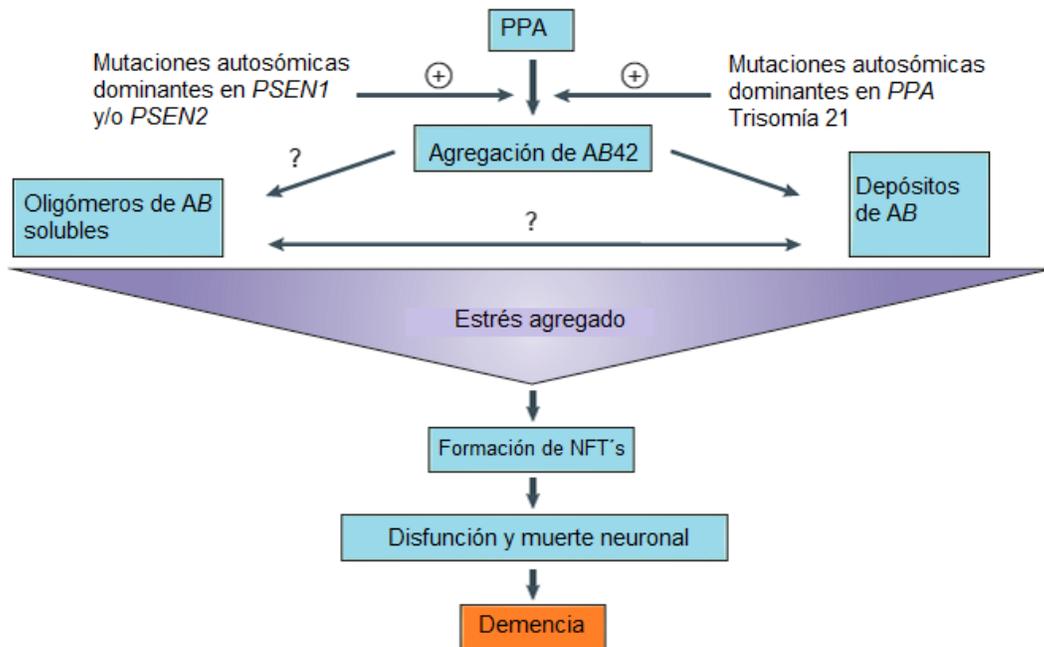


Fig. 4. Hipótesis de la cascada amiloide. La hipótesis de la cascada amiloide postula que la deposición de A β en el parénquima cerebral es un paso crucial que conduce, en última instancia, a la EA. Mutaciones autosómicas dominantes en *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*, conducen a una agregación del péptido A β 42 ya sea en formas tóxicas de oligómeros de A β solubles o depósitos derivados de A β . La hipótesis amiloidea sugiere ahora que la sinaptotoxicidad y la neurotoxicidad pueden estar mediadas por dichas formas de especies A β . El mecanismo de toxicidad aún no está bien definido por lo que se utiliza el término de “estrés agregado” para describir los posibles mecanismos que conducen a la formación de filamentos helicoidales pareados (NFT’s), disfunción y muerte neuronal, y en última instancia a la demencia. Tomada y modificada de Karran E. *et al.* (31).

Aunque el mecanismo en el cual el péptido A β o los depósitos derivados de esta molécula aún no están bien definidos, se muestran las siguientes evidencias a favor de esta hipótesis:

- (1) El péptido A β es conocido por interrumpir la homeostasis del calcio y aumentar las concentraciones de calcio intraneuronales. Esta observación podría explicar la formación de marañas neurofibrilares, ya que éstas se componen en gran parte de filamentos helicoidales pareados, formados a partir de la proteína tau hiperfosforilada asociada a

microtúbulos, por lo que tau hiperfosforilada podría ser controlada por el calcio intracelular (29).

(2) Las mutaciones en el gen *TAU* causan demencia frontotemporal con parkinsonismo. Incluso la formación de marañas neurofibrilares conducen a neurodegeneración sin inducir a las placas amiloides características de la EA (30).

(3) Ratones que sobre expresan tanto APP humana mutante como TAU humana mutante se someten a una mayor formación de marañas neurofibrilares, en comparación con los ratones que solo sobre expresan TAU mutante, mientras que la estructura y número de placas amiloides es inalterada. Esto sugiere que el procesamiento alterado de APP ocurre antes que las alteraciones de tau en la cascada amiloide (30).

(4) Los pacientes con síndrome de Down desarrollan EA resultado de la presencia de una copia adicional del gen *PPA* debido a la trisomía del cromosoma 21 (23).

(5) Se demostró que mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* alteran el procesamiento de PPA incrementando la concentración extracelular de $A\beta$, a través de una ganancia de función nociva que aumenta la cantidad de $A\beta_{42}$ (32).

3.9.1.2 Presenilinas

Las mutaciones en el gen de *PPA* resultan insuficientes para explicar todas las formas de EA familiar de inicio temprano ya que representan solo el 15% de los casos. Dos genes adicionales, Presenilina 1 (*PSEN1*) y Presenilina 2 (*PSEN2*), representan entre 20-70% de los casos de EA familiar con un patrón de herencia autosómico dominante. (33)

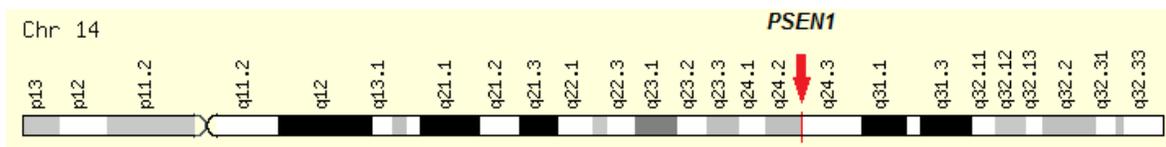
3.9.1.2.1 Localización y estructura de los genes *PSEN1* y *PSEN2*

Solo un año después del descubrimiento de la primera mutación en el gen de *PPA*, varios grupos de investigación reportaron un locus asociado con la EA de inicio temprano localizado en la región 14q24.3, y fue hasta 1995 que el equipo de George Hyslop clonó el gen correspondiente y fue nombrado presenilina 1 (*PSEN1*) (Figura 5). Durante la clonación de *PSEN1*, se identificó una secuencia similar en las bases de datos de nucleótidos públicas. Un análisis más detallado reveló que esta secuencia deriva en un

gen en el cromosoma 1q42.1, que posteriormente fue clonado y nombrado presenilina 2 (*PSEN2*) (Figura 6). Se nombraron presenilinas ya que se sabe causan la variante “presenil” de la enfermedad. (20, 33, 34, 35, 47)

Las estructuras de los genes de *PSEN1* y *PSEN2* son remarcablemente similares, cada gen consiste de un total de 12 exones, de los cuales, los exones 3-12 comprenden la secuencia de codificación. La región 5'UTR se encuentra en cuatro exones separados (1a, 1b, 2 y 3). En *PSEN1*, los exones 1a y 1b se excluyen mutuamente y representan los sitios de inicio de la transcripción alternativos. El promotor de *PSEN1* contiene las cajas TATA y CAAT, además se observan varios elementos STAT (traductores de señal y activadores de transcripción) involucrados en la activación transcripcional, en respuesta a la traducción de señal. Por el contrario, el promotor de *PSEN2* carece de cajas consenso TATA y CAAT, pero contiene regiones ricas en GC río arriba en los dos sitios de inicio de la transcripción. Los límites intrón/exón en la secuencia de codificación, son prácticamente idénticos en ambos genes, consistente con la idea de que derivan de un gen ancestral común que se sometió a duplicación. Ambos genes presentan splicing alternativo. Sin embargo, no se ha establecido una función específica para cada una de estas isoformas. (36, 37, 87)

A)



B)

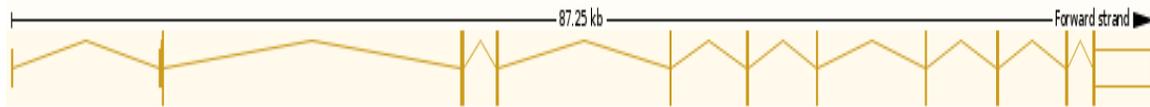
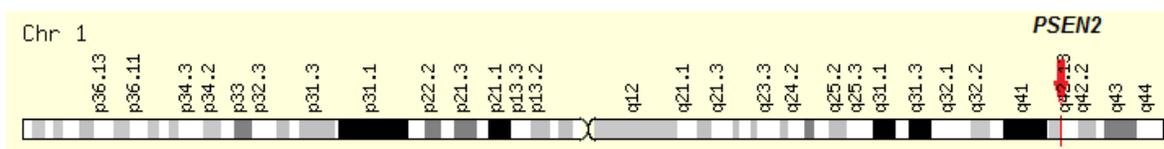


Fig. 5. A) Se muestra la ubicación del gen *PSEN1* en el cromosoma 14q24.3. B) Se muestra el tamaño y transcrito del gen *PSEN1*.

A)



B)

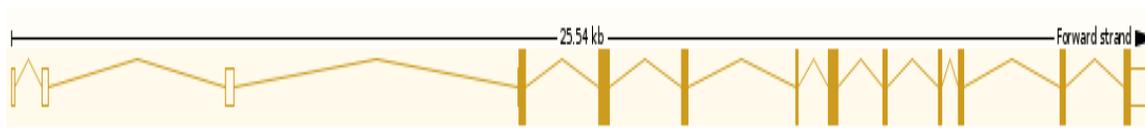


Fig. 6. A) Se muestra la ubicación del gen *PSEN2* en el cromosoma 1q42.1. B) Se muestra el tamaño y transcrito del gen *PSEN2*

3.9.1.2.2 Conservación entre especies

Los genes de *PSEN1* y *PSEN2* codifican para proteínas de membrana politépicas de 467 (*PSEN1*) y 448 aminoácidos (*PSEN2*), con una fuerte homología y altamente conservados en la evolución. Las presenilinas están presentes en otros organismos como el nematodo (*C. elegans*) y la mosca de la fruta (*D. melanogaster*). *PSEN1* y *PSEN2* son 67% idénticos en la secuencia primaria y comparten 57% de homología con el homólogo en *Drosophila melanogaster*. En *Xenopus laevis*, los homólogos *PS-alpha* y *PS-beta* tienen 90 y 86% de identidad con *PSEN1* y *PSEN2* respectivamente. Por otra parte, las presenilinas están conservadas funcionalmente en humanos y en *C. elegans*. La *PSEN1* humana es capaz de rescatar el fenotipo defectuoso del homólogo *Sel-12* mutado en *C. elegans*. Además, el análisis de secuencia del genoma reveló un homólogo de presenilina en la planta *Arabidopsis thaliana* con un 33% de homología en la secuencia primaria. (34, 35, 37)

3.9.1.2.3 Expresión y localización subcelular

El gen *PSEN1* se transcribe a niveles bajos en diferentes tipos celulares, tanto en el SNC como en tejidos periféricos no neurológicos. En el SNC, los transcritos de *PSEN1* pueden ser detectados en la neocorteza (en neuronas corticales de las capas II y IV), en neuronas del hipocampo de los campos CA1-CA3, en neuronas de las células granulares de la

circunvolución dentada, subiculum, cerebelosa de Purkinge y células granulares y núcleos profundos, así como en menores cantidades en el bulbo olfatorio, el estriado, núcleos del tronco cerebral y el tálamo. En contraste con PSEN1, que se expresa homogéneamente en el cerebro y tejidos periféricos, PSEN2 se expresa en músculo cardiaco, músculo esquelético y páncreas, y se expresa menos homogéneamente en el SNC y tejidos periféricos. (34, 35)

A nivel subcelular, las proteínas presenilinas se encuentran predominantemente en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. En el desarrollo de las neuronas, las presenilinas son expresadas durante las primeras etapas de diferenciación y se localizan principalmente en el cuerpo celular y vesículas citoplasmáticas. Fraccionamientos subcelulares de extractos de cerebro demostraron que fragmentos de presenilina, pero no de las presenilinas de longitud o tamaño completo, se encuentran en vesículas de núcleo denso y membranas de crecimiento de cono, al igual que en axones y dendritas. Alternativamente, las presenilinas también se han localizado en la membrana plasmática, en la envoltura nuclear interna, cinetocoros y centrosomas. (34, 35, 36, 37).

3.9.1.2.4 Estructura de las proteínas, topología y corte endoproteolítico.

Los genes *PSEN1* y *PSEN2*, codifican proteínas de 50-55KDa que presentan una homología del 60% en sus aminoácidos. Ambas proteínas contienen nueve dominios transmembranales o TMD's (por sus siglas en inglés), con un extremo N-terminal citosólico y un extremo C-terminal luminal, y con un largo bucle citoplasmático entre los TMD's 6 y 7 (Figura 7). Este bucle incluye una región hidrofóbica que es cortada entre los residuos N292 y V293 (en el exón 9) en un fragmento N-terminal (~27-30KDa) localizado en los TMD's 1-6; y un fragmento C-terminal (~16-18KDa) localizado en los TMD's 7-9, y son parte del complejo multiproteínico que constituye a la γ -secretasa. Esta endoproteólisis parece ser un evento autocatalítico que se lleva a cabo por la misma actividad de γ -secretasa. Esto surge de la observación de que presenilina 1 mutante en el sitio activo D257A o D385A no se someten a endoproteólisis y no pueden cortar sustratos. La endoproteólisis de la presenilina aparentemente elimina el impedimento estérico del bucle citoplasmático, lo que permite asumir su conformación activa. El sitio catalítico de presenilina consiste en dos residuos aspartil críticos, cada uno situado en los TMD's 6 y 7, en las posiciones D257 y D385 respectivamente. En cuanto a la disposición

intramolecular de los TMD's de presenilina, se ha demostrado mediante entrecruzamiento de uniones en disulfuro que el TMD1 está cerca del TMD8. Además el TMD9 parece estar más cerca del poro catalítico y podría estar implicado en la unión inicial de sustratos como se muestra en la figura 8 (38, 39, 40).

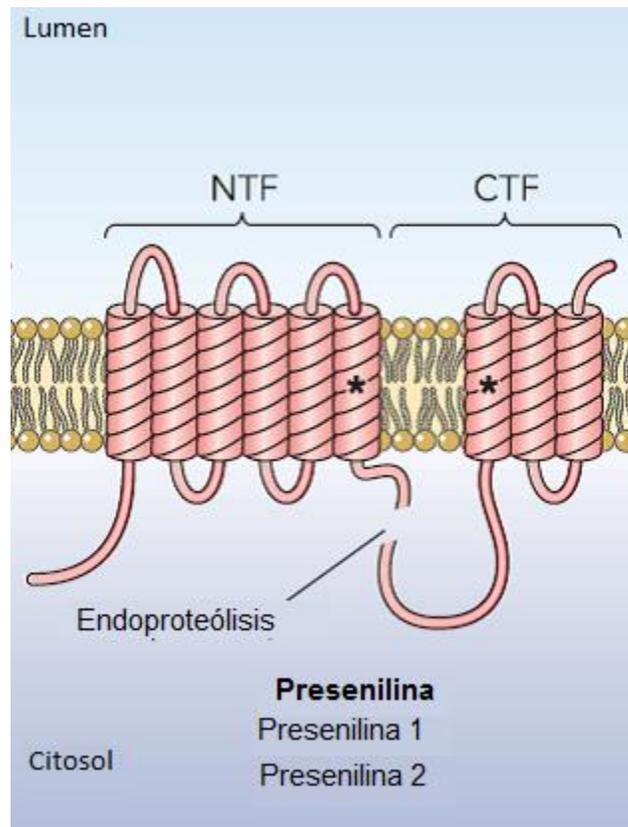


Fig. 7. Topología de las presenilinas. La presenilina está conformada por nueve dominios transmembranales y dos aspartatos conservados (estrellas) en los TMD's 6 y 7. Al ensamblarse con otros miembros para formar el complejo γ -secretasa, la presenilina lleva a cabo una autoproteólisis entre el bucle que conecta los TMD's 6 y 7, y forma un fragmento N-terminal (NTF) y un fragmento C-terminal (CTF). Tomado y modificado de Wakabayashi. *et al.* (39)

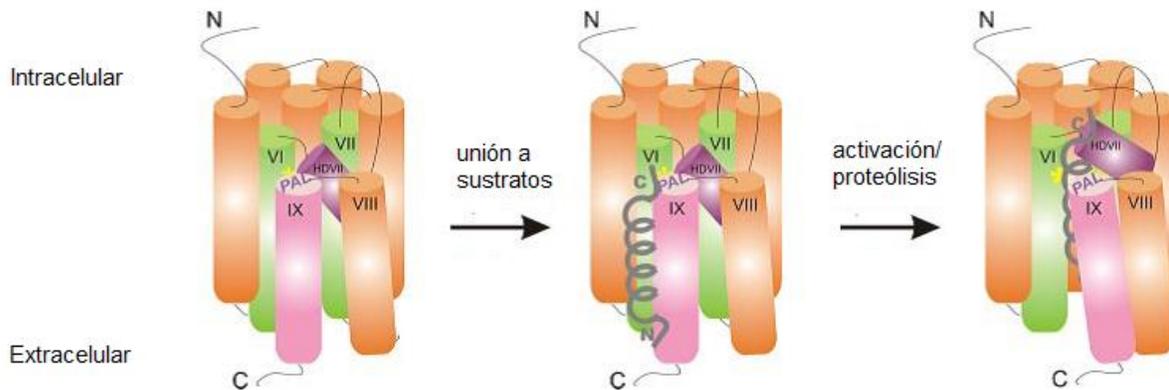


Fig. 8. Papel del TMD9 en la función catalítica de PSEN1. Los TMD's 6 y 7 se muestran en verde, el sitio catalítico D257 y D385 está representado con un asterisco amarillo. El TMD9 (en color rosa) se encuentra a poca distancia del D257 pero no del D385, debido a que el dominio hidrofóbico que une a las TMD's 6 y 7 (HDVII) sobresale de la cavidad. Una etapa de activación, que podría ser iniciada por la unión del sustrato a la zona del TMD9, es la señal para el movimiento molecular del motivo prolina-alanina-leucina (PAL) dependiente del TMD9 flexible. El tipo exacto de movimiento no está claro aún, pero podría implicar la traducción, rotación o una combinación de estas y se espera que sea acompañado por los movimientos de la región circundante, es decir, de HDVII, lo que resulta en la activación del sitio catalítico para el corte del sustrato. Tomado y modificado de Tolia *et al.* (88).

