



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Expresión del Factor Silenciador Restringido (NRSF) y de la Colina Acetiltransferasa (CHAT) en tejido cerebral de pacientes con Enfermedad de Alzheimer: estudio *post mortem*

Tesis

que para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(ORIENTACIÓN NEUROCIENCIA)**

presenta

Rocío Elizabeth González Castañeda

Comité

Dr. Genaro Gabriel Ortíz (Director)

Dr. Andrés González Garrido

Dr. Emilio Gumá Díaz

Dra. Verónica Loera Castañeda (Asesora)

Guadalajara, Jalisco

Mayo de 2007

Dedicatorias

A Óscar, por que siempre has respetado mi trabajo, pese a que en ocasiones implique estar tanto tiempo fuera de casa, además por que a tu lado he encontrado todo, muchas gracias por todo el amor y apoyo incondicional que siempre me has brindado.

Ahora en especial dedico también este trabajo a mi pequeña diablita Daniela, por que desde que llegaste a mi vida todo ha sido diferente, eres mi motivo y mi mayor alegría.

A mis padres, por creer siempre en mí, por que sé que si algo tengo seguro es su amor y apoyo. Mamá, te agradezco infinitamente toda la ayuda con el cuidado de mi hija durante todas esas tardes de trabajo, sin tu ayuda este trabajo no se hubiera realizado.

A mis hermanos Tomás, Miguel, Alfonso y especialmente a Paty. Doy gracias a la vida por haber tenido la suerte de tenerlos como mi familia. Además aprovecho también para decirles a través de estas breves líneas que me llena de orgullo el saber que cada uno también trabaja arduamente para superarse y ser mejor cada día. Aprovecho para agradecer también a Ramiro y la "flaca" por todos los momentos buenos compartidos, su cariño y paciencia que tienen con Daniela.

Agradezco también a: Ing. Jorge, Betty y demás tíos, Por su apoyo y el cariño que le dan a Daniela, además por todo los momentos compartidos y que resultan difícil de olvidar!

También quiero dedicar este trabajo a alguien muy especial que me acompaña en los momentos difíciles y que siempre esta presente en mi memoria, me refiero a mi abuelita Ma. De Jesús, por que aunque no este físicamente con nosotros, su cariño y sus enseñanzas permanecerán para toda la vida.

Con cariño: Rocío E. González C.

Agradecimientos

A través de estas breves líneas, deseo expresar mi agradecimiento hacia todas aquellas personas e instituciones que contribuyeron con los soportes financieros, de infraestructura y académicos para hacer posible la materialización de este trabajo.

**Instituto de Neurociencias, programa de Doctorado en Ciencias del
Comportamiento (orientación Neurociencias), U de G.**

**Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), en particular al
Laboratorio de Desarrollo- Envejecimiento de la División de Neurociencias,
Instituto Mexicano del Seguro Social.**

Departamento de Anatomía Patológica, HE, CMNO, IMSS.

Departamento de Neurología, HE, CMNO, IMSS.

Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI)

Proyecto número 2005/1/I/148.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Becario No. 153614

Agradecimientos

Dr. Genaro Gabriel Ortiz. Por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por que a pesar de tener mucho trabajo siempre tiene tiempo de escucharnos. Le agradezco también por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo, Muchísimas gracias!!

Dr. Mario E. Flores Soto. Por que desde que te conocí nunca he visto una sola muestra de enojo ni desesperación cuando ayudas a otras personas. Es admirable la dedicación con que realizas tú trabajo, solamente me resta decirte de corazón que te deseo un camino lleno de éxito y felicidad, Mil gracias !!

Dr. Victor J. Sánchez González. El famoso "comelón" del grupo, sabes ha sido muy grato trabajar contigo ya que además de ser divertido siempre buscas la manera de compartir tus pinceladas de conocimiento. Te deseo mucha suerte con tus famosos priones y nuevamente sólo me resta decirte: ¡ Muchas gracias !

Dr. Óscar González Pérez. Por todo el apoyo que siempre me has brindado. Me siento orgullosa de haberte conocido, además quiero confirmarte que tus enseñanzas en el terreno de la investigación me han servido mucho. Te agradezco por los momentos agradables que en compañía de tu familia hemos compartido. Una vez más muchas gracias por ser mi maestro pero sobre todo mi amigo!

Dra. Verónica Loera Castañeda. Por esos días de trabajo y los momentos compartidos antes de tu partida, además por tu amistad y apoyo cuando recién llegue a este laboratorio, muchas gracias!!

Dr. Fermín Pacheco Moises Por que a pesar de tener poco tiempo de conocerlo, siempre nos ha transmitido su buena disposición para el trabajo en el laboratorio, por su apoyo y asesoría en la técnica de Western Blot. Muchas gracias!

Agradecimientos

M. en Cs. Alejandro B., Psic. Lucy Castro, MCP. Silvia, Quím. Armida, M. en Cs. Karim, M. en Cs. Alicia. Los integrantes más nuevos del laboratorio, pero no menos queridos, tengo mucho que agradecerles por contagiarme de su buen humor y su disposición incondicional para el trabajo ¡ Gracias !

Tec. Angélica González Ballesteros Por todos esos años que juntas hemos pasado ante distintas situaciones, por tu apoyo y amistad incondicional, mil gracias!! . **Tec. Margarita.** Siempre detallista en las fechas importantes, por tu apoyo y ánimo muchas gracias!

Dr. Andrés González y Dr. Emilio Gumá-Díaz, por ser parte de mi comité tutelar y por sus valiosas aportaciones para que este trabajo se realizara. ¡ Muchas gracias!

Mi último agradecimiento, pero no el menos importante, es para esas personas que tanto amo y dedico esta tesis. A mis **padres y hermanos**, por creer en mí y por todo el apoyo que siempre me han brindado de manera incondicional. A **Óscar** por tu amor y por que cuento contigo ante cualquier situación. A mi hija **Danielita**, por que desde que naciste me has permitido aprender que una de las cosas más importantes en la vida es el amor.

Rocío E. González C.

EA	Enfermedad de Alzheimer
ChAT	Proteína colina acetil-transferasa
CHAT	Gen colina acetiltransferasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
OMIM	On line Mendelian Inheritance in Man
Ac	Acetilcolina
Vach	Vesícula transportadora de acetilcolina
Ace	Enzima Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NRSF	Factor Silenciador Restrictivo Neuronal
NRSE	Elemento Silenciador Restrictivo Neuronal
H3	Histona 3
H4	Histona 4
OMS	Organización Mundial de la Salud
NINCDS	Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de Comunicación y Cerebrovasculares
ADRA	Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados
SNC	Sistema Nervioso Central
FHAs	Filamentos Helicoidales pareados
Tau	Proteína tau
Aβ	Proteína Amiloide
PPAβ	Proteína precursora de β Amiloide
ApoE	Apolipoproteína E
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
HSV1	Herpes virus tipo 1
ERO	Especies reactivas de oxígeno

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I.- Introducción	1
II.- Antecedentes	4
Enfermedad de Alzheimer	4
Prevalencia	4
Clínica	5
Diagnóstico	6
Alteraciones Neuropsicológicas en EA	6
Factores de Riesgo para el desarrollo de la EA	7
Factores Genéticos	7
Factores Ambientales	8
III. Neurotransmisión colinérgica y la EA	9
Sistema Colinérgico	9
Biosíntesis Colinérgica	10
Alteraciones del Sistema Colinérgico en EA	11
Regulación de la Expresión genética ChAT	13
IV.- Genes Silenciadores Restrictivos Neuronales	14
V.- Planteamiento del problema	19
VI.- Hipótesis	20
VII.- Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
VIII.- Material y método	21
Tipo de Estudio	21
Universo de Estudio	21
Consentimiento informado de la necropsia y toma del encéfalo	22
Análisis de Biología Molecular	23
Extracción del ARN total	24

Determinación de la cantidad y calidad del ARN	24
Transcriptasa Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	25
Normalización del gen GPADH	27
Determinación de proteína ChAT y NRSF	27
Western Blot	27
Análisis Estadístico	29
IX.- Resultados	30
Análisis Patológico	30
Análisis Microscópico	31
Análisis de los hallazgos genético moleculares	32
A) Expresión genética del ARNm de CHAT y NRSF	33
Corteza Frontal	33
Corteza Temporal	34
Corteza Entorrinal	37
Corteza Parietal	39
B) Expresión de los niveles de proteína de ChAT y NRSF	41
Corteza Frontal	41
Corteza Temporal	42
Corteza Entorrinal	43
Corteza Parietal	44
C) Análisis Regional de CHAT y NRSF en Controles y EA	45
X.- Discusión	51
XI.- Conclusiones	62
XII.- Limitaciones y Perspectivas del estudio	63
XII. Bibliografía	65
Anexos	76

Introducción: Una de las principales alteraciones bioquímicas implicadas en la etiopatogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (EA) es la disminución de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Evidencias recientes muestran que el gen de la ChAT puede ser regulado por un factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF). **Objetivo.** Evaluar la expresión genética y proteica de la ChAT y NRSF en corteza frontal, temporal, entorrinal y parietal de pacientes con EA. **Materiales y método.** Se incluyeron un total de 4 pacientes con EA y 4 pacientes control. Se extrajeron 100 mg de tejido cerebral y se homogenizó para la extracción del ARNm total por el método de isotiocianato de guanidina. Para registrar los niveles de expresión genética se realizó la técnica de Transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para la determinación de proteína de ChAT y NRSF se obtuvieron 100 gr. de tejido cerebral, se cuantificaron proteínas por el método de Lowry y se determinaron mediante Western Blot. **Resultados:** La expresión del gen *CHAT* en forma global fue menor en un 39% en el grupo con EA vs. control ($p < 0.05$, U) y los niveles de su proteína se redujeron en un 17 % en el grupo con EA vs. control ($p = 0.02$, U). La expresión genética de *NRSF* se aumentó en un 86% en el grupo con EA en comparación con el control ($p = 0.001$). En contraparte, los niveles de la proteína NRSF aumentaron en un 57% en el grupo con EA ($p > 0.05$). **Conclusión:** En la Enfermedad de Alzheimer existe una mayor expresión proteica de NRSF que condiciona niveles bajos de la expresión genética de *CHAT*.

ABSTRACT

Decreased choline acetyltransferase (ChAT) brain levels is one of the main biochemical disorders in Alzheimer's Disease (AD). Recent data show that the ChAT gene can be regulated by a neural restrictive silencer factor (NRSF). **Objective.** To evaluate ChAT and NRSF genetic and protein expression in frontal, temporal, enthorrinal and parietal cortices of AD patients. **Methods.** A total of 4 patients with AD and 4 without dementia were studied. Cerebral tissue was obtained and processed by the guanidine isothiocyanate method for RNA extraction. ChAT and NRSF expression was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results.** Global levels of ChAT gene expression were decreased by 39% in AD patients as compared to the control group ($p < 0.05$, *U* test), whereas ChAT protein levels decreased only by 17% ($p = 0.02$). Compared to the control group, NRSF gene expression was increased by 86% in the AD group ($p = 0.001$). On the other side, NRSF protein levels were increased by 57% ($p > 0.05$). **Conclusion.** Greater NRSF protein levels determine low ChAT gene expression levels in AD patients.

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia degenerativa del sistema nervioso (Selkoe, 2001). Evidencias recientes demuestran que la EA es un trastorno heterogéneo compuesto por diferentes características fenotípicas y genotípicas. Clínicamente esta enfermedad se caracteriza por daño progresivo e irreversible de las funciones cognitivas en etapas medias y tardías de la vida adulta con síntomas iniciales como disminución de la memoria y el lenguaje (Carlesimo, Mauri & Graceffa, 1998; Bonzeat, Gregory, Ralph & Hodges, 2000). A pesar de disponer de protocolos de diagnóstico clínico cuidadosamente diseñados, la certeza del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es de aproximadamente 85% y sólo se confirma por el examen post-mortem del cerebro (Morelli, 1997).

Los cerebros de los pacientes con EA, muestran varias características neuropatológicas como depósitos proteínicos que consisten en placas neuríticas compuestas por depósitos extracelulares de β -amiloide (placas de β -amiloide) y por ovillos intraneuronales formados por neurofibrillas consistentes en filamentos enrollados de la proteína tau citoesquelética (Bondareff, Mountjoy, Roth & Hauser et al., 1989; Terry, Masliah & Salmon, 1991; Delacourte, David, Sergeant, Buce, Wattez, Vermersch, et al., 1999; Arrigada, Growdow, Hedley-Whyte & Hyman, 1992), gliosis astrocítica, microglia reactiva, inflamación así como pérdida neuronal y sináptica (Geula, 1998; Selkoe, 2001). Estas alteraciones neuropatológicas son más prominentes en regiones cerebrales como corteza frontal, parietal, temporal, entorrinal, el hipocampo y amígdala.

Otro de los eventos patológicos iniciales en la EA es un notable decremento de la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), evento que a su vez altera la producción de acetilcolina (AC) (Coyle, Price & DeLong, 1983; Pearson, Esiri, Horns, Wilcock & Powell, 1983). Diferentes investigaciones, han correlacionado la disfunción de ChAT con el deterioro cognitivo de los pacientes con EA, así mismo con los cambios histopatológicos típicos de la enfermedad. Evidencias recientes, han confirmado una importante disminución del ARNm de *CHAT*, en los núcleos colinérgicos principales (Núcleo Basal de Meynert, Banda Diagonal y Vertical de Broca, etc) (Strada, Vyas, Etienne, Hirshs, Ruberg, Brice, et al., 1992; Boissiere, Faucheux, Agid & Hirsch, 1997). Sin embargo, aún no se ha logrado comprender cuál es la causa exacta o los factores adicionales que subyacen a este proceso.

La síntesis de las moléculas colinérgicas neuronales involucradas en la neurotransmisión de la Ac está elaboradamente controlada por elementos reguladores de ADN y de proteínas de unión al ADN. En modelos murinos y en cultivos celulares de roedores, se ha observado que la expresión génica de *CHAT* está regulada negativamente por un factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF). Este factor debe reconocer a un elemento silenciador restrictivo neuronal (NRSE) para poder inhibir la expresión genética en forma conjunta. Por otra parte, se ha encontrado que el locus del gen colinérgico en humanos contiene una secuencia homóloga al NRSF/NRSE de la rata en una región correspondiente (Hahn, Chen, Patel, Ericsson, Bonner, Weihe, et al., 1997; Tanaka, Zhao, Wu & Hersch, 1998). Además, evidencias recientes, han demostrado que el gen colinérgico de las células de la médula espinal y placenta humana expresan al NRSF (Oda, Muroishi, Misawa & Suzuki, 2004).

Actualmente, en pacientes con EA no se han realizado estudios para investigar si la depleción de la expresión genética del ARNm de *CHAT* se deba al mecanismo inhibitorio mediado por NRSE - NRSF. Con base en lo anterior y como primer abordaje experimental decidimos realizar un análisis *post-mortem* de la expresión génica de *CHAT* y *NRSF* y los niveles de sus proteínas en diferentes regiones cerebrales de personas con Enfermedad de Alzheimer y personas sin demencia.

II. ANTECEDENTES

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), es una patología degenerativa cerebral irreversible, de progresión lenta e inexorable (Katzman, 1986; Selkoe, 2001; Selkoe, 2002). Esta enfermedad afecta de modo difuso a las neuronas de la corteza cerebral, así como otras estructuras subyacentes, esto provoca un deterioro de la capacidad del sujeto para el control de las emociones, reconocimiento de errores, coordinación de los movimientos y memoria, que es lo que en conjunto se conoce como demencia. Por último, se acaba perdiendo por completo la memoria y las facultades mentales superiores (Hodges & Patterson, 1995; Lawrence & Sahakian, 1998; Bozeat, Gregory, Ralph & Hodges, 2000).

Prevalencia

Los estudios de prevalencia realizados en los últimos 70 años coinciden en señalar que el aumento progresivo de las demencias corre paralelo con el incremento de la edad. Así, el número de pacientes con EA será una variable en gran medida dependiente de la distribución de edades de una población determinada. Actualmente, en México, existen pocas investigaciones respecto a la prevalencia de la EA; estos estudios se han determinado en poblaciones muy seleccionadas (residentes de asilos y centros hospitalarios de referencia, entre otros) (Alvarado, Hernández & Tapia, 2004; Cruz-Alcalá & Vázquez, 2002) y no son un reflejo representativo de esta población en nuestro país. Por otra parte, Arias (2006) y su grupo de trabajo realizaron un estudio de prevalencia de demencia en el Estado de Jalisco y sus hallazgos preliminares muestran un 14.3% de deterioro cognitivo en el área metropolitana (Arias, Morales, Maynard, Flores, González & Velásquez, 2006).

Clínica

Actualmente se piensa que un deterioro mental leve puede ser un síntoma importante de las primeras fases de la EA, no obstante, los síntomas precoces de la EA pueden en muchas ocasiones pasar desapercibidos y quedar enmascarados por los signos del envejecimiento normal, algunos de estos síntomas se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Principales diferencias entre el envejecimiento normal y patológico

DIFERENCIAS ENTRE ENVEJECIMIENTO NORMAL Y LA DEMENCIA	
Signos precoces de Enfermedad de Alzheimer	
NORMAL	DEMENCIA
Memoria y concentración Pequeños fallos de memoria periódicos u olvidos de parte de una experiencia. Fallos ocasionales de atención o concentración	Memoria y concentración Cambio de lugar o pérdida de objetos importantes. Confusión acerca de cómo llevar tareas simples. Dificultades para resolver problemas aritméticos sencillos Dificultad para tomar decisiones rutinarias Confusión acerca del mes o estación del año
Humor y conducta Tristeza o melancolía temporales y apropiada a una causa específica. Conducta progresivamente sigilosa	Humor y conducta Cambios de humor impredecibles. Progresiva pérdida de interés por el entorno. Depresión, angustia o confusión en respuesta a cambios Negación de síntomas
Signos tardíos de la Enfermedad de Alzheimer	
NORMAL	DEMENCIA
Lenguaje y discurso Habilidades lingüísticas conservadas	Lenguaje y discurso Dificultad para comprender frases o encontrar palabras adecuadas Incapacidad para entender el significado de las palabras Conversación reducida o irrelevante
Movimientos y coordinación Cautela incrementada en los movimientos Tiempos de reacción más bajos	Movimientos y coordinación Movimientos y coordinación marcadamente deteriorados, incluyendo lentitud de movimientos, marcha renqueante y sentido del equilibrio disminuido

- Las *placas neuríticas* están formadas por la acumulación extracelular de fragmentos insolubles de la proteína β -amiloide ($A\beta$), actualmente se cree que las alteraciones en el metabolismo de la proteína precursora del β -amiloide (PPA β) con la acumulación progresiva de su fragmento ($A\beta$) es un evento crucial en la patogénesis de la EA (Barger & Harmon, 1997).
- Los *ovillos neurofibrilares* están constituidos por filamentos helicoidales pareados (FHAs) y la proteína tau es su principal componente estructural. Esta proteína se encuentra asociada a los FHAs y presenta una serie de modificaciones postraduccionales relacionadas con cambios conformacionales progresivos como una hiperfosforilación y proteólisis endógena, lo que origina una importante alteración en la función de las neuronas (Kapaki, Kilidireas, Paraskevas, Michalopoulou & Patsouris, 2001; Mao, Katamaya, Watanabe, Harada, Noda, Yamamura, et al., 2001; Garcia-Sierra, Wischik, Harrington, Luna-Muñoz & Mena, 2001).

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA EA

No se conoce aún la causa exacta de la EA, sin embargo se han identificado una serie de factores genéticos y ambientales que juegan un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad.

Factores Genéticos :

La investigación se centra fundamentalmente en conocer por qué la proteína β -amiloide se produce y se deposita en unos individuos y no en otros. A este respecto, se ha llegado a diferentes hallazgos según se trate de la EA de inicio tardío (la forma más común) o de inicio precoz.

