



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

*Frecuencia del polimorfismo M129V en pacientes con
probable enfermedad de Alzheimer
de inicio temprano*

Tesis
que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIA)

presenta
Víctor Javier Sánchez González

Comité tutorial
Dr. Genaro Gabriel Ortiz (Director)
Dr. Jorge Juarez González
Dr. Emilio Gumá Díaz

A mis padres

Quienes han visto este viaje en sus múltiples circuitos, y aunque a veces no han quedado muy claros la causa y el destino, siempre han estado ahí para apoyarme.

Muchas gracias por su ejemplo y sus consejos, es un orgullo ser su hijo.

A Claudia

Por su cariño y su paciencia en mis horas de trabajo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Instituto Mexicano del Seguro Social, mediante una beca del Fondo al Fomento a la Investigación. Registro: 2006-785-022.

Gracias al apoyo del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Guadalajara, por su formación en el programa de posgrado y la orientación de los miembros del Comité Tutorial.

A la beca recibida por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al National Prion Disease Pathology Surveillance Center, en Cleveland, EUA, por permitirme trabajar las muestras de los pacientes estudiados.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Esta tesis se debe a todos los amigos y compañeros quienes, en mayor o menor medida, coincidieron en la elaboración de este trazo.

La permanencia y transición radican en este trabajo: un sistema de personas, laboratorios y ciudades han dado parcial fundamento del que goza este trabajo. Sin saber el punto preciso de inicio, al menos 3 nodos lo delimitan: un artículo de Prusiner, una idea romántica de la locura y la sabia y prudente insistencia de la Dra. Lourdes Ramírez. La locura llevó a la Demencia (del tipo Alzheimer), el artículo orientó hacia los priones y la doctora insistió: la investigación es tu área, si no en la Genética, sigue tu ruta entre neuronas, pero no te alejes de la investigación. Muchas gracias, doctora, por el empuje y la infinita paciencia hacia su alumno quizás más exótico de todos. Sus enseñanzas, las discusiones académicas y extracurriculares son de admirar por su visión y por ser una extensión de su poesía.

Una gran influencia ha sido mi tutor, el Dr. Genaro Gabriel Ortiz, quien comparte a todo momento su entusiasmo por el Alzheimer, el estrés oxidativo y el Rock and Roll. A su vez, diversos trabajos (todos ellos en el rubro de las demencias) enriquecen su propuesta formativa. Muchas gracias por tantas oportunidades, apoyo y consejos (siempre "en función de tiempo", claro está).

Hay tanta gente qué agradecer del laboratorio: gracias Lucy, mi gran apoyo con los pacientes de la Clínica de Demencias. A Mari y Cristi, siempre pacientes a cuanto ocurrencia surgiera de uno, sobre todo "cuando no tienes las cosas bajo control", muchas gracias por su apoyo, amistad y complicidad. Gracias a Hilda y a su encomiable afán para mantener las cosas en orden ("todo como lo encontraron, dijo el Doctor"). A Milla, a quien agradezco sus tardes entre la Proteinasa K y el CTAB/DTAB. Al "joven" Jorge por sus oídos y su colaboración en el trabajo del laboratorio. A Nohemí, por filtrar pacientes, familiares, jubilados ("no son controles", diría el Dr. Genaro) y cuanta persona interviniera con el orden de la consulta y el laboratorio. A Rocío, "mi Chío", siempre al pendiente de tener "cuidado con el paraformaldehído". Tu asistencia en las autopsias, las sesiones, el laboratorio, las suplencias de algunas clases y ser la fiel escribana de mi versión de Ibarquengoitia han matizado mucho la tensión de las sesiones de trabajo y de ausencia. Un gran abrazo. Alejandro, gracias por compartir los días de consulta, por tu insistencia

académica, esas vueltas al aeropuerto cargado, cargado de cerebros y los momentos nutricios de todos los días.