3.9.1.2.5 Funciones de las presenilinas

3.9.1.2.5.1 Presenilinas en el complejo γ -secretasa

Las presenilinas proveen el núcleo catalítico del complejo enzimático γ -secretasa, el cual contiene además a la nicastrina, el potenciador de presenilina 2 (Pen-2) y Aph-1 (Figura 9) que son las cuatro proteínas necesarias para su activación. El peso molecular (PM) mínimo para este complejo es de 250kDa, que es más o menos la suma de los pesos moleculares de las cuatro proteínas mencionadas anteriormente. (20, 38, 39, 40, 41, 42, 47)

La γ -secretasa corta, con una gran especificidad de secuencia, dominios transmembrana de proteínas transmembranales tipo I, incluyendo las moléculas de adhesión N-cadherina y E-cadherina, el receptor de neurotrofina p75, la subunidad reguladora β 2 de los canales

de voltaje de sodio, neuregulina y los dos sustratos con las consecuencias fisiopatológicas más trascendentales, APP y Notch. (41)

El ensamblaje de γ -secretasa es un proceso gradual, inicialmente nicastrina y Aph-1 forman un subcomplejo binario. Posteriormente, la presenilina se une al subcomplejo nicastrina-Aph-1 para formar un complejo heterodimerico y finalmente, Pen-2 se une al subcomplejo. Pen-2 podría permitir la endoproteolisis de presenilina, lo que resulta en la formación y activación de γ -secretasa, en ausencia de Pen-2 la escisión se lleva a cabo por el proteosoma. Solo se requiere de una molécula de presenilina para la actividad de γ -secretasa, lo que significa que el complejo de proteasa contiene solo un par de aspartatos y por lo tanto solo un sitio activo. Hay algunas pruebas de que la activación completa pudiera ocurrir en un compartimento de exportación del retículo endoplásmico. (38, 40, 42)

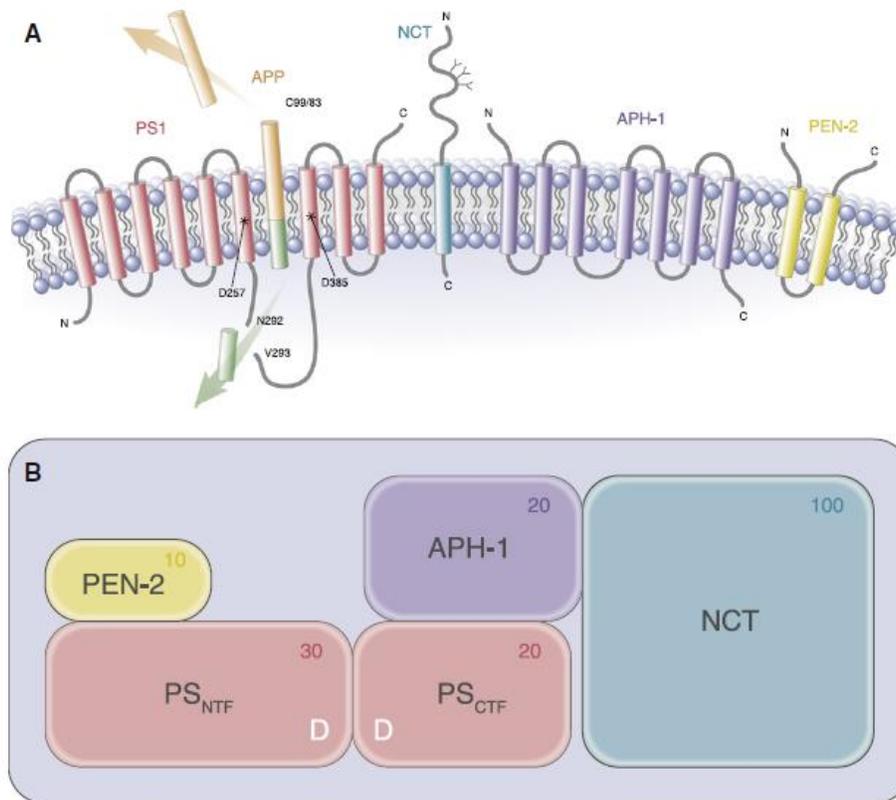


Fig. 9. Complejo γ -secretasa. A) Subunidad topológica. B) Probable arreglo de las subunidades en el complejo γ -secretasa. Los números representan los pesos moleculares de las proteínas componentes, "D" representa los dos aspartatos catalíticos de presenilina. Tomado y modificado de Li *et al.* (38)

3.9.1.2.5.2 Procesamiento de Notch

Al mismo tiempo de que las presenilinas se descubrieron como loci de susceptibilidad para la EA, un ortólogo en *C. elegans*, Sel-12, fue identificado como un componente en la vía de señalización Notch. Esta es una vía conservada evolutivamente y utilizada en todos los metazoarios durante el desarrollo y la diferenciación celular. (43, 47)

Después de que Notch se sintetiza en el retículo endoplásmico, el receptor se escinde en su dominio extracelular durante su paso a través de la ruta secretora y las dos piezas generadas permanecen asociadas. Tras la interacción con un ligando cognado, Notch se vuelve susceptible a una segunda proteólisis extracelular por una metaloproteasa cerca de la membrana. El remanente asociado a la membrana se escinde dentro de su dominio transmembranal por γ -secretasa (dependiente de presenilina), liberando el dominio intracelular de Notch (NICD por sus siglas en inglés) y éste a su vez se trasloca hacia el núcleo para activar la transcripción de un conjunto de genes diana involucrados en el desarrollo y la diferenciación. (40, 43)

La interferencia en la vía Notch conduce a muchas perturbaciones en la embriogénesis, incluyendo la interrupción de la somitogénesis y la formación de los vasos sanguíneos. Se ha demostrado que knockout de *PSEN1* murina es letal en útero (alrededor del día 13 de vida embrionaria) o poco después del nacimiento, y está asociada a: 1) defectos graves en el desarrollo de la formación de somitas y la formación del esqueleto axial. 2) aparición de hemorragia cerebral y 3) reducción de la transcripción de Notch en tipos celulares seleccionados. Doble knockout *PSEN1/PSEN2* murina manifiestan un fenotipo letal embrionario similar a knockout en *Notch 1*. Por lo tanto, el procesamiento proteolítico de Notch con la liberación del NICD parece ser la función biológica primaria de PSEN/ γ -secretasa, por lo menos en edad temprana de mamíferos. Las mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* no solo causan EA familiar, si no también disminuye la señalización de Notch en diversos grados (34, 40, 47).

3.9.1.2.5.3 Regulación de β -catenina

Más allá de su papel en γ -secretasa se ha sugerido que las presenilinas pueden llevar a cabo un amplio rango de funciones. Una función bien establecida de presenilina 1 independiente de γ -secretasa es la interacción y regulación de β -catenina y otros

miembros de la familia de proteínas armadillo o β -cateninas que son proteínas de adhesión celular. (43)

Las cateninas forman parte de una familia de genes relacionados con el gen *Armadillo* en *Drosophila* y se caracterizan por una serie de repetidos de 40 aminoácidos denominados como “repetidos armadillo”. Estas repeticiones en β y delta catenina interactúan con el bucle largo de PSEN1. Las cateninas tienen al menos dos funciones diferentes en la célula: 1) son componentes de uniones adhesivas célula-célula que interactúan con moléculas de adhesión a caderina. 2) como una proteína citoplasmática que se trasloca al núcleo en la vía de señalización Wnt, la cual es crucial en el desarrollo en vertebrados y en *Drosophila*. Los niveles citoplasmáticos de β -catenina son controlados por la proteína glicógeno-sintasa-cinasa 3 β (GSK-3 β) y la proteína de poliposis adenomatosa en *E. coli* (APC), los cuales se unen a β -catenina y facilitan su fosforilación y posterior degradación. La activación de la señalización Wnt antagoniza este proceso bloqueando la fosforilación y como consecuencia la β -catenina es estabilizada y acumulada en el citoplasma donde se une al factor nuclear de transcripción (TCF). El complejo β -catenina/TCF se trasloca hacia el núcleo en donde se inicia la transcripción de genes diana. Estudios en células deficientes de presenilina indican que presenilina también promueve la fosforilación y desestabilización de β -catenina, al funcionar como un andamio para unir a GSK-3 β . La capacidad de presenilina para promover la fosforilación y degradación de β -catenina no se ve afectada por inhibidores de γ -secretasa ni por presenilinas catalíticamente no funcionales, lo que indica que es un proceso independiente de γ -secretasa. (37, 43, 44)

3.9.1.2.5.4 Homeostasis de calcio

Se ha demostrado otra función de las presenilinas independiente de su papel en γ -secretasa, la cual es, intervenir en la homeostasis de calcio intracelular. Las presenilinas constituyen canales de fuga de calcio que facilitan la filtración pasiva de Ca^{2+} a través de la membrana del retículo endoplasmático cuando no están incorporadas al complejo γ -secretasa. La pérdida de función de presenilina mediante knockout genético o a través de mutaciones causantes de EA familiar altera esta función de fuga y posiblemente también afecta la regulación de receptores de inositol 1-4-5 3P lo que aumenta la acumulación de iones calcio en el retículo endoplásmico. Esta actividad es independiente de la actividad

de γ -secretasa debido a que ratones nulos para las tres proteínas APH1 y con una mutación en un sitio activo de residuo aspártico en presenilina (D257A), conservan la homeostasis de calcio, mientras que alelos asociados a EA familiar ejercen efectos negativos en el canal de fuga y en consecuencia a las funciones fisiopatológicas del calcio (39, 40, 44).

3.9.1.2.5.5 Función patológica de presenilina en la EA

La generación del péptido $A\beta$ por PPA es un procesamiento normal en diferentes tipos celulares, este péptido puede ser detectado en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo tanto de pacientes con EA como en individuos sanos. El péptido $A\beta$ puede ser generado en diferentes tamaños ($A\beta_{39}$ - $A\beta_{43}$) que son secretados desde la célula, pero la forma más abundante liberada por la actividad de β y γ secretasas es $A\beta_{40}$ (40 a.á), el cual comprende el 90% de los péptidos liberados, mientras que cerca del 10% corresponde a péptidos $A\beta_{42}$ (42 a.á). Aunque $A\beta_{42}$ difiere en solo dos aminoácidos de $A\beta_{40}$, es diferente en sus propiedades fisicoquímicas siendo más hidrófobo y con una mayor disposición a formar agregados. (37)

Aunque aún se desconoce la forma en que el péptido $A\beta_{42}$ es generado, hay algunas posibles explicaciones de la escisión intramembranal mediada por γ -secretasa que conduce a la generación de los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$.

La enzima γ -secretasa muestra tres tipos de actividades proteolíticas: 1) Una función autoproteolítica, en la cual la presenilina de longitud completa es cortada dentro del bucle que se encuentra entre el TMD6 y el TMD7 para activar el complejo para la escisión de otros sustratos. 2) Una función endoproteolítica que escinde dominios transmembrana tipo I. 3) Una función carboxipeptidasa, mediante la cual el fragmento restante que contiene la mayor parte del dominio transmembranal es cortado aproximadamente cada tres aminoácidos hasta ser finalmente liberado. Muchos estudios sugieren que para APP, la primera hidrólisis mediada por γ -secretasa para liberar el AICD tiene lugar en la interfase citosólica (ϵ /sitio S3) esta escisión inicial forma un péptido $A\beta$ de 48 o 49 aminoácidos. A partir de esta evidencia, se sugieren dos vías para la producción de $A\beta$ dependiendo del sitio exacto del corte inicial: $A\beta_{49} \rightarrow A\beta_{46} \rightarrow A\beta_{43} \rightarrow A\beta_{40}$ y $A\beta_{48} \rightarrow A\beta_{45} \rightarrow A\beta_{42} \rightarrow A\beta_{39}$,

esta demostración es apoyada por la detección de tri y tetra péptidos, correspondientes a los productos del corte. (40, 43, 45)

Las mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* causantes de EA pueden alterar el sitio inicial de escisión ϵ y aumentar la formación de $A\beta_{48}$, aumentando así la relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, así como también alterar la función carboxipeptidasa de γ -secretasa. (40)

3.9.1.2.6 Mutaciones en los genes *PSEN1* y *PSEN2*

Las mutaciones en el gen *PSEN1* son la causa más común de la EOFAD y representan aproximadamente 70% de los casos de estas formas autosómico dominantes en la población general. Hasta ahora, 205 mutaciones diferentes que afectan a 435 familias alrededor del mundo, han sido descritas para este gen (Tablas 2 y 3). La mayoría de estas mutaciones son mutaciones sin sentido, de sustitución de un aminoácido por otro y se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del marco de lectura mayoritariamente en los dominios transmembrana o próximos a estos. La edad de inicio promedio para los portadores de una mutación en el gen de *PSEN1* es de 45 años aunque la enfermedad puede ocurrir desde los 30 años de edad (20, 33).

Tabla 2. Mutaciones por exón en el gen de *PSEN1*. Tomada y modificada de <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> (46)

Exón	# Mutaciones	# Familias
EX4	17 (8.29 %)	25 (5.75 %)
IVS4	1 (0.49 %)	10 (2.30 %)
EX5	41 (20.00 %)	96 (22.07 %)
EX6	25 (12.20 %)	50 (11.49 %)
EX7	47 (22.93 %)	83 (19.08 %)
EX8	31 (15.12 %)	74 (17.01 %)
IVS8-IVS9	2 (0.98 %)	3 (0.69 %)
IVS8	3 (1.46 %)	6 (1.38 %)
EX9	1 (0.49 %)	1 (0.23 %)
EX10	4 (1.95 %)	4 (0.92 %)
EX11	17 (8.29 %)	30 (6.90 %)
EX12	16 (7.80 %)	53 (12.18 %)
Total	205	435

Tabla 3. Mutaciones por dominio en PSEN1. Tomada y modificada de <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> (46)

Dominio	# Mutaciones	# Familias
N-Term	1 (0.49 %)	8 (1.84 %)
IM-I	9 (4.39 %)	10 (2.30 %)
HL-I	22 (10.73 %)	46 (10.57 %)
IM-II	25 (12.20 %)	64 (14.71 %)
HL-II	5 (2.44 %)	23 (5.29 %)
IM-III	21 (10.24 %)	29 (6.67 %)
HL-III	2 (0.98 %)	3 (0.69 %)
IM-IV	12 (5.85 %)	32 (7.36 %)
HL-IV	7 (3.41 %)	8 (1.84 %)
IM-V	19 (9.27 %)	31 (7.13 %)
HL-V	1 (0.49 %)	1 (0.23 %)
IM-VI	11 (5.37 %)	19 (4.37 %)
HL-VI a	17 (8.29 %)	35 (8.05 %)
HL-VI (MA)	16 (7.80 %)	39 (8.97 %)
HL-VI b	3 (1.46 %)	3 (0.69 %)
IM-VII	14 (6.83 %)	24 (5.52 %)
HL-VII	1 (0.49 %)	1 (0.23 %)
IM-VIII	10 (4.88 %)	14 (3.22 %)
HL-VIII	2 (0.98 %)	35 (8.05 %)
IM-IX	7 (3.41 %)	10 (2.30 %)
Total	205	435

Las mutaciones en *PSEN2* son una causa rara de EOFAD, hasta ahora solo se han identificado 13 mutaciones que afectan a 22 familias alrededor del mundo. La edad de inicio para estos casos es de 45 a 88 años de edad y presenta una penetrancia más baja que las mutaciones en *PSEN1* (Tabla 4 y 5). (20, 33)

Tabla 4. Mutaciones por exón en el gen de *PSEN2*. Tomada y modificada de <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> (46)

Exón	# Mutaciones	# Familias
Ex4	1 (7.69 %)	1 (4.55 %)
EX5	4 (30.77 %)	12 (54.55 %)
EX6	2 (15.38 %)	3 (13.64 %)
EX7	4 (30.77 %)	4 (18.18 %)
EX12	2 (15.38 %)	2 (9.09 %)
Total	13	22

Tabla 5. Mutaciones por dominio en *PSEN2*. Tomada y modificada de <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> (46)

Dominio	# Mutaciones	# Familias
N-Term	1 (7.69 %)	1 (4.55 %)
HL-I	2 (15.38 %)	3 (13.64 %)
TM-II	2 (15.38 %)	9 (40.91 %)
TM-III	2 (15.38 %)	3 (13.64 %)
TM-V	4 (30.77 %)	4 (18.18 %)
TM-IX	1 (7.69 %)	1 (4.55 %)
C-Term	1 (7.69 %)	1 (4.55 %)
Total	13	22

3.9.2 Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD)

En la mayoría de los casos de Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, el riesgo de desarrollar EA está determinado tanto por variantes genéticas como por factores ambientales. Es la forma más común de EA con aproximadamente 90% de los casos y se caracteriza por una edad de inicio después de los 65 años. Las formas familiares de inicio tardío siguen un patrón de herencia autosómico dominante, sin embargo, son más

comunes los casos esporádicos en los que no se ha establecido un patrón de herencia pudiendo mostrar agregación familiar (18, 19, 20, 21, 22).

El alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE*) es el único factor de riesgo genético bien establecido para la EA de inicio tardío (Tabla 6). (18)

Tabla 6. Susceptibilidad de *APOE* para formas de EA no mendelianas. Tomado y modificado de Bertram L, et al. (22).

Gen	Proteína	Localización	OR ^{a)}	Función
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	19q13.2	~4 portadores de un alelo $\epsilon 4$ y ~15 portadores de 2 alelos $\epsilon 4$	Agregación y eliminación de $A\beta$ /metabolismo del colesterol

a) Razón de momios, indica las veces que se presenta la enfermedad en presencia del alelo $\epsilon 4$ comparada con las veces que se presenta la enfermedad en ausencia del alelo $\epsilon 4$. Proporción 4:1 para heterocigotos del alelo $\epsilon 4$ y 15:1 homocigotos del alelo $\epsilon 4$.

3.9.2.1 Apolipoproteína E

En 1991, Pericak-Vance y su equipo describieron una asociación con la EA en el brazo corto del cromosoma 19 en familias con LOAD. Por otra parte en ese mismo año, varios estudios establecieron la presencia de la *APOE* en las placas amiloides. En 1993, se informó de una asociación del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* con la EA. El equipo de Strittmatter et al. (48) demostró que *APOE* podía unirse al péptido $A\beta$ con gran avidéz y que la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ era mayor en LOAD. Finalmente, el grupo de Corder et al. (49) reportó una asociación de dosis génica entre el alelo $\epsilon 4$ y la EA, en la cual las personas con un alelo $\epsilon 4$ tenían una edad de inicio más temprana de los síntomas de la EA y las personas con un alelo $\epsilon 2$ demostraban un efecto protector en el desarrollo de la EA. (21, 48, 49)

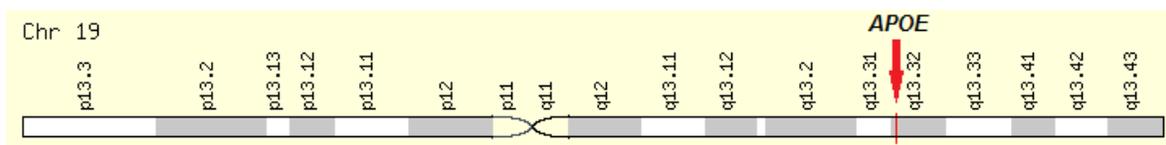
ApoE es el factor de riesgo más importante para LOAD, a diferencia de las mutaciones en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, el alelo $\epsilon 4$ no es suficiente ni necesario para causar EA, pero funciona como un modificador de riesgo genético mediante la disminución de la edad de

inicio en una manera dosis dependiente y en los pacientes con EA la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* se incrementa hasta en un 40% en poblaciones caucásicas (21, 22).