En la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, los hallazgos más significativos se refieren a la llamada *apolipoproteína E* (ApoE), que interviene en los mecanismos de movilización y distribución del colesterol para la reparación de las células nerviosas en el curso de su desarrollo y

después de una lesión. El gen para la ApoE se presenta en tres formas principales: *ApoE4*: Los mayores depósitos de β -amiloide se producen en los portadores de este gen, lo que lo constituye en el principal factor de riesgo para el Alzheimer de inicio tardío. *ApoE3*: Los depósitos son menores, pero se ha observado que su combinación con el ApoE4 podría inducir el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria en el cerebro. *ApoE2*: Es el que produce menos depósitos y actualmente se piensa que podría tener un papel protector.

Por otra parte, ya se han identificado los genes anómalos implicados en la **EA de inicio precoz**, una forma agresiva de la enfermedad:

La mayoría de los casos de **EA de inicio precoz** parecen implicar mutaciones de los genes *presenilina-1* (PS1) y *presenilina-2* (PS2). Estos genes defectuosos parecen acelerar la formación de la placa de β -amiloide y la *apoptosis* (Janssen, Lantos, Fox, Harvey, Beck, Dickinson, et al., 2001; Queralt, Ezquerro, Castellvi, Lleo, Blesa & Oliva, 2001; Devi, Fotiou, Jyrinji, Tycko, DeArmand, Rogaeva, et al., 2000)

Se han encontrado también diversas mutaciones en los genes que controlan la proteína PPA β . Estas mutaciones estarían, por ejemplo, en el origen de EA precoz característico del síndrome de Down (Selkoe, 2000).

Factores ambientales

- Las Proteínas priónicas como las que se han descrito en la *enfermedad de Creutzfeldt-Jakob* causan enfermedades neurodegenerativas. Recientemente se ha visto que estas entidades están relacionadas patogénicamente con la Enfermedad de Alzheimer por el mecanismo de malplegamiento proteico (de hélices α a hojas plegadas de tipo β) (Kretschmar & Poser, 2001).

- **Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)**, son sustancias altamente reactivas, poseedoras de un número impar de electrones en su último orbital, estos son capaces de existir de manera independiente y se encuentran fuertemente implicadas en los mecanismos patológicos de la EA, ya que dañan las membranas celulares e incrementan la respuesta inflamatoria (Bourdel-Marchasson, Delmas-Beauvieux, Peuchant, Richard-Harston, Decamps, Reignier, et al., 2001).
- **Metales:** Algunos estudios, muestran la formación de placas de β -amiloide en presencia de niveles altos de iones metálicos como *zinc, cobre, aluminio e hierro*. Parece que esta acción se incrementa en un medio ligeramente ácido. Por otro lado, se ha observado también que precisamente estas condiciones de elevado nivel de zinc o cobre en un medio acidificado, se dan como parte de la respuesta inflamatoria local frente a la lesión (Solomon, Koppel & Jossiphov, 2001; Flaten, 2001; Kozin, Zirah, Rebuffat, Hoa & Debey, 2001).

III. NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA Y LA EA

Sistema colinérgico

De los sistemas de neurotransmisión implicados en la fisiopatología de la EA el mejor caracterizado es el colinérgico. El sistema colinérgico se encuentra integrado por el núcleo basal de Meynert (NBM), banda horizontal y vertical diagonal de Broca (BHDB y BVDB), así como el núcleo medial septal (NMS) (Fibiger, 1982; Mesulam & Geula, 1988; Mesulam, 1996). Este sistema neuronal provee las inervaciones colinérgicas a las estructuras cerebrales corticales. Las neuronas situadas en NMS envían proyecciones al hipocampo y las del BHDB y BVDB inervan la corteza anterior del cíngulo y el bulbo olfatorio respectivamente (Gaykema, Luiten, Nyakas & Traber, 1990; Mesulam, 1996). El NBM proyecta aferencias a la amígdala y al resto del manto cortical, sus divisiones anterolateral y anteromedial inervan la región opercular fronto-parietal y cortical

medial, respectivamente, mientras que sus divisiones intermedia y posterior envían proyecciones ampliamente distribuidas en las cortezas frontal, parietal y temporal (Mesulam, 1996).

Biosíntesis colinérgica

La síntesis de acetilcolina (Ac) se origina a partir de sus dos precursores colina y acetil coenzima A y la intervención catalítica de la enzima ChAT. Esta enzima se encuentra en el Sistema Nervioso Central, específicamente en las regiones cerebrales donde la AC ejerce su función. Dentro de las neuronas colinérgicas, ChAT se concentra tanto en los axones como en las terminales sinápticas (Martínez-Murillo, Villalba, Montero-Caballero & Rodrigo, 1989, Carroll, 1994). La transcripción genética de ChAT, a partir del molde de DNA nuclear debe realizarse bajo una estricta organización molecular, posteriormente el ARN es transportado al citosol para llevar a cabo la traducción de la proteína (Lönnerberg, Schoenherr, Anderson & Ibáñez, 1996). Una vez sintetizada, ChAT es transportada a través del axón hasta llegar al lugar donde ejerce su actividad catalítica para producir Ac y enseguida es almacenada en vesículas sinápticas transportadoras para ser liberada posteriormente al espacio sináptico (fig. 1). Una vez liberada, la Ac se va a unir a receptores muscarínicos y nicotínicos presentes tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico. Una vez ejercida su acción la Ac va a ser rápidamente eliminada de la hendidura sináptica mediante la acción de la enzima acetil colinesterasa (Ace). Esta enzima es sintetizada por las neuronas colinérgicas y es liberada a la hendidura sináptica donde se va a asociar a las membranas colinérgicas de la terminal axónica.

La Ace degrada la Ac en colina y ácido acético, siendo la colina recaptada en su mayor parte por la terminal presináptica para ser reutilizada para la síntesis de nueva Ac (Okuda, 2000). Por otra parte, la Ac es uno de los neurotransmisores ampliamente distribuidos por todo el SCN y

desempeña un papel importante en diversas funciones cognitivas como el aprendizaje, atención y memoria, entre otras. Cabe mencionar que en los pacientes con EA la producción de este neurotransmisor se encuentra notablemente disminuida por una alteración de la actividad enzimática de ChAT (Bierer, Haroutunian, Gabriel, Knott, Carlin, Purohit, et al., 1995; Everitt & Robbins, 1997; Small, 1998).

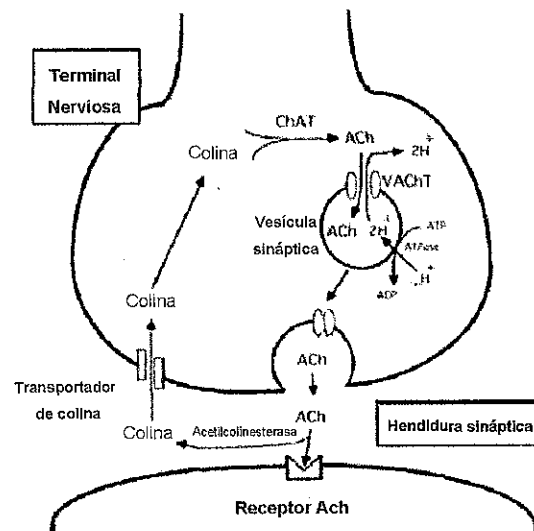


Fig. 1 Representación esquemática de la síntesis de acetilcolina a partir de colina y acetil CoA, con la intervención catalítica de la enzima colina acetil-transferasa (ChAT).

Alteraciones del sistema colinérgico en EA

Las alteraciones del sistema colinérgico contribuyen significativamente en las manifestaciones neuropsiquiátricas de los pacientes con EA. Diversos estudios bioquímicos y de hibridación *in situ* señalan una marcada disminución en la actividad de la ChAT (30-90%) y de sus niveles de Ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (aproximadamente 50%) en la corteza temporal, frontal y parietal de pacientes con EA (Bowen, Smith, White & Davison, 1976; Coyle, Price & Delong, 1983; Pearson, Esiri, Hiorns, Wilcock & Powell, 1985; Strada, Vyas, Etienne, Hirsch, Merle, Brice, et al., 1992; Everitt & Robbins, 1997; Boissiere, Faucheux, Agid & Hirsch, 1997). La

disminución de la actividad de ChAT es consistente con el decremento del número de neuronas colinérgicas del NBM (Henke & Lang, 1983; Bird, Stranahan, Sumi & Raskind, 1983; Lawrence & Sahakian, 1995; Lawrence, 1998). La mayor parte de los estudios post-mortem en pacientes con EA han demostrado que la actividad de la ChAT presenta una significativa -aunque variable- correlación con la densidad de las placas neuríticas en varias de las regiones corticales analizadas (Mountjoy, 1984); sin embargo, existe una insignificante correlación entre los niveles de ChAT y los ovillos neurofibrilares, mientras que en otros estudios presentan una asociación significativa entre los ovillos y la neurodegeneración de varias regiones corticales en pacientes con EA (Wilcock, Esiri, Bowen & Smith, 1982; Epstein, 1999). También se ha comprobado que existe una correlación entre la disminución de la actividad de ChAT y la pérdida neuronal en NBM con el grado de la demencia (Dekosky, Harbaugh, Schmitt, Bakau, Chui, Knopman, et al., 1992; Bierer, Haroutunian, Gabriel, Knott, Carlin, et al., 1995). Estudios más recientes proponen que la depleción colinérgica es específica para cada región cerebral y que depende del grado de avance de la EA; proponen además que el sistema colinérgico puede realizar respuestas compensatorias durante la primera fase de la demencia, motivo por el cual es de suma importancia identificar a los pacientes con EA desde la etapa inicial de la enfermedad (Dekosky, Ikonovic, Styren, Beckett, Wisniewski, Bennet, 2002).

Se han desarrollado diferentes estrategias farmacoterapéuticas enfocadas a mejorar la neurotransmisión colinérgica, como precursores de la síntesis de acetilcolina, agonistas/antagonistas de los receptores muscarínicos, agonistas de los receptores nicotínicos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, etc. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios al tratar de confirmar la utilidad clínica de estos agentes mediante ensayos clínicos controlados (Davis, Emmerling, Jaen, Moos & Spiagel, 1993; Newhouse, Potter & Lenox, 1993; Amenta, Parnetti, Gallai & Wallin, 2002).

Regulación de la expresión genética de ChAT

Pese al conocimiento de la disfunción del sistema colinérgico en la EA, actualmente no se conoce la causa exacta o los factores adicionales que subyacen a este proceso. La evidencia actual sugiere que el funcionamiento deficiente de los mecanismos de transcripción genética pueden influir directamente en la inadecuada regulación de dicho sistema (Strada et al., 1992; Boissiere et al., 1997).

El gen colinérgico se encuentra en el cromosoma 10q11.2 (OMIM, *118490) y codifica para ChAT y para la vesícula transportadora de Ac. Se ha descrito, que el gen colinérgico posee 4 exones no-codificables en la región 5': exon R, exon N, exon M y exon 4, los cuales pueden producir diferentes especies de ARNm a través de diferentes empalmes y sitios promotores. El ARNm del exon tipo M puede generar una proteína grande o pequeña de ChAT, mientras que el ARNm de tipo R genera solamente proteína pequeña. El ARNm final es el resultado de una combinación específica de diferentes sitios promotores. En modelos murinos, los sitios promotores para ChAT se han identificado en la región 5' del gen colinérgico, uno de ellos antes del exon R y otro entre los exones N y M (Misawa, Ishii & Deguchi, 1992; Kengaku, Misawa & Deguchi, 1993; Wu & Hersh, 1994; Misawa, Matsuura, Oda, Takahashi & Deguchi, 1997).

Esta organización genética debe llevarse a cabo mediante una regulación altamente coordinada a nivel transcripcional (Oda, Nakanishi & Deguchi, 1992; Oda, Muroishi & Nakanishi, 1996; Misawa et al., 1997; Mallet, Houhou & Pajak, 1998). El análisis de la región 5' del gen colinérgico sugiere la presencia de numerosas secuencias *cis* reguladoras; sin embargo, aún no se conoce exactamente cual es la secuencia de nucleótidos con funciones reguladoras específicas en las neuronas. Experimentos *in vitro* han demostrado que la región 5' del exón 4 del gen *CHAT* contiene varios elementos reguladores de la expresión genética, como el elemento supresor/silenciador, elemento

potenciador de respuesta al factor de crecimiento nervioso. Estos hallazgos son concordantes con los descritos por Lönnerberg y su grupo de trabajo (1996), ya que describen un elemento silenciador restrictivo neuronal (NRSE) específico y uno incrementador en el segmento de ADN, sugieren además que ambos intervienen en el control de la expresión genética molecular del sistema nervioso central (Lönnerberg, Lendahl, Funakoshi, Arhlund-Richter, Persson & Ibásson, 1995; Lönnerberg, Schoenherr, Anderson & Ibáñez, 1996). Posteriormente, Hersh y su grupo de trabajo (2003), realizaron un estudio *in vitro* en células PC12 de riñón de rata y describen que la regulación transcripcional del locus del gen colinérgico es a través de la acción de un Factor Silenciador Restrictivo Neuronal (NRSF), en esta investigación también se describe la participación de la proteína cinasa A, cuyo sitio de acción se localiza antes del locus del gen colinérgico (Hersh & Shimojo, 2003). Evidencias recientes, han demostrado que el gen colinérgico humano contiene una secuencia homóloga de NRSE en una región correspondiente (Hahm, Chen, Patel, Ericsson, Bonner, Weihe, et al., 1997; Tanaka, Zhao, Wu & Hersh, 1998; Oda, Muroishi, Misawa & Suzuki, 2004), además ya se ha comprobado la expresión de NRSF en células de placenta y médula espinal. Por otra parte, en pacientes con EA no se han realizado investigaciones para analizar si la depleción del ARNm de ChAT se deba al efecto represor que ejerce el complejo NRSF/NRSE.

IV.- GENES SILENCIADORES RESTRICTIVOS NEURONALES

Desde hace algunos años se han publicado diferentes trabajos que aportan evidencias sobre los cambios genéticos relacionados con la edad. Algunos de estos cambios provocan un incremento o decremento de la actividad genética (Finch & Morgan, 1990; Goyns, Charlton, Dunford, Lavery & Ferry, 1998; Guarente, 2000). En el sistema nervioso muchos genes que codifican para neurotransmisores, enzimas, receptores, canales iónicos, etc., se encuentran bajo control de un represor transcripcional como el factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF) (Schoenherr &

Anderson, 1995), también conocido como REST (Chong, Tapia-Ramirez, Kim, Toledo-Arai, Zheng, Bouros, et al., 1995). En un principio se creía que NRSF ejercía una función represora solamente en células no neurales (Kraner, Chong, Tsay & Mandel, 1992; Mori, Schoenherr, Vandenberg & Anderson, 1992; Schoenherr, 1995); sin embargo, existen evidencias de que NRSF puede regular la expresión de genes específicos neuronales, ya que se ha encontrado la expresión del ARNm de NRSF en regiones cerebrales específicas tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto (Kallunki, Edelman & Jones, 1998; Palm, Belluardo, Metsis & Timmusk, 1998; Timmusk, Palm, Lendahl & Metsis, 1999). Se conoce también, que NRSF dirige a una amplia variedad de genes cuya función es la elaboración del fenotipo neuronal (Chen, Paquette & Anderson, 1998).

El NRSF es un miembro de la familia de GLi-Krüppel -proteínas transcripcionales con huellas o dedos de zinc-, cuya característica principal es la de poseer ocho huellas de zinc cerca de su terminal amino, seguido por una región rica en aminoácidos básicos como prolina, lisina y otro dedo de zinc cerca de su terminal carboxilo (Figura 2) y es a través de éstas huellas de zinc que ejerce su efecto represor sobre la expresión de otros genes (Tapia-Ramirez, Eggen, Peralta-Rubio, Toledo & Mandel, 1997).

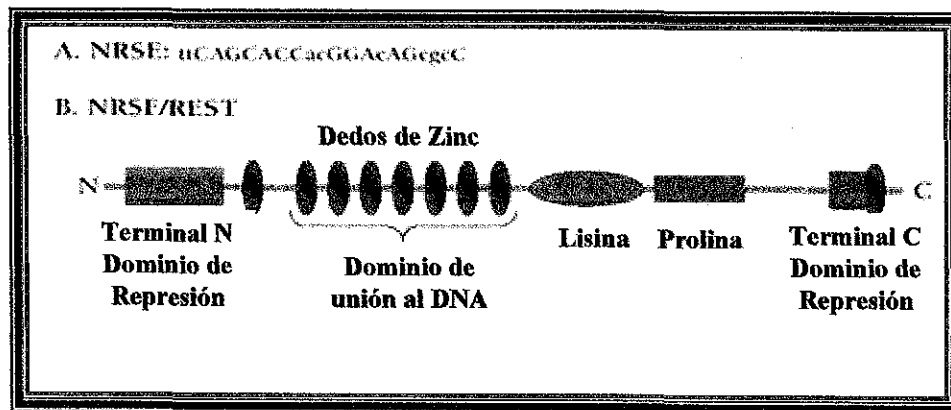


Fig. 2. Esquema del sistema NRSE-NRSF. A.-Secuencia consenso (NRSE) que la proteína NRSF debe reconocer para ejercer su efecto represor. B. Se presentan los dominios de represión de la proteína NRSF.

El NRSF es una proteína represora que funciona a nivel nuclear al impedir la transcripción genética, para lo cual primero debe reconocer una secuencia consenso conocida como elemento silenciador restrictivo neuronal (NRSE) constituido por 21 pares de bases (Mori, Stein, Sigmund & Anderson, 1990; Mori, 1997) que se encuentra en las regiones promotoras proximales y distales de los diferentes genes neuronales (Schoenherr, 1996). La represión transcripcional de NRSF es mediada por su dominio amino terminal e involucra el reclutamiento de varios elementos como el complejo histona desacetilasa (HDAC) por vía de un complejo integrado por Sin3B y Sin3A. La desacetilación de las histonas H3 y H4 induce la condensación de la cromatina y quedan protegidos los sitios promotores de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa (Figura3) (Grunstein, 1997; Ashraf & Ip, 1998; Naruse, auki, Kojima & Mori, 1999). En adición, Watanabe (2006) describe otro complejo conocido como SWI/SNF que interactúa en conjunto con NRSF en células cancerígenas de hígado humano, en esta investigación también se demostró que la supresión de los genes de la proteína sinaptofisina y SCG10 es a través de este complejo (Watanabe, Mizutani, Haraguchi, Yamamichi, Minoguchi, Yamamichi, et al., 2006).

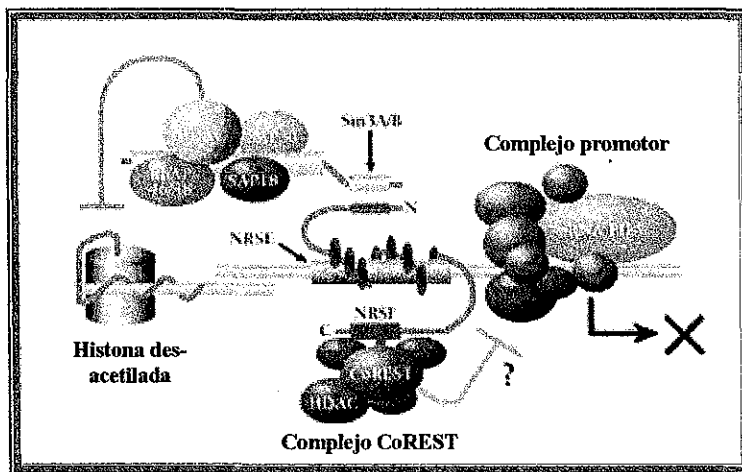


Fig.3 Representación esquemática a través de la cual NRSF ejerce la represión transcripcional al reconocer la secuencia consenso NRSE.