En el mítico piso 11, del servicio de Neurología, agradezco de inicio a Marthita, cuya organización de las consultas, los pacientes, las recetas y los estudios han hecho que la Clínica de Demencias tenga una sólida estructura. Al Dr. Miguel Ángel, por sus sugerencias y facilitarnos la evaluación de los pacientes, "siempre y cuando tengan entendida la exploración neurológica", por lo cual agradezco a todos los residentes de Neurología: Juan Luis, Oscar, Pepe, Pacheco, Chuy y Ceci, todos siempre al pendiente de nosotros y dispuestos a disipar cualquier duda. Las valoraciones de los Doctores Guzmán y Jiménez Gil de los probables casos de Creutzfeldt-Jakob dieron buen impulso a este trabajo, muchas gracias. A César, buen neurólogo quien sabe de las frustraciones de todo proyecto, pero aún así comparte la ilusión de alcanzar algo mayor. Por supuesto, a todos los pacientes y familiares que generosamente aprobaron colaborar con este trabajo.

En el servicio de Patología agradezco el sincero apoyo del Dr. Vázquez Camacho, quien ha puesto a nuestra entera disposición las salas de autopsias. Su gestión en la remodelación del área para el laboratorio de priones y el Centro de Acopio de Cerebros es invaluable. A los residentes José y Prats que han apoyado en la realización de las autopsias, muchas gracias por el esfuerzo y la tan temida exposición "a tus priones".

Mis agradecimientos en Londres para el Prof. Sebastian Brandner y a Caroline Powell por sus enseñanzas en la histopatología y procesamiento de las laminillas, así como a John Beck por inducirme a la secuenciación del PRNP.

En Edimburgo, agradezco bastante al Dr. Richard Knight por su excelente trato, esas últimas noches pagadas del B&B me dieron el reposo que hacía falta. Al alma de (N)EUROCID y de toda sesión: Terri Lindsay. A Jan Mackenzie, Christian Donaldson, Prof. Ironside, Mark Head, Matt Bishop, Alison Green y Hester Ward muchas gracias por sus enseñanzas en la histopatología, inmunohistoquímica, western-blot, ELISA y todo aquel procesamiento necesario para el estudio de muestras de un paciente con priones. Un agradecimiento muy especial para el Prof. Robert Will, "Bob", quien me orientó desde el principio y me llevó a Eslovenia a mi primera reunión de (N)EUROCID. Basta decir que ese viaje detonó todos los demás. Su humor y su mediación para que todo vaya avanzando hacen de él uno de los grandes personajes que uno encuentra en este campo. Inolvidables también los

momentos en México y en Vancouver con Bob y el Dr. Brown, quien ha estado siempre con un artículo nuevo y un comentario sabio para compartir a todos en el campo. "The voice of wisdom from the background" (Bob dixit).

Siguiente escala: Cleveland: Muchas gracias al Dr. Gambetti por todo el apoyo en recibir cuanta muestra envíe y por arreglar los tiempos de laboratorio para mis visitas de trabajo. Sus enseñanzas de la neuropatología de las enfermedades por priones han sido de los momentos más intensos de esta etapa. Al Dr. Mark Cohen por todo lo aprendido de la neuropatología en general, sobre todo de las enfermedades neurodegenerativas, principalmente Alzheimer y por Priones. A Kay por estar siempre al pendiente de la lista de mis muestras, de tenerlas a tiempo en el laboratorio y de coordinarme con los investigadores del área de Genética y de la Unidad. A Jay y Frieja por su invaluable apoyo en las horas del laboratorio. A "el Pachuco Honorario", Ignazio, siciliano para cuentas rápidas Los meses de trabajo fueron soportables por esas rondas mexicanoitalianas por la ciudad. Tanti grazie. Janis, muchas gracias por mantener la información fluyendo, sin ti gran parte de lo que hay aquí seguiría en los anales de Genética. Keep up the good work, my Captain!

En Göttingen, a la Prof. Inga Zerr y todo su equipo de trabajo: Bettina, Daniela, Lennart, Kathrin, Uta y Jovanna. Sus enseñanzas en el campo clínico, imagenológico y EEG de las enfermedades neurodegenerativas fueron de gran ayuda para el abordaje de los pacientes. Danke schön, hoffentlich treffen wir uns noch einmal in Göttingen!!

De regreso a Guadalajara, agradezco las revisiones puntuales del Dr. Emilio Gumá y el Dr. Jorge Juárez, quienes dieron meticuloso seguimiento de esta tesis y siempre mostraron optimismo y paciencia ante las vicisitudes en el avance de este trabajo. A la Dra. Julieta y al Dr. Zarabozo por su trabajo en la coordinación del posgrado y por ser un antídoto a mi desmemoria.