3.9.2.1.1 Localización y estructura del gen

El gen de *APOE* se localiza en la región 19q13.2 y forma parte de los genes *ApoC I*, tiene un tamaño de 3.597 pb y consta de cuatro exones y tres intrones (Figura 10). El primer exón es no codificante, el segundo exón codifica para una péptido señal y el tercer exón codifica para los primeros 61 aminoácidos de la proteína madura. El exón 4 codifica la mayor parte de la proteína madura y contiene cientos de nucleótidos no codificantes en el extremo 3' y 8 repetidos de 66 nucleótidos que codifican para α hélices anfipáticas. Este dominio es rico en dinucleótidos CpG, haciendo de apoE una de las proteínas humanas ricas en islas CpG. El gen *APOE* presenta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) a lo largo de todo el gen. Los tres alelos más comunes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ producen tres isoformas de la proteína denominadas E2, E3 y E4. Estos alelos son heredados de forma codominante dando como resultado seis genotipos que son el resultado de la combinación de los alelos. Las tres isoformas principales son determinadas por sustituciones de cisteína y arginina en las posiciones 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos. APOE2 (cys 112, cys 158), APOE3 (cys 112, arg 158) y APOE4 (arg 112, arg158). El alelo $\epsilon 3$ es el más común con una frecuencia de 77% en poblaciones caucásicas, con variaciones en otros grupos étnicos y geográficos, mientras que $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ tienen frecuencias de 15% y 8% respectivamente (Tabla 7) (21, 50, 51, 52, 53).

A)



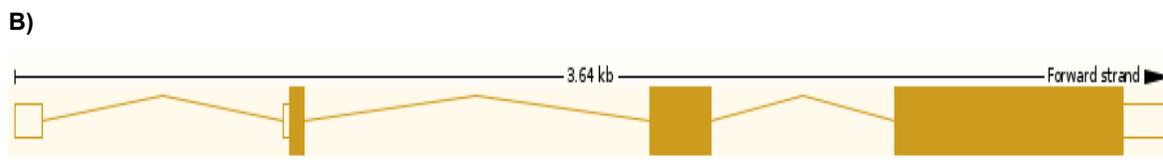


Fig. 10. A) Ubicación del gen *APOE* en el cromosoma 19q13.2. B) Tamaño y transcrito del gen *APOE*, las cajas indican los cuatro exones del gen, en amarillo se muestran los exones codificantes.

Tabla 7. Isoformas de la Apolipoproteína E y sus propiedades. Tomada y modificada de García C. A. M. (51)

	E4	E3	E2
Frecuencia alélica*	15%	77%	8%
Diferencias en la secuencia	Arg-112 Arg-158	Cys-112 Arg-158	Cys-112 Cys-158
Unión al receptor	100%	100%	<2%
Enfermedad asociada	Enfermedad de Alzheimer	“Normal”	Hiperlipoproteinemia tipo III

*La frecuencia alélica es indicativa para poblaciones caucásicas, con variaciones en otros grupos étnicos y geográficos.

3.9.2.1.2 Función y síntesis de la proteína

La apolipoproteína E (APOE) es un componente de varias lipoproteínas, tales como lipoproteínas de alta densidad (HDL) y muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones. La función principal de APOE es el transporte de lípidos y el tráfico de colesterol. También es

un ligando para receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y media la unión, internalización y catabolismo de lipoproteínas en la célula. En el cerebro, APOE es la apolipoproteína primaria que se asocia con lipoproteínas de alta densidad de unión a lipoproteínas, lo que significa que juega un papel vital en el mantenimiento de las funciones neuronales dependientes de colesterol. APOE participa en la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica, la neuroinflamación, crecimiento neurítico, arborización dendrítica y neurogénesis, a menudo con una eficacia específica de la isoforma (Tabla 7). (21, 22, 54, 55)

APOE es principalmente secretada en el hígado y en segundo lugar en el cerebro, aunque también es detectada en la glándula suprarrenal, testículo, piel, bazo, riñón y tejido adiposo. Además es abundante en el fluido intersticial, la linfa y el plasma. APOE puede ser secretada en una forma pobre en lípidos pero debido a su afección por ellos (especialmente fosfolípidos), se encuentran siempre en asociación, que probablemente los adquiere de la superficie celular o mediante vesículas secretoras. En el SNC, los astrocitos son los principales productores de la APOE, comprendiendo hasta un 3% de las proteínas secretadas a partir de estas células. La microglía y las neuronas también producen APOE pero en cantidades mucho más pequeñas, pero su secreción por estas células puede aumentar como respuesta a lesión o a estrés. Al ser secretada por los astrocitos, APOE se carga con colesterol y otros lípidos a través del transportador de unión a ATP (transportador ABC), para formar partículas de lipoproteínas antes de ser endocitadas por las neuronas, principalmente a través del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la proteína 1 relacionada con LDL, ambos miembros de la familia de receptores LDL. (21, 54, 55).

3.9.2.1.3 Estructura de APOE

La proteína APOE humana es una glicoproteína ácida de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34.2 KDa. La APOE posee una estructura secundaria con α hélices anfipáticas como dominios de unión a lípidos que le permiten cambiar de una manera reversible entre un estado de unión a lipoproteínas y un estado libre de lípidos. En su estado libre de lípidos, APOE tiene dos dominios estructurales plegados independientemente, un N-terminal de 22 KDa de los residuos 1 a 191, compuesto por un haz de cuatro hélices α , y un dominio C-terminal de 10 KDa altamente α -helicoidal de los

residuos 216-299. Estos dominios se unen por una región bisagra, ubicada entre los residuos 165-215. En el dominio N-terminal se ubica la región de unión al receptor LDL (residuos 136-150) en la cuarta hélice. La actividad de unión al receptor requiere de arginina en la posición 172 que se encuentra en la región bisagra. Por el contrario, el dominio C-terminal es la región de unión a lípidos (residuos 244-272) (Figura 11) (50, 54, 55, 56, 57).

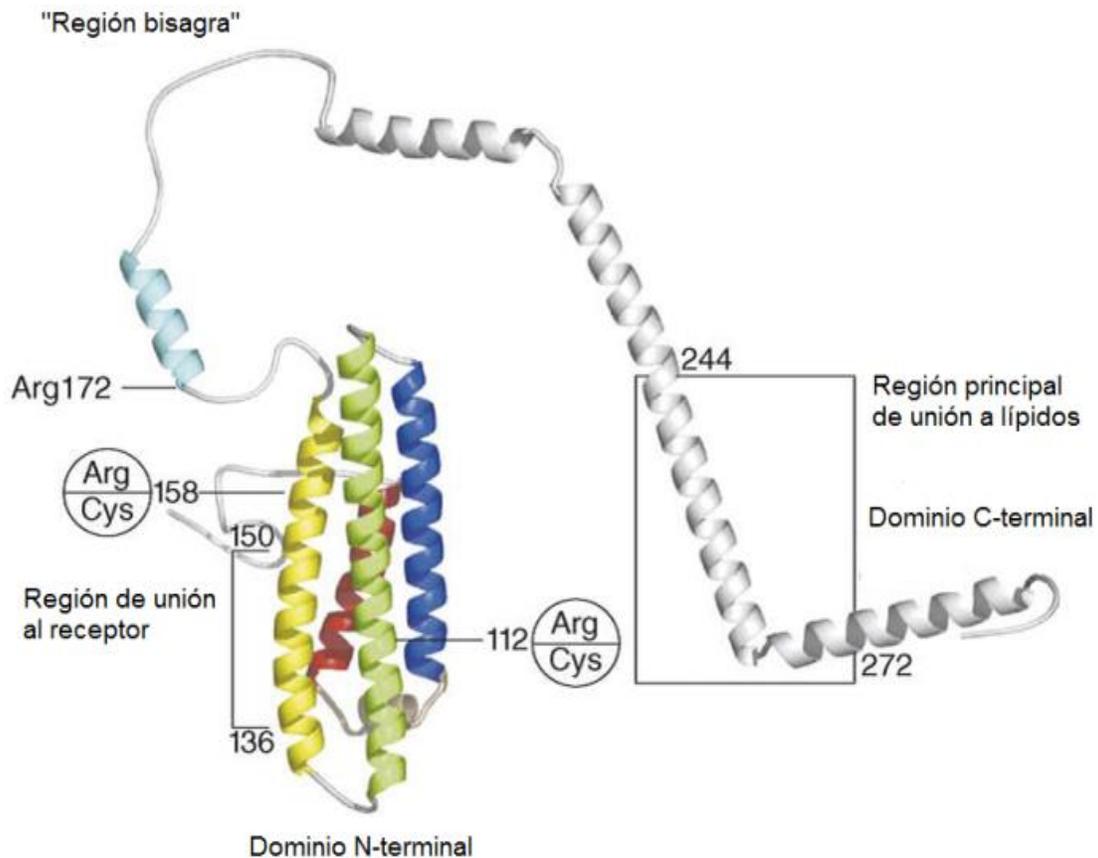


Fig. 11. Estructura de APOE libre de lípidos. El dominio N-terminal consiste en un haz de cuatro hélices (hélice 1, rojo; hélice 2, azul; hélice 3, verde; hélice 4, amarillo). La región de unión al receptor LDL se localiza sobre la hélice 4 y también requiere de Arg en el codón 172 que se encuentra en la región bisagra. El dominio N-terminal también contiene las posiciones polimórficas 112 y 158, que distinguen las tres isoformas comunes. El dominio C-terminal (gris) contiene los elementos de unión a lipoproteínas. Tomado y modificado de Hatters *et al.* (57)

Las isoformas de APOE tienen preferencia por diferentes clases de lipoproteínas. Se ha demostrado que APOE4 tiene preferencia por lipoproteínas de baja y muy baja densidad (VLDL's y LDL's) ricas en triglicéridos, mientras que APOE2 y APOE3 se asocian con lipoproteínas de alta densidad (HDL) ricas en fosfolípidos y colesterol. Los residuos que distinguen a las isoformas de APOE, como se mencionó anteriormente, se encuentran en el N-terminal (APOE4 arg112, APOE2 y APOE3 cys112), sin embargo, la región de unión a lípidos se encuentra en el dominio C-terminal, por lo que se ha sugerido que los dominios N y C terminales podrían interactuar en la isoforma ApoE4. La comparación de las estructuras tridimensionales de los dominios N-terminales de APOE3 y APOE4 y por mutagénesis dirigida han proporcionado información sobre las diferencias funcionales de las isoformas. ApoE4 presenta un fenómeno de compactación conocido como interacción de dominio debido a la presencia de arginina en el residuo 112 lo que resulta en la interacción de arginina en el residuo 61 (localizado en el N-terminal) con glutamato en el residuo 255 (localizado en el C-terminal) a través de la formación de un puente salino (Figura 12). La APOE humana es la única forma con arginina en el residuo 61, en otras especies el residuo 61 es treonina. A pesar de tener arginina en el residuo 112, en otras especies apoE se asocia preferentemente con HDL, lo que sugiere que arginina en el residuo 61 en presencia de arginina 112 conduce a APOE con lipoproteínas VLDL. La arginina en la cadena lateral está menos disponible en ApoE2 y ApoE3, haciéndolos menos propensos a la interacción de dominio. Se sugiere que la interacción de dominio en APOE4 es responsable de muchos efectos tóxicos y podría tener un papel clave en su asociación con la EA. (54, 55, 56)

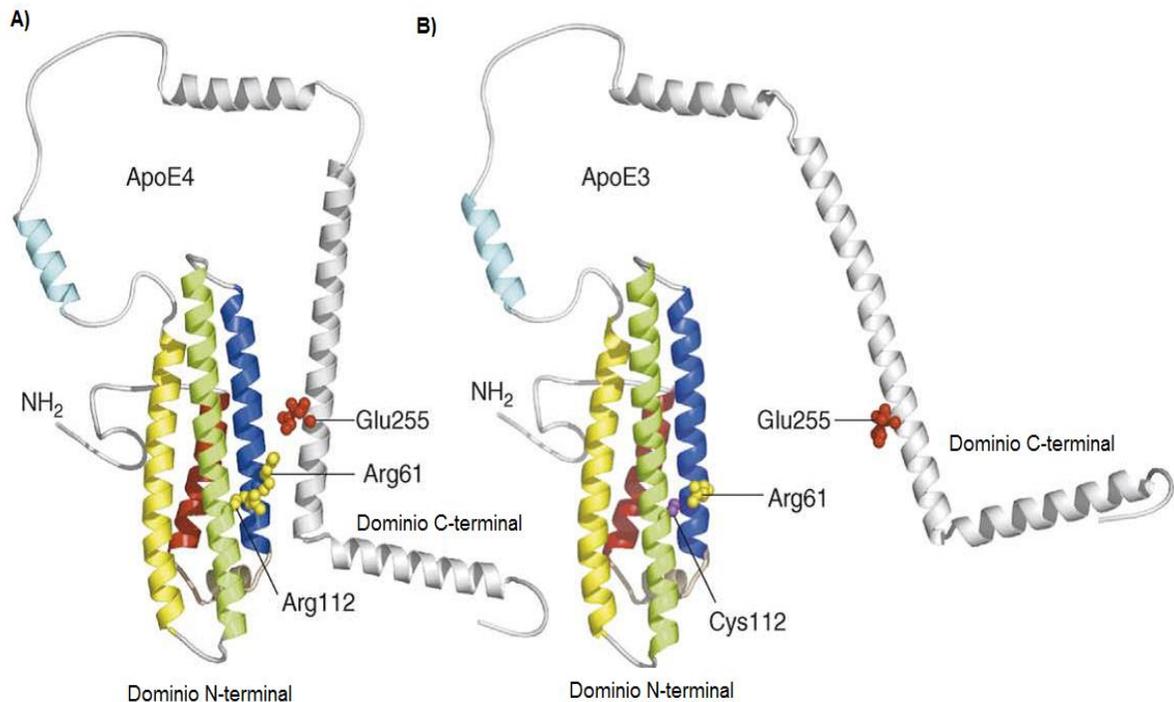


Fig. 12. Interacción de dominio en la estructura de ApoE. A) En ApoE4 la interacción de dominio ocurre como resultado de un puente salino entre Arg61 y Glu255, que estabiliza un contacto entre los dominios N y C terminales. B) La interacción no se produce en ApoE2 y ApoE3 por que la cadena lateral de Arg61 adopta una conformación diferente (en la cual se entierra entre las hélices 2 y 3) debido a Cys 112, lo que resulta en la cadena lateral menos accesible para la formación de un puente salino con Glu255. Tomada y modificada de Hatters *et al.* (55)

3.9.2.1.4 Polimorfismo de ApoE y EA

Muchos estudios han evidenciado que el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, es el factor de riesgo genético más importante para la EA, la frecuencia de este alelo es de $\sim 40\%$ en pacientes con EA, en la población general. Además, en un estudio realizado por Corder y colaboradores, en población caucásica se comprobó que la presencia de este alelo reduce la edad de inicio de una manera dosis génica dependiente. En homocigotos $\epsilon 4$, la frecuencia de EA fue de 91% y la edad media de aparición de la enfermedad clínica fue de 61 años, en comparación con una frecuencia de la EA de 47% y una edad media de aparición de la enfermedad de 76 años en heterocigotos $\epsilon 4$ y una frecuencia de la EA de 20% y una media de aparición de la enfermedad clínica de 84 años en los no portadores del alelo $\epsilon 4$. Es importante destacar que la deposición de A β es más abundante en portadores

APOE ϵ 4 en comparación con no portadores. Además del aumento de riesgo asociado con el alelo ϵ 4, varios estudios también han reportado un efecto protector débil pero significativo para el alelo ϵ 2, solo ~10% de los pacientes con EA en poblaciones caucásicas que portan este alelo contra una ocurrencia dos veces mayor en la población sana. Además, el alelo ϵ 4 también está asociado con una edad de inicio temprana en pacientes con EA esporádica o sin mutación en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. (21, 22, 54, 57, 58, 59, 60)

3.9.2.1.5 APOE y A β .

Existen diferentes hipótesis para abordar el papel fisiológico de la APOE en el cerebro de portadores del alelo ϵ 4. Se estipula que APOE4 compromete el metabolismo de A β ya sea directa o indirectamente y causa una acumulación tóxica de A β . La segunda hipótesis implica el metabolismo de la proteína tau, y asume que la APOE se libera en el citoplasma, donde interfiere directamente con la estructura del citoesqueleto de las neuronas. Por último, la tercera hipótesis postula que la APOE actúa en la homeostasis lipídica en el cerebro y que los portadores del alelo ϵ 4 tienen niveles reducidos de APOE en comparación con los no portadores (61). Además APOE también se ha asociado con funciones colinérgicas, en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y en la neurotoxicidad. (57, 61, 62) Las tres isoformas comunes de APOE difieren profundamente en su estructura y función, incluyendo su habilidad para interactuar con el A β . Mediante análisis in vitro, se demostró que A β y APOE4 promueven la formación de fibrillas de A β más rápidamente y con una mayor densidad en comparación con los no portadores de APOE4, siguiendo un orden en el rango de velocidad de agregación APOE4>APOE3>APOE2. Lo que puede sugerir una ganancia de función tóxica en la agregación del A β por APOE4. Sin embargo, la mayoría de los estudios han demostrado que APOE lipídada tiene una afinidad diferente dependiente de la isoforma para A β . Al comparar la afinidad al ligando en APOE lipídada, usando líneas celulares eucarióticas transfectadas, los niveles de los complejos APOE3/A β son 20 veces más altos que los niveles de los complejos APOE4/A β , siguiendo un orden en la eficiencia de formación de complejos APOE/A β (APOE2>APOE3>APOE4). Dado que esta eficiencia de unión se correlaciona inversamente con el riesgo de desarrollar EA, se planteó la hipótesis de que APOE2 y APOE3 pueden aumentar el aclaramiento de A β del cerebro en comparación

con APOE4, obteniendo así una pérdida de función neuroprotectora del alelo ϵ 4 de APOE. (57, 58, 62, 63). Además se ha demostrado que A β se une a APOE a través de su dominio C-terminal y A β anula la unión de APOE a lípidos. Esto sugiere que A β interfiere con la función de APOE como una proteína de transporte de lípidos en el cerebro, pudiendo así contribuir con la progresión de la enfermedad mediante la alteración de la homeostasis lipídica. APOE4 también parece ser más susceptible a proteólisis que APOE3, sugiriendo que los productos de la digestión de ApoE4 contribuyen a la formación de placa amiloide y a la patología de la EA, ya que estos fragmentos han sido detectados en placas amiloides de cerebros con EA. Además, la acumulación de estos fragmentos en el citosol de las neuronas altera la organización del citoesqueleto e interrumpe el equilibrio energético mitocondrial. Por lo tanto, el alelo ϵ 4 podría causar una ganancia de función neurotóxica o una pérdida de función neuroprotectora, o ambas. (55, 56, 63)

3.10 Otros factores de riesgo

Edad.

Los estudios epidemiológicos indican que la edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EA, La incidencia entre los sexagenarios es de 1 entre 1000 enfermos, 1 en 100 entre los septagenarios y 1 en 10 entre los octagenarios, en una población de Cache County, USA. Esto puede ser debido al aumento de superóxido dismutasa que puede ser la base de mutaciones en aproximadamente 1000 genes implicados en la biogénesis mitocondrial, pero aún no está clara esta relación (64, 65)

Género

Se ha demostrado que las mujeres tienen un riesgo relativo mayor para sufrir EA en comparación con los hombres. Estudios en poblaciones chinas y holandesas han determinado una mayor incidencia de la EA en las mujeres después de los 85 años, al mismo tiempo de que el riesgo disminuye en hombres pero no en mujeres después de los 90 años de edad. Debido a que las mujeres viven el último tercio de su vida con una deficiencia estrogénica, lo que podría explicar la mayor incidencia y prevalencia de las mismas. Sin embargo, en poblaciones italianas y españolas la asociación entre el género y demencia no es significativa. En un estudio en población mexicana se reportó que las

mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar demencia tipo Alzheimer, contrario a los hombres, cuyo riesgo de desarrollar demencia vascular es mayor (64, 65, 93).