Por otra parte, una falla de la función de NRSF durante el envejecimiento puede generar un error en la transcripción de numerosos genes tanto del sistema nervioso central (SNC) como los de tejidos periféricos (Mori, 1997), por lo que el deterioro de la expresión de genes neuronales durante el envejecimiento puede atribuirse a un incremento de la expresión de NRSF (Chen et al., 1998; Ballas, Grunstein, Lu, Speh & Mandel, 2005). Un estudio realizado en ratones deficientes del factor NRSF/REST demostró que presentan una diferenciación prematura anormal de las neuronas y esto les provoca muerte prenatal (Chen et al., 1998). Otro hallazgo comprobó que ante daño isquémico existe una sobreexpresión significativa del ARNm de NRSF, además se ha implicado su participación directa en las cascadas de señalización que inducen muerte celular (Calderone, Jover, Kyung-min, Hidenobu, Yolota, Lin, et al., 2003).

La mayor parte de las investigaciones se ha enfocado en identificar qué genes poseen la secuencia consenso de NRSE, hasta la fecha se ha comprobado en 57 genes de interés en el área de neurociencias, además de ChAT se ha encontrado en la subunidad $\mu 4$ del receptor acetilcolina de tipo muscarínico, receptor opioide μ , la subunidad $\beta 2$ del receptor para acetilcolina de tipo nicotínico y la subunidad GluR2 del receptor a Ácido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico (AMPA) entre otros (Bessis, Champiaux, Chatelin & Changeux, 1995; Schoch, Cibelli & Thiel, 1996; Mieda, Haga & Saffen, 1997; Myers et al., 1998; Andria & Simon, 2001).

Actualmente, no existen estudios previos donde se haya investigado si la depleción de la actividad de ChAT en pacientes con EA se deba al mecanismo represor que ejerce NRSF; sin embargo, se ha observado que en modelos murinos la expresión génica de *CHAT* se encuentra regulada negativamente por la proteína NRSF. Además, se ha encontrado que el locus del gen colinérgico

en humanos contiene una secuencia homóloga al NRSF/NRSE de la rata en una región correspondiente (Hahm et al., 1997; Tanaka et al., 1998). También existe evidencia de que NRSF se expresa en la médula espinal y placenta a término humana (Oda et al., 2004). Estas evidencias pueden ser útiles para tratar de comprender mejor como es que esta compleja interacción molecular puede interferir directamente en la expresión del gen ChAT en humanos y cuál sería su participación en los procesos de neurodegeneración.

V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EA es el resultado de la degeneración progresiva de las poblaciones neuronales de la corteza cerebral y núcleos subcorticales que llevan a quien la padece a limitación funcional, mala calidad de vida y muerte. Uno de los principales fenómenos bioquímicos implicados en la etiopatogénesis es la depleción de la actividad de la colina acetiltransferasa (ChAT), lo que a su vez induce una disminución en la concentración de acetilcolina (Ac). La síntesis de las moléculas colinérgicas neuronales involucradas en la neurotransmisión de la Ac está controlada por elementos reguladores de ADN y de proteínas de unión al ADN. En modelos murinos y en cultivos celulares se ha observado que la expresión génica de *CHAT* está regulada negativamente por la proteína NRSF. Además, se ha encontrado que el locus del gen colinérgico en humanos contiene una secuencia homóloga al NRSF/NRSE de la rata en una región correspondiente (Hahm et al, 1997; Tanaka et al, 1998). Además, los hallazgos recientes han demostrado que el gen colinérgico humano expresa *NRSF* en neuronas colinérgicas de la médula espinal y en la placenta a término (Oda et al., 2004). Por otra parte, actualmente no se han realizado investigaciones en pacientes con EA para analizar si la actividad de la ChAT es regulada por la proteína NRSF, por lo que nuestra pregunta de investigación es la siguiente:

¿La transcripción de la ChAT en tejido cerebral de personas con EA es regulada negativamente por el NRSF?

VI. HIPÓTESIS

En tejido cerebral de pacientes fallecidos con diagnóstico definitivo de EA se encontrará una regulación negativa de la transcripción de la ChAT, manifestándose con niveles elevados de la expresión proteica de NRSF y niveles bajos de *CHAT*.

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión genética del ARNm y proteína de ChAT y NRSF en corteza cerebral frontal, temporal, entorrinal y parietal de personas con Alzheimer y personas sin demencia.

Objetivos particulares

1. Determinar los niveles de expresión genética del ARNm de *CHAT* y *NRSF* en la corteza cerebral frontal, temporal, entorrinal y parietal de enfermos con Alzheimer y controles sin demencia.
3. Registrar los niveles de proteína de ChAT y NRSF en la corteza cerebral frontal, temporal, entorrinal y parietal de personas con EA y controles sin demencia.
4. Comparar los niveles de expresión del ARNm de *CHAT* y *NRSF* y sus proteínas en las personas con EA y controles sin demencia

VIII. MATERIAL Y MÉTODO

El presente estudio cumplió con las normas éticas vigentes de la Comisión Nacional de Investigación Científica con número de registro: 2003-249-020.

Tipo de Estudio: **Casos y Controles.**

Variables registradas: edad, sexo, peso del encéfalo, tiempo de extracción del encéfalo desde el fallecimiento hasta la congelación y fijación del mismo.

Universo de estudio:

Grupo de casos:

Se incluyeron muestras de tejido cerebral de personas fallecidas diagnosticadas clínicamente y comprobado histopatológicamente con Enfermedad de Alzheimer en la clínica de demencias del departamento de neurología del UMAE-HE-CMNO (IMSS) y del Departamento de Fisiología y Biofísica del Instituto Politécnico Nacional. México, CINVESTAV. El diagnóstico clínico se realizó en base a los criterios de la Asociación Americana de Psiquiatría de acuerdo con el DSM IV así como los criterios del Instituto Nacional para los trastornos Neurológicos (NINCDS-ADRDA) para el diagnóstico de la EA (Anexo I).

Criterios de inclusión:

Se incluyeron todos los tejidos cerebrales de personas fallecidas con EA definitiva (comprobado con el análisis histopatológico).

Criterios de exclusión:

En este estudio se excluyeron las muestras de tejidos cerebrales de pacientes que fallecieron con enfermedad crónica neurodegenerativa demencial que pudiera ser atribuida a otras causas definidas (demencia vascular, demencia Pick, Parkinson etc.).

También se excluyeron las muestras de tejido cerebral de pacientes con EA que fueron insuficientes para el análisis o que por pérdida involuntaria no fue posible su recuperación.

Grupo Control:

En este grupo se incluyeron muestras de tejido cerebral de personas cuyo fallecimiento no involucró directamente al encéfalo (infarto cerebral, traumatismo, etc) y sin antecedentes familiares de EA o de algún otro tipo de demencia.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron las muestras de tejido cerebral de personas que fallecieron sin antecedentes de enfermedades crónico neurodegenerativas demenciales tipo Alzheimer o eventos cerebro vasculares de tipo hemorrágico o embólico.

Criterios de exclusión:

Muestras de tejido cerebral de personas con síndrome demencial el cual pudo atribuirse a otras causas definidas.

Muestras de tejido cerebral de personas con antecedentes de daño neurológico

Muestras de tejido que fueron insuficientes para el análisis o que por pérdida involuntaria no sea posible su recuperación.

Consentimiento informado de la necropsia

La entrada del cuerpo al hospital con fines de la necropsia y toma del encéfalo fue precedido por la entrega del consentimiento de la necropsia y toma del encéfalo para la investigación en un formato establecido. Esta forma fue firmada por el familiar responsable y acompañada de la firma de dos

testigos, de acuerdo a los lineamientos de la Ley General de Salud vigente en el país.

Toma del encéfalo para la investigación

Una vez llevada a cabo la necropsia, el patólogo extrajo el encéfalo completo y se registró el peso completo del mismo. Posteriormente, el cerebro se dividió en los dos hemisferios por un corte medio-sagital. Uno de hemisferios se procesó para investigación y el otro para el diagnóstico neuropatológico. El hemisferio cerebral seleccionado para la investigación se cortó en secciones coronales; la línea de corte fue tangencial tanto en la parte ventral del lóbulo temporal izquierdo, como al polo occipital. Las rebanadas se cortaron de 1 cm. de espesor aproximadamente y el primer corte se tomó 1 cm posterior al inicio del polo frontal. Los demás cortes fueron paralelos al primero. A medida que se van obteniendo las rebanadas se colocaron sobre una plataforma fría (1-5°) y enseguida se procedió a su congelación en un ultracongelador con una temperatura de -80° C.

El hemisferio destinado para el diagnóstico neuropatológico y estudios morfológicos se sumergió completo en una solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfatos con un pH de 7.4. Los tejidos permanecieron en esta solución por una semana y posteriormente se procesaron para llevar a cabo su inclusión en bloques de parafina. Enseguida se realizaron cortes coronales de 5µ de espesor, se montaron en un portaobjetos y se procesaron para ser teñidos con Hematoxilina y Eosina para llevar a cabo el análisis microscópico.

ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se llevó a cabo la disección de: corteza frontal (4 y 12 de Brodmann), temporal (21 y 22 de Brodmann), entorrinal y parietal (áreas 5 y 7 de Brodmann) de cada uno de los cerebros de ambos

grupos. Los tejidos se pesaron y se colocaron en criotubos eppendorf de 2 ml y se mantuvieron en congelación a -80°C hasta la extracción del ARN total.

Extracción de ARN total

Las muestras recabadas se procesaron en forma paralela y bajo las mismas condiciones para ambos grupos. La extracción de ARN total se llevó a cabo con el método de isotiocianato de guanidina, descrito por Chomczynski & Sacchi, 1987. Este método consiste brevemente en lo siguiente: En el criotubo eppendorf con 100 mg de tejido cerebral se le agregó 1 ml de trizol en baño de hielo ($0-4^{\circ}$) y se homogenizó en un tubo politron (virsonic 100) por 35 segundos, posteriormente se dejó incubar por 8 minutos en baño de hielo, enseguida se le agregaron 200 μL de cloroformo frío, se agitó en el vortex por 20 segundos y se dejó incubar por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 19 minutos a 4°C . Se obtuvieron dos fases (fenol/cloroformo/acuosa), la fase acuosa (superior) se separó y cuantificó para agregar un volumen igual de isopropanol ($0-4^{\circ}\text{C}$), se mezcló suavemente por inversión y se deja reposar al menos por 24 hr. en un congelador a -20°C . Al día siguiente, se realizó una centrifugaación a 10,000 rpm a 4°C por 19 minutos, se decantó y secó con papel filtro. Se agregaron 500 μL de etanol al 75% en agua tratada previamente con 0.1% de dietil pirocarbonato (agua DEPC) y se centrifugó a 9,000 rpm por 7 minutos a 4°C , este paso se repite 3 veces y al final se resuspende el sedimento de acuerdo al tamaño de la pastilla en agua DEPC (20-80 μL).

Determinación de la cantidad y calidad del ARN

Una vez que se extrajo el ARN total, entonces se evaluó la cantidad y calidad del ARN, con un espectrofotómetro (Biophotometer eppendorf 8.5 mm) se evaluó a través del índice de

absorbancia de la muestra con la relación 260/280 nm, lo que permitió calcular la concentración de ARN de cada muestra. Se consideraron óptimas aquellas muestras cuyo índice de absorbancia fue de 1.8 a 2.0 nm.

Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la obtención del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se utilizó la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Molovney. Para ello, se tomaron 2 µg de ARN de cada muestra y se le adicionó agua estéril hasta un volumen total de 6 µL más una gota de aceite mineral. Posteriormente, para desnaturalizar las muestras se incubaron durante 10 min a 70°C en el termociclador. Inmediatamente después se incubó en un baño de hielo con agitación continua durante 10 min. Una vez transcurrido este período, se adicionó la mezcla de retrotranscripción, la cual esta compuesta por los siguientes elementos: Buffer 5x para retrotranscripción, Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPS) 2.5 mM; Ditiotretitol 10 mM; Iniciadores aleatorios (Random primer) 1 mg/µL; Inhibidores de ARNasas (RNAsin) 1U/µL y la transcriptasa reversa (200 U/µL), para luego incubarse a 37°C durante una hora y a 95°C durante 10 min. Se les adicionó 5 µL agua estéril y se conservaron a -20° C hasta su utilización para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Taq DNA polimerasa (1 U/µL), 1 µL de ADNc, dNTPs (10 mM), MgCl₂ (50 mM), agua estéril y los oligonucleótidos sentido y antisentido para cada gen. Las secuencias de los oligonucleótidos, el tamaño del producto de la PCR y el número de acceso al Genbank para identificar la secuencia del gen que codifica para las subunidades son las siguientes:

NRSF, Sentido 5'-TGC CGC GAG CTC GCG GCG CAG CAG CG-3 (oligonucleótido sentido localizado en la posición 1) y 5'-ATA CAG GCT GAG GTT CTA CGA CGC TG-3 (oligonucleótido antisentido en la posición 720) y el producto de la PCR es de 720 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM_005612. Total de ciclos 36.

CHAT, Sentido: 5'-TAG CCG ATG ACA GCC TGT GAA TGA CC-3 (oligonucleótido sentido localizado en la posición 61) y 5'-TTG TTG CCA GGA ACA GAG AGT CCA GA-3 (oligonucleótido antisentido en la posición 660) y el producto de la PCR es de 600 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es X56585. Total de ciclos 32.

GAPDH, Sentido: 5'-CGC TTC GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC-3 (oligonucleótido sentido localizado en la posición 3) y 5'-GGG GTG CTA AGC AGT TGG TGG TGC AG-3 (oligonucleótido antisentido en la posición 580) y el producto de la PCR es de 577 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM_002046. Los ciclos de amplificación fueron 26 ciclos.

A las reacciones de amplificación se les adicionó aceite mineral con la finalidad de evitar la evaporación y las condiciones del termociclador (ependorf mastercycler) fueron las siguientes: primera etapa a 95° C por 5 minutos, 95° C un minuto, 60° C un minuto, 72° por 1.30 minutos y 72° C por 5 minutos. Los productos amplificados de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1X en una cámara horizontal de electroforesis (owl) por hora y 20 minutos a 110 volst (fuente de poder Accu power, VWR Scientific Product). Los geles se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta (Alpha Innotech Corporation) y se utilizó el sistema de fotodocumentación Alpha Digidoc Image análisis software para la cuantificación de las bandas correspondientes. Los valores de densidad óptica para los genes de

CHAT y *NRSF* se normalizaron contra la expresión del gen constitutivo *GAPDH*. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de absorbancia de las densidades ópticas registradas.

Normalización del gen *GPADH* en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La extracción de ARN total en cada una de las muestras es variable, por lo que fue necesario normalizar los niveles de expresión *NRSF* y *CHAT*, utilizando como referencia el gen constitutivo de *GAPDH*. Para esto se fijaron los ciclos correspondientes y se agregó el ARN total a la mezcla de reacción en la PCR hasta alcanzar un nivel de expresión de este gen semejante en todas las muestras, del grupo experimental y control. De esta forma se utilizó la misma cantidad de cDNA en la mezcla de reacción en la PCR para determinar los niveles de expresión de los genes correspondientes a *CHAT* y *NRSF*.

Determinación de la proteína ChAT y NRSF

Western Blot

El análisis de proteínas se realizó por el método de Western Blot. Para ello primero se homogenizaron 100 mg de tejido (corteza frontal, temporal, parietal y entorrinal) en 1 ml de buffer de lisis 920 μ l de regulador de lisis (Sol. Stock: Tris-base pH 7.5, 1mM; NaCl 5mM, NaF 0.2M, Na_3VO_4 10M, NP_{40} 2mM) + 80 μ l de inhibidores de proteasas (Tabletas complete) en PBS 0.1M, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante claro y se procedió a la determinación de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry. Se utilizaron 25 μ g de proteína por muestra para realizar la electroforesis.

Posteriormente, la muestra de proteína se resuspende en 10 μ l de amortiguador de electroforesis (tris-HCl 6.8, 50 mM DTT, 1% de dodecil sulfato de sodio, 20% de glicerol y 0.1% de azul de bromofenol). Se efectuó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a lo descrito por Laemmli con algunas modificaciones como se describe enseguida. Se cargó en cada carril 25 μ g de proteína. La concentración de acrilamida en el gel apilador fue de 5% para ChAT y NRSF, mientras que la concentración para el gel separador de ChAT fue del 12% y del 7% para NRSF. La electroforesis se llevó a cabo en una minicámara de electroforesis de BIORAD a 110 volts por 2 horas y el buffer que se utilizó fue de corrida electroforética (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 1%, pH 8.3).

Después de la electroforesis, el gel y la membrana de nitrocelulosa (Sigma N-7892) se incubaron durante 15 minutos en amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, Metanol 20%, pH 8.3). La transferencia de las proteínas del gel se hizo de acuerdo a Towbin y cols., brevemente, se colocó el gel en contacto directo con la membrana de nitrocelulosa para efectuar la transferencia en una cámara de transferencia húmeda de Biorad a 110 mA por dos horas en baño de hielo agua. Terminada la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche libre de grasa (svelty) al 5% en PBS 1 M, por dos horas a temperatura ambiente y en agitación. Enseguida se añadieron 5 μ l de anticuerpo primario goat policlonal contra ChAT (Chemicon AB144P) y 5 μ l de anticuerpo primario goat policlonal contra NRSF(P-18) (Santa Cruz Biot. SC-15118) y se dejaron incubar por 24 hr en agitación constante. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05% por 10 minutos cada uno y al final se le agregó el anticuerpo secundario donkey anti-goat IgG HRP (Santa Cruz Biot. SC-2020) en 5 ml PBS-Tween y 5% de leche svelty y se dejaron incubar toda la noche a 4° y en agitación constante. Posteriormente se

sacaron las membranas y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se les adicionó el complejo ABC PK-6200 (Vector) por 2 horas en oscuridad y temperatura ambiente.

Después de este tiempo se lavaron las membranas 3 veces con PBS Ph. 7.4, 1M por 10 minutos cada lavado, y se procedió a revelar con DAB y una vez revelada la membrana se obtuvo una impresión fotográfica de la banda correspondiente a la proteína de ChAT y de NRSF y posteriormente se efectuó el análisis de densitometría de las bandas de proteína reveladas.

Análisis Estadístico

Los resultados se estudiaron con medidas de tendencia central. Para el análisis intergrupos de los niveles de expresión de NRSF y ChAT, se utilizó la prueba estadística no paramétrica de la *U de Mann Whitney* para muestras independientes y para el análisis regional se utilizó la prueba de Wilcoxon. Se consideró significancia estadística cuando $p \leq 0.05$.

IX. RESULTADOS

El total de pacientes incluidos en este estudio fue de 4 para el grupo control y 4 para el grupo con EA (ver tabla 1), el promedio de edad para el grupo control fue de 54 ± 4 años y 64 ± 8 años para el grupo EA, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$). Ninguno de los pacientes presentó un estado de coma prolongado, infecciones del SNC o tumor cerebral. El tiempo máximo post-mortem para la extracción del encéfalo fue de 6 hr.

Tabla 1. Edad y sexo de los personas con EA y control.

Grupo Control	Grupo EA
43 años, masculino	49 años, masculino
53 años, femenino	50 años, femenino
56 años, masculino	76 años, masculino
64 años, masculino	80 años, masculino
x= 54 años	x=64 años

Fuente: Directa

Análisis patológico

El análisis macroscópico de los cerebros de pacientes con EA se llevó a cabo por el patólogo del hospital al momento de la toma del encéfalo. En particular, se examina el círculo de Willis, se toman fotografías y se analiza el grado de atrofia cortico-cerebral, la presencia de sangrado o isquemia y datos de infecciones concomitantes (Figura 1). Se registró el peso completo del encéfalo y posteriormente se realizó la sección del mismo en los dos hemisferios (a través del cuerpo caloso), uno de los cuales se procesó para realizar el análisis microscópico y confirmar el diagnóstico definitivo de EA.