A mis padres, que siempre estuvieron atentos a todo pendiente que ocurriera en mis salidas, por asegurarse que todo en mi estuviera asegurado. Cualquier obra de parte mía no sería posible sin su incondicional apoyo. A mis hermanos, Oscar e Isa, por las porras en la distancia y ese impulso en la proximidad.

Finalmente, a Claudia, a todo momento en puerto en mi ir y mi venir y quien soportó sonriente y silenciosa tantos momentos de ausencia y de estrés. Muchas gracias por estar siempre ahí. El mar aún no es distante para los dos...

Objetivo: Determinar la frecuencia de las variantes alélicas del gen *PRNP* en pacientes con la Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano y tardío (EAITE, EAITa), así como en pacientes con Enfermedad por Priones.

Metodología: Se analizaron muestras de sangre de 23 pacientes con probable Enfermedad de Alzheimer, para la genotipificación *PRNP* por Reacción en Cadena de la Polimerasa y búsqueda de mutaciones por secuenciación del gen. Para los pacientes con priones, se analizaron laminillas de 6 casos con probable Encefalopatía Espongiforme, además de tejido cerebral obtenido de 3 autopsias y un caso familiar, vivo. Se realizó Inmunohistoquímica para diagnóstico de Enfermedad por Priones. Se obtuvieron los Odds-ratios (OR) para determinar los factores de riesgo de estos componentes.

Resultados: En la población con Enfermedad de Alzheimer, el genotipo MM fue el polimorfismo *PRNP* más común. Al comparar entre EAITE y EAITa, el alelo V fue el más frecuente en la EAITE (OR 7.5; 95% CI 1.54-39.98, $p=0.008$) y el alelo M tiene un OR 0.13 (IC 95% 0.03-0.65, $p = 0.008$). No hubo mutaciones en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, a pesar de que dos polimorfismos y una deleción no patológica fueron encontrados. En los pacientes con Enfermedades por Priones el polimorfismo MM fue el más común. Un caso familiar tuvo la mutación E200K. Ningún caso con Enfermedad de Alzheimer se asignó como por Enfermedad por Priones.

Conclusiones: El alelo V del *PRNP* es factor de riesgo de la EAITE, mientras que el alelo M disminuye el riesgo de padecer EAITE.

Objective: To evaluate the frequency of *PRNP* genotypes in Early Onset and Late Onset Alzheimer's Disease (EOAD, LOAD) subjects as well as in Prion Disease's.

Methods: Blood samples from 23 patients fulfilling NINCDS-ADRDA diagnostic criteria for Alzheimer's Disease were collected for *PRNP* PCR-genotyping. Search of mutations was also looked for by means of gene sequencing. In prion cases, slides of 6 suspected Spongiform Encephalopathy were analyzed, as well as brain tissue from 3 autopsies and an alive familial case. Immunohistochemistry was used for the definitive diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. Odds ratios (OR) were obtained to determine risk factor of these components.

Results: MM genotype was the most common *PRNP* polymorphism in the Alzheimer's Disease population. V *PRNP* allele was more common in EOAD than in LOAD (OR of 7.5, 95% CI 1.54-39.98, $p = 0.008$), the M allele having an OR of 0.13 (CI 95% 0.03-0.65, $p = 0.008$). There were no mutations in the Alzheimer's Disease population, despite the presence of 2 different polymorphisms and a non pathologic deletion. In prion disease subjects, MM genotype was the most common polymorphism. A familial case was E200K, M129M. No Alzheimer's Disease case was assigned as being caused by prions.

Conclusions: The V *PRNP* allele is a risk factor for EOAD, whereas the M allele diminishes the risk for EOAD.

Índice

ABREVIATURAS	1
I.- INTRODUCCIÓN	3
II.- ANTECEDENTES	4
Enfermedad de Alzheimer	5
Anatomopatología de la Enfermedad de Alzheimer	6
Genética de la Enfermedad de Alzheimer	9
Proteína del β -amiloide	10
La "cascada del amiloide"	11
Apolipoproteína E	12
Características clínicas de la Enfermedad de Alzheimer	14
Variantes de la Enfermedad de Alzheimer	15
Enfermedades por priones	19
Características clínicas de las enfermedades por priones	20
Anatomopatología de las enfermedades por priones	22
Genética de las enfermedades por priones	23
Biología de los priones	24
Diagnóstico de las enfermedades por priones	26
Semejanzas y diferencias entre los priones y la β APP	26
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV.- HIPÓTESIS	32
V.- OBJETIVOS	33
VI.- MATERIAL Y METODOS	
Diseño experimental	34
Estudio de frecuencia de las enfermedades por priones	36
Toma y transporte de las muestras	37
Determinación de los genotipos y alelos del gen <i>PRNP</i>	37