Síndrome de Down

Los pacientes con Síndrome de Down presentan lesiones características de la EA a la edad de 30-40 años, pero los estudios de prevalencia indican que desarrollan los síntomas clínicos que definen a la demencia tipo Alzheimer. En un estudio de seguimiento con 307 personas con Síndrome de Down se encontró que el 18% desarrollaban EA con un promedio de edad de 56 años. La prevalencia aumentaba conforme la edad: 77% a los 60-69 años y 100% en mayores de 70 años. Las razones de esta relación son probablemente la duplicidad del gen APP en el cromosoma 21 y sus productos a lo largo de la vida. (65, 66)

Índice de masa corporal (IMC)

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para la EA. Un reciente meta-análisis, incluyendo 10 estudios de seguimiento con sujetos de entre 40-80 años en Estados Unidos, ha demostrado una relación entre el IMC y la demencia a los 50 años de edad. (64)

Comorbilidad

El riesgo de la EA se relaciona con varias enfermedades. La diabetes tipo 2 se asocia fuertemente con resistencia a la insulina, que está relacionada con la formación de A β y agentes inflamatorios en el cerebro. Por otra parte, la lesión cerebral traumática puede inducir EA. En un meta-análisis se encontró una asociación entre antecedentes de traumatismo craneoencefálico con pérdida de conciencia y EA, en el cual se incrementaba el riesgo en un 80%. Algunos estudios indican que tras una contusión cerebral se producía depósito amiloide. Los virus de Inmunodeficiencia humana y hepatitis C también se asocian con la demencia. Por último, dos meta-análisis han mostrado consistentemente que una historia de depresión es un factor de riesgo para EA en la edad adulta (64, 65).

Factores ambientales

Varios estudios indican que el aluminio puede actuar como un cofactor para el riesgo de demencia. . En la mayor parte de los estudios revisados se ha examinado la exposición al metal a través del agua de bebida. Los estudios que sugieren que existe una asociación

entre el aluminio y la enfermedad presentan riesgos relativos de alrededor de 2 para poblaciones con exposiciones a concentraciones de aluminio en el agua mayores de 0,1 mg/l. Varios macronutrientes también se han asociado con el riesgo de demencia. La glucosa, proteínas (triptófano y tirosina) y ácidos grasos insaturados, se han vinculado con cambios en la función cognitiva entre las personas con AD. (64, 65, 67)

IV JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia ya que comprende entre 60 y 70% de todos los casos reportados. En México existen alrededor de 350 mil personas con esta enfermedad y la prevalencia va en aumento (6). Clínicamente se tiene certeza de esta enfermedad, pero la prueba confirmatoria es un estudio postmortem. Las mutaciones en el gen *PSEN1* son la causa más común de las formas familiares de Alzheimer de inicio temprano y representan aproximadamente el 70% de todos los casos en la población general. Por otro lado, el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* es el único factor de riesgo genético bien establecido para formas familiares de enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Es por esto, que el análisis de estos genes no solo servirá como una nueva herramienta para confirmar el diagnóstico de esta enfermedad, sino también para brindar un mejor asesoramiento genético en las familias en riesgo, así como para conocer la frecuencia de estas variaciones en la población mexicana y adquirir una mejor comprensión de la fisiopatología de la EA.

V HIPÓTESIS

De acuerdo con los reportes en la población general, se espera que entre 50-70% de los casos de EA familiar presenten una mutación en el gen de *PSEN1* y alrededor de 40% del total de casos con EA presenten el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*.

VI OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar variantes génicas en los exones 4-12 del gen *PSEN1* y determinar la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* en una muestra de pacientes mexicanos con enfermedad de Alzheimer

Objetivos particulares

- Determinar la asociación de estas formas génicas con la aparición y desarrollo de la EA
- Establecer una correlación genotipo-fenotipo en estos casos de EA.

7.1 Población de estudio

Se analizaron 55 pacientes con diagnóstico probable de demencia tipo Alzheimer, los cuales contaban con un rango de edad de 36 a 97 años, atendidos en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Se incluyeron las frecuencias alélicas y genotípicas ya determinadas en 345 controles sanos del gen *APOE* sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado.

7.2 Toma de muestra

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

7.3 Extracción de DNA

Se obtuvo DNA genómico siguiendo el método de sales Miller (89).

1. Se transfirió la sangre periférica a un tubo Falcon de 15mL y se adicionaron 9mL de solución buffer para lisis de glóbulos rojos (BLGR) y se homogenizó por inversión.
2. Se centrifugó a 3000 rpm / 6 minutos y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregó al botón 1 mL de BLGR, se homogenizó y se transfirió a un microtubo de 1.5mL.
3. Se centrifugó a 14000 rpm /2 minutos y se decantó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta que el botón se encontró aparentemente libre de hemoglobina.
4. Se agregó al botón 570 μ L de NaCl (5 mM) y se homogenizó. Posteriormente se agregaron 40 μ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% y se homogenizó. Por último se agregaron 200 μ L de NaCl (7M) y se homogenizó.
5. Se centrifugó a 14000 rpm /15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5mL.

6. Se agregó al sobrenadante 700µL de cloroformo-álcohol isoamílico (49:1) y se homogenizó. Se centrifugó a 14000 rpm /15 minutos a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5mL.
7. Se adicionó a la fase acuosa 900mL de etanol absoluto frío, se homogenizó y se centrifugó a 14000 rpm/15min. El sobrenadante se desechó y el botón se secó en un concentrador al vacío durante 30 min. Aproximadamente.
8. Se resuspendió el botón en 250mL de agua estéril y se mantuvo en agitación constante a 60°C/2 hrs. La muestra de DNA se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

7.3.1 Análisis espectrofotométrico

Se determinó la concentración de DNA y la pureza de la muestra mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000) a dos longitudes de onda (260 y 280nm). En la que la lectura de 280 nm corresponde a las proteínas y la lectura de 260nm corresponde a ácidos nucleicos. La relación 260/280 nos da la pureza de la muestra.

7.3.2 Análisis de integridad del DNA.

Se analizó la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando el procedimiento siguiente:

1. En un matraz Erlenmeyer se disolvió 1g de agarosa por cada 100mL de buffer TBE 1x (Tris, ácido bórico. EDTA).
2. La mezcla se calentó hasta formar una solución homogénea.
3. Se adicionó 1µL de bromuro de etidio (10mg/mL) por cada 100 mL de solución y se homogenizó.
4. La mezcla se vertió en un porta gel colocando los peines y se dejó solidificar aproximadamente durante 1 hora y se retiraron los peines.
5. Se colocó el portagel en una cámara de electroforesis y se añadió buffer TBE 1x hasta la marca especificada en la cámara.
6. Se tomaron 2 µL de muestra de DNA y se mezcló con 2 µL de colorante de carga 10x (azul de bromofenol, glicerol, xilencianol).
7. Se colocó la muestra en el pozo y se llevó a cabo la electroforesis a 100 V/30 min.

8. Se colocó el gel en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía mediante el uso de un fotodocumentador para su análisis.

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

7.4.1 *PSEN1*

Se amplificaron los exones 4-12 del gen *PSEN1* a través de DNA genómico usando los siguientes oligonucleótidos previamente descritos por Cruets *et al.* (68):

Exón	Oligonucleótido sentido Oligonucleótido antisentido	Tamaño del producto (pb)
4	5'-CGTTACCTTGATTCTGCTGA-3' 5'-GACATGCTGTAAAGAAAAGCC-3'	371
5	5'-GATTGGTTGAGTTGGGGAAAAGTG-3' 5'-ATACCCAACCATAAGAAGAACAGG-3'	335
6	5'-TCTGTACTTTTTAAGGGTTGT-3' 5'-ACTTCAGAGTAATTCATCAACA-3'	299
7	5'-GGAGCCATCACATTATTCTAAA-3' 5'-AACAAATTATCAGTCTTGGGTTT-3'	326
8	5'-TTAATTCCTCCCTACCACCC-3' 5'-AGTTACATGTGCTTCAGTTC-3'	247
9	5'-TGTGTGTCCAGTGCTTACCTG-3' 5'-TGTTAGCTTATAACAGTGACCCTG-3'	188
10	5'-CCAGCTAGTTACAATGACAGC-3' 5'-TCAAAAAGGTTGATAATGTAGCT-3'	345
11	5'-GGTTGAGTAGGGCAGTGATA-3' 5'-TTAAAGGGACTGTGTAATCAAAG-3'	275
12	5'-GTCTTTCCCATCTTCTCCAC-3' 5'-GGGATTCTAACCGCAAATAT-3'	199

En las tablas 8 y 9 se muestran los reactivos y las condiciones empleadas en la PCR del gen *PSEN1* respectivamente.

Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR del gen *PSEN1*.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/μL	3 μL
Hot Star		10 μL
Oligonucleótido sentido	25 μM	1 μL
Oligonucleótido antisentido	25 μM	1 μL
Agua libre de DNAsas		15 μL
Volumen Final		30 μL

Tabla 9. Condiciones generales empleadas para la amplificación de los exones 4-12 de *PSEN1*. La temperatura de hibridación varía de acuerdo a la Tm de cada par de oligonucleótidos.

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

} 35 ciclos

7.4.2 APOE

Se amplificó el exón 4 del gen *APOE* usando los siguientes oligonucleótidos previamente descritos por Hixon *et al.* (69):

Exón	Oligonucleótido sentido Oligonucleótido antisentido	Tamaño del producto (PB)
4	5'- ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC-3' 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'	244

En las tablas 10 y 11 se muestran los reactivos y las condiciones empleadas para la PCR del gen *APOE* respectivamente.

Tabla 10. Reactivos empleados en la PCR del gen *APOE*.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/μL	1 μL
Hot Star		10 μL
Oligonucleótido sentido	10 μM	1 μL
Oligonucleótido antisentido	10 μM	1 μL
DMSO	10%	2 μL
Agua libre de DNAsas		5 μL
Volumen final		20 μL

Tabla 11. Condiciones empleadas para la PCR del gen *APOE*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 min.
Desnaturalización	94°C	30 seg.
Hibridación	60°C	30 seg.
Elongación	72°C	1 min.
Elongación final	72°C	10 min.
Conservación	4°C	-----

} 35 ciclos

7.4.3 Análisis de productos de PCR.

Se analizó la integridad y el tamaño de los productos de PCR de los exónes 4-12 de *PSEN1* y el exón 4 de *APOE* mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%/TBE1x y se tomó una fotografía usando un fotodocumentador para su análisis posterior.

7.5 SECUENCIACIÓN TIPO SANGER DEL GEN *PSEN1*

7.5.1 Purificación de los productos de PCR

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

1. Se adicionó un volumen de solución de unión a la membrana igual al de la reacción de PCR (v/v) y se mezcló.
2. Se insertó una minicolumna SV dentro del tubo colector.
3. Se transfirió el producto de PCR preparado a la minicolumna ensamblada y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min.
4. Se centrifugó a 16,000 g durante 1 min. Se desechó el sobrenadante y se reinserto la columna.
5. Se adicionaron 700µl de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16,000g/1min. Se desechó la solución restante y se reinsertó la minicolumna.
6. Se repitió el paso anterior pero con 500µl de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16,000g/5min.
7. Se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 1 min.
8. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 µl .
9. Se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Se centrifugó a 16,000g/1min.
10. El producto de PCR purificado se guardó a 4°C, hasta su uso posterior.

7.5.2 Reacción de secuenciación

Para la reacción de secuenciación se empleó el estuche comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®). Los reactivos y las condiciones empleadas se muestran en las tablas 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Reactivos empleados para la reacción de secuenciación del gen *PSEN1*

Reactivo	Concentración	Volumen
PCR	~100 ng/ μ L	2 μ L
BigDye Terminator V3.1		1 μ L
Oligonucleótido sentido	25 μ M.	1 μ L
Buffer	5 X	4 μ L
Agua libre de DNAsas		12 μ L
Volumen final		20 μ L

Tabla 13. Condiciones de la reacción de secuenciación del gen *PSEN1*.

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

} 25 ciclos

7.5.3 Purificación de los productos de secuenciación

Para la purificación de los productos de secuenciación se emplearon columnas *Centri-Sep*, utilizando la siguiente metodología:

1. A las columnas de purificación *Centri-Sep* se le adicionaron 800 μ L de agua estéril para hidratarlas y se eliminaron las burbujas de aire.

2. Las columnas se conservaron en refrigeración a 4°C/2 horas.
3. Una vez hidratadas, se colocaron en un tubo colector y se retiraron las tapas.
4. Se centrifugaron a 3000 rpm/2 min y se desechó el sobrenadante.
5. Se insertó la columna en un tubo de 1.5 ml y se colocó la muestra de secuenciación.
6. Se centrifugó a 3000 rpm/3 min.
7. La muestra purificada se secó empleando un concentrador al vacío aproximadamente por una hora.

7.5.4 Secuenciación

La muestra purificada se hidrató con 14 µL de formamida ultrapura, se homogenizó y se transfirió a una placa de secuencia de 96 pozos. Se desnaturalizó a 94°C/ 5 min y se analizó en un secuenciador automatizado de DNA AB3130 (*Applied Biosystem*). Por último, se analizaron las secuencias mediante el uso del programa *Sequencing Analysis v5.3*.

7.6 FRAGMENTOS POLIMORFICOS DE LONGITUD DE RESTRICCIÓN DE APOE (RFLP)

7.6.1 Digestión enzimática

Se realizó la restricción enzimática del exón 4 de *APOE* utilizando la enzima de restricción *HhaI* a partir del producto de PCR. Las muestras fueron digeridas a 37°C durante 4 horas. Los reactivos utilizados para la restricción se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Reactivos empleados para la restricción enzimática del gen *APOE*. La concentración de la enzima en la reacción es de 5u por lo que en la reacción se usan 0.5 μ L para obtener una concentración final de 5u.

Reactivo	Concentración	Volumen
Producto de PCR		10 μ L
Buffer	10 X	2 μ L
ER HhaI	10 u	0.5 μ L
Agua libre de DNAsas		7.5 μ L
Volumen final		20 μ L

7.6.2 Análisis de productos de restricción

El producto obtenido de la restricción enzimática fue analizado mediante la utilización de un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8%, durante 2.5 horas a 100 V y flanqueando con el marcador de peso molecular *Marker V (8-587 pb) Molecular Weight (Roche)*. Los reactivos utilizados para la elaboración del gel se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Reactivos empleados para la elaboración del gel de poliacrilamida.

Reactivo	Concentración	Volumen
Acrilamida	40 %	10 mL
Buffer TBE	10 X	5 mL
Agua libre de DNAsas		34.3 mL
Persulfato de amonio		700 μ L
TEMED		50 μ L
Volumen final		50 mL

Al finalizar la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) y se visualizaron las bandas en un transiluminador de luz UV. Por último, se tomó una imagen usando un fotodocumentador para su análisis posterior. Los patrones de banda esperados se muestran en la figura 14.

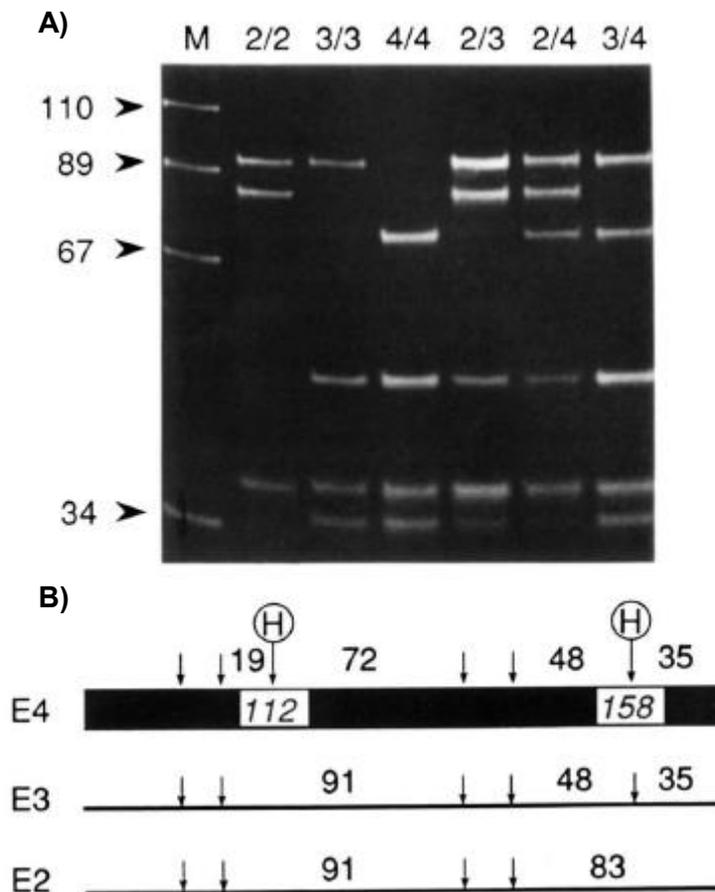


Fig. 14. Patrones esperados de los genotipos *APOE*. A) Electroforesis de los genotipos *APOE*. Se muestran dos bandas para el genotipo 2/2, de 91 y 83 pb respectivamente, tres bandas para el genotipo 3/3 de 35, 48 y 91 pb, dos bandas de 48 y 72 pb para el genotipo 4/4, tres bandas de 48, 81 y 91 pb para el genotipo 2/3, cuatro bandas de 48, 72, 81 y 91 pb para el genotipo 2/4 y tres bandas de 48, 72 y 91 pb para el genotipo 3/4. B) Mapa de restricción de *HhaI*. Las (H) indican los sitios de reconocimiento de la enzima *HhaI* en los codones 112 y 158 del exón 4 de *APOE*. Tomada y modificada de Hixon *et al.* (69).

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *APOE* mediante conteo directo de cada genotipo y se determinó si las muestras de pacientes y controles se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg.

Se realizó la prueba exacta de Fisher o χ^2 según el caso para la comparación de la frecuencia alélica del gen *APOE* en los diferentes grupos, así como también se calculó la razón de momios u *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza (IC) de 95% empleando el programa *MedCalc Software bvba Versión 15.11*.

Se realizó la prueba de ANOVA y la prueba de Tukey para comparar la edad promedio de acuerdo a la dosis génica del alelo $\epsilon 4$, con un intervalo de confianza (IC) de 95%. Para el análisis de electroferogramas se utilizó el software *Sequencher 5.1. Demo. Ink.*

VIII RESULTADOS

8.1 Población de estudio

La población total estudiada fue de 55 pacientes de los cuales 30 fueron mujeres (55%) con una edad media de 63 años (rango de edad: 36-97 años) y 25 hombres (45%) con una edad media de 63 años (rango de edad: 40-83 años) (Figura 15). 67% de los pacientes presentaban una edad de inicio temprana de los síntomas de la enfermedad (<65 años), de los cuales 51% eran formas familiares, 30% eran formas esporádicas y 20% no presentaban antecedentes familiares. 33% de los pacientes presentaban una edad de inicio tardía (≥ 65 años), de los cuales 56% se trataba de formas familiares, 11% de formas esporádicas y 33% no presentaban antecedentes familiares (Figura 16).