Figura 1. Fotografía del encéfalo de un paciente con Enfermedad de Alzheimer. Fig. A. Se observa atrofia cortical más evidente en el lóbulo frontal. B. Se observa una marcada atrofia cortical con dilatación ventricular.

Análisis microscópico

Este análisis se llevó a cabo con la finalidad de realizar el diagnóstico definitivo de EA. Los hallazgos neurohistopatológicos (fig.2) denotan además de las placas neuríticas y degeneración neurofibrilar, un patrón típico de degeneración neuronal: el parénquima cerebral presenta pérdida de la afinidad a la hematoxilina, las neuronas se toman fusiformes y sus citoplasmas muestran retracción, basofilia intensa y sus núcleos se toman picnóticos con cromatina condensada. Cabe señalar que estos cambios son sugestivos de muerte celular por apoptosis.

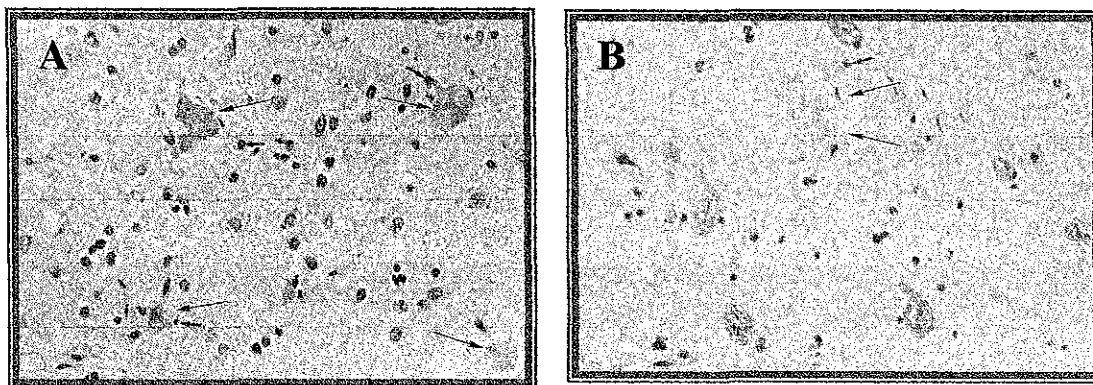


Fig 2. Histopatología de la corteza temporal de un paciente con Enfermedad de Alzheimer. A. Las flechas grandes señalan las placas neuríticas compuestas principalmente por el péptido β -amiloide. B. Los hallazgos patológicos por

degeneración gránulo vacuolar se observan en las neuronas marcadas con asterisco, las flechas señalan una placa difusa por depósito temprano de B-amiloide. Técnica, hematoxilina & eosina.

ANÁLISIS DE LOS HALLAZGOS GENÉTICOS-MOLECULARES

Expresión genética de *CHAT* y *NRSF*

Corteza Frontal

La figura 3 muestra los resultados de la expresión del gen constitutivo *GAPDH*, el cual se utilizó como control metodológico para normalizar la expresión de *CHAT* y *NRSF* en corteza frontal de personas con EA y controles. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$, prueba *U*).

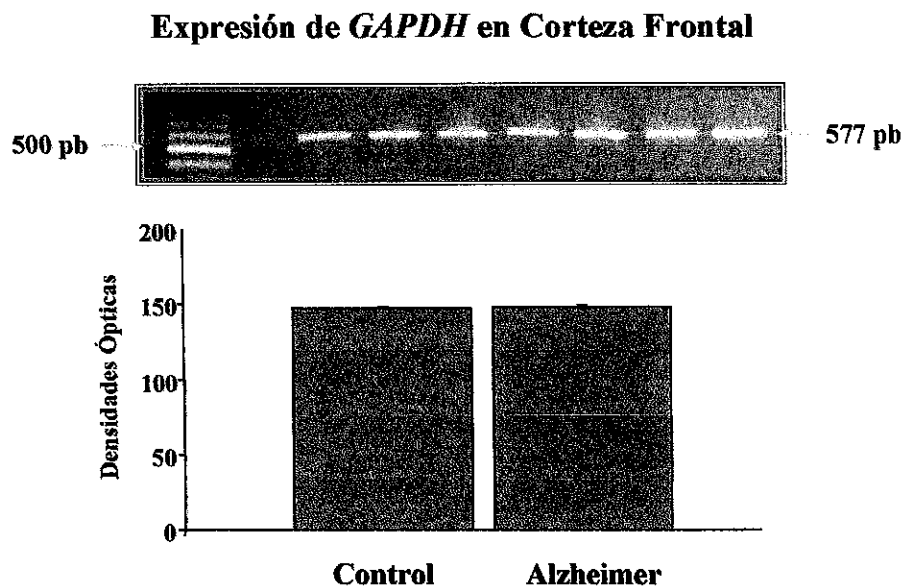


Fig.3. Niveles de expresión del gen *GAPDH* en corteza frontal. Parte superior se muestra los productos amplificados de la PCR (los número nones pertenecen al grupo Control y los pares al de EA) El gráfico muestra la media \pm E.E.M de las D.O. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos, $p > 0.05$;U de Mann-Whitney.

Los niveles de expresión del ARNm de *CHAT* en corteza frontal de los pacientes con EA, mostraron un decremento significativo (21%) con respecto al grupo control (115 ± 7 vs. 145 ± 9 , respectivamente, $p = 0.02$, prueba *U*, Media \pm EEM), (Fig.4). En contra parte, los resultados del ARNm de *NRSF* (Fig.5), mostraron un incremento del 45% en los niveles de expresión del grupo con EA en comparación con el grupo control (174 ± 20 vs. 120 ± 15 $p = 0.04$, prueba *U*, Media \pm E.E.M).

Expresión Genética de *CHAT* en Corteza Frontal

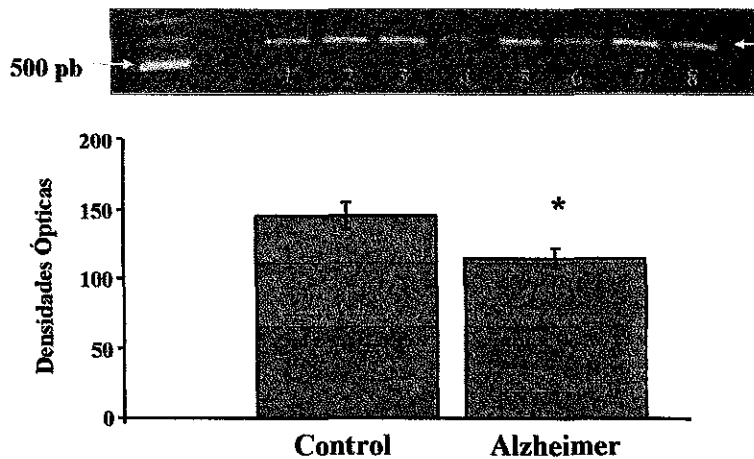


Figura 4. Niveles de expresión del gen *CHAT* en la corteza frontal de pacientes con EA (n=4) y sus controles (n=4). El panel de superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control y 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). El gráfico muestra las barras con la media de los datos \pm E.E.M de cuatro experimentos determinados por duplicado. * $p=0.02$; U de Mann-Whitney.

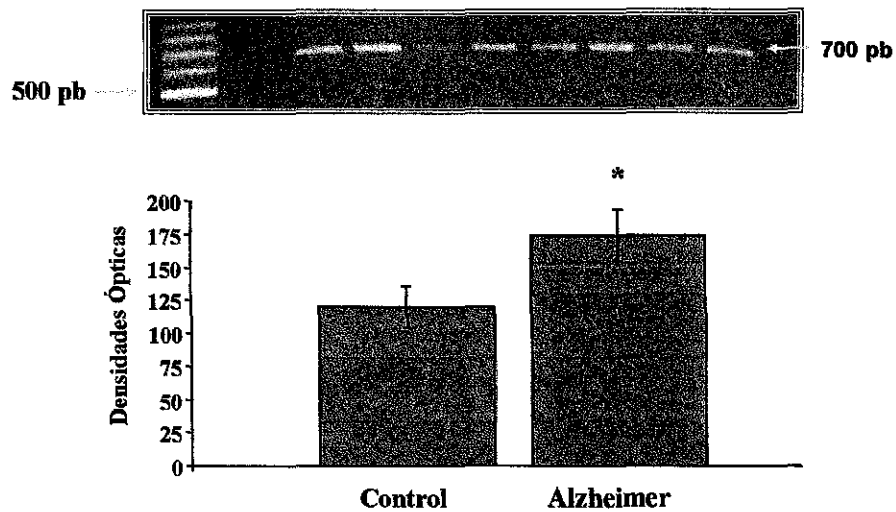
Expresión Genética de *NRSF* en Corteza Frontal

Figura 5. Expresión del gen *NRSF* en corteza frontal de personas con EA (n=4) y controles (n=4). El panel de superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control y 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). En la gráfica, las barras expresan la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado. *U de Mann-Whitney*, * $p = 0.04$.

Corteza Temporal

La figura 6 muestra los resultados del control metodológico del gen constitutivo *GAPDH*, de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y sus respectivos controles. El análisis no encontró diferencia significativas ($p > 0.05$, *U de Mann Whitney*).

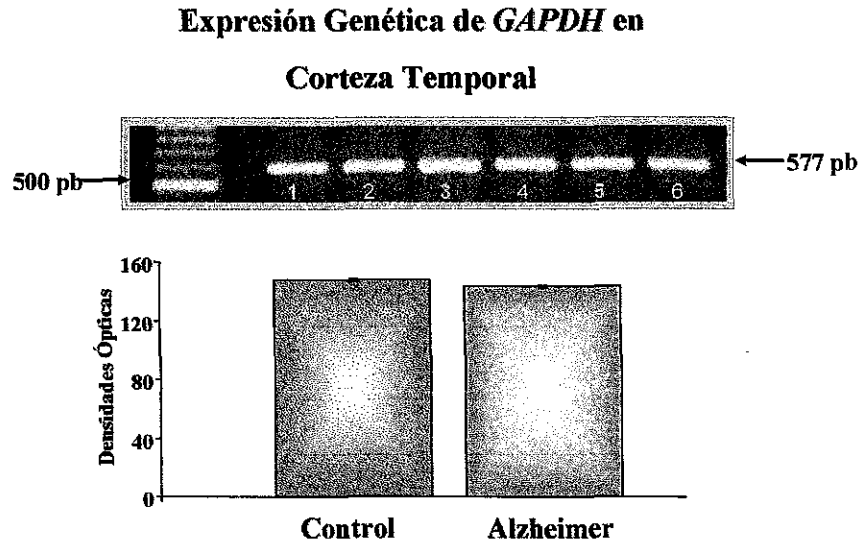


Fig. 6. Expresión del ARNm del gen *GAPDH* en corteza temporal del grupo con EA (n=3) y grupo Control (n=3). La parte superior muestra los productos de la PCR (los números impares indican las bandas correspondientes al grupo control y los pares al grupo EA). En la gráfica, las barras indican la media \pm E.E.M. No existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$, *U de Mann-Whitney*).

En la figura 7 se encuentran los resultados de los niveles de expresión de ARNm de *CHAT* en la región temporal. La expresión del ARNm mostró una disminución del 35% en el grupo EA (29 ± 4) en comparación con el grupo Control (45 ± 2), $p = 0.05$. Por otra parte, los resultados de la expresión de *NRSF*, en esta región se encontraron notablemente incrementados (122%) en el grupo con EA (71 ± 3), el análisis estadístico determinó un valor estadístico limítrofe con respecto al grupo Control (37 ± 2) $p = 0.05$ (ver figura 8).

Expresión de *CHAT* en Corteza Temporal

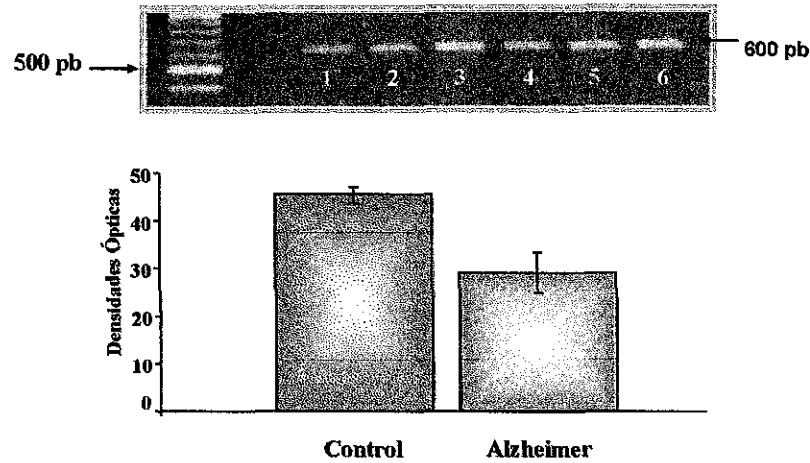


Figura 7. Niveles de ARNm de *CHAT* en corteza temporal del grupo con EA (n=3) y controles (n=3). La región superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control; 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). En el gráfico, las barras muestran la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado ($p=0.05$, U de Mann-Whitney).

Expresión de *NRSF* en Corteza Temporal

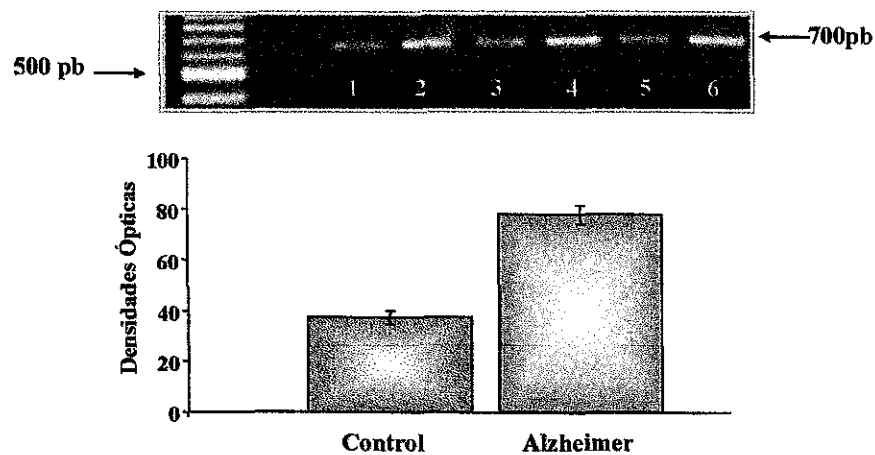


Figura 8. Expresión del gen de *NRSF* en corteza temporal de personas con EA (n=3) y sus controles (n=3). La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control; 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). En la gráfica, las barras expresan la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado. ($p = 0.05$, U de Mann-Whitney).

Corteza Entorrinal

Los resultados de la expresión del control metodológico *GAPDH*, de esta región se muestran en la figura 9. El análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con EA y Control. Por otra parte, el análisis de los niveles de expresión para el gen *CHAT* en esta región (fig. 10) presentó una disminución del 63.5% en el grupo con EA (59 ± 15) en comparación con el grupo control (162 ± 3 ; $p = 0.05$, U de Mann-Whitney). La cuantificación de la expresión del gen *NRSF* presentó un incremento del 141% en el grupo con EA (147 ± 15) cuando se comparó con el grupo control (61 ± 2 ; $p = 0.05$, U de Mann-Whitney; ver figura 11).

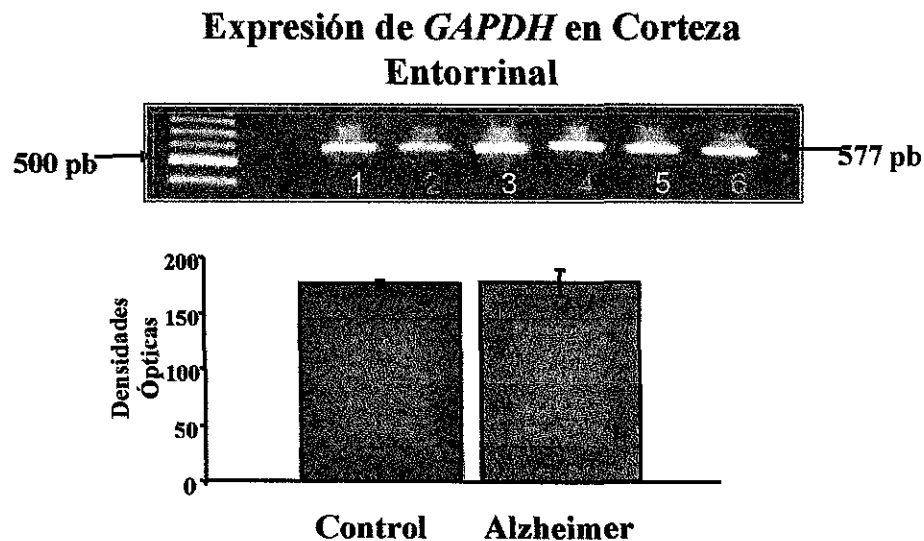


Figura 9. Expresión del gen *GAPDH* en la corteza entorrinal de pacientes con EA y control. La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (Los números ones indican las bandas del grupo control y los números pares indican las bandas del grupo EA). En el gráfico, las barras muestran la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado ($p > 0.05$, U de Mann-Whitney).

Expresión de *CHAT* en Corteza Entorrinal

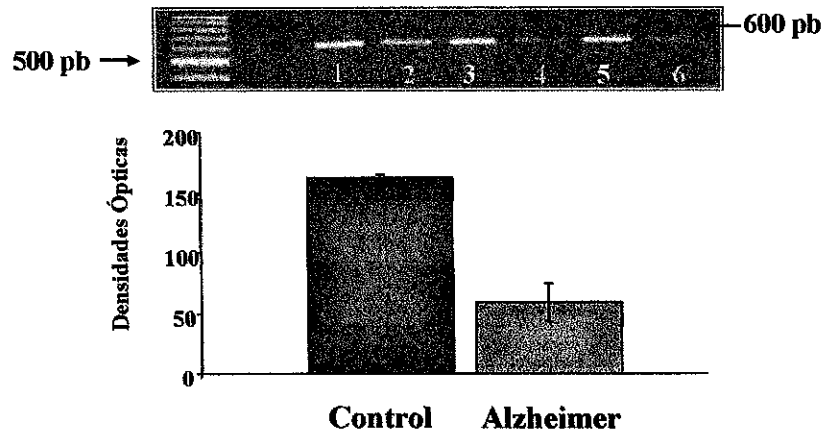


Figura 10. Expresión del gen *CHAT* en la corteza entorrinal. La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (Números impares corresponden al grupo Control (n=3) y los pares al de EA (n=3)). En el gráfico, las barras expresan la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado. El grupo con EA presentó una disminución con respecto al grupo control. ($p = 0.05$, *U de Mann-Whitney*).

Expresión de *NRSF* en Corteza Entorrinal

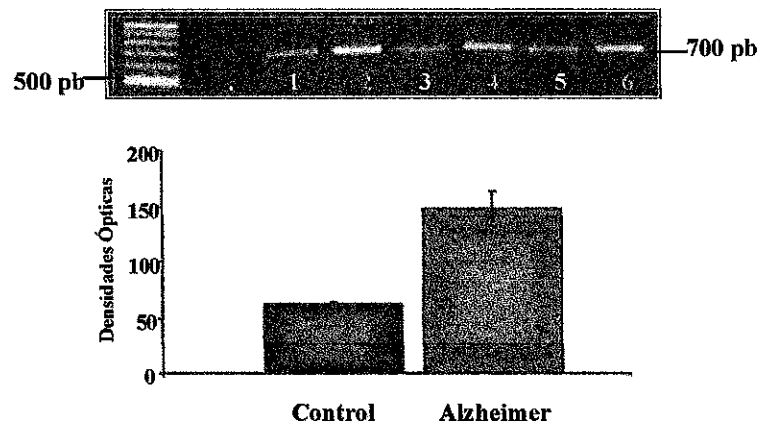


Figura 11. Expresión del gen *NRSF* en corteza entorrinal de personas con EA y sus respectivos controles. La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control; 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). En el gráfico, las barras expresan la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado ($p = 0.05$, *U de Mann-Whitney*).