Análisis estadístico	38
VII.- RESULTADOS	
Variables demográficas de los grupos de estudio	40
Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar	42
Genotipificación <i>PRNP</i>	43
Sujetos con Enfermedades por Priones	47
VIII.- DISCUSIÓN	52
IX.- CONCLUSIONES	
Conclusiones	59
X.- BIBLIOGRAFIA	60
XI.- ANEXOS	68
Anexo I Criterios de demencia del DSM-IV	68
Anexo II Criterios de la EA del NINCDS-ADRDA	69
Anexo III Criterios de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	71
Anexo IV Extracción de ADN, micrométodo	73
Anexo V Extracción de ADN, método de Miller	75
Anexo VI Precipitación de ADN	76
Anexo VII Protocolo de secuenciación del gen <i>PRNP</i>	77
Anexo VIII Inmunohistoquímica, PrP ^{Sc}	80
Anexo IX Carta de consentimiento informado	81
Anexo X Carta del Comité de Ética, IMSS	82
Anexo XI Carta del Comité de Ética, Instituto de Neurociencias	83

ADAM	Dominio de disintegrina y metaloproteinasa
β-APP	Proteína precursora del beta amiloide
βA	Beta-amiloide
A	Adenina
ApoE	Apolipoproteína E
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
ARN	Ácido-ribonucleico
BACE1	Beta secretasa
°C	Grados centígrados
C	Citosina
CI	Cociente intelectual
CTAB	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
DE	Desviación estándar
dNTP	Dinucleótido trifosfatado
DSM-IV	Diagnostic State Mental Evaluation IV
DTAB	Dodecil trimetil amonio
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAITe	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano
EAITa	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
ECJs	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
ECJf	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Encefalopatía Espongiforme
EEG	Electroencefalograma
EET	Encefalopatía Espongiforme Transmisible
EP	Enfermedades por Priones
G	Guanina
GABA_A	Ácido gamma- amino butírico
HCl	Ácido clorhídrico
IC	Intervalo de Confianza

IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobases
KDa, Kd	Kilodalton
NINCDS	National Institute for Neurological and Communicative Disorders and Stroke
mA	Miliamperes
µg	Microgramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
MMSE	Mini Mental State Examination
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrógeno
PrP^c	Proteína Priónica Celular (Normal)
PrP^{Sc}	Proteína Priónica Anormal (Scrapie)
PSE1	Presenilina 1
PSE2	Presenilina 2
pter	P terminal, región final del brazo corto de un cromosoma
OR	Odds-ratio
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
T	Timina
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unidades
UK	Reino Unido (United Kingdom)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
5-HT	Serotonina

El concepto de enfermedades por mal plegamiento proteico ha surgido para englobar un espectro de enfermedades que tienen en común una conformación espacial distinta a la normal en varias proteínas celulares. La agregación proteica y los cuerpos de inclusión son característicos de estas enfermedades, entre las que se encuentran la Enfermedad de Alzheimer (EA) y las Enfermedades por Priones (EP).

Los cuerpos de inclusión pueden ser una etapa final de un proceso previo de degeneración que puede ser común en estas enfermedades. La EA es la patología más común por mal plegamiento proteico, pero las enfermedades por priones han tenido un estudio amplio que ha permitido conceptualizar mejor a la EA. Las similitudes entre estas enfermedades ha originado la teoría de que existe una correlación entre ambas.

El polimorfismo M129V es determinante en el fenotipo clínico de las EP, siendo la variante VV (o con un alelo V) la que está más relacionado con las variantes de tipo familiar y con presentación de mayor duración, muy semejante a una EA. El objetivo de este trabajo fue el de encontrar la influencia de la variante polimórfica V de la proteína por priones en la EA de origen temprano.

Este estudio demuestra que en la población con EA, al igual que en las enfermedades por priones, el genotipo MM es el polimorfismo *PRNP* más común. Sin embargo, al comparar entre EA de Inicio Temprano (EAITE) y la EA de Inicio Tardío (EAITa), el alelo V fue más frecuente en la EAITE. Ninguna mutación se encontró en el gen *PRNP*, por lo que se infiere que el alelo V es un factor de riesgo *per se* para la EAITE.