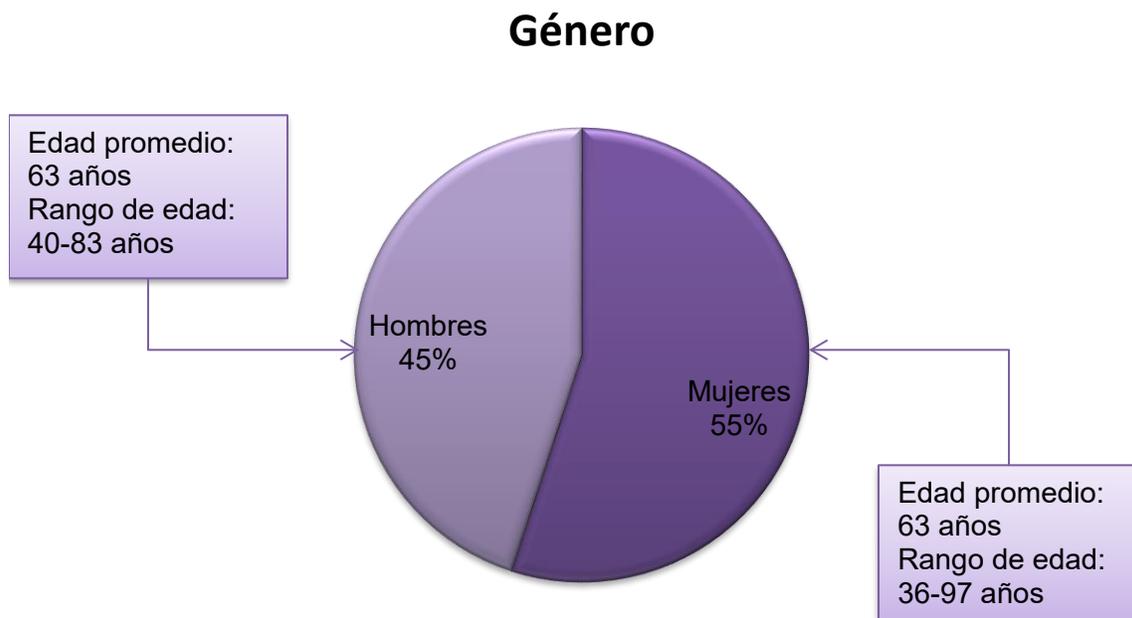


Fig. 15. Género y edad de los pacientes con probable demencia tipo Alzheimer

Edad de inicio de la enfermedad

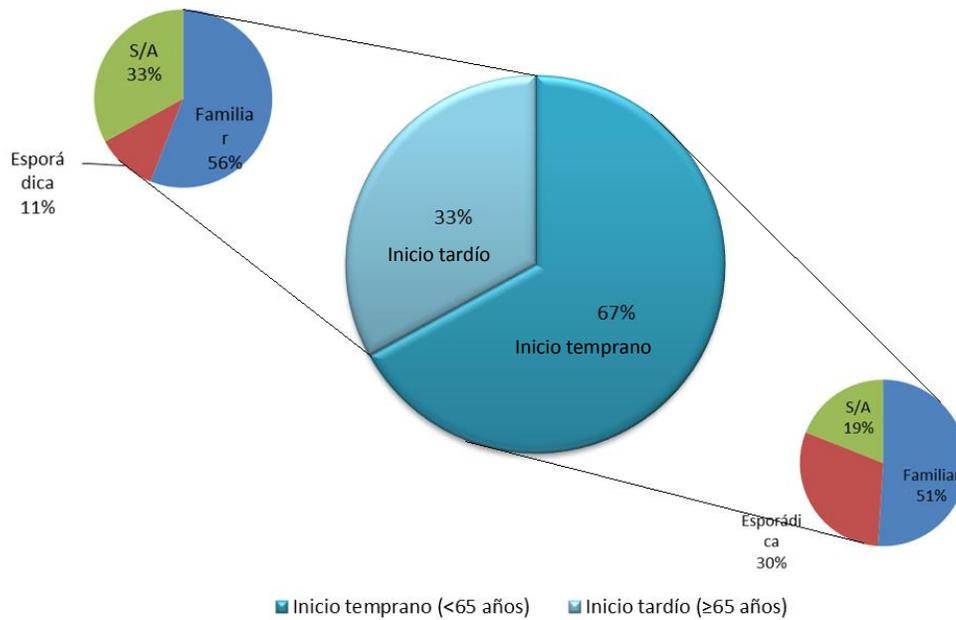


Fig. 16. Distribución de la edad de inicio de la muestra estudiada. Se muestra la distribución de las formas familiares y esporádicas por edad de inicio de la EA.

De acuerdo a su clasificación genética, se observó que 29 pacientes (53%) tenían diagnóstico probable de enfermedad de Alzheimer familiar, de las cuales 67% presentaban una edad de inicio de los síntomas temprano (<65 años) y 33% presentaban una edad de inicio tardío (≥65 años). 13 casos (24%) fueron esporádicos, de los cuales 85% presentaba una edad de inicio temprano y 15% presentaban una edad de inicio tardío. En 13 pacientes (24%) se desconocían sus antecedentes familiares, 54% de estos pacientes presentaban una edad de inicio temprano y 46% presentaba una edad de inicio tardío (Figura 17).

Distribución genética

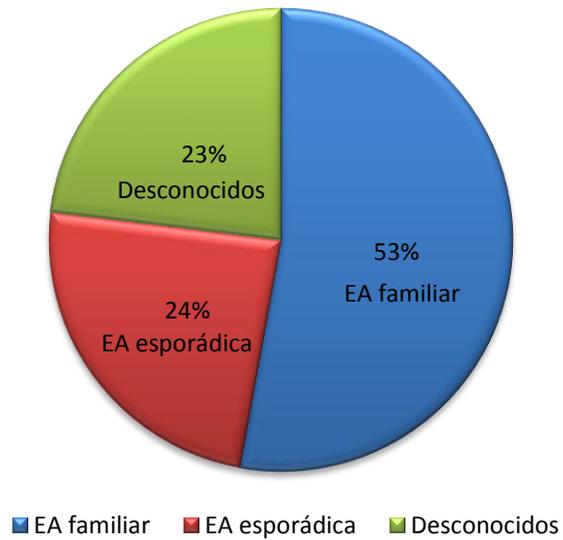


Fig. 17. Distribución de las formas familiares y esporádicas de la muestra estudiada.

8.2 Cuantificación de DNA genómico

El DNA obtenido de las muestras de los pacientes analizados muestra en promedio una concentración de 194.81ng/ μ L, con un rango de pureza de 1.8 a 2 de acuerdo a la relación A_{260}/A_{280} .

8.3 Análisis de integridad del DNA

El DNA obtenido de los pacientes resultó íntegro y de alto peso molecular, comparado con el marcador de peso molecular de 10000 pb (Figura 18).

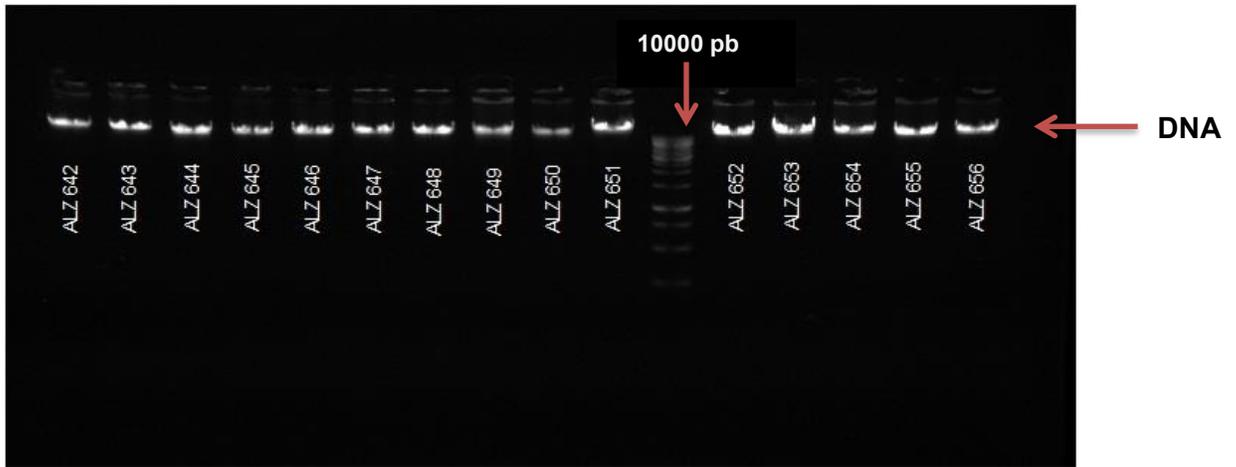


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa 1%, en donde se muestra la integridad del DNA genómico a una concentración promedio de 194.81ng/μL, se compara con el marcador de peso molecular *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*.

8.4 Análisis de los productos de PCR de *PSEN1*

Se obtuvieron los productos de PCR correspondientes a los exones 4 al 12 del gen *PSEN1* a partir de DNA genómico, se muestran en la figura 19.

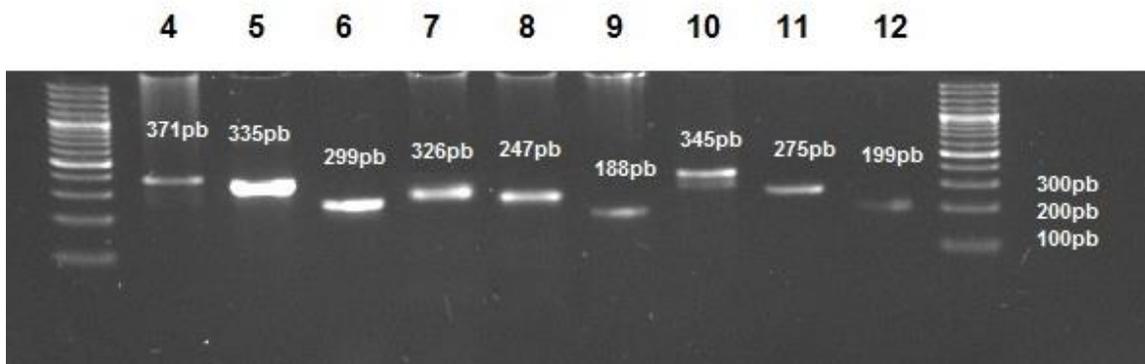
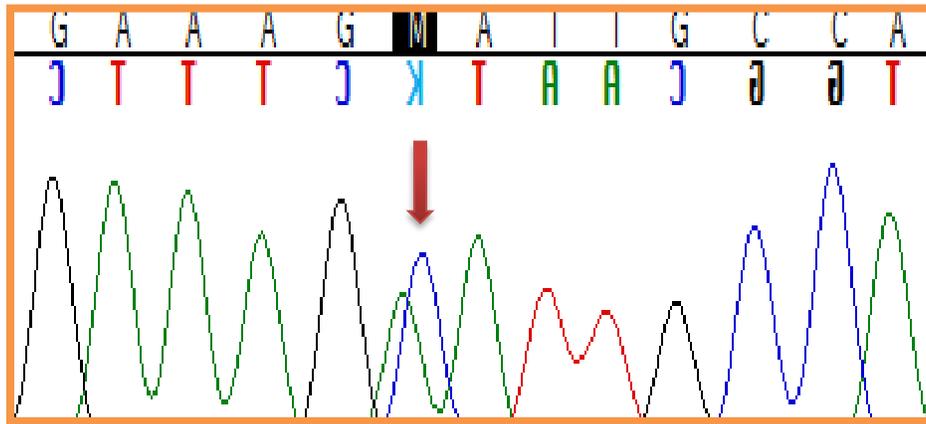


Fig. 19. Resolución de los productos de PCR de los exones 4-12 del gen *PSEN1*, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En la parte superior de cada amplicón se muestra el peso molecular de cada uno de los exones, flanqueados con el marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*).

8.5 Mutaciones encontradas en el gen *PSEN1*

Cuatro pacientes presentaron una mutación puntual en el codón 431 del exón 12, en la que se sustituye una citosina (C) en el codón GCA por una adenina (A) GAA, dando como resultado un cambio de aminoácido de una alanina por un ácido glutámico (A431E) (Figura 20).

A)



B)

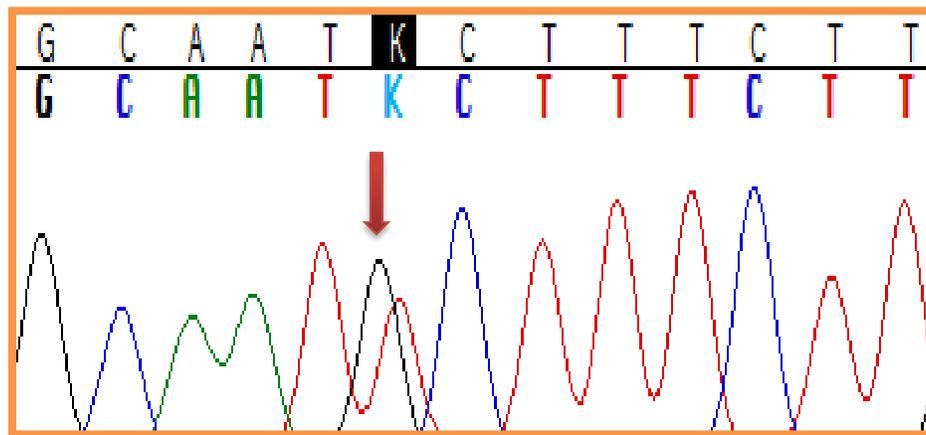
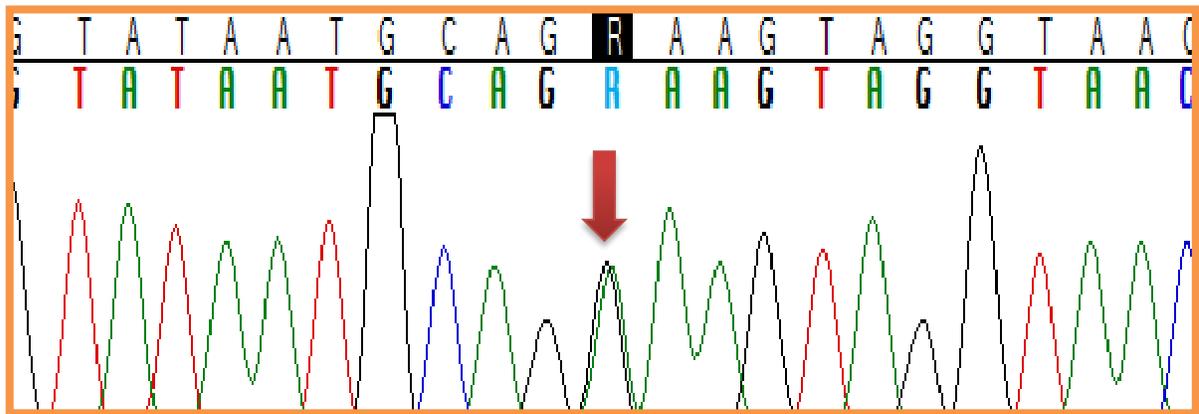


Fig. 20. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 12 de *PSEN1*. (A) Hebra sentido. (B) Hebra antisentido. La flecha indica la sustitución de una alanina (A) por un ác. Glutámico (E) en el codón 431.

Dos pacientes presentaron una mutación puntual en el codón 318 del exón 9, en la que se sustituye una adenina (A) en el codón 318 por una guanina (G) quedando como GGA. Dando como resultado un cambio de aminoácido en la secuencia, de un ác. glutámico (E) por una glicina (G) (E318G) (Fig. 21).

A)



B)

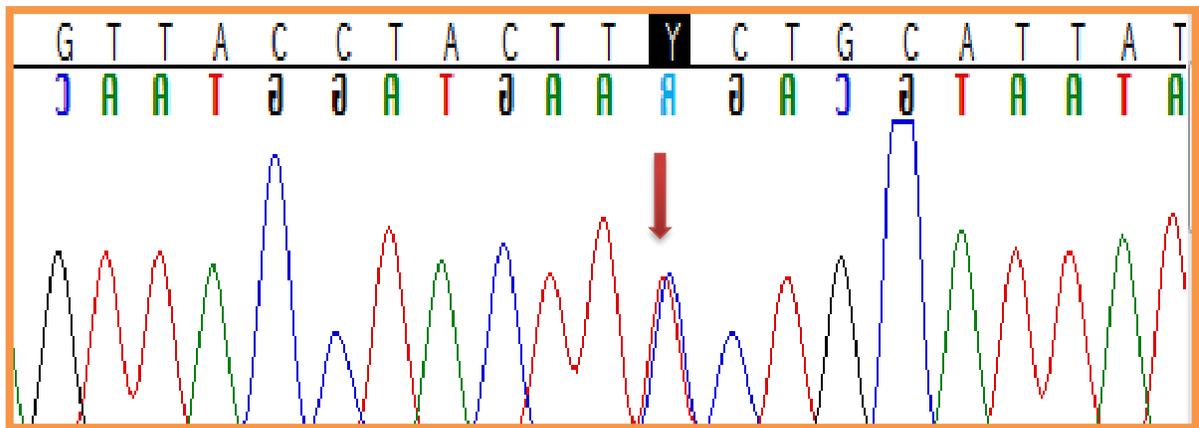


Fig. 21. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 9 de *PSEN1*. (A) Hebra sentido. (B) Hebra antisentido. La flecha indica el cambio que ocasiona la mutación E318G.

De los exones 4 al 8 y del 10 al 11 no se encontraron mutaciones ni polimorfismos en los pacientes analizados.

En las tablas 16 y 17 se resumen las mutaciones encontradas del gen *PSEN1* en la muestra de los pacientes analizados, así como su edad de inicio, el lugar de origen y su genotipo *APOE*.

Tabla 16. Mutaciones identificadas en el gen *PSEN1* en la muestra analizada.

Pacientes		Mutación	
	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Referencia
4	A431E	c. 1292C>A	rs63750083
2	E318G	c.953A>G	rs17125721

Tabla 17. Mutaciones en *PSEN1* y características de los portadores.

Paciente	Mutación	Género	Edad de inicio	Tipo de EA	Genotipo <i>APOE</i>	Lugar de origen
1	A431E	Masculino	45	Familiar	3/3	Irapuato, Gto.
2	A431E	Femenino	43	Familiar	3/3	León Gto.
3	A431E	Femenino	45	Familiar	3/3	Michoacán
4	A431E	Femenino	33	Familiar	3/3	Jalisco
5	E318G	Femenino	41	Familiar	3/3	Tlaxcala
6	E318G	Femenino	60	Familiar	3/3	Michoacán

8.6 Análisis de productos de PCR de *APOE*

Se obtuvo un amplicón de 244 pb del exón 4 del gen *APOE* a partir de DNA genómico, como se muestra en la figura 22.