Corteza Parietal

Los resultados de la expresión genética de *GAPDH* se muestran en la figura 12. El análisis de los niveles de expresión del ARNm de *CHAT* en esta región mostró una disminución (27.5%) de los niveles en el grupo con EA (ver figura 13); sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los pacientes con EA (29 ± 10) y el grupo Control (40 ± 12 ; $p > 0.05$, U de Mann-Whitney). En contraparte, los niveles de expresión de *NRSF* en esta región se encuentran incrementados (132%) en el grupo con EA en relación al grupo Control (142 ± 15 vs. 61 ± 14 ; respectivamente, $p = 0.05$, U de Mann-Whitney; ver fig.14).

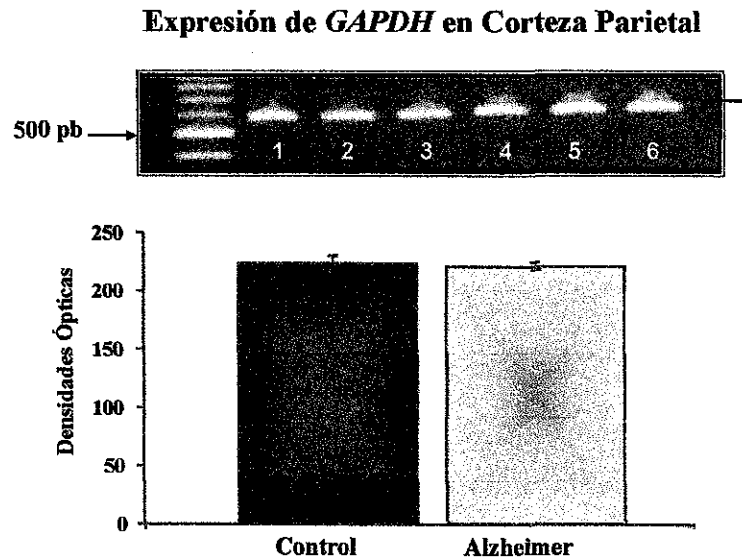


Figura 12. Expresión del gen *GAPDH* en corteza parietal de personas con EA (n=3) y el grupo control (n=3). La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (Números impares indican las bandas del grupo control, y los números pares a las del grupo EA). En el gráfico, las barras muestran la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado. ($p > 0.05$, U de Mann-Whitney).

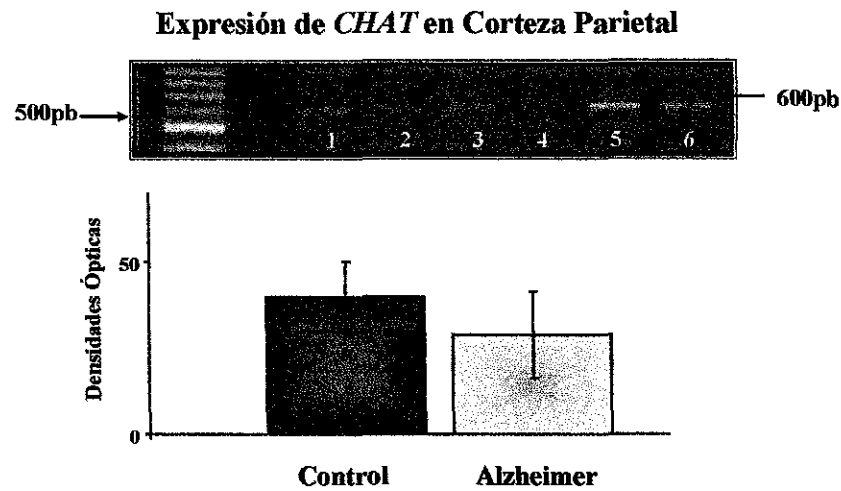


Figura 13. Expresión de *CHAT* en corteza parietal de personas con y sin EA. La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (los números nones corresponden al grupo control y los pares al grupo EA). En la parte inferior, las barras muestran la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado ($p > 0.05$, U de Mann-Whitney).

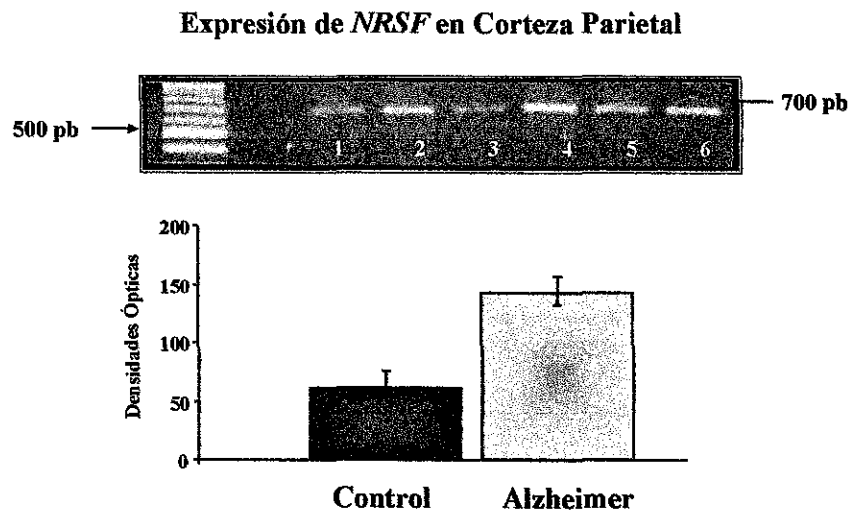


Figura 14. Expresión del gen *NRSF* en corteza parietal de personas con EA ($n=3$) y sus respectivos controles ($n=3$). La parte superior muestra los productos amplificados por PCR (1, 3, 5 y 7 corresponden al grupo control; 2, 4, 6 y 8 corresponden al grupo EA). En el gráfico, las barras expresan la media \pm E.E.M. de 4 experimentos por duplicado ($p = 0.05$, U de Mann-Whitney).

B) Cuantificación de las proteínas ChAT y NRSF

Corteza Frontal

Los resultados de la cuantificación de la proteína ChAT en corteza frontal del grupo con EA (fig. 15A), mostraron una disminución del 42% (58 ± 5) en comparación con los niveles que se registraron en el grupo Control (101 ± 6 , $p < 0.05$, U de Mann-Whitney). En contraparte, la cuantificación de proteína de NRSF en esta región disminuyó en 6.25% en el grupo con EA, no hubo diferencias significativas entre el grupo ambos grupos (60 ± 10 vs. 64 ± 11 , respectivamente; $p > 0.05$, U de Mann-Whitney; Figura 15B).

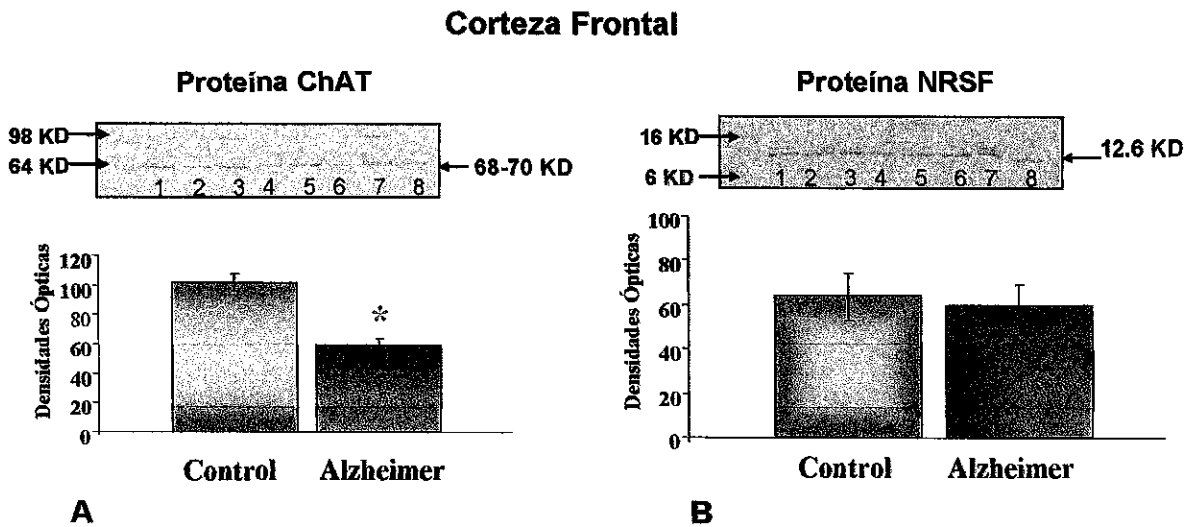


Figura 15. Niveles registrados de proteína de ChAT y NRSF. **A.** La región superior muestra la fotografía de la membrana de nitrocelulosa con la bandas correspondientes de la proteína ChAT (1,3,5 y 7son las bandas del grupo control, 2,4,6 y 8 del grupo con EA) Las gráficas muestran la media \pm E.E.M., (*) Indica diferencias significativa $p=0.02$, prueba U. **B.** La región superior superior es la fotografía de las bandas correspondientes de la proteína NRSF en la membrana de nitrocelulosa (bandas 1,3,5 y 7 pertenecen al grupo control, mientras que las 2,4,6 y 8 al grupo con EA. Las gráficas, muestran la media \pm E.E.M, $p=0.56$, prueba U.

Corteza Temporal

Los resultados obtenidos en esta región se muestran en la figura 16A. Se encontró una disminución del 21.5% en la concentración de la proteína de ChAT en el grupo con EA (84 ± 4) en comparación con el grupo control (107 ± 2 ; $p = 0.05$, U de Mann-Whitney). En adición, los hallazgos en la cuantificación de la proteína de NRSF, demostraron un incremento del 64% en el grupo EA contra el grupo control (719 ± 33 vs. 438 ± 62 ; $p = 0.05$, U de Mann-Whitney) Fig.16B.

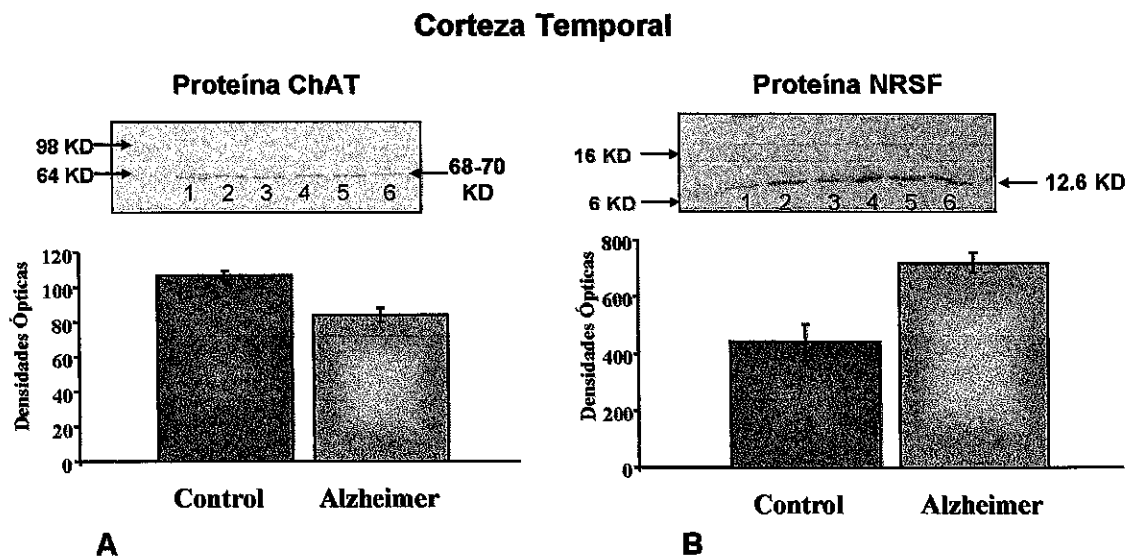


Fig. 16. Niveles de proteína de ChAT y NRSF. **A.** La región superior muestra la fotografía de las bandas analizadas de ChAT (bandas 1,3 y 5 son del grupo control, y las 2,4 y 6 del grupo Alzheimer). La gráfica muestra la media \pm EEM, $p=0.05$,prueba U. **B.** La imagen superior es la fotografía de la membrana de nitrocelulosa (numeros impares pertenecen a las bandas del grupo control y las pares al del grupo con EA. La gráfica, muestra la media \pm E.E.M., $p=0.05$,prueba U.

Corteza Entorrinal

Los resultados encontrados en esta región se muestran en la figura 17A. La cuantificación de ChAT en esta región se observó ligeramente incrementada en un 11.32% en el grupo con EA, sin alcanzar diferencias significativas (118 ± 12 vs. 106 ± 6 , del grupo control; $p > 0.05$, U de Mann-Whitney). Sin embargo, el análisis estadístico de la cuantificación de la proteína NRSF en esta región, presentó un incremento del 47% en el grupo con EA (94 ± 4) vs. el grupo control (64 ± 2 ; $p = 0.05$, U de Mann-Whitney) Fig.17B.

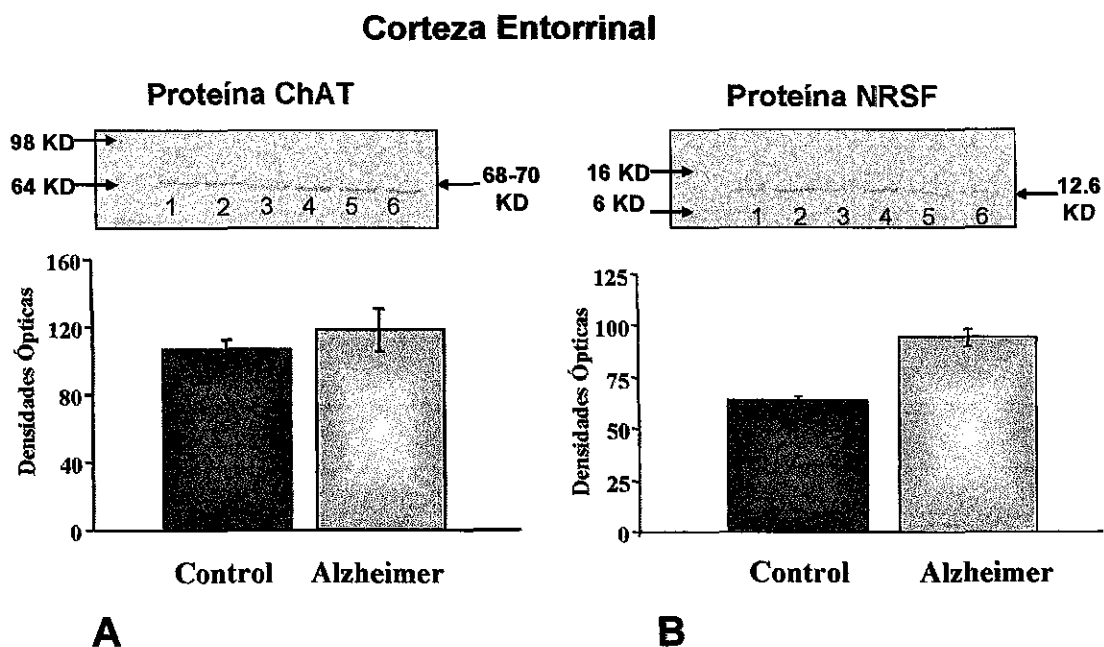


Fig. 17. Niveles de proteína de ChAT y NRSF. A. La imagen superior es la fotografía de ChAT (Números impares, señalan las bandas del grupo control; los pares pertenecen al grupo con EA). La gráfica señala la media \pm E.E.M., $p = 0.43$, prueba, U. B. Imagen superior es la fotografía de NRSF (números impares pertenecen al grupo control y los pares al EA). La gráfica indica la media \pm E.E.M., $p = 0.05$, prueba U.

Corteza Parietal

Los datos obtenidos mostraron una disminución del 4.5%, sin alcanzar diferencias significativas en la concentración de la proteína ChAT en el grupo de pacientes con EA (85 ± 9) en comparación con el grupo Control (89 ± 14 ; $p > 0.05$, U de Mann-Whitney). Por su parte, en la evaluación de la proteína NRSF en el grupo con EA presentó un marcado incremento del 79% en esta región cuando se comparó con el grupo control (226 ± 29 vs. 127 ± 15 , respectivamente, $p = 0.05$, U de Mann-Whitney; ver figura 18 A,B).

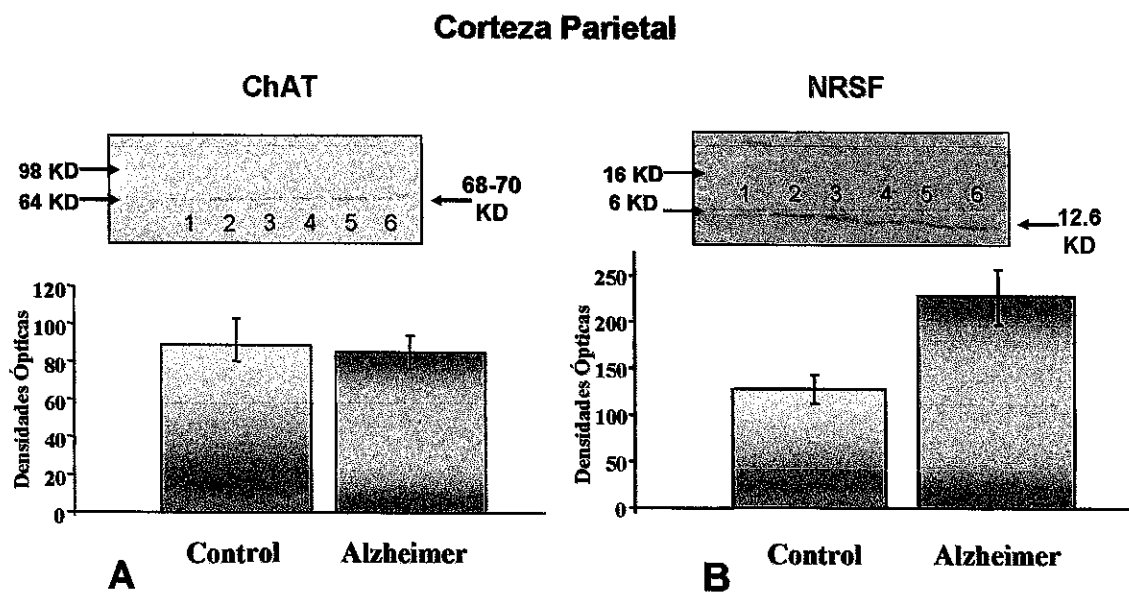


Figura 18. Cuantificación de las proteínas ChAT y NRSF. A. La imagen superior es la fotografía de ChAT (1,3,5 pertenecen al grupo control y 2,4 y 6 al grupo con EA). La gráfica indica la media \pm E.E.M. $p = 0.8$, prueba U. B. Imagen superior es la fotografía de NRSF (1,3 y 5 pertenecen al grupo control y 2,4 y 6 al grupo con EA). La gráfica indica la media \pm E.E.M., $p = 0.05$, prueba U.

C) Análisis Regional de la cuantificación de CHAT y NRSF en Control y EA

En un análisis regional, encontramos que tanto en los controles como en las personas con la EA el patrón de distribución de la expresión del gen *CHAT* (medido mediante la expresión del ARNm de *CHAT*), es mayor en corteza frontal y entorrinal y menor en las regiones temporal y parietal. Sin embargo, la expresión es mayor en los controles que en las personas con EA (ver tabla 2 y figura 19, A).