II.- Antecedentes

Recientemente ha aumentado la evidencia de que diversas enfermedades neurodegenerativas tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica y las Enfermedades por priones tienen mecanismos celulares y moleculares en común que incluyen la agregación de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión (Ross & Poirier, 2004, Figura 1). Los agregados generalmente consisten de fibras que contienen proteínas con un plegamiento anormal en una conformación de hoja β , denominada amiloide (Selkoe, 2003).

Syndrome	β -Linked Protein and Inclusion
Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies, progressive myoclonic epilepsy, atypical myoclonic disease	Neuroserpin  Collins body
Familial Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, Lewy-body variant of Alzheimer's disease	α -Synuclein  Lewy body
Creutzfeldt-Jakob disease, bovine spongiform encephalopathy, variant Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, fatal familial insomnia, kuru	Prion protein  Variant Creutzfeldt-Jakob disease amyloid
Alzheimer's disease, Down's syndrome, familial Alzheimer's disease	β -Amyloid peptide  β -Amyloid plaque
Frontotemporal dementia (Pick's disease)	Tau protein  Pick body
Huntington's disease, dentatorubral-pallidoluysian atrophy (Haw-River syndrome), spinocerebellar ataxia types 1, 2, and 3 (Machado-Joseph disease)	Glutamine repeats (huntingtin)  Huntingtin inclusion

Figura 1. Esquema de diversas enfermedades por mal plegamiento proteico. Se observan las proteínas afectadas, los cuerpos de inclusión y su nomenclatura histopatológica. Tomado de Carrell, R. W. et al. (2002). *N Engl J Med* ; 346:45-53.

En estas enfermedades hay una similitud parcial, pero no perfecta, entre las células en las cuales se da el depósito de proteínas anormales y las células que degeneran. La explicación más recurrida es que las inclusiones y otros agregados proteicos visibles representan una etapa terminal de una cascada molecular de varios pasos, y de que los pasos iniciales en dicha cascada pueden estar más directamente ligados a la patogénesis de lo que puedan estarlo las inclusiones. Para varias enfermedades, las variaciones genéticas ayudan en la explicación de la patogénesis de las formas esporádicas más comunes de estas enfermedades. Actualmente hay un mayor conocimiento de las vías involucradas en la agregación proteica y han emergido algunas pistas recientes en cuanto a los mecanismos moleculares de la toxicidad celular (Ross & Poirier, 2004).

Entre las enfermedades neurodegenerativas hay dos padecimientos que muestran una similitud anatomopatológica en particular: La Enfermedad de Alzheimer y las Enfermedades por priones (por proteínas infecciosas; EP), también llamadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET).

Enfermedad de Alzheimer

Con una afección actual cercana al 10% de la población mayor que 65 años de edad, la Enfermedad de Alzheimer es la causa más común e importante tanto de enfermedad degenerativa del cerebro como de demencia progresiva, la cual fue identificada en 1907 por Alois Alzheimer en un breve reporte médico de una mujer de 56 años cuyo cerebro fue evaluado por él. La autopsia de la paciente reveló un cerebro atrófico sin demás anomalías

macroscópicas. Las secciones histopatológicas mostraron cambios neuronales ahora conocidos como "marañas neurofibrilares". Además, Alzheimer demostró numerosos "focos miliares" llamados ahora placas seniles o neuríticas. Alzheimer enfatizó, basado en la evidencia clínica, la naturaleza presenil de la demencia (Nakawatase & Cummings, 2000).

Anatomopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Los cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer muestran crecimiento ventricular, atrofia cerebral generalizada y circunvoluciones ampliadas. En ambos lóbulos temporales hay atrofia simétrica de la corteza entorrinal, la amígdala y el hipocampo, que es la estructura más gravemente atrofiada (Chan, Fox, Scahill, Crum, Whitwell, Leschziner, et al., 2001).