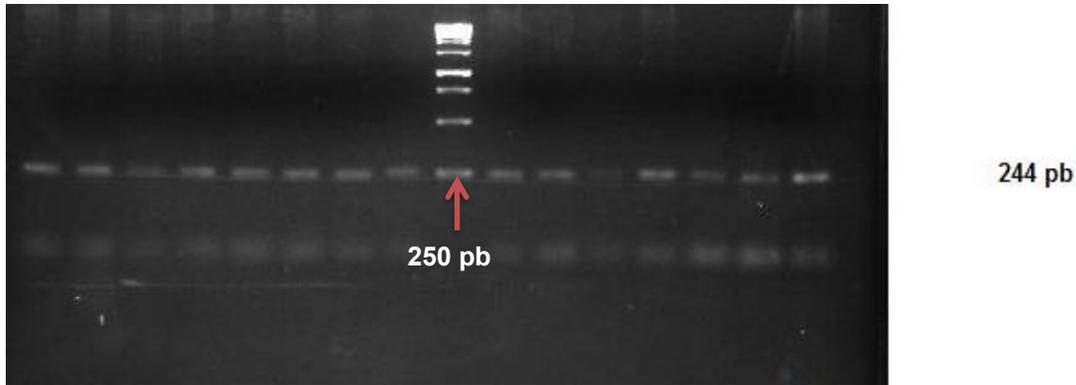


Fig. 22. Resolución de los productos de PCR del exón 4 del gen *APOE*, en gel de agarosa al 2% flanqueados con el marcador de peso molecular *O'Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas)*, a la derecha se muestra el peso molecular del amplicón y se indica con una flecha la banda correspondiente en el marcador de peso molecular.

8.7 Fragmentos de restricción de *APOE*

A partir del producto del exón 4 del gen *APOE* amplificado por PCR, se obtuvieron 5 genotipos mediante la restricción enzimática con la endonucleasa de restricción *HhaI*, observándose los genotipos 2/4, 2/3, 3/4, 3/3, 4/4. Estos genotipos se compararon con una muestra analizada previamente en población mestizo mexicana de 345 controles sanos, no relacionados entre sí, ni con los pacientes. El genotipo 2/2 no se observó en pacientes ni en controles (Fig. 23).

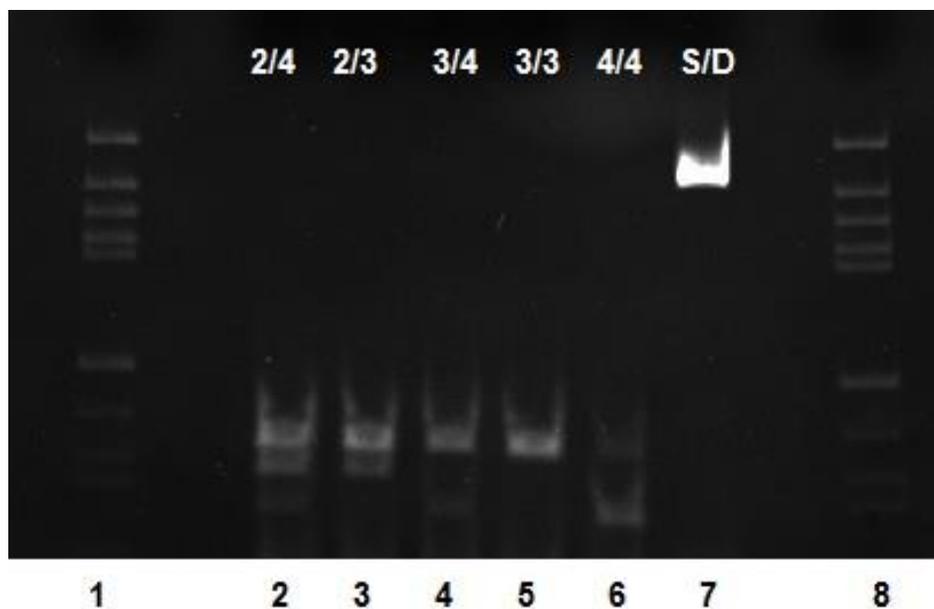


Fig. 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante 8%, en donde se muestran los cinco genotipos observados en pacientes y controles: 2/4, 2/3, 3/4, 3/3, 4/4 del carril 2 al 6 respectivamente, en el carril 7 se muestra el producto de PCR del exón 4 de *APOE* sin digerir (S/D) y en los carriles 1 y 8 se ubica el marcado de PM *Marker V* (8-587 pb) *Molecular Weight* (Roche).

8.8 Frecuencias alélicas y genotípicas de *APOE*

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para casos con EA y controles sanos (Tabla 18). Al analizar la distribución de las frecuencias genotípicas se observó que el genotipo 3/3 es el más frecuente para casos con EA, seguido por los genotipos 3/4 y 4/4 respectivamente. Al analizar las frecuencias en controles se observó también el genotipo 3/3 como el más frecuente seguido por los genotipos 3/4 y 3/2 respectivamente. Además solo se encontró un individuo con el genotipo 4/4 en controles y ningún caso con el genotipo 2/2 tanto en controles como en pacientes con EA (Fig. 24).

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en individuos sanos y en pacientes con EA. Las frecuencias genotípicas y alélicas se establecieron en porcentaje.

GENOTIPO	CASOS		CONTROLES		ALELO	CASOS		CONTROLES	
	n	%	N	%		N	%	N	%
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0	0	0	$\epsilon 2$	1	0.91	20	2.89
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0	0	18	5.22	$\epsilon 3$	84	76.36	619	89.7
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1	1.81	2	0.58	$\epsilon 4$	25	22.72	51	7.39
$\epsilon 3/\epsilon 3$	34	61.8	277	80.29					
$\epsilon 3/\epsilon 4$	16	29.09	47	13.62					
$\epsilon 4/\epsilon 4$	4	7.27	1	0.29					
TOTAL	55		345			110		690	

Frecuencias genotípicas de APOE

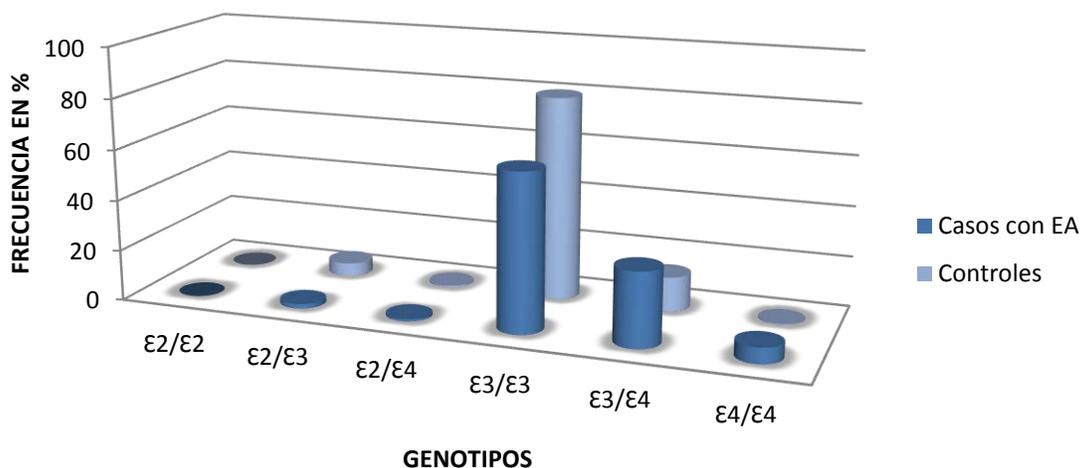


Fig. 24. Frecuencias observadas para cada genotipo en casos con EA y controles expresadas en porcentaje.

Al analizar la distribución de las frecuencias alélicas se observó que tanto en casos con EA como en controles, el alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente seguido por el alelo $\epsilon 4$. El alelo $\epsilon 2$ es poco frecuente (Fig. 25).

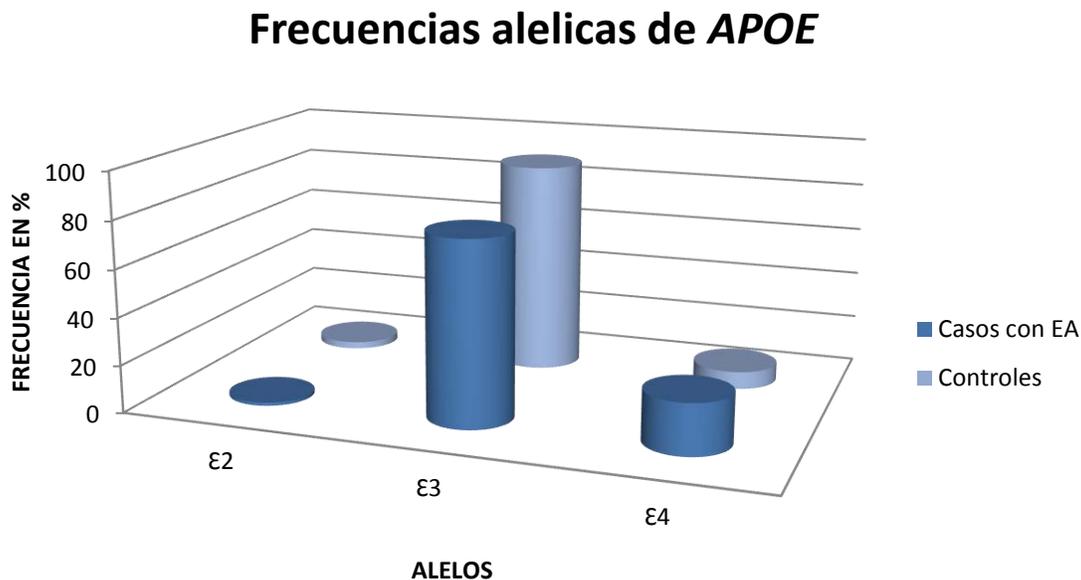


Fig. 25. Frecuencias observadas para cada alelo en individuos con EA e individuos sanos expresadas en porcentaje.

Para demostrar que la muestra de casos y controles fue tomada aleatoriamente se calcularon las frecuencias genotípicas y se determinó el equilibrio de Hardy Weinberg tanto en casos como en controles, dando como resultado un equilibrio en ambos grupos (Casos con EA: $\chi^2=4.5267$ $p=7.81$, IC 95%) (Controles: $\chi^2=0.92$ $p=7.81$, IC95%) (Anexo).

La frecuencia del genotipo homocigoto (4/4) en casos con EA fue de 0.0727, significativamente mayor en comparación con los controles (0.0029) (χ^2 7.2539 $p=0.007075$) (OR 16.12, IC 95% 0.9082-286.2394). Así mismo, al comparar la frecuencia del genotipo 3/4 en casos con EA (0.290) y controles (0.136) se encontraron diferencias significativas (χ^2 6.6657 $p=0.009829$), por lo cual se comprobó una asociación de manera general entre estos genotipos y la EA.

La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en casos con EA (0.2272) fue significativamente mayor en comparación con los controles (0.0739) (χ^2 10.039 $p=0.001532$) (OR 3.96, IC 95% 1.6161-

9.7447). Además la frecuencia del alelo ε3 en casos con EA (0.7636) fue significativamente menor en comparación con el grupo control (χ^2 6.9454 $p=0.0084$). No se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia del alelo ε2 en el total de casos analizados con EA (0.009) y el grupo control (0.029) (χ^2 1.02 $p=0.3124$).

Para determinar con una mayor exactitud esta asociación se dividieron los casos con EA en dos grupos: pacientes con EA de inicio temprano (<65 años) y pacientes con EA de inicio tardío (≥ 65). El grupo control fue dividido de igual manera. Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas para cada grupo (Tabla 19 y 20) (Fig. 26 y 27).

Tabla 19. Frecuencias genotípicas de los grupos por edad de inicio de pacientes y controles expresadas en porcentaje.

Genotipo	Casos de inicio temprano		Controles (<65 años)		Casos de inicio tardío		Controles (≥ 65 años)	
	n	%	N	%	n	%	n	%
	ε2/ε2	0	0	0	0	0	0	0
ε2/ε3	0	0	10	4.23	0	0	8	7.33
ε2/ε4	0	0	1	0.42	1	5.55	1	0.917
ε3/ε3	27	72.97	192	81.35	7	38.88	85	77.98
ε3/ε4	8	21.62	32	13.55	8	44.44	15	13.76
ε4/ε4	2	5.40	1	0.42	2	11.11	0	0
TOTAL	37		236		18		109	

Tabla 20. Frecuencias alélicas de los grupos por edad de inicio de pacientes y controles expresadas en porcentaje.

Alelo	Casos de inicio temprano		Controles (<65 años)		Casos de inicio tardío		Controles (≥65 años)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ε2	0	0	11	2.33	1	2.77	9	4.128
ε3	62	83.78	426	90.25	22	61.11	193	88.53
ε4	12	16.21	35	7.4	13	36.11	16	7.34
TOTAL	74		472		36		218	

Las frecuencias alélicas del grupo de pacientes con inicio temprano como tardío muestran diferencias estadísticamente significativas en relación con el alelo ε4, χ^2 3.97 $p=0.046061$ para el grupo de pacientes con inicio temprano y χ^2 24.91 $p=0.000001$ para el grupo de pacientes con inicio tardío.

Se determinó si el número de copias del alelo ε4 se asocia con un mayor riesgo de EA, por lo que se realizó el cálculo de OR con un intervalo de confianza de 95% para 0, 1 y 2 copias del alelo ε4 (Tabla 21 y 22).

Tabla 21. Dosis génica del alelo ε4 en pacientes con EA, EA de inicio temprano y EA de inicio tardío.

Número de copias del alelo ε4	Pacientes con EA	Pacientes con EA de inicio temprano	Pacientes con EA de inicio tardío
0	34	27	7
1	17	8	9
2	4	2	2

Tabla 22. Odds ratio (IC 95%) de los genotipos (con respecto al número de alelos $\epsilon 4$) y alelos ApoE en EA, EA de inicio temprano y EA de inicio tardío.

Genotipo	EA	EA de inicio temprano	EA de inicio tardío	Alelo	EA	EA de inicio temprano	EA de inicio tardío
3/3 + 3/2 + 2/2 (0 copias del alelo $\epsilon 4$)	0.2656 (0.1326-0.5319) p=0.0002	0.4401 (0.2149-0.9015) p=0.0249	0.1128 (0.0571-0.2228) p<0.0001	$\epsilon 2$	0.3266 (0.0334-3.1946) p=0.3362	0.1960 (0.0093-4.1353) p=0.2949	0.7423 (0.1618-3.4052) p=0.7014
3/4 + 2/4 (1 copia del alelo $\epsilon 4$)	2.7598 (1.3621-5.5920) p=0.0048	1.7326 (0.8293) p=0.1437	5.6667 (2.8866-11.1241) p<0.0001	$\epsilon 3$	0.3519 (0.1583-0.7818) p=0.0103	0.5833 (0.2508-1.3569) p=0.2108	0.1933 (0.0918-0.4069) p<0.0001
4/4 (2 copias del alelo $\epsilon 4$)	16.1230 (0.9082-286.2394) p=0.0582	11.5759 (0.6315-212.2057) p=0.0989	25.8268 (1.5003-444.6032) p=0.0251	$\epsilon 4$	3.9685 (1.6161-9.7447) p=0.0026	2.5306 (0.9926-6.4519) p=0.0518	7.4732 (3.1310-17.8373) p<0.0001

Frecuencias genotípicas por edad de inicio

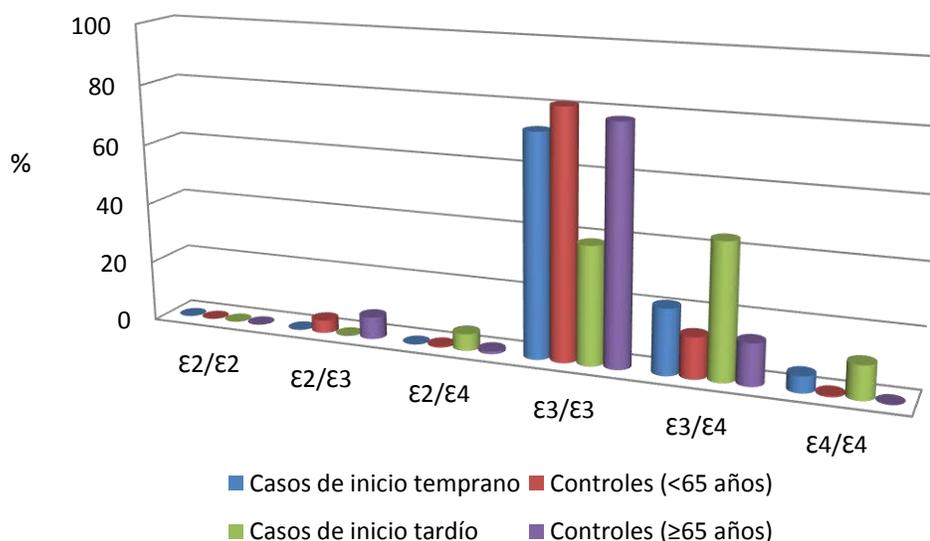


Fig. 26. Frecuencias observadas para cada genotipo en casos con EA de inicio temprano y EA de inicio tardío con sus respectivos controles. Las frecuencias están expresadas en porcentaje.

Frecuencias alelicas por edad de inicio

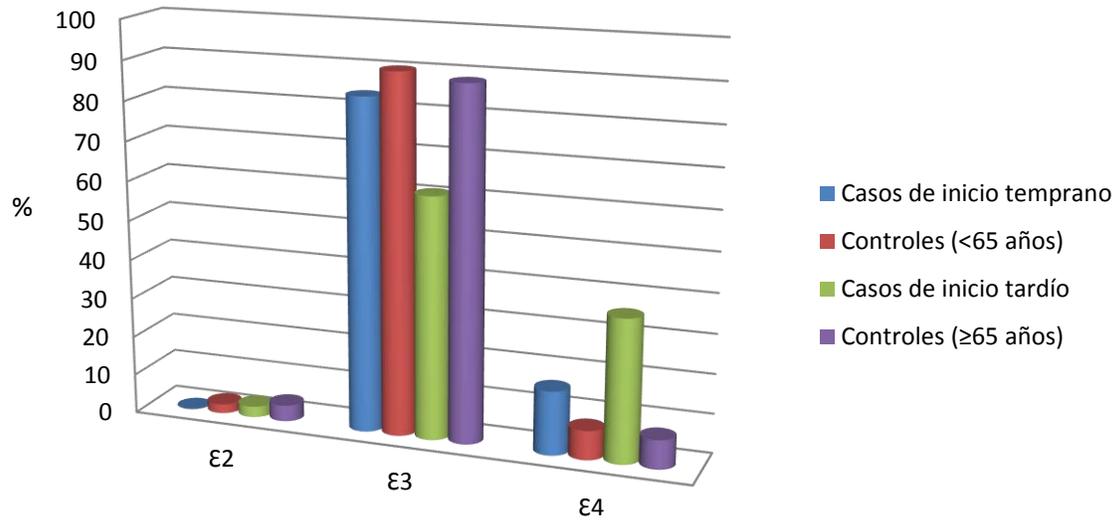


Fig. 27. Frecuencias observadas para cada alelo en casos con EA de inicio temprano y EA de inicio tardío con sus respectivos controles. Las frecuencias están expresadas en porcentaje.

La frecuencia del alelo ε4 muestra diferencias estadísticamente significativas en los casos con EA de inicio temprano en comparación con el grupo control (<65 años) (χ^2 3.9794 $p=0.046061$) (OR 2.53, IC 95% 0.99-6.45), por lo que se comprobó una asociación entre el alelo ε4 con el inicio temprano. No se encontraron diferencias significativas en los alelos ε3 y ε2 en comparación con el grupo control.