El análisis de la media regional de los resultados globales de la expresión genética y de la proteína de ChAT y NRSF mostraron que la expresión del gen *CHAT* fue menor en un 39% en el grupo con EA vs. control (62 ± 12 vs. 102 ± 16 ; $p < 0.05$, *U* de Mann Whitney), mientras que las concentraciones de proteína ChAT fueron menores en un 17% en el grupo con EA vs. controles (84 ± 7 vs. 101 ± 4 ; $p < 0.05$, *U* de Mann Whitney). Por otra parte, los resultados mostraron que la expresión del gen de *NRSF* es mayor en un 86% en el grupo con EA en comparación con el control (138 ± 12 vs. 74 ± 11 ; $p < 0.001$, *U* de Mann Whitney) y los niveles de su proteína son mayores en un 57% en el grupo con EA (258 ± 76 vs. 164 ± 46 ; $p > 0.05$, *U* de Mann Whitney).

Tabla 2. Expresión^a de los genes *CHAT* y *NRSF* y de las proteínas ChAT y NRSF en la EA y Controles

REGIÓN	CONTROL				ALZHEIMER			
	CHAT		NRSF		CHAT		NRSF	
	ARNm	Proteína	ARNm	Proteína	ARNm	Proteína	ARNm	Proteína
Valor global ^b	102 ± 16	101 ± 4	74 ± 11	164 ± 46	62 ± 12*	84 ± 7*	138 ± 12**	258 ± 76
C. Frontal	145 ± 9	101 ± 6	120 ± 15	64 ± 11	115 ± 7*	58 ± 5*	174 ± 20*	60 ± 10
C. Temporal	45 ± 2	107 ± 2	37 ± 2	438 ± 62	29 ± 4	84 ± 4	71 ± 4	719 ± 33
C. Entorrinal	162 ± 3	106 ± 6	62 ± 2	64 ± 2	59 ± 16	118 ± 12	147 ± 16	94 ± 4
C. Parietal	40 ± 10	89 ± 14	61 ± 14	127 ± 15	29 ± 12	85 ± 9	142 ± 15	226 ± 29

Fuente: Directa

a: Unidades en Densidades Ópticas

b: media y EEM de las cuatro regiones estudiadas

* p < 0.05 en comparación intergrupos de la variable señalada, U de Mann-Whitney

** p < 0.001 en comparación intergrupos de la variable señalada, U de Mann-Whitney

En todas las comparaciones intragrupos, p > 0.05, prueba de Wilcoxon

A pesar de las variaciones de la expresión del gen *CHAT*, en los controles la expresión de la proteína ChAT se mantiene constante (ver fig.19, B), mientras que en las personas con EA esta expresión presenta un pico en la corteza entorrinal y notable disminución en la corteza frontal (p > 0.05, prueba W). La expresión de la proteína ChAT en corteza temporal (p = 0.05, U) y parietal (p > 0.05, prueba U) fue similar entre sí y ligeramente menor a la de los controles (ver figura 19, B).

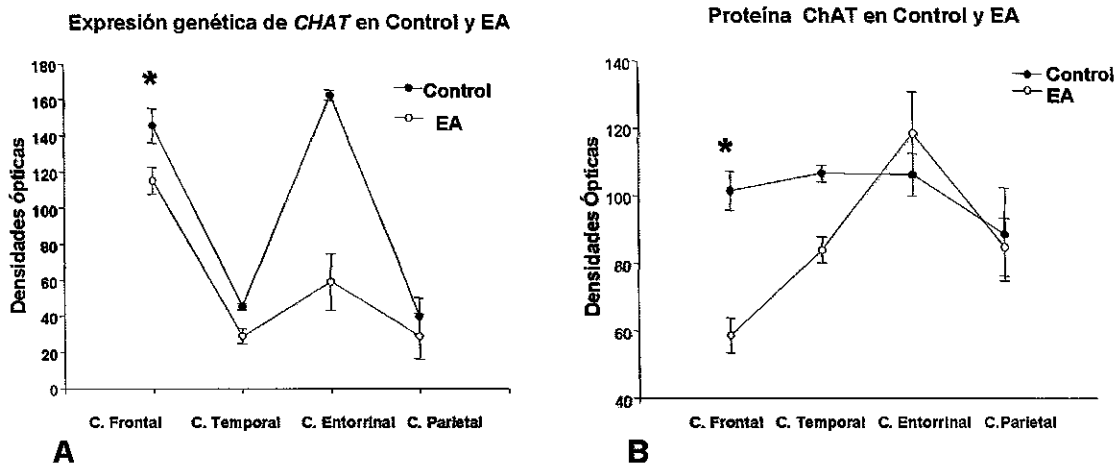


Figura. 19. Expresión genética de *CHAT* y su proteína. A. La curva de expresión de *CHAT* en ambos grupos es similar, aunque menor en el grupo de EA. B. La curva de expresión de ChAT se mantiene constante en el grupo control, mientras que la del grupo de EA presenta un pico en la corteza entorrinal y una marcada disminución en la corteza frontal. En ambas gráficas, los valores indican la media \pm E.E.M., $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon, intragrupos; * $p < 0.05$, U.

Por otra parte, los resultados del análisis regional del gen *NRSF* muestran un patrón de expresión similar al del gen *CHAT* (mayor en corteza frontal y menor en temporal; $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon). A diferencia de la expresión del gen *CHAT*, cuya expresión es mayor en los controles, la expresión del gen *NRSF* es mayor en las personas con EA y la expresión de la proteína *NRSF* no es constante (mayor en región temporal, con niveles similares en corteza frontal, entorrinal y parietal; $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon, ver tabla 2 y figura 20).

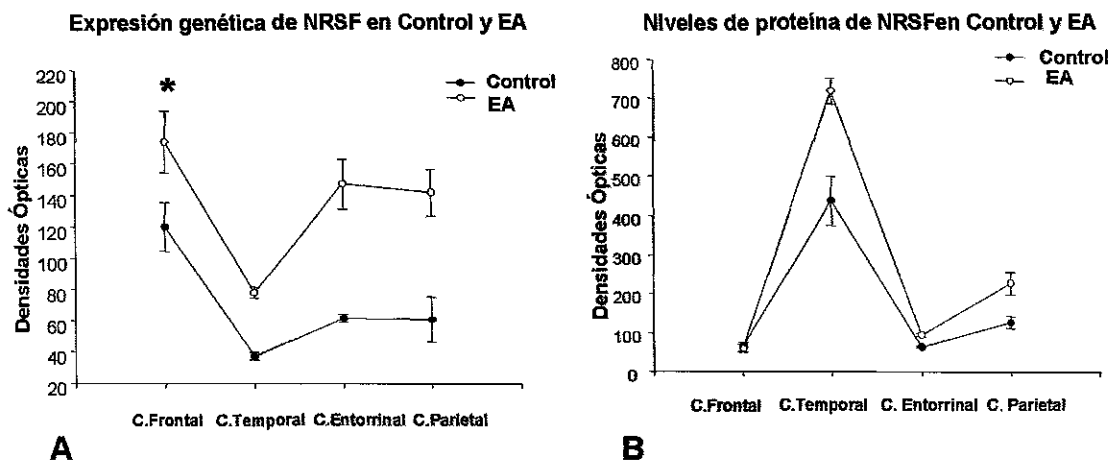


Fig.20. Expresión genética y de proteína de NRSF en Controles y EA. **A.** La expresión genética de *NRSF* es similar en ambos grupos, sin embargo la expresión es mayor en el grupo con EA. **B.** La expresión de la proteína NRSF es mayor en el grupo con EA. En ambas gráficas se muestra la media \pm E.E.M., $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon, intragrupos; * $p < 0.05$, prueba U.

Los resultados de la expresión genética de *CHAT* en el grupo control mostraron variaciones en las diferentes regiones analizadas con niveles balanceados de su proteína (ver figura 21,A). En las personas con EA, la expresión presenta un pico en la corteza entorrinal y notable disminución en la corteza frontal ($p = 0.05$, prueba W). La expresión de la proteína ChAT en corteza temporal ($p = 0.05$, W) y parietal ($p > 0.05$, prueba W) fue similar entre sí y ligeramente menor a la de los controles (ver figura 21, B).

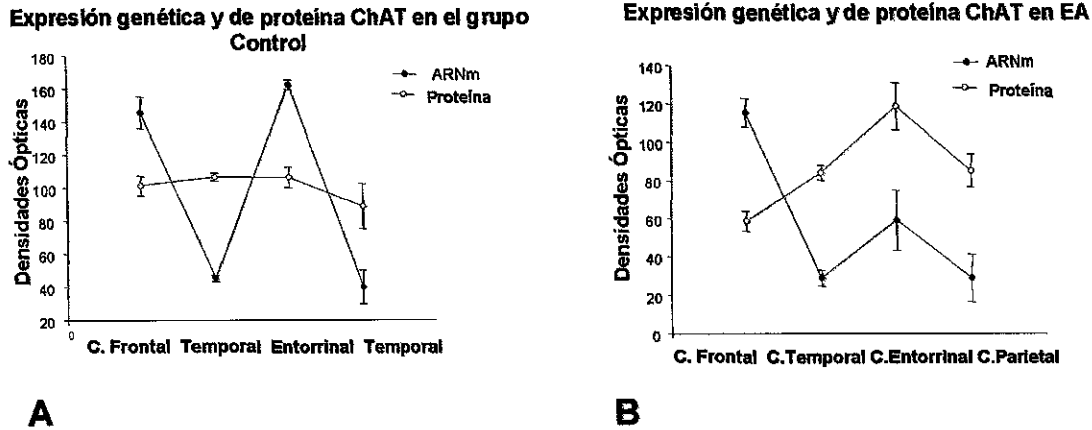


Figura 21. Se muestra la relación entre los niveles de expresión génica y proteínica de ChAT en las diferentes cortezas analizadas en ambos grupos **A.** Resultados del grupo control. **B.** Resultados del grupo con EA. Los datos expresan la media \pm E.E.M. $p > 0.05$, prueba Wilcoxon

Los resultados de la interacción entre la proteína NRSF contra la expresión génica de *CHAT* muestran una disminución en la expresión de *CHAT* principalmente en la región temporal y parietal del grupo control a diferencia de los niveles de NRSF que se encuentran incrementados en estas mismas regiones cerebrales ($p > 0.05$; prueba de Wilcoxon, ver figura 22,A). En el grupo con EA se registraron niveles de expresión génica disminuidos de *CHAT* en la corteza temporal, entorrinal y parietal con niveles elevados de la proteína NRSF en estas mismas regiones ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon, ver figura 22,B).

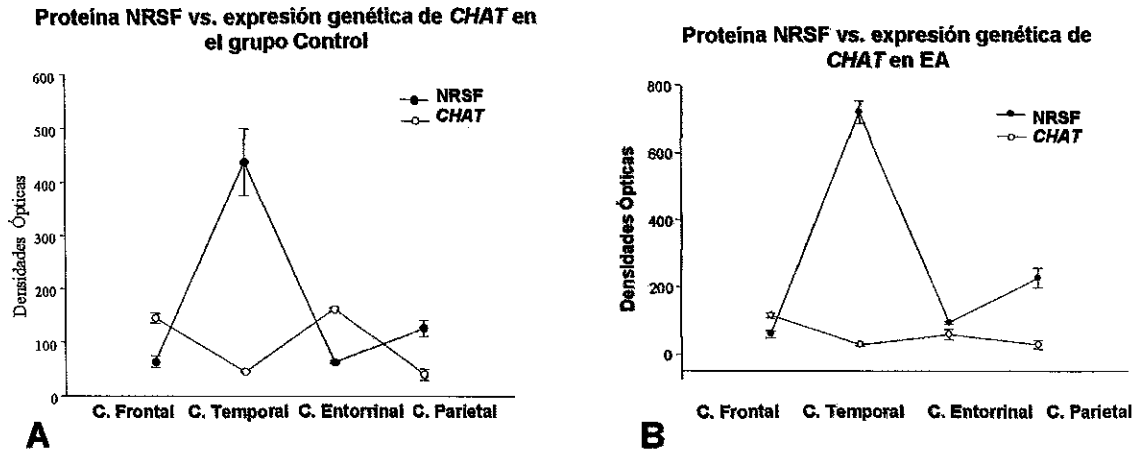


Figura 22.A. Interacción de la proteína NRSF contra la expresión génica de CHAT en las diferentes cortezas cerebrales del grupo control. B. Interacción de NRSF contra la expresión génica de CHAT en EA (Los datos expresan la media \pm E.E.M., $p > 0.05$, prueba Wilcoxon,).

X. DISCUSIÓN

Expresión del gen *CHAT* y de la proteína NRSF en el grupo Control

La síntesis de las moléculas colinérgicas neuronales involucradas en la neurotransmisión de la Ac está elaboradamente controlada por elementos reguladores de ADN y de proteínas de unión al ADN. En modelos murinos y en cultivos celulares de roedores se ha observado que la expresión génica de *CHAT* está regulada por la proteína NRSF (Shimojo, Wu and Hersh, 1998; Hersh et al., 2003). Además, se ha encontrado que el locus del gen colinérgico en humanos contiene una secuencia homóloga al NRSF/NRSE de la rata en una región correspondiente (Hahm et al., 1997; Tanaka et al., 1998). También existe evidencia de que NRSF se expresa en células humanas de la médula espinal y placenta a término (Oda et al., 2004). Por lo tanto, puede suponerse que la expresión del gen colinérgico *CHAT* está reprimido en las células neuronales en humanos de una forma similar al de los modelos murinos. Lo anterior generaría una expresión disminuida del gen *CHAT* en células neuronales que expresen la proteína NRSF.

En este estudio, el aumento de la proteína NRSF y la disminución de la expresión del gen de la *CHAT* en los cerebros de controles concuerda con el comportamiento esperado para este complejo: la regulación negativa de la expresión del gen *CHAT* por parte de la proteína NRSF. Esto indica que la interacción NRSF/ *CHAT* se comporta de manera similar al observado en los modelos murinos y de cultivo celular (Schoenherr et al., 1995; Palm et al., 1998; Chen et al., 1998; Jones and Meech, 1999; Hersh et al., 2003). Este estudio es el primero que demuestra dicha relación en tejido neuronal de humano. En dicha relación, la expresión del gen *CHAT* es mayor en la región frontal y entorrinal y menor en la región temporal y parietal.

En este estudio, la mayor expresión del ARNm del gen *CHAT* en la región frontal puede explicarse por la presencia de circuitos con funciones primordiales de regulación motora (Myers, 2005). La presencia de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral ha sido descubierta recientemente, aunque su topografía es más selectiva (no se encuentra en cortezas sensoriales primarias) y su distribución en cada región es escasa (Kasashima, Muroishi, Futakuchi, Nakanishi & Oda, 1998; Kasashima, Muroishi, Futakuchi, Nakanishi & Oda, 1999). Uno de los principales sitios a cargo de la memoria de trabajo se encuentra en la corteza frontal, además de que la corteza somatomotora y premotora (áreas 4 (Passingham, 1993, cap. II) y 6, 8 y 9 de Brodmann, respectivamente (Passingham, 1993, cap. II, III, IV, V) se ubican en esta región y tienen como principal función la ideación de la conducta motora (Passingham, 1993, cap. II).

La persistencia de la memoria (en este caso, memoria declarativa, para el aprendizaje de habilidades motoras) requiere de circuitos reverberantes para, junto con otros neurotransmisores - catecolaminas, glutamato (Francis, 2006; Walton & Dodd, 2006)-, mantener el estímulo por periodos de tiempo mayores al de la duración usual del potencial de acción (Gumá, 2001, cap. 7). Un circuito así podría utilizar la Ac como neurotransmisor, ya que la ChAT, al reciclar la colina utilizada, permite una persistencia de la señal química en estos pequeños circuitos. Esto haría de la ChAT y su codificación génica un elemento indispensable. De esta forma, una mayor expresión del ARNm de *CHAT* generaría más proteína ChAT, la cual serviría a su vez para el reciclamiento de la Ac que estaría aportada por zonas locales (escasas neuronas colinérgicas en la corteza frontal) o distales (Núcleo Basal de Meynert y Núcleo Septal Medial).

De la misma forma, los hallazgos encontrados en la corteza entorrinal pueden atribuirse a que es una región con numerosas aferencias colinérgicas -procedentes principalmente de la Banda Vertical Diagonal de Broca y el Núcleo Basal de Meynert- (Fibiger, 1982; Semba, et al., 1989; Mesulam, 1996) y su proximidad con el hipocampo, además de su conectividad con la amígdala y cortezas de asociación requiere también de circuitos reverberantes aunque en este caso su participación sería distinta al de la regulación motora (Alcaraz, 2001, cap. 6). En este caso, colaboraría en la generación de la memoria sensitiva olfativa y contribuiría en la generación de emociones por su asociación con la amígdala y el giro del cíngulo, todos ellos componentes del circuito de Papez (Squire & Zola-Morgan, 1991; Wible, Shiber & Olton, 1992; Price, 2000).

Expresión del gen *NRSF* y de la proteína NRSF en controles

Se observa que la expresión del gen *NRSF* en los controles es prácticamente constante, pero disminuye en la corteza temporal. Además, la expresión de la proteína NRSF se incrementa significativamente en esta región. Debido a esto, decidimos buscar una relación de la expresión gen / proteína, en la que encontramos que en la región temporal se producen 11.83 proteínas por unidad de ARNm del gen *NRSF*, contra un global (todas las regiones) de 2.2. En las demás regiones se preserva la proporción gen / proteína en relación con el valor global.

Esta relación incrementada en la región temporal nos hablaría de un mecanismo de regulación postranscripcional de la expresión del gen *NRSF*, en el que podría estar participando un mayor número de ribosomas adheridos a la hebra del ARNm del gen *NRSF* para producir una mayor expresión de la proteína NRSF. Existe evidencia de que para una hebra de ARNm se pueden

intercalar múltiples ribosomas para la codificación de proteínas, un mecanismo así podría estar ocurriendo en este caso (Lewin, 2000; Luque & Herráez, 2002).

El observar que ni la cantidad de expresión del gen *CHAT* ni de la proteína ChAT disminuyen en la misma proporción al aumento de *NRSF/NRSF* nos indica que, por lo menos en la región temporal, la proteína NRSF regula más de un sólo gen. Se ha visto que este gen también regula la expresión de los genes BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) (Timmusk, Palm, Lendahl & Metsis, 1999), sinapsina I (Thiel, 1994), SCG10 (Mori et al., 1990; Mori et al., 1992), canal de Na⁺ (Chong, Tapia-Ramirez, Kim, Toledo-Aral & Zheng, 1995), la subunidad $\beta 2$ del receptor nicotínico (Bessis, Salmon, Zoli, Le Novere, Picciotto & Changues, 1995; Bessis et al., 1997) de acetilcolina y la subunidad $\mu 4$ del receptor muscarínico de nicotina, entre otros (Roopra, Sharling, Word, Briggs, Bachfischer & Paquette, 2000). Muy probablemente el papel de la proteína NRSF en esta región no se limita exclusivamente a la regulación de la expresión del gen *CHAT*, sino también a la de, por lo menos, alguno de los otros genes ya mencionados. Sería necesario buscar la expresión de estos genes en las regiones estudiadas para evaluar dicha relación.

Es de tener en cuenta, además, que en el homogenizado de tejido cerebral que se utilizó para este estudio pudiera contener tanto terminales pre-sinápticas como post-sinápticas y es probable que la sobreexpresión de NRSF se deba a que las neuronas colinérgicas post-sinápticas también produzcan esta proteína restrictora ya que se ha demostrado que también interactúa con los genes de otros tipos de proteínas (en los que también se ha reportado la secuencia NRSE), como las subunidades GluR2 y GluR1 de los receptores a glutamato. Se ha observado que estas subunidades regulan la expresión de NRSF (Myers et al., 2000; Myers, Peters, Huang, Comer, Barthel & Dingleline, 2000; Huang, Doherty & Dingleline, 2001) y dado que la actividad sináptica en esta

zona está dada principalmente por glutamato, éste puede regular la expresión de las subunidades de los receptores mediante la expresión de NRSF.