Placas amiloideas. Histológicamente, se han observado numerosas placas de amiloide rodeadas de neuritas distróficas, con pérdida de sinapsis, formación de marañas neurofibrilares y gliosis (Figura 2), en particular en el área del hipocampo, la corteza prefrontal y la entorrinal (Barger & Harmon, 1997; Mirra, Heyman, McKeel, Sumi, Crain, Brownlee, et al., 1991). Los depósitos extracelulares e intracelulares de proteínas filamentosas se correlacionan con la eventual disfunción neuronal y pérdida de sinapsis que conducen a demencia (Yan, Soto, Chen, Zhu, Al-Mohanna, Collison, et al., 1997). Los depósitos extracelulares están formados principalmente por un fragmento proteico de 40 a 42 aminoácidos denominado β -amiloide.



Figura 2. Placa de proteína b-amiloide (A) en una persona con la EA. Las flechas marcan células gliales reactivas; las puntas de flecha señalan neuritas distróficas. Tomado de Selkoe, D. & Lansbury, P. J. (1999). En G. Siegel, B. Agranoff, W. Albers, et al. (Eds.) *Basic Neurochemistry*, vol. 46 (pp. 949-968). Lippincott Williams and Wilkins.

Angiopatía congófila. Además de los depósitos que se ven en las placas seniles, la proteína amiloide también se acumula en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales. Este proceso afecta a las pequeñas arterias y arteriolas de las leptomeninges y de la corteza cerebral y se conoce como angiopatía congófila. El acúmulo que se observa en las paredes de los vasos sanguíneos suele estar compuesto por 1 a 40 aminoácidos, o la forma más corta del β A.

Cuerpos granulovacuolares. Consisten acúmulos de pequeñas vacuolas claras dentro del citoplasma perinuclear, conteniendo cada una de ellas un

denso gránulo basófilo. Las vacuolas suelen medir de 2 a 3 μ de diámetro, midiendo el gránulo interno aproximadamente 1 μ de diámetro.

Cuerpos de Hirano. Es una formación tubular intensamente eosinófila que se encuentra, sobre todo, junto a las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Tienen un aspecto característico de filamentos paralelos con patrón regular de entrecruzamiento. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que contienen epítopes para la actina, tropomiosina y vinculina.

Pérdida sináptica. Se ha observado una disminución del 45% en el grado de tinción inmunohistoquímica para la sinaptofisina (proteína presináptica utilizada como indicador de la integridad sináptica) en el neocórtex, sugiriendo una pérdida masiva de elementos presinápticos (Perl D., 2000).

A su vez, se han encontrado diversas alteraciones neuroendocrinológicas en los procesos demenciales, como lo son el aumento en la concentración de varios compuestos neuroquímicos en el SNC (receptor-1 de dopamina, monoaminoxidasa A, hormona folículoestimulante, hormona luteinizante, hormona antidiurética y prolactina), disminución (dopamina, receptor-2 de dopamina, noradrenalina, serotonina, ácido γ -aminobutírico, endorfinas, hormona del crecimiento y melatonina, entre otros) y otros que permanecen sin alteración (tiroxina y triyodotironina). El cambio neuroendócrino más importante en la EA parece ser una reducción de la función colinérgica hipotalámica (Rehman & Masson, 2001) y en región entorrinal y temporal (González, R., 2007).

Genética de la Enfermedad de Alzheimer

Los estudios de la incidencia y los patrones de transmisión en las familias de los pacientes con EA muestran que los parientes de individuos afectados tienen un riesgo aumentado de desarrollar la EA cuando son comparados con miembros de la población en general. Las tasas de concordancia entre los gemelos de probandos monocigóticos con EA son del 40 al 60%, lo que sugiere una fuerte pero no absoluta influencia genética de la enfermedad (Nakawatase, et al., 2000; Continuum of the American Academy of Neurology-Genetics, 1991).

Se han asociado cinco genes con la EA: el cromosoma 21 es portador del gen que codifica para la Proteína precursora del beta amiloide (β APP). El gen de la presenilina 1 (PS1), en el cromosoma 14, fue localizado estudiando familias con EA de inicio temprano. Otro gen asociado, el de la presenilina 2 (PS2), se ha localizado en el cromosoma 1. El cromosoma 12 puede tener una mutación causal relevante para la EA de inicio tardío, el cual se ha visto relacionado con la proteína α 2-microglobulina (Maccioni, Muñoz, & Barbeito, 2001; Selkoe, 2000). El gen de la Apolipoproteína E (ApoE) se encuentra en el cromosoma 19 (Borgaonkar, Schmidt, Martin, Kanzer, Edelsohn, Growdon, et al., 1993) y, además de la EA, se encuentra en varias enfermedades neurodegenerativas (Saunders, Schmeider, Breitner, Benson, Brown, Goldfarb, et al., 1993). El alelo de la ApoE tipo 4 (ϵ 4) se ha visto como un factor de riesgo para la EA (Sánchez, 2004), con un riesgo atribuible estimado de un 45 a un 60% (Nakawatase, et al., 1999). Una mayor evaluación de los aspectos genéticos de la EA se verá en las distintas variantes de la enfermedad.