Al comparar la frecuencia del alelo ε4 entre casos de inicio tardío y controles (≥65 años) se encontró una diferencia estadística significativa (χ^2 24.9148 $p=0.000001$) (OR 7.47, IC 95% 3.13-17.83), siendo mayor esta asociación entre el alelo ε4 y el inicio tardío de la EA. No se encontraron diferencias significativas en el alelo ε2 en comparación con los controles.

Así mismo, al comparar la frecuencia del alelo ε4 entre los casos con EA de inicio temprano y los casos de EA de inicio tardío se encontró una diferencia significativa (χ^2 10.39 $p= 0.001264$), siendo mayor la frecuencia de este alelo en los casos de inicio tardío.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias del alelo $\epsilon 2$.

Se determinó si el número de copias del alelo $\epsilon 4$ se asocia con una edad de inicio de la EA más temprana, por lo que se comparó la edad de inicio promedio en la muestra total de pacientes con EA, así como por el grupo de EA de inicio temprano y el grupo de EA de inicio tardío (Tabla 23).

Tabla 23. Dosis génica del alelo $\epsilon 4$ y edad de inicio promedio en la EA, EOAD y LOAD.

Número de copias	Edad de inicio promedio en EA (años) (p=0.30)	Edad de inicio promedio en EOAD (años) (p=0.79)	Edad de inicio promedio en LOAD (años) (p=0.01)
0	55.4	50	76.3
1	61	51.7	69.2
2	57	48.5	65.5

IX DISCUSIÓN

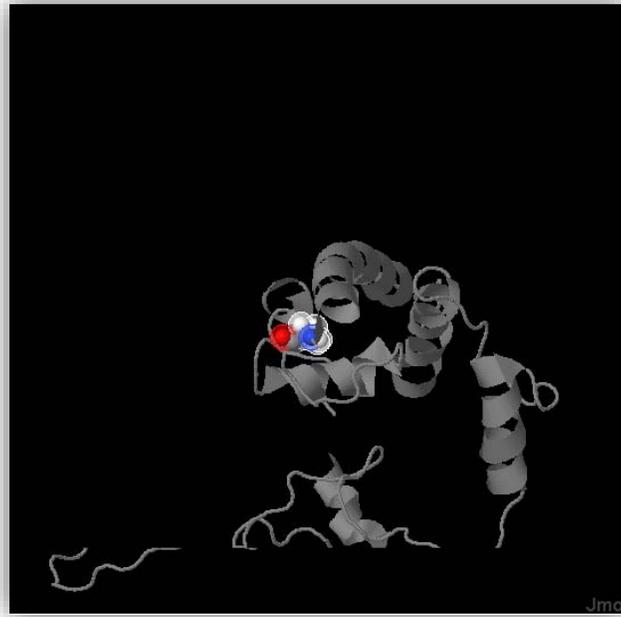
De los 55 pacientes analizados, cuatro presentaron la mutación A431E, dos la mutación E318G y 49 no presentaron mutación en los exones analizados del gen *PSEN1*, representando un total del 30% en la EA familiar de inicio temprano, estos datos parecen indicar que la incidencia de mutaciones en *PSEN1* descrita en la literatura (50% a 70%) esta sobreestimada o es propia de poblaciones diferentes a la población mexicana.

En cuanto a los polimorfismos del gen *APOE*, el 22.7% del total de la muestra analizada presentó el alelo $\epsilon 4$ de riesgo ya sea en su forma homocigota (4.3%) o heterocigota (18.4%). Estos datos muestran que la frecuencia de este alelo en la población mexicana con EA, es baja en comparación con la reportada en la literatura para otras poblaciones como la caucásica, en la cual es de ~40%, pero similar a las poblaciones asiáticas ~25% (21, 22, 54, 57, 58, 59, 60), lo cual podría deberse también a la baja frecuencia de este alelo en el grupo control determinado de población mestizo mexicana (7.39%).

Como se muestra en la tabla 17, la mutación A431E es no sinónima y se encontró en casos familiares de EA de inicio temprano, los cuales tenían un promedio de edad de inicio de 41.5 años (rango: 33-45 años), y un patrón de herencia autosómico dominante. Los cuatro pacientes identificados con esta mutación corresponden al 7.27% del total de casos de EA analizados y al 13.79% de las formas familiares del total de la muestra. Esta mutación ya había sido reportada anteriormente por Yescas y cols. en 9 familias del estado de Jalisco (70), demostrándose un efecto fundador en esta región. Sin embargo, como se muestra en la tabla 16 solo uno de estos nuevos casos es originario de Jalisco, dos son de Guanajuato y uno de Michoacán, por lo que habría que confirmar si existe también en estos nuevos casos un alelo en común, lo cual reforzaría este efecto fundador, ya que pudieron nacer en otra entidad y sin embargo sus padres o abuelos podrían ser originarios del Edo. de Jalisco.

Esta mutación se encuentra en el C-terminal de la proteína, entre los dominios transmembranales 8 y 9 además de que el aminoácido alanina en la posición 431 está ampliamente conservado entre las especies. Empleando el programa *PolyPhen-2* (71), en el cual se pueden predecir las consecuencias funcionales de la proteína debidas a un cambio de aminoácido, se determinó que el cambio de citosina (C) en el codón GCA por adenina (A) GAA, dando como resultado un cambio de aminoácido en el codón 431 de la secuencia de la proteína, de una alanina por un ácido glutámico (A431E) es probablemente perjudicial para la función de la proteína con una puntuación de 1,000 (sensibilidad: 0,00; especificidad: 1.00) (Fig. 28). En la figura 28 se muestra la ubicación espacial de esta mutación.

A)



B)

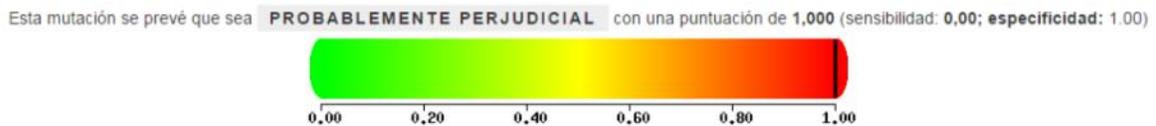


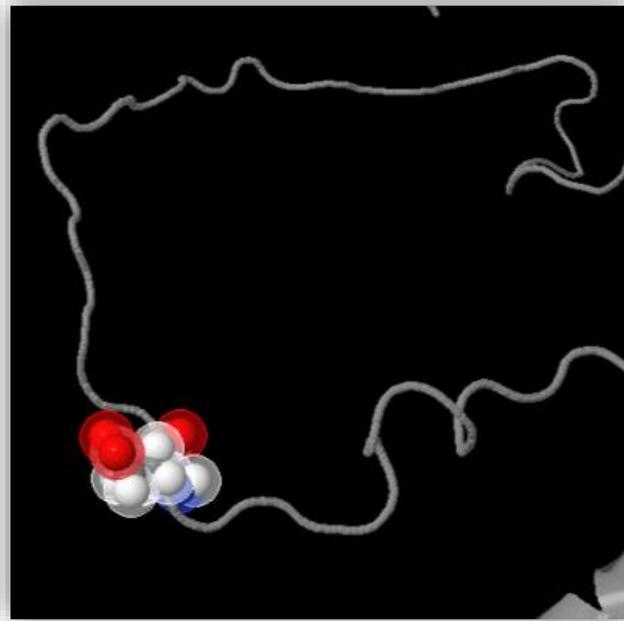
Fig. 28. (A) Ubicación espacial de la mutación A431E. (B) Análisis con el programa *PolyPhen-2*, donde de acuerdo a la escala nos indica que este cambio es perjudicial o dañino (71)

El mecanismo por el cual esta mutación ejerce un efecto perjudicial aún no está claro, sin embargo se sabe que las mutaciones nocivas en *PSEN1* pueden alterar la función carboxipeptidasa de γ -secretasa aumentando así la relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (40). En un estudio realizado por Portelius, en el cual se midió la concentración de isoformas $A\beta$ en el LCR en 7 pacientes portadores de la mutación A431E, mostró que los portadores de esta mutación manifestaron niveles significativamente bajos de $A\beta_{37}$, $A\beta_{38}$ y $A\beta_{39}$, los cuales son solubles y no se agregan, comparados con los niveles de $A\beta_{40-42}$ a.á., los cuales son insolubles y se agregan. Estos fragmentos son liberados normalmente por la actividad del complejo γ -secretasa, lo que sugiere que esta mutación podría modular la función de γ -secretasa modificando el sitio normal de escisión en $A\beta$ -PPA (Gly 37, Gly 38 y Val 39), sugiriendo una pérdida de efecto de función que lleva a una abundancia relativa de la agregación de $A\beta_{1-42}$ (72).

En el exón 9 se identificó la mutación no sinónima E318G, como se muestra en la tabla 16 y corresponde a dos casos familiares de EA de inicio temprano, los portadores de esta mutación presentan un promedio de inicio de los síntomas de 50.5 años (rango: 40-60 años). Los 2 pacientes que portan esta mutación corresponden al 3.63% de todos los casos de EA analizados y al 6.89% de las formas familiares.

Esta mutación está situada en la parte intermedia del bucle hidrofílico de PSEN1 en un residuo poco conservado entre las especies. Empleando el programa *PolyPhen-2* (70), se determinó que la sustitución de una adenina en el codón 318 (GAA) por una guanina (GGA), la cual da como resultado el cambio de aminoácido, de ác. glutámico (E) por glicina (G), lo que origina la mutación E318G, la cual no resulta perjudicial para la función de la proteína. En la figura 29, se muestra la ubicación espacial de la proteína.

A)



B)

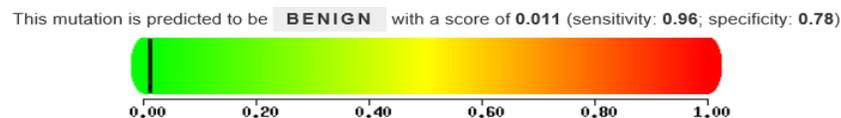


Fig. 29. (A) Ubicación espacial de la mutación E318G. (B) Análisis con el programa *PolyPhen-2*, donde de acuerdo a la escala nos indican que este cambio es perjudicial o dañino. (71)

Esta variante génica ya ha sido descrita como una mutación causal con penetrancia reducida en algunas familias y se ha considerado como un polimorfismo benigno, debido a que ha sido hallada en individuos no demenciados, además de que se ha demostrado que no incrementa la generación de A β (1-42) en modelos celulares (72). Sin embargo existen contradicciones, algunos autores han asociado esta variante como un polimorfismo de riesgo para padecer EA, esto ha sido demostrado en la población australiana, italiana y finlandesa (73, 74, 75). Además, se ha relacionado con el alelo ϵ 4 de *APOE* estableciendo una mayor susceptibilidad para padecer la EA ya que la interacción de la mutación E318G con el alelo ϵ 4 de *APOE*, aumenta la deposición A β 42 (76).

Como se muestra en la tabla 17, los casos portadores de la mutación E318G en este estudio no se encuentran influenciados por el alelo ϵ 4 de *APOE*, ya que son portadores homocigotos del alelo ϵ 3, por lo que no se puede relacionar que esta variante influya sobre la sustitución E318G. Sin embargo, los dos casos se tratan de formas familiares, por lo que resultaría de importancia realizar un tamizaje en la familia para ver su segregación y evaluar un grupo control sano para conocer su frecuencia y determinar si se trata de un polimorfismo de riesgo poco frecuente.

Con respecto al polimorfismo *APOE*, en el grupo control se encontró que el alelo ϵ 3 fue el más frecuente (0.879), seguido por el alelo ϵ 4 (0.0739) y el alelo ϵ 2 (0.029). La frecuencia del alelo ϵ 3 es similar a las frecuencias de este mismo alelo pero en otras poblaciones: Caucásicos (0.80), colombianos (0.852), brasileños (0.840), cubanos (0.80), asiáticos (0.885) y australianos (0.74), a diferencia de las frecuencias en: africanos (0.662) y afroamericanos (0.668). Así mismo, se observó una frecuencia baja del alelo ϵ 2 comparada con otras poblaciones: Caucásicos (0.08), brasileños (0.120), chilenos (0.190), ecuatorianos (0.280), cubanos (0.130), africanos (0.114), afroamericanos (0.13) y asiáticos (0.09) y similar a la observada en peruanos (0.050) y australianos (0.007). Así mismo, la frecuencia del alelo ϵ 4 también es baja comparada con otras poblaciones: africanos (0.204), australianos (0.189) y caucásicos (0.123) sin embargo, es similar a la observada en las poblaciones asiáticas (0.074), colombianos (0.068) y costarricenses (0.060) (50, 77, 78, 90).

En la muestra total de casos con EA el alelo ϵ 3 también fue el más frecuente (0.763), seguido por el alelo ϵ 4 (0.227) y el alelo ϵ 2 (0.009). La frecuencia del alelo ϵ 4 es una de

las más bajas en comparación con las frecuencias halladas en enfermos de Alzheimer en otras poblaciones como en la caucásica (0.367) y afroamericana (0.322), sin embargo, es similar en Japoneses (0.278) (79, 80, 81, 82, 83, 84), lo cual podría ser explicado debido a la baja frecuencia de este alelo en la población control de la muestra estudiada. Al comparar las frecuencias del alelo $\epsilon 4$ en los casos con EA (0.227) y el grupo control (0.07) se encontraron diferencias estadísticamente significativas (χ^2 10.0392 $p=0.001532$) (OR 3.96, IC 95% 1.6161-9.7447), corroborando así el papel del alelo $\epsilon 4$ como factor de riesgo para la EA (48), con un riesgo de cuatro veces mayor en los portadores de este alelo ya sea de manera homocigota u heterocigota que en los no portadores. La OR en no portadores del alelo $\epsilon 4$ fue de 0.2656 (IC 95% 0.1326-0.5319), en los portadores de un alelo $\epsilon 4$ fue de 2.7596 (IC 95% 1.3621-5.5920) y en los portadores de dos alelos $\epsilon 4$ fue de 16.1230 (IC 95% 0.9082-286.2394). Estos datos indican que el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, incrementa el riesgo para la EA en la población estudiada en una manera dosis dependiente, de manera similar que en caucásicos, iraníes, japoneses y chinos (78, 83, 86).

Al dividir en los grupos por edad de inicio de la enfermedad, se encontró que tanto el grupo de EA de inicio temprano como el grupo de EA de inicio tardío muestran diferencias en las frecuencias del alelo $\epsilon 4$, al compararse con sus respectivos controles se muestra significancia estadística: (χ^2 3.97 $p=0.046061$) (OR 2.53, IC 95% 0.9926-6.4519) para el grupo de EA de inicio temprano y (χ^2 24.91 $p=0.000001$) (OR 7.47, IC 95% 3.1310-17.8373) para el grupo de EA de inicio tardío, hay una pequeña diferencia estadística comparando con los casos de inicio tardío en donde se muestra su efecto. Mientras que el efecto protector del alelo $\epsilon 2$ en esta muestra estudiada no muestra diferencias estadísticamente significativas en ambos, debido también a la baja frecuencia de este alelo en la muestra estudiada, por lo cual se tendría que ampliar la muestra para determinar si el alelo $\epsilon 2$ se relaciona con un efecto protector de baja frecuencia en la población mexicana (49).

Por otro lado, se sabe que el alelo $\epsilon 4$ funciona como un factor de riesgo mediante la disminución de la edad de inicio en una manera dependiente de la dosis (21, 22), sin embargo, en la muestra total de pacientes con EA general y EA de inicio temprano no fue evidente esta asociación. En el caso de los pacientes con EA de inicio tardío se demostró esta asociación siendo la edad de inicio en los homocigotos para el alelo $\epsilon 4$, 10.7 años

más temprana que en los no portadores de este alelo, con una significancia estadística ($p=0.01$), por lo que para esta muestra el alelo $\epsilon 4$ funciona como un factor de riesgo mediante la disminución de la edad de inicio en una manera dependiente de la dosis solo en los casos de EA de inicio tardío. Estos datos coinciden con los resultados de otros estudios (91), que han descrito que el riesgo conferido para el alelo $\epsilon 4$ modifica la edad de inicio de la EA, observándose una mayor influencia de este alelo en las formas de inicio tardío, por lo que resulta importante conocer la frecuencia de este alelo en la población, dado que el mayor número de casos son esporádicos.

En México se requieren estudios epidemiológicos que nos permitan conocer la incidencia y prevalencia de la EA, de esta manera podríamos saber si la baja frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en la población general está relacionada con una baja incidencia en la EA.

A pesar de que el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* es considerado como un factor de riesgo para desarrollar la EA en la muestra estudiada, se ha establecido que la genotipificación de este polimorfismo no debe usarse como un único valor para predecir el futuro riesgo de la EA o para su diagnóstico (85).

X CONCLUSIONES

Se identificó la mutación A431E en cuatro pacientes y la mutación E318G en dos pacientes correspondientes al 30% de las formas familiares de inicio temprano de la EA en la muestra estudiada, estas mutaciones han sido reportadas anteriormente.

La mutación A431E es causa de la EA de inicio temprano, esta mutación tiene un efecto fundador, mientras que la mutación E318G puede actuar como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA.

El alelo $\epsilon 4$ de *APOE* es un factor de riesgo para el desarrollo de la EA, siendo de mayor susceptibilidad en casos de inicio tardío para la muestra estudiada, sin embargo, no puede tomarse como un único valor de diagnóstico o predictivo de la EA.

La EA es una enfermedad multifactorial, en la cual intervienen factores de susceptibilidad genética así como factores ambientales, en los pacientes en los que no se encontraron mutaciones en el gen *PSEN1* o el polimorfismo de riesgo *APOE* $\epsilon 4$, no se descarta que sean debidos a otras variantes génicas no analizadas en este estudio.

XI PERSPECTIVAS

Es importante realizar este tipo de estudios para establecer una definición más confiable de la enfermedad, así como un diagnóstico precoz en las fases más tempranas, además de implementar estrategias preventivas en las fases iniciales de la enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, se ha comprobado que la mutación A431E presenta un efecto fundador en familias del estado de Jalisco, con un promedio de inicio de la enfermedad de alrededor de 40 años, en el presente estudio, solo uno de estos nuevos casos es originario del Edo. de Jalisco, dos son de Guanajuato y un caso de Michoacán, por lo que se debe de confirmar si existe también en estos nuevos casos un alelo en común. A partir de esto, se propone que para todos los pacientes con diagnóstico probable de EA de inicio temprano en este estado y en el área circundante, la aproximación molecular inicial debe ser a partir de la detección de esta mutación, con el fin de brindar un adecuado asesoramiento a las familias en riesgo e implementar medidas para mitigar la enfermedad, como puede ser mediante el diseño y la administración de fármacos en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad.

En el caso de la mutación E318G, es necesario realizar un tamizaje familiar para ver su segregación y evaluar un grupo control sano para descartar que se trate de un polimorfismo en la población mexicana.