Expresión de la proteína ChAT en el grupo control

Además de la expresión del gen *CHAT*, decidimos determinar las concentraciones de la proteína ChAT para saber si la información genética correspondería con la cantidad de proteína producida. Se observa que el nivel de proteína ChAT se mantiene prácticamente constante en todas las regiones estudiadas. La actividad de la proteína NRSF que se encuentra en estas regiones está “balanceada” en relación con la expresión del gen *CHAT* (en una relación inversamente proporcional), lo que contribuiría a mantener constante el nivel de expresión de la ChAT en todas las regiones. De esta forma, en las regiones temporal y parietal, una mayor cantidad de la proteína NRSF limita la expresión del gen *CHAT*, como se describió en la sección anterior.

El hecho de tener niveles de la proteína ChAT que sobrepasan por mucho la expresión del gen *CHAT* en la región temporal y parietal puede explicarse por la gran cantidad de aferencias colinérgicas procedentes del Núcleo Tegmental Ventral (para la región temporal) y del Núcleo Septal Medial (para la región parietal) (Fibiger, 1982; Semba, et al., Fibiger, 1989; Gaykema et al., 1990; Mesulam, 1996). La enzima ChAT se origina en sitios distantes y migra hacia el botón sináptico (Frizell et al., 1970; Martínez-Murillo et al., 1989; Oda, et al., 1992; Oda et al., 1996), por lo que es probable que las mismas aferencias colinérgicas de sitios distales proporcionan el exceso de la enzima ChAT en relación a la expresión génica en las regiones temporal y parietal.

El que existan neuronas colinérgicas en la región frontal (como se demuestra con una elevada expresión del gen *CHAT*) con una cantidad constante de enzima ChAT hace creer que si bien hay producción tanto de acetilcolina como de la ChAT en estas regiones, éstas mantienen los circuitos con aferencias principalmente de tipo distal y probablemente escasa distribución local, haciendo que la ChAT se distribuya a sitios diferentes de donde fue producida. Probablemente la producción de la proteína ChAT en estos sitios (corteza frontal y entorrinal) esté contribuyendo en cierta medida a los valores elevados de la enzima ChAT en las regiones temporales y parietales, manteniendo circuitos con estas zonas. La comprobación de dichos circuitos requiere un estudio posterior que permita confirmar los sitios de distribución cerebral de la acetilcolina y de la enzima ChAT producidas en las regiones frontal y entorrinal.

Expresión del gen *CHAT* y de la proteína NRSF en la EA

En los pacientes con la EA se observó una expresión genética de *CHAT* con una tendencia similar a la de los controles: menor en región temporal y parietal y mayor en región frontal y entorrinal (en la región entorrinal el valor es menor que el de la región frontal), aunque en todos los casos, la expresión del gen *CHAT* fue menor en el grupo de EA que en el de los controles. Esto concuerda con los resultados reportados por diferentes autores (Pearson et al., 1985; Strada et al., 1992; Everitt et al., 1997; Boissiere et al., 1997; Baskin, Browing, Pirozzolo, Corporal, Bassin & Appel, 1999; Epstein, 1999) así como con la hipótesis del estudio, en la que se espera una disminución de la expresión de este gen en la EA.

El aumento de la proteína NRSF y la disminución de la expresión del gen *CHAT* en los cerebros de personas con la EA fue otra de las características observadas. Esta relación inversamente proporcional entre la expresión de la proteína NRSF con la expresión del gen *CHAT* concuerda con el comportamiento encontrado en este complejo con el de la población control: la regulación negativa de la expresión del gen *CHAT* por parte de la proteína NRSF. Esto indica que la interacción NRSF / *CHAT* se comporta de la misma forma que aquella observada en el modelo humano sin EA. Debemos señalar que en las personas con EA se observa una mayor expresión de la enzima ChAT en la región entorrinal y una distribución menor en las regiones temporal y parietal, con expresión muy disminuida en la región frontal (alrededor de la mitad en comparación con la región frontal de los controles).

Los cambios encontrados en los casos con EA reflejan una disminución de la actividad colinérgica. Estos cambios concuerdan con lo esperado en esta población, ya que uno de los principales sitios con un patrón de neurodegeneración en la EA es el hipocampo, además de las cortezas entorrinal y temporal (Pearson et al., 1983; Selkoe, 1991; Yanker, 1996; Small, 1998; Garcia-Alloza, Gil-Bea, Diez-Ariza, Chen, Francis, Laceras, et al., 2000; Ikonovic, Mufson, Wu, Bennett & Dekosky, 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que ante daño neuronal de tipo isquémico (Calderone et al., 2003) o inducido por la administración de kainato se produce una sobreexpresión de NRSF (Palm et al., 1998). Los hallazgos en este estudio son una evidencia más de la regulación que el daño neuronal puede ejercer sobre esta proteína.

El hecho de encontrar una disminución de la expresión del gen *CHAT* con un incremento en la expresión de la proteína NRSF indica que tanto la función reguladora de la proteína NRSF como la expresión del gen *CHAT* se mantienen intactos en su relación (a mayor proteína NRSF, menor expresión del gen *CHAT*), es decir, la interacción NRSF/*CHAT* de regulación se mantiene intacto. Al parecer, la interacción NRSF/*CHAT* es independiente de la pérdida de tejido neuronal, aunque el decremento de la expresión del gen *CHAT* no está a la par de la sobreexpresión del NRSF. Como ya se mencionó anteriormente, el NRSF actúa sobre otros genes como BDNF, Sinapsina I y SCG10, etc. (Timmusk et al., 1999; Thiel, 1994; Thiel 1998; Mori et al., 1990; Mori et al., 1992; Chong et al., 1995), por lo que no podemos descartar la posibilidad de que NRSF este interactuando con diferentes procesos, como por ejemplo la regulación del NRSF podría estar relacionada con los procesos de muerte celular programada inducida por la degeneración neuronal propia de esta patología (Chen, et al., 1998; Grooms, Opitz, Bennett & Zukin, 2000), es decir, en la EA el NRSF puede estar ejerciendo un efecto contrario al postulado y regular alternamente la expresión de la ChAT. Sería necesario estudiar la participación de este proceso en la neurodegeneración que se presenta en la EA.

Por otra parte, debemos considerar la probabilidad de que el comportamiento de la interacción NRSF/*CHAT* sea dependiente de la edad. La curva de la interacción NRSF/*CHAT* es similar en su distribución que la de los controles (a mayor proteína NRSF, menor expresión del gen *CHAT*), aunque existe una mayor expresión de NRSF y una disminución en la expresión génica de *CHAT*. Podría pensarse que en sujetos sin demencia ocurra una variación paulatina dependiente de la edad en el comportamiento de esta interacción. Esta variación, sin embargo, encontraría una meseta, impidiendo su progresión, mientras que en las personas con EA esta curva sobrepasaría este punto de meseta y contribuiría en parte a la sintomatología observada en esta enfermedad. Hasta el

momento no existe ninguna investigación donde se analice si la expresión de NRSF en humanos tenga tal comportamiento (dependiente de la edad). Resultaría interesante llevar a cabo una investigación en la que se incluyera tejido cerebral de personas de diferentes edades para registrar si varía dicha expresión.

Expresión de *NRSF* y de la proteína NRSF en la EA

Se observa que la expresión del gen *NRSF* es mayor en las personas con la EA en relación con los controles. Si bien la expresión del ARNm de *NRSF*, se aumentó en un 86% en el grupo con EA en comparación con el control y los niveles de la proteína NRSF aumentaron en un 57% en el grupo con EA, se observa que hay un exceso de producción de proteína NRSF en la región temporal en ambos grupos de estudio. En las personas con la EA, esta proporción se mantiene aunque con mayor expresión (ver gráfica 20, de la sección de resultados), lo que nos indica un mayor efecto regulador en las personas con esta enfermedad. La interacción *NRSF/CHAT* está preservado en esta población, aunque buscando de nuevo la relación de la expresión gen / proteína, encontramos que en la región temporal se producen en la EA 10.12 proteínas por unidad de ARNm del gen *NRSF*, contra un global (todas las regiones) de 1.86. Al igual que en los controles, en las demás regiones se preserva la proporción en relación con el valor global.

Lo anterior parece indicar que los cambios se deben no precisamente a una alteración de esta interacción, sino a daño neuronal. Como se mencionó en el apartado anterior, esto pudiera deberse a un mecanismo de compensación de la producción de NRSF ante la pérdida neuronal, provocando su sobreexpresión. Actualmente se ha descrito que NRSF incrementa sus niveles de expresión en epilepsia (inducida por Kainato) esto indica que la actividad neuronal ante un daño produce una

sobre-expresión de esta proteína (Palm, et al., 1998). Es probable que los resultados en la región temporal de los pacientes con EA se deban en parte a que esta es una de las regiones más vulnerables a los daños producidos por la acumulación de la proteína β amiloide, así como la alteración intracelular de la proteína Tau (Hyman, Van Hoesen, Damasio & Barnes, 1984; Price, Davies, Morris & White, 1991; Avila, 2000; Garcia-Sierra, Wischik, Harrington, Luna-Muñoz & Mena, 2001; Zhang, 2004; Goekoop, Shceltens, Barkhof & Rombouts, 2006) lo que a su vez también puede inducir una respuesta incrementada de NRSF. El hecho de haber encontrado una mayor expresión del gen NRSF en las personas con la EA, nos indica que el efecto que el daño neuronal tiene en la sobreexpresión de NRSF es a nivel nuclear, es decir, parece haber un mecanismo de señalización directo entre el daño neuronal y la expresión génica. Habría que investigar si este efecto es directo o si requiere de intermediarios (incremento de Ca^{++} , activación de receptores, entre otros).

Expresión de la proteína ChAT en la EA

Ya se ha mencionado la interacción NRSF / *CHAT* y de cómo esta influye en la expresión de la proteína ChAT. El hecho de que en el lóbulo frontal haya menor cantidad de proteína ChAT se debería en este caso a la pérdida de aferencias a esta región como consecuencia de la neurodegeneración en los sitios ya mencionados. La mayor expresión de la enzima ChAT en comparación con la región frontal se debería a la persistencia de aferencias por ser sistemas de distribución más locales que el que involucra a la región frontal. Esto es, parece ser que la desaferentación sería más susceptible a presentarse en sistemas colinérgicos de axones largos que en sistemas colinérgicos de axones cortos. La comprobación de este fenómeno requeriría de un estudio posterior.

Puede observarse, además que la concentración de la proteína ChAT es mayor que la expresión del gen *CHAT*, pero de manera “paralela” (como se observó en la figura 21). En este caso, la expresión del gen *CHAT* se reduce, pero la cantidad de proteína no sigue este curso. Esto habla de que puede presentarse un mecanismo de sobreexpresión postranscripcional (como se mencionó anteriormente), o bien habla de que disminuye la actividad sintética de la proteína, pero los niveles no, muy probablemente debido al aporte exógeno de la ChAT por medio de los núcleos colinérgicos que hacen aferencia en estas regiones (núcleo septal medial para región parietal y tegmental ventral para región temporal y entorrinal).

Por otra parte, sería necesario evaluar hasta qué punto la pérdida de aferencias colinérgicas estaría relacionado con la manifestación de los síntomas característicos de la EA, a saber: disfunción en los procesos que involucran el uso de la memoria de trabajo, apraxias ideomotoras, aplanamiento emocional y las agnosias (Yesavage, Brooks, Taylor & Tinklenberg, 1993; Kramer & Duffy, 1996; Barret, Eslinger, Ballentine & Heilman, 2005).

XI.- CONCLUSIONES

- 1.- En las personas sin demencia existe una regulación negativa de la expresión del gen *CHAT* por parte de la proteína NRSF
- 2.- En la Enfermedad de Alzheimer existe una mayor expresión proteica de NRSF que condiciona niveles bajos de la expresión genética de *CHAT*.
- 3.- Este cambio en la Enfermedad de Alzheimer es debido principalmente al daño neuronal propio de la patología.

XII.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las principales limitaciones para realizar este estudio fue la dificultad para conseguir las muestras de tejido cerebral de personas con EA. Actualmente, el número de autopsias ha disminuido significativamente y resulta lamentable que al menos en las personas con EA no se lleve a cabo este estudio, ya que solamente se puede establecer el diagnóstico definitivo de la EA mediante el análisis histopatológico cerebral. Por otra parte, al no contar con el encéfalo completo de personas con EA no se pudieron extraer los principales núcleos colinérgicos (Núcleo Basal de Meynert, Banda diagonal y vertical de Broca, Núcleo Tegmental Ventral, etc.) para realizar una correlación más detallada de la expresión de ChAT y NRSF en todo el sistema colinérgico. Otra de las limitaciones de una muestra pequeña es el no contar con una muestra representativa de cada uno de los estadios de esta patología (leve, moderada y grave) para determinar si estos cambios sufren variaciones graduales o si se estancan en algún momento de la enfermedad.

PERSPECTIVAS

Para corroborar que NRSF regula negativamente la expresión del gen ChAT sería necesario comprobar si la proteína represora se encuentra unida al gen *CHAT* para lo cual es necesario utilizar otra serie de técnicas, como la inmunoprecipitación de la cromatina. Asimismo, se deberá realizar una secuenciación del gen *CHAT* para ver si las modificaciones encontradas en las diferentes regiones analizadas son debidas a una alteración de tipo secuencial de los nucleótidos y en el caso de NRSF para ver qué isoforma es la que se expresa.

Recientemente se ha realizado la valoración de la cantidad de acetilcolina cerebral en los pacientes con EA mediante la espectrofotometría por resonancia magnética funcional. Esta técnica podría ser útil para complementar el "perfil colinérgico" de estos pacientes, es decir, tener la expresión del gen *CHAT*, su regulación por NRSF, la cantidad de enzima ChAT y finalmente la cantidad de acetilcolina resultante. Una de las ventajas de esta investigación sería estudiar el sistema colinérgico de las personas con EA *in vivo* y continuarlo con el estudio *post mortem*.

También resultaría interesante analizar la expresión de la interacción NRSF/*CHAT* en otros procesos neurodegenerativos (esclerosis lateral amiotrófica y epilepsia frontal nocturna, entre otras) para determinar si estos cambios son exclusivos de la EA o si son similares a los de otra enfermedad y en qué intensidad.

- Alcaraz, V.M. (2001). Mecanismos cerebrales del aprendizaje simple y complejo. En Alcaraz, V. & Gumá, E. (Eds.). *Texto de Neurociencias Cognitivas* (pp.143-192). México, DF: *Manual Moderno*.
- Alvarado, C., Hernández, A.B. & Tapia, R.O. (2004). Prevalence of dementia and Alzheimer's disease in elders of nursing homes and a senior center of Durango city, México. *BMC Psychiatry*, 4-3.
- Amenta F., Parnetti, L., Gallai, V. & Wallin A. (2002). Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursor. Ineffective treatments of inappropriate approaches? *Mech Ageing Dev*, 12, 2025-2040.
- Andria, M.L. & Simon, E.J. (2001). Identification of neurorestrictive suppressor element (NRSE) in the human mu-opioid receptor gene. *Brain Res Mol Brain Re*, 91, 73-80.
- Arias, E., Morales, A., Maynard, W., Flores, M. González, E. Velásquez, I. & Ortiz, G. (2006). Deterioro cognitivo en el adulto mayor. En *Investigación en neurociencias* Dr. Alfredo Feria Velasco. México. Bios-Médica editores.
- Arrigada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte & Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurolog*, 42, 631-639.
- Ashraf, S.I. & Ip, Y.T. (1998). Transcriptional control: repression by local chromatin modification. *Curr. Biol*, R683-R686.
- Avila, J. (2000). Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. *FEBS lett*, 30, 89-92.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D.D., Speh, J.C. & Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cel*, 121(4), 645-57.
- Barger, S. & Harmon, A.D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*, 388, 878-881.
- Barret, A.M., Eslinger, P.J., Ballentine, N.H., Heilman, K.M. (2005). Unawareness of cognitive deficit (cognitive anosognosia) in probable AD and Control subjects. *Neurology*, 64(4), 693-699.
- Baskin, D.S., Browing, J.L., Pirozzolo, F.J., Korporaal, S., Baskin, J.A. & Appel, S.H. (1999). Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 56(9), 1121-1123.
- Bessis, A., Champiaux, N., Chatelin, L., Changeux, J.P. (1997). The neuron-restrictive silencer element : a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proc Natl Acad Sci*, 94, 5906-5911.

- Bessis, A., Salmon, A.M., Zoli, M., Le Novere, Picciotto, M., Changeux, J.P. (1995). Promoter elements conferring neuron-specific expression of the beta 2-subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor studied in vitro and in transgenic mice. *Neuroscience*, 69, 807-819.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., et al. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem*, 64, 749-760.
- Bird, T.D., Stranahan, S., Sumi, S.M., Raskind, M. (1983). Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann Neurol* 14, 284-293.
- Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E.C. (1997). Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 225(3), 169-72.
- Bondareff, W., Mountjoy, C.Q., Roth, M., Hauser, D.L. (1989). Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 10, 709-715.
- Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., et al. (2001). Antioxidant defenses and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally malnourished elderly Alzheimer patients. *Age and Ageing*, 30, 235-24.
- Bozeat, S., Gregory, C.A., Ralph, M.A. & Hodges, J.R. (2000). Wicha neuropsychiatric and behavioral features distinguish frontal and temporal variants or frontotemporal dementia from Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 69, 178-186.
- Calderone, A., Jover, T., Kyung-min, N., Hidenobu, T., Yokota, H., Lin, Y., et al. (2003). Ischemic Insults Derepress the Gene Silencer REST in Neurons Destined to Die. *The Journal of Neuroscience*, 23(6), 2112-2121.
- Carlesimo, G.A., Mauri, M. & Graceffa, A.M.S. (1998). Memory performances in young, elderly, and very old healthy individuals versus patients with Alzheimer's disease: evidence for discontinuity between normal and pathological aging. *J Clin Exp Neuropsychol*, 20, 14-29.
- Carroll, P.T. 1994. Membrana-bound choline O acetyltransferase in rat hippocampal tissue is associated with synaptic vesicles. *Brain Res*, 633, 112-118.
- Chen, Z.F., Paquette, J.A., and Anderson, D.J. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet* 20, 136-142.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-Step of Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.

- Chong, J.A., Tapia-Ramírez, J., Kim, S., Toledo-Arai, J.J., Zheng, Y., Boutros, et al. (1995). Rest: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80, 949-957.
- Coyle, J.T., Price, D.L. & DeLong, M.R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219, 1184-1190.
- Cruz-Alcalá, L.E. & Vazquez-Castellanos, J.L. (2002). Prevalencia de algunas enfermedades neurológicas en la Ciudad de Tepatitlán, Jalisco, México. *Revista mexicana de Neurociencias*, 3(2), 71-76.
- Davis, R.E., Emmerling, M.R., Jaen, J.C., Moos, W.H. & Spiagel L.(1993). Therapeutic intervention in dementia. *Crit Rev Neurobiol*, 7, 41-83.
- DeKosky, S.T., Harbaugh, R.E., Schmitt, F.A., Bakay, R.A., Chui, H.C., Knopman, D.S., et al. (1992). Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. *Ann Neurol*, 32, 625-632.
- Dekosky, S.T., Ikonomic, M.D., Styren, S.D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D.A. et al. (2002). Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 51(2), 143-4.
- Delacourte, F., David, J.P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P. et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52, 1158-65.
- Devi, G., Fotiou, A., Jyrinji, D., Tycko, B., DeArmand, S., Rogaeva, E., et al. (2000). Novel presenilin 1 mutations associated with early onset of dementia in a family with both early-onset and late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 57(10), 1454-1457.
- Epstein, F.H.(1999). Molecular basis of the Neurodegenerative disorders. *New Eng J of Medicine*, 340, 1970-1980.
- Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol*, 48, 649-94.
- Fibiger, H.C.(1982). The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res*, 257, 327-388.
- Finch, C.E., & Morgan, D.G. (1990). RNA and protein metabolism in the aging brain. *Annu Rev Neurosci*, 13, 75-88.
- Flaten, T.P. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull*, 55(2), 187-96.