Proteína del β -amiloide

El β -amiloide es un derivado degradativo y no obligatorio del catabolismo de la llamada proteína precursora del β -amiloide (Szabó, 1996; Figura 3), pero en la EA se generan grandes cantidades de este péptido y se acumula a manera de fibrillas insolubles (Del Bo, Angeretti, Lucca, De Simoni, & Forloni, 1995), las que afectan, de forma primaria, a las neuronas y células microgliales (Selkoe, & Lansbury, 1999).

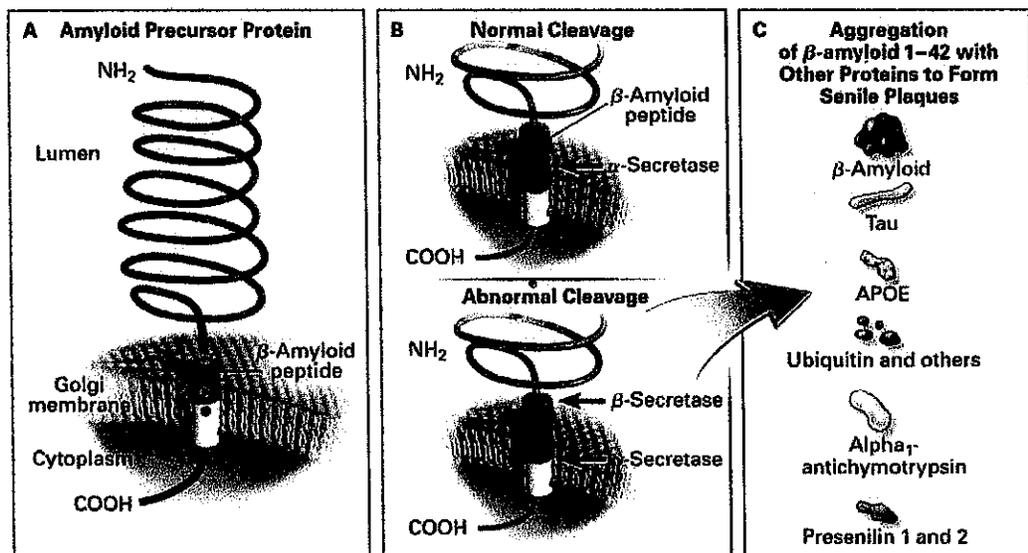


Figura 3. Estructura de la proteína precursora del beta amiloide (β APP). A. Sitio transmembranal de la proteína; los puntos en verde señalan los puntos de ruptura por parte de las secretasas, el fragmento rojo señala la porción de la proteína del β -amiloide. B. Sitios de ruptura normal y anormal de la β APP. C. Otras proteínas involucradas en el proceso de depósito de la β APP. Tomado de Martin, J. B. (1999). *N Engl J Med*;340:1970-1980

La presencia del β -amiloide₁₋₄₂ en fluidos corporales como líquido cefalorraquídeo (Mottet, Vigo-Pelfrey, Kholodenko, Barbour, Johnson-Wood, Galasko, et al., 1995) y plasma (Citron, Vigo-Pelfrey, Teplow, Miller, Schenk, Johnston, et al., 1994) es susceptible de cuantificarse y se ha utilizado como

un auxiliar en el diagnóstico de la EA (Turner, Suzuki, Chyung, Younkin, & Lee, 1996). Se ha encontrado, además, su presencia en plaquetas, y se cree que tenga un papel en la inhibición de los factores de la coagulación IXa y XIa. Además, se han detectado residuos específicos de la β APP (residuos 1-39/40 y 17-39/43) en plaquetas. Estos residuos, conocidos como residuos insolubles y solubles, están asociados con la EA (Li, Whyte, Tanner, Evin, Beyreuther, & Masters, 1998).