En la muestra total estudiada se comprobó que el alelo $\epsilon 4$ causa susceptibilidad para la EA, en una manera dependiente de la dosis génica, siendo mayor esta asociación en portadores de dos alelos $\epsilon 4$ y casos de inicio tardío, sin embargo, no se asoció el alelo $\epsilon 2$ con un efecto protector para la EA como lo reportado en otros estudios (49), por lo que se propone ampliar la muestra para conocer si este alelo muestra un efecto protector de baja frecuencia en la población mexicana.

XII BIBLIOGRAFÍA

1. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H. 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*. 349:1546-1549.
2. Katzman R, Bick K. 2000. Alzheimer Disease: The Changing View. Ed. Academic Press. Chapter 1.
3. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Nat Rev Neurol*. 7(3):137-152.
4. Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe M, Dodel R, Leyhe T, Bertram L, Hoffmann W, Faltraco F. 2011. The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Progress in Neurobiology*. 95:718-728.
5. Mejia-Arango S, Gutierrez L. M. 2011. Prevalence and Incidence Rates of Dementia and Cognitive Impairment No Dementia in the Mexican Population: Data from the Mexican Health and Aging Study. *J Aging Health*. 23(7):1050-1074.
6. INNN (MVS)-2015. Enfermedad de Alzheimer. Recuperado el 17 de noviembre de 2015, de <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html>
7. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. 2011. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci*. 32:275-279.
8. OMS-2014 Demencia. Recuperado el 10 de septiembre de 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
9. American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4^a ed. Washington D.C. American Psychiatric Association, 1994.
10. Sarazin M, Cruz de Souza L, Lehérecy S, Dubois B. 2012. Clinical and Research Diagnostic Criteria for Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America*. 22:23-32
11. Bermejo P. F, Floriach R. M, Muñoz G. D. 2003. Enfermedad de Alzheimer. Concepto y Manifestaciones Clínicas. *Medicine*. 8(101):5432-5440.
12. Franco M. E, Suárez G. A, Bustamante R. A, Gil N. E. 2011. Enfermedad de Alzheimer. *Medicine*. 10(76):5129-37

13. Dickson D. 2001. Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias. *Alzheimer's Disease and Dementia*. 17(2): 209-228.
14. Mott R. T, Hulette C. M. 2005. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America*. 15: 755-765.
15. Vickers J. C, Dickson T. C, Adlard P. A, Saunders H. L, King C. E, McCormack G. 2000. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 60: 139-165.
16. Harrington C. R. 2012. The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America*. 22: 11-22.
17. Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 67:195-203.
18. Zou Z, Liu C, Che C, Huang H. 2014. Clinical Genetics of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 2014:1-10
19. Antonell A, Lladó A, Almirante J, Botta-Orfila T, Balasa M, Fernández M, Ferrer I, Sánchez-Valle R, Molinuevo J. L. 2013. Preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 34: 1772-1778.
20. Alonso V. M. E, López-López M, Yescas-Gómez P. 2012. Genetics of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*. 43:622-631.
21. Chouraki V, Seshadri S. 2014. Genetics of Alzheimer's Disease. In Friedmann t, Dunlap J. C, Goodwin S. F. Chouraki V, Seshadri S. *Advances in Genetics*. Ed. Academic Press/Elsevier. Primera Edición. Capítulo 5.
22. Bertram L, Tanzi R. E. 2012. The Genetics of Alzheimer's Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Ed. Academic Press/Elsevier. Capítulo 3.
23. Walsh D, Teplow D. B. 2012. Alzheimer's Disease and the Amyloid β -Protein. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Ed. Academic Press/Elsevier. Capítulo 4.
24. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. 2011. APP processing in Alzheimer's Disease. *Molecular Brain*. 4:1-13.

25. Nalivaeva N. N, Turner A. J. 2013. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters*. 587: 2046-2054
26. St George-Hyslop P. H, Petit A. 2004. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. 328: 119-130
27. Bignante E. A, Heredia F, Morfini G, Lorenzo A. 2013. Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β -induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 34: 2525-2537
28. Karch C. M, Cruchaga C, Goate A. M. 2014. Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron*. 3:11-26
29. Hardy J. A, Higgins G. A. 1992. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. 256: 184-185.
30. Hardy J, Selkoe D. J. 2002. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*. 297: 353-356.
31. Karran E, Mercken M, De Strooper B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews*. 10: 698-712.
32. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada C, Perez-Tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon M. N, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. 1996. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 383:710-713.
33. El Kadmiri N, Hamzi K, El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S. 2013. Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer. *Pathologie Biologie*. 61: 228-238.
34. St George-Hyslop P. H. 2000. Molecular Genetics of Alzheimer's Disease. *Society of Biological Psychiatry*. 47:183-199.
35. Fraser P. E, Yang D, Yu G, Lévesque L, Nishimura M, Arawaka S, Serpell L. C, Rogaeva E, St George-Hyslop P. 2000. Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502: 1-15.
36. Hutton M, Hardy J. 1997. The presenilins and Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 6(10): 1639-1646.
37. Czech C, Tremp G, Pradier L. 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology*. 60: 363-384.

38. Li H, Wolfe M. S, Selkoe D. J. 2009. Toward Structural Elucidation of the γ -Secretase Complex. *Structure (Cell Press)*. 17: 326-334.
39. Wakabayashi T, De Strooper B. 2008. Presenilins: Members of the γ -Secretase Quartets, But Part-Time Soloists Too. *Physiology*. 23: 194-204.
40. Wolfe M. S. 2013. Toward the structure of presenilina/ γ -secretase and presenilin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828: 2886-2897.
41. Bergmans B. A, De Strooper B. 2010. Γ -secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurology*. 9: 215-226.
42. St George-Hyslop P, Fraser P. E. 2012. Assembly of the presenilin γ -/ ϵ -secretase complex. *Journal of Neurochemistry*. 120(1):84-88.
43. Hass M. R, Sato C, Kopan R, Zhao G. 2009. Presenilin: RIP and beyond. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20: 201-210.
44. Parks A. L, Curtis D. 2007. Presenilin diversifies its portfolio. *Trends in Genetics*. 23(3): 140-150.
45. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y. 2009. γ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of β -Carboxyl Terminal Fragment. *The Journal of Neuroscience*. 29(41): 13042-13052.
46. "Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Data Base". <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>.
47. Wolfe M. S. 2013. Presenilin 1. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Ed. Academic Press/Elsevier. Tercera Edición. Capítulo 65.
48. Strittmatter W. J, Saunders A. M, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen G. S, Roses A. D. 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amiloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:1977-1981.
49. Corder E. H, Saunders A. M, Risch N. J, Strittmatter W. J, Schmechel D. E, Gaskell P. C, Rimmler J. B, Locke P. A, Conneally P. M, Schmechel K. E, Small G. W, Roses A. D, Haines J. L, Pericak-Vance M. A. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics* 7:180-184.

50. Moreno V. A, Cartagena P. A. E, Pabón G. M. 2006. Apolipoproteína E y Enfermedad Cardiovascular. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb.* 54(1):53-65
51. García C. A. M. 2003. La Apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *Revista Colombiana de Cardiología.* 10(4):189-193.
52. Dominiczak M. H. 2000. Apoproteins and Lipoproteins in Human Plasma. In Rafai N, Warnick G. R, Dominiczak M. H. *Handbook of Lipoprotein Testing.* Ed. Amer Assoc for Clinical Chemistry. Segunda Edición. Capítulo 1.
53. Benlian P. 2012. Apolipoprotein E. In *Genetics of Dyslipidemia.* Ed. Springer US. 2a. Edición. Capítulo 2.2.23
54. Wolf A. B, Caselli R. J, Reiman E. M, Valla J. 2012. *APOE* and neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 30:1-11.
55. Huang Y, Mahley R. W. 2014. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Disease.* 72:3-12.
56. Hatters D. M, Peters-Libeu C. A, Weisgraber K. H. 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 31(8):445-454.
57. Kim J, Basak J. M, Holtzman D. M. 2009. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 63:287-303.
58. Kanekiyo T, Xu H, Bu G. 2014. ApoE and A β in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners?. *Neuron.* 81:287-303.
59. Michaelson D. M. 2014. *ApoE* ϵ 4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* 10:861-868.
60. Houlden H, Crook R, Backhovens H, Prihar G, Baker M, Hutton M, Rossor M, Martin J. J, Broeckhoven C. V, Hardy J. 1998. ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset alzheimer's disease families. *American Journal of Medical Genetics.* 81(1):117-121.
61. Poirer J, Miron J, Picard C, Gormley P, Tréroux L, Breitner J, Dea D. 2014. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 35:S3-S10.

62. Reinvang I, Espeseth T, Westlye L. T. 2013. *APOE*-related biomarker profiles in non-pathological aging and early phases of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 37:1322-1335.
63. Hauser P. S, Narayanaswami V, Ryan R. O. 2011. Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Progress in Lipid Research*. 50:62-74.
64. Chen J.H, Lin K. P, Chen Y. C. 2009. Risk factors for Dementia. *J Formos Med Assoc*. 108 (10): 754-764.
65. Martínez Lage J. M. 2002. Factores de riesgo y de protección de enfermedad de Alzheimer. In *Fronteras en la enfermedad de Alzheimer*. Ed. Farmaindustria. Cap. 2.
66. Flórez J. 2010. Enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. *Revista Síndrome de Down*. 27:63-76.
67. Suay L. L, Ballester D. F. 2002. Revisión de los estudios sobre exposición al aluminio y enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Salud Pública*. 76:645-658.
68. Cruts M, van Duijin C. M, Bachhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, George-Hyslop P. H, Hofman A, Van B. C. 1998. Estimation of the genetic contribution of presenilina-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Human Molecular Genetics*. 7(1):43-51.
69. Hixon J. E, Vernier D. T. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *Journal of Lipid Research*. 31:545-548.
70. Yescas P, Huertas-Vazquez A, Villarreal-Molina M. T, López M, Canizales-Quinteros S, Alonso M. A. 2006. Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families. *Neurogenetics* 7:195-200.
71. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs <http://genetics.bwh.harvard.edu/>
72. Portelius E, Andreasson U, Ringman J. M, Buerger K, Daborg J, Buchhave P, Hansson O, Harmsen A, Gustavsson M. K, Hanse E, Galasko D, Hampel H, Blennow K, Zetterberg H. 2010. Distinct cerebrospinal fluid amyloid β peptide signatures in sporadic and *PSEN1* A431E-associated familial Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 5(2):1-10.

73. Taddei K, Fisher C, Laws SM, Martins G, Paton A, Clarnette RM, Chung C, Brooks WS, Hallmayer J, Miklossy J, Relkin N, St George-Hyslop PH, Gandy SE, Martins RN. 2002. Association between presenilina-1 Glu318Gly mutation and familial Alzheimer's disease in the Australian population. *Molecular Psychiatry*. 7:776-781.
74. Albani D, Roiter I, Artuso V, Batelli S, Prato F, Pesaresi M, Galimberti D, Scarpini E, Bruni A, Franceschi M, Piras M. R, Confaloni A, Forloni G. 2007. Presenilin-1 mutation E318G and familial Alzheimer's disease in the Italian population. *Neurobiology of Aging*. 28:1682-1688.
75. Helisalmi S, Hiltunen M, Mannermaa A, Koivisto A. M, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Ryyanen M, Soininen H. 2000. *Neuroscience Letters*. 278:65-68.
76. Benitez B. A, Karch C. M, Cai Y, Jin S. C, Cooper B, Carrell D, Bertelsen S, Chibnik L, Schneider J. A, Bennett D. A, ADNI, GERAD1, Fagan A. M, Holtzman D, Morris J. C, Goate A. M. 2013. The *PSEN1*, p.E318G Variant Increases the Risk of Alzheimer's Disease in *APOE-ε4* Carriers. *PLOS Genetics* 9(8):1-15
77. Hallman D. M, Boerwinkle E, Saha N, Sandholer C, Menzel H. J, Császár A, Utermann G. 1991. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 338-349.
78. Raygani A. V, Zahrai M, Raygani A. V. Doosti M, Javadi E, Rezaei M, Pourmotabbed T. 2005. Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neuroscience Letters* 375 1-6.
79. Adroer R, Santacruz P, Blesa R, López-Pousa S, Ascaso C, Oliva R. 1995. Apolipoprotein E4 allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neuroscience Letters*. 189: 182-186.
80. Woong K. K, Hyeong J. J, Uk L. K, Young L. D, Hie L. J, Youn Y. J, Jae L. B, Hee H. S, Inn W. J. 1999. Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in Koreans. *Neuroscience Letters*. 277: 145-148.
81. Friedman G, Gabizon R, Ben-Yehuda A. 1997. Apolipoprotein Eε4 allele, a risk factor for late onset nonfamilial Alzheimer's disease among Israeli Jews. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 24: 175-181.
82. Nunomura A, Chiba S, Eto M, Saito M, Makino I, Miyagishi T. 1996. Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to early- and late-onset sporadic Alzheimer's disease in Hokkaido, the northern part of Japan. *Neuroscience Letters*. 206: 17-20.

83. Chen L, Baum L, Ho-Keung N. G, Chan L. Y. S, Pang C. 1999. Apolipoprotein E Genotype and Its Pathological Correlation in Chinese Alzheimer's Disease With Late Onset. *Human Pathology*. 30(10): 1172-1177.
84. Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Latocarra S. Gobbini I, Bracco L, Piacentini S, Amaducci L. 1994. ApoE allele frequencies in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 177: 100-102.
85. *National Institute on Aging/Alzheimer's Association Working Group*. 1996. Apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease. *The Lancet*. 347: 1091-1095.
86. Farrer L. A, Cupples A, Haines J. L, Hyman B, Kukull W. A, Mayeux R, Myers R. H, Pericak-Vance M. A, Risch N, van Duijn C. M. 1997. Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. A Meta-analysis. *JAMA*. 278(16):1349-1356.
87. Rogaev E. I, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva E. A, Chi H, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw W. J, de Jong P. J, Fraser P. E, Rommens J. M, St. George-Hyslop P. 1997. Analysis of the 5' sequence, genomic structure and alternative splicing of the presenilin 1 gene associated with early onset Alzheimer's disease. *Genomics* 40:415-424.
88. Tolia A, Horré K, De Strooper B. 2008. Transmembrane Domain 9 of Preseniline Determines the Dynamic Conformation of the Catalytic Site of γ -Secretase. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(28): 19793-19803.
89. Miller S. A, Dykes D. D, Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3): 1215.
90. Marca V, Acosta O, Cornejo-Olivas M, Ortega O, Huerta D, Mazzetti P. 2011. Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en una población peruana. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 28(4): 589-594.
91. Frisoni G, Manfredi M, Geroldi C, Binetti G, Zanetti O, Bianchetti A, Trabucchi M. 1998. The prevalence of apoE- ϵ 4 in Alzheimer's disease is age dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 65:103-106.
92. Ensembl. Recuperado el 19 de octubre de 2016. <http://www.ensembl.org/>.
93. Corona V. T, Medina M. M. E, Ostrosky W. P, Sarti G. E. J, Uribe Z. P. 2014. La mujer y la salud en México. In Trujillo Z, Corona T. Deterioro cognitivo y demencia en adultas mayores. Ed. Intersistemas. Primera edición. Capítulo 16.

XII APÉNDICE

a) Índice de tablas

Tabla 1. Genes causantes de Enfermedad de Alzheimer Familiar

Tabla 2. Mutaciones por exón en el gen *PSEN1*

Tabla 3. Mutaciones por dominio en *PSEN1*

Tabla 4. Mutaciones por exón en el gen *PSEN2*

Tabla 5. Mutaciones por dominio en *PSEN2*

Tabla 6. Susceptibilidad de *APOE* para formas de EA no mendelianas

Tabla 7. Isoformas de la Apolipoproteína E y sus propiedades

Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR del gen *PSEN1*

Tabla 9. Condiciones generales empleadas para la amplificación de los exones 4-12 de *PSEN1*

Tabla 10. Reactivos empleados en la PCR del gen *APOE*

Tabla 11. Condiciones empleadas para la PCR del gen *APOE*

Tabla 12. Reactivos empleados para la reacción de secuenciación del gen *PSEN1*

Tabla 13. Condiciones de la reacción de secuenciación del gen *PSEN1*.

Tabla 14. Reactivos empleados para la restricción enzimática del gen *APOE*

Tabla 15. Reactivos empleados para la elaboración del gel de poliacrilamida

Tabla 16. Mutaciones identificadas en *PSEN1*

Tabla 17. Mutaciones en *PSEN1* y características de los portadores

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en individuos sanos y pacientes con EA

Tabla 19. Frecuencias genotípicas de los grupos por edad de inicio de pacientes y controles expresadas en porcentaje

Tabla 20. Frecuencias alélicas de los grupos por edad de inicio de pacientes y controles expresadas en porcentaje

Tabla 21. Dosis génica del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con EA, EA de inicio temprano y EA de inicio tardío

Tabla 22. Odds ratio de los genotipos y alelos ApoE en EA, EA de inicio temprano y EA de inicio tardío con respecto al número de alelos $\epsilon 4$

Tabla 23. Dosis génica del alelo $\epsilon 4$ y edad de inicio promedio en EA, EA de inicio temprano y EA de inicio tardío

b) Índice de figuras

Figura 1. Lesiones principales en la EA

Figura 2. Localización cromosómica del gen *PPA* en la región 21q21.1

Figura 3. Procesamiento de PPA

Figura 4. Hipótesis de la cascada amiloide

Figura 5. Ubicación del gen *PSEN1* en el cromosoma 14q24.3 y tamaño y transcrito del gen *PSEN1*

Figura 6. Ubicación del gen *PSEN2* en el cromosoma 1q42.1 y tamaño y transcrito del gen *PSEN2*

Figura 7. Topología de las presenilinas

Figura 8. Papel del TMD9 en la función catalítica de PSEN1

Figura 9. Complejo γ -secretasa

Figura 10. Ubicación del gen *APOE* en el cromosoma 19q13.2 y tamaño y transcrito del gen *APOE*

Figura 11. Estructura de apoE libre de lípidos

Figura 12. Interacción de dominio en la estructura de apoE

Fig. 13. Metodología general

Fig. 14. Patrones esperados de los genotipos *APOE*

Fig. 15. Género y edad de los pacientes con probable demencia tipo Alzheimer

Fig. 16. Distribución de la edad de inicio de la muestra estudiada

Fig. 17. Distribución de las formas familiares y esporádicas de la muestra estudiada

Fig. 18. Integridad del DNA genómico

Fig. 19. Resolución de los productos de PCR de los exones 4-12 del gen *PSEN1*

Fig. 20. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 12 de *PSEN1*

Fig. 21. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 9 de *PSEN1*

Fig. 22. Resolución de los productos de PCR del exón 4 del gen *APOE*

Fig. 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida en donde se muestran los cinco genotipos del gen *APOE* observados en pacientes y controles

Fig. 24. Frecuencias observadas para cada genotipo en casos con EA y controles expresadas en porcentaje

Fig. 25. Frecuencias observadas para cada alelo en individuos con EA e individuos sanos expresadas en porcentaje

Fig. 26. Frecuencias observadas para cada genotipo en casos con EA de inicio temprano y EA de inicio tardío con sus respectivos controles

Fig. 27. Frecuencias observadas para cada alelo en casos con EA de inicio temprano y EA de inicio tardío con sus respectivos controles

Fig. 28. Análisis bioinformático (PolyPhen) para la mutación A431E

Fig. 29. Análisis bioinformático (PolyPhen) para la mutación E318G