- Francis, P.T. (2003). Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 18(1), S15-21.
- Fratiglioni, L., Wang, H.X., Ericson K, Maytan M, Winblad B. (2000). Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet*, 355, 1315-1319.
- Frizell, M., Hasselgren Po, & Sjöstrand J. (1970). Axoplasmic transport of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in vagus and hypoglossal nerve of the rabbit. *Exp Brain Res*, 10, 526-531.
- Garcia-Alloza, M., Gil-Bea, F.J., Diez-Ariza, M., Chen, C.P., Francis, P.T., Lasheras, B., et al. (2000). Cholinergic-serotonin imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neurology*, 55(10), 1460-1467.
- Garcia-Sierra, F., Wischik, C.M., Harrington, C.R., Luna-Munoz, J., & Mena, R. (2001). Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*, 22(1-2), 65-77.
- Gaykema, R.P. Luiten, P.G., Nyakas, C., & Traber, J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum diagonal band complex. *J Comp Neurol*, 293, 103-124.
- Geula, C. (1998). Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology*, 51, S18-S29 (Discussion pp S65-S117)
- Goekoop, R., Shceltens, P., Barkhof, F., & Rombouts, S.A. (2006). Cholinergic challenge in Alzheimer's patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation -a pharmacological fMRI study. *Brain*, 129, 141-57
- Goyns, M.H., Charlton, M.A., Dunford, J.E., Lavery, W.L., & Merry, B. J. (1998). Differential display analysis of gene expression indicates that age-related changes are restricted to a small cohort of genes. *Mech Ageing Dev*, 101, 73-90.
- Grooms, S.Y., Opitz, T., Bennett, M.V., & Zukin, R.S. (2000). Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 3631-3636.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-352.
- Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing metabolism and aging. *Genes Dev* 14,1021-6.
- Guma, E. (2001). La memoria humana. En Alcaraz, V & Gumá, E (Eds.), *Texto de Neurociencias Cognitivas* (pp.195-234). México, DF: Manual Moderno.

- Hahn, S.H., Chen, L., Patel, C., Erickson, J., Bonner, T.I., Weihe, E., et al. (1997). Upstream sequencing and functional characterization of the human cholinergic gene focus. *J Mol Neurosci*, 9, 223-236.
- Henke, H., & Lang, W. (1983). Cholinergic enzymes in neocortex, hippocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer's type patients. *Brain Res.* 267,281-291.
- Hersh, L.B., & Shimojo, M. (2003). Regulation of cholinergic gene expression by the neuron restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor. *Life Sciences*, 72, 2021-2028.
- Hodges, J.R., & Patterson, K. (1995). Is semantic memory consistently impaired early in the course of Alzheimer's disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. *Neuropsychologia*, 33, 441-459.
- Huang, Y., Doherty, J., & Dingleme R. (2001). Altered histone acetylation and DNA methylation at GluR2 promoter after status epilepticus (SE). *Soc Neurosci Abst.*
- Hyman, B.T., Van Hoesen, G.W., Damasio, A., & Barnes, C. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225, 1168-1170.
- Ikonomovic, M.D., Mufson, E.J., Wu, J., Bennett, D.A., & DeKosky, S.T. (2005). Reduction of choline acetyltransferase activity in primary visual cortex in mild to moderate Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 62(3), 425-430.
- Janssen, J.C., Lantos, P.L., Fox, N.C., Harvey, R.J., Beck, J., Dickinson, A., et al. (2001). Autopsy-confirmed familial early-onset Alzheimer disease caused by the I153V presenilin 1 mutation. *Arch Neurol*, 58(6), 953-958.
- Jones, F.S., & Meech, R. (1999) Knockout of REST/NRSF shows that the protein is a potent repressor of neuronally expressed genes in non-neural tissues. *Bioessays*, 21, 372-376.
- Kallunki, P., Edelman, G.M., & Jones, F.S. (1998). The neuronal restrictive silencer element can act as both repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 3233-3238.
- Kandel (2000). Integration of sensory and motor function: The association areas of the cerebral cortex and the cognitive capabilities of the brain. En Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (Eds.), *Principles of Neural Science*, vol. 58 (pp 349-380). Mc. Graw-Hill.
- Kapaki, E., Kilidireas, K., Paraskevas, G.P., Michalopoulou, M., & Patsouris, E. (2001). Highly increased CSF tau protein and decreased beta-amyloid (1-42) in sporadicCJD: a discrimination from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(3), 401-3.

- Kasashima, S., Kawashima, A., Muroishi, Y., Futakuchi, H., Nakanishi, I., & Oda Y. (1999). Neurons with choline acetyltransferase immunoreactivity and mRNA are present in the human cerebral cortex. *Histochem. Cell Biol*, 111, 197-207.
- Kasashima, S., Muroishi, Y., Futakuchi, H., Nakanishi, I., & Oda Y. (1998). In situ hybridization study of the distribution of choline acetyltransferase in the human brain. *Brain Res* 806, 8-15.
- Katzman R. (1986). Alzheimer disease. *N Engl J Med*, 314, 964-973.
- Kengaku, M.H., Misawa, H., & Deguchi, T. (1993). Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. *Mol Brain Res*, 18, 71-76.
- Kozin, S.A., Zirah, S., Rebuffat, S., Hoa, G.H., & Debey, P. (2001). Zinc binding to Alzheimer's Abeta(1-16) peptide results in stable soluble complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(4), 959-964.
- Kramer, J.H. & Duffy, J.M. (1996). Aphasia, apraxia, and agnosia in the diagnosis of dementia. *Dementia*, 7(1), 23-26.
- Kraner, S.D., Chong, J.A., Tsay, H.J. & Mandel, G. (1992). A model for neuronal-specific gene regulation. *Neuron*, 9, 37-44.
- Kretschmar, H.A., & Poser, S. (2001). Patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies mistaken for Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(1), 33-39.
- Lawrence, A.D., & Sahakian, B.J. (1995). Alzheimer disease, attention, and the cholinergic system. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 9, 43-49.
- Lawrence, A.D., Sahakian, B.J. (1998). The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic system. *Neurochem Res*, 23, 787-794.
- Lewin, B. (2000). Genes VII. In Oxford (Ed.), *Transcription* (pp. 233-271). New York, USA: Oxford University Press and Cell Press.
- Lönnberg, P., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arhlund-Richter, L., Persson, H., & Ibáñez, C.F. (1995). Regulatory region in choline acetyltransferase gene directs developmental and tissue-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4046-4050.
- Lönnberg, P., Schoenherr, C.J., Anderson, D.J., & Ibáñez, C.F. (1996). Cell type-specific regulation of choline acetyltransferase gene expression. *J Biol Chem*, 271, 358-365.
- Lunyak, V.V., & Rosenfeld, M.G. (2005). No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell*, 121(4), 499-501.

- Luque, J., & Herráez, A. (2002). Biología Molecular e Ingeniería Genética. In Harcourt (Ed.), Maduración del RNA o procesamiento postranscripcional (pp. 275-284). Madrid, España: Gráficas Marte, S.A.
- Mallet, J., Houhou, L., Pajak, F. (1998). The cholinergic locus: ChAT VAcHT genes. *J Physiol*, 92, 145-147.
- Mao, J.J., Katayama, S., Watanabe, C., Harada, Y., Noda, K., Yamamura, Y., et al. (2001). The relationship between alphaB-crystallin and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 3, 180-188.
- Martínez-Murillo, R., Villalba, R.M., Montero-Caballero, M.I., & Rodrigo J. (1989). Cholinergic somata and terminals in the rat substantia nigra: An immunocytochemical study with optical and electron microscopy techniques. *J Comp Neurol*, 281, 397-415.
- Mesulam, M.M. (1996). The system-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alteration in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*, 109, 285-297.
- Mesulam, M.M., Geula, C. (1988). Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: Observation based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J Comp Neurol*, 275, 216-240.
- Mieda, M., Haga, T., & Saffen, D.W. (1997). Expression of the rat m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is regulated by the neuron-restrictive element/repressor element 1. *J Biol Chem*, 272, 5854-5860.
- Misawa, H., Ishii K, & Deguchi T. (1992). Gene expression of mouse/choline acetyl transferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. *J Biol Chem*, 267, 20392-20399.
- Misawa, H., Matsuura, J., Oda, Y., Takahashi, R., & Deguchi T. (1997). Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69 kDa major translation product. *Mol Brain Res*, 4, 323-333.
- Morelli, L., & Castaño, E.M. (1997). Proteínas anormales en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Div Cient*, 7(41), 23.
- Mori, N. (1997). Molecular genetic approaches to the genes of longevity, aging and neurodegeneration in mammals. *Mech Ageing Dev*, 98, 223-30.
- Mori, N., Schoenherr, C., Vandenberg, D.J., & Anderson, D.J. (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but in neuronal cells. *Neuron*, 9, 45-54.
- Mori, N., Stein, R., Sigmund, O., & Anderson, D.J. (1990). A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the SCG10 gene. *Neuron*, 4, 583-594.

- Myers, S.J., Peters, J., Huang, Y., Comer, M.B., Barthel, F., & Dingledine, R. (1998). Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci*, 18, 6723-6739.
- Naruse, Y., Aoki, T., Kojima, T., & Mori, N. (1999). Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 13691-13696.
- Newhouse, P.A., Potter, A., & Lenox, E. (1993). The effects of nicotinic agents on human cognition, possible therapeutic applications in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Med Chem Res* 2, 628-642.
- Oda, Y., Muroishi Y., Misawa H., & Suzuki, S. (2004). Comparative study of gene expression of cholinergic system-related molecules in the human spinal cord and term placenta. *Neuroscience*, 128, 39-49.
- Oda, Y., Muroishi, Y., & Nakanishi I. (1996). Translation initiation sites and relative activity of large and small forms of human choline acetyltransferase. *Mol Brain Res*, 38, 135-138.
- Oda, Y., Nakanishi, I., & Deguchi Y. (1992). A complementary DNA from human choline acetyltransferase induces two forms of enzyme with different molecular weights in cultured cells. *Mol Brain Res*, 16, 287-294.
- Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M., & Timmusk, T. (1998). Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *Journal of Neuroscience*, 18, 1280-96.
- Passingham R. (1993). (Ed.). En *The frontal lobes and voluntary action*. Cap. II Motor Cortex (area 4) pp 13-37; United States: Oxford Psychology series no. 21. Ed. Oxford University press.
- Passingham R. (1993). (Ed.). En *The frontal lobes and voluntary action*. Cap. III Lateral Premotor cortex (area 6) pp 38-68, United States: Oxford Psychology series no. 21. Ed. Oxford University press.
- Passingham R. (1993). (Ed.). En *The frontal lobes and voluntary action*. Cap IV Medial Premotor Cortex (SMA) Area 6, pp 69-101. United States: Oxford Psychology series no. 21. Ed. Oxford University press.
- Passingham R. (1993). (Ed.). En *The frontal lobes and voluntary action*. Cap V: Premotor (area 8) pp 103-122. United States: Oxford Psychology series no. 21. Ed. Oxford University press.
- Pearson, R.C.A., Esiri, M.M., Horns, R.W., Wilcock, G.K., & Powell, T.P.S. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 82, 4521-34.

- Pearson, R.C.A., Esiri, M.M., Hiorns, R.W., Wilcock, G.K., & Powell, T.P.S. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 82, 4521-34.
- Price, D. L. (2000). Aging of the Brain and Dementia of the Alzheimer Type. En Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (Eds.), *Principles of Neural Science*, vol. 58 (pp. 1149-61). Mc. Graw-Hill.
- Price, J.L., Davies, P.B., Morris, J.C. & White, D.L. (1991). The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 12, 295-312.
- Queralt, R., Ezquerro, M., Castellvi, M., Lleo, A., Blesa, R., & Oliva, R. (2001). Detection of the presenilin 1 gene mutation (M139T) in early-onset familial Alzheimer disease in Spain. *Neurosci Lett*, 3, 239-41.
- Roopra, A., Sharling, L., Wood, I.C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A.J. et al. (2000). Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol*, 20, 2147-2157.
- Schoch, S., Cibelli, G., & Thiel, G. (1996). Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *J Biol Chem*, 271, 3317-3323.
- Schoenherr, C.J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9881-9886.
- Schoenherr, C.J., & Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 267, 1360-1363.
- Selkoe, D. (2000). Genética y bases moleculares de la Enfermedad de Alzheimer. En S.T. Dekosky (Ed.), *Clinicas Neurológicas de Norteamérica*. vol 4 (pp.973-994) McGraw-Hill/Interamericana.
- Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487-498.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Review*, 81, 741-766.
- Selkoe, D.J.(2002).Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298, 789-791.
- Shimojo, M., Wu, D., Hersh, L.B. (1998). The cholinergic gene locus is coordinately regulated by protein kinase A II in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 71,1118-1126.
- Singleton, A.B., Hall, R., Ballard, C.G., Perry, R.H., Xuereb, J.H., Rubinsztein, D.C, et al. (2000). Pathology of early-onset Alzheimer's disease cases bearing the Thr113-114 in presenilin-1 mutations.*Brain*, 12, 2467-2474.

- Small, G.W. (1998). The pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Clin Psychiatry*, 59(9), 7-14.
- Solomon, B., Koppel, R., & Jossiphov, J. (2001). Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease-affected brains. *Brain Res Bull*, 55(2), 253-256.
- Squire, L.R., Zola-Morgan S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253, 1380-1386.
- Strada, O., Vyas, S., Hirsch, E.C., et al. (1992). Decreased choline acetyltransferase mRNA expression in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer disease: an in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 9549-9553.
- Tanaka H., Zhao Y., Wu D., & Hersch L.B. (1998). The use of Dnase I hypersensitivity site mapping to identify regulatory regions of the human cholinergic gene locus. *J Neurochem*, 70, 1799-1808.
- Tapia-Ramírez, J., Eggen, B.J, Peral-Rubio, M.J., Toledo Aral, J.J., & Mandel, G. (1997). A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural specific type II sodium channel promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 1177-1182.
- Terry, R.D., Masliah, E., & Salmon, D.P. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30, 572-580.
- Thiel, G., Lietz, M., & Cramer, M.(1998). Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem*, 275, 26891-26899.
- Thiel, G., Schoch, S., Petersohn, D. (1994). Regulation of sinapsin I gene expression by zinc finger transcription factor zif268/egr-1. *J Biol Chem*, 269(21), 15294-15301.
- Timmusk, T., Palm, K., Lendahl, U., & Metsis, M. (1999). Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem*, 274, 1078-1084.
- Walton, H.S., & Dodd, P.R. (2006). Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 30: en prensa.
- Watanabe, H., Mizutani, T., Haraguchi, T., Yamamichi, N., Minoguchi, S., Yamamichi-Nishina, M., et al. (2006). SWI/snf complex is essential for NRSF-mediated suppression of neuronal genes in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Oncogene*, 25(3), 470-479.

Bibliografia

- Wible, C.G., Shiber, J.R., Olton, D.S. (1992). Hippocampus, fimbria-fornix, amygdala, and memory: object discrimination in rats. *Behav Neurosci*, 106(5), 751-761.
- Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Bowen, D.M., & Smith, C.C. (1982). Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J. Neurol Sci*, 57(2-3), 407-417.
- Wu, D., & Hersh, L.B. (1994). Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J Neurochem* 62, 1653-1663.
- Yanker, B.A. (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 16, 921-32.
- Yesavage, J.A., Brooks, J.O., Taylor, J., Tinklenberg, J. (1993). Development of aphasia, apraxia, and agnosia and decline in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*, 150(5), 742-747
- Zhang, X. (2004). Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(2), 137-52.

Anexo I

Diagnóstico de Demencia de acuerdo a los criterios del DSM-IV:

- ❖ Criterio A1: deterioro de la memoria a corto y largo plazo

- ❖ Criterio A2: La presencia de por lo menos uno de los siguientes trastornos cognitivos:
 - A2a: Afasia
 - A2b: Apraxia
 - A2c: Agnosia
 - A2d: Trastornos en la función de ejecución

- ❖ Criterio B: Los trastornos A1 y A2 deben ser lo suficientemente severos como para causar un deterioro significativo en la actividad social y ocupacional y como consecuencia causar una declinación del nivel previo de funcionamiento.

- ❖ Criterio C: Los hallazgos enunciados no deben aparecer exclusivamente durante el curso de un estado confusional agudo (delirium) (17).

Anexo II

Criterios para el diagnóstico de Probable Enfermedad de Alzheimer del Instituto Nacional para los Trastornos Neurológicos de la Comunicación y Apoplejía y la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados de Estados Unidos (NINCDS-ADRDA) (56):

El criterio para el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer probable incluye:

Demencia establecida por examen clínico y documentado por el Mini Mental Test Examination, Escala para la demencia de Blessed o algún otro similar y confirmado por la evaluación neuropsicológica.

Defectos en dos o más áreas de la cognición.

Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas.

Ausencia de perturbación de la conciencia.

Comienzo de la sintomatología entre los 40 y 90 años, más a menudo después de los 65.

Ausencia de trastornos sistémicos u otras enfermedades del cerebro que por sí mismas pudiesen provocar defectos progresivos de la memoria y la cognición.

El diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer probable es apoyado por:

Deterioro progresivo de funciones cognitivas específicas tales como lenguaje (Afasia), habilidades motoras (Apraxias) y perceptivas (Agnosias).

Compromiso de las actividades de la vida diaria y patrones alterados del comportamiento.

Historia familiar de trastornos similares, particularmente probados anatómo-patológicamente, y

Resultados de laboratorio de:

Punción lumbar normal evaluada con técnicas estándar

EEG normal o cambios de carácter inespecífico tales como incremento de actividad lenta.

Evidencia de atrofia cerebral en la tomografía computada con progresión documentada a través de observaciones seriadas o a través de resonancia magnética nuclear.

Otros rasgos clínicos consistentes con el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer probable luego de la exclusión de otras causas de demencia distintas a dicha enfermedad incluyen:

Estancamientos en el curso evolutivo de la enfermedad.

Síntomas asociados de depresión, insomnio, incontinencia, delusiones, alucinaciones, ilusiones, comportamiento catastrófico, verbal o emocional, exabruptos físicos, trastornos sexuales y pérdida de peso; otras anomalías neurológicas, específicamente en estadios más avanzados de la enfermedad que incluyen signos motores tales como incremento del tono muscular, mioclonías o trastornos de la marcha.

Convulsiones en estadios avanzados.

Tomografía dentro de límites normales para la edad del paciente.

Rasgos clínicos que hacen incierto o improbable el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer probable:

Comienzo agudo o apopléctico

Hallazgos de signos neurológicos de carácter focal tales como hemiparesia, pérdida de la sensibilidad, defectos campimétricos visuales y trastornos en la coordinación motora de aparición temprana en la enfermedad.

Convulsiones o perturbaciones de la marcha en estadios iniciales de la enfermedad.

Diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer posible:

Puede ser hecho sobre la base del diagnóstico de síndrome demencial, en ausencia de otra enfermedad neurológica, psiquiátrica o trastornos sistémicos capaces de provocar demencia, y cuando se constatan variaciones en las formas de iniciación, presentación o curso evolutivo del cuadro clínico.

Puede ser hecho, también bajo la presencia de desordenes cerebrales o sistémicos asociados, capaces de provocar demencia pero que no son considerados la causa del síndrome demencial en cuestión, y

Debería ser utilizado en estudios de investigación, cuando un defecto cognitivo único y gradualmente progresivo, es identificado en ausencia de otras causas posibles que lo puedan originar.

Diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer definitivo:

Requiere el diagnóstico de EA probable y la comprobación histopatológica por biopsia o autopsia.

La clasificación de EA para propósitos de investigación debe especificar características que pueden identificar subgrupos de dicho trastorno, tales como:

Antecedentes familiares

Inicio antes de los 65 años

Presencia de trisomía 21

Coexistencia de otras condiciones relevantes como por ejemplo enfermedad de Parkinson.