La “cascada del amiloide” en la etiología de la Enfermedad de Alzheimer

El esquema de la “cascada del amiloide” como causa de la EA fue propuesto en 1996 por el Dr. Dennis Selkoe y postula que la EA es un síndrome clínico-patológico en el cual diferentes defectos genéticos pueden conducir –directa o indirectamente- a una expresión alterada de la β APP o a procesamientos proteolíticos alterados o a cambios en la estabilidad del β A o a agregación del β A. Esto provoca un desbalance crónico entre la producción del β A y su depuración. La acumulación gradual de agregados de β A inicia una cascada compleja, de varias etapas que incluye gliosis, cambios inflamatorios, cambios sinápticos/neuríticos y pérdida de transmisores (Figura 4; Selkoe, 1996).

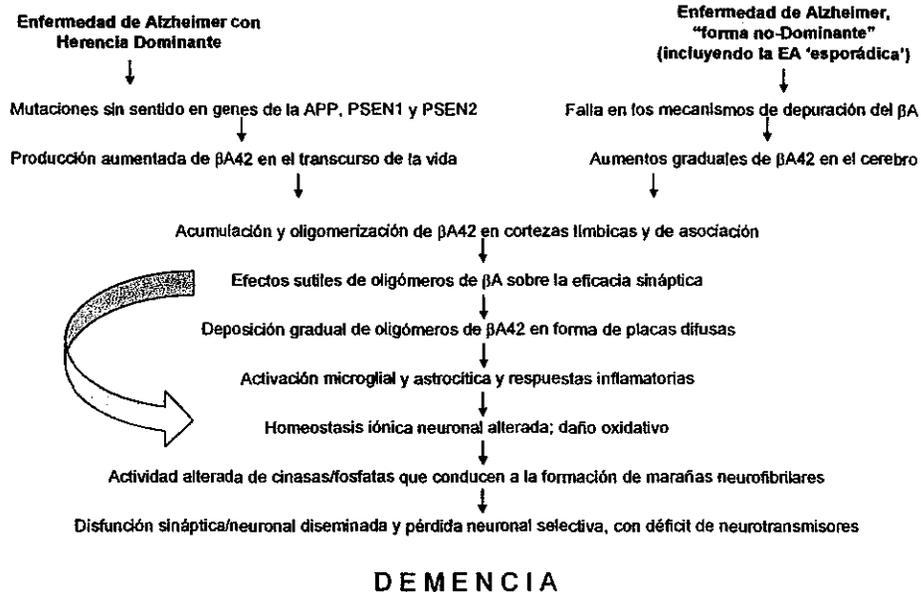


Figura 4. Esquema de la "cascada del amiloide", que muestra los pasos que involucran una anomalía en la estructura de la proteína $\beta A P P$ y que conducen a demencia. Tomado de Selkoe, 1996.

Apolipoproteína E

El enfoque racional para la valoración de la EA también comprende el estudio de la Apolipoproteína E (ApoE) (Schenk, Lieberburg, Motter, & Seubert, 1996). Esta proteína de 34 kDa juega un papel importante en el transporte, captación y redistribución del colesterol (Mahley, et al., 1983). La primera sugerencia de que la ApoE pudiera estar involucrada en la EA provino de su localización inmunológica en los depósitos de amiloide extracelular, incluyendo depósitos vasculares y neuronas con marañas neurofibrilares (Weisgraber & Mahley, 1996; Strittmatter, Saunders, Schmechel, Pericack-Vance, Enghild, Salvesen, et al., 1993; Polvikovski,

Sulkava, Haltia, Kainulainen, Vuorio, Verkkoniemi, et al., 1995). En los humanos, todas las isoformas de ApoE se codifican en el cromosoma 19 (Figura 5):

- ApoE2, con aminoácidos Cisteína en los sitios 112 y 158 (112Cys y 158Cys) y cuya expresión tiene aparente función protectora para la EA (Talbot, Lendon, Craddock, Shears, Morris & Goate, 1994),
- ApoE3, con aminoácidos 112Cys y 158Arg, está presente en forma predominante en la población en general (Walden & Hegele, 1994) y
- ApoE4, con aminoácidos 112Arg y 158Arg, el cual conlleva a riesgo elevado de enfermedad vascular aterosclerótica y de EA de inicio tardío (Borgaonkar, et al., 1993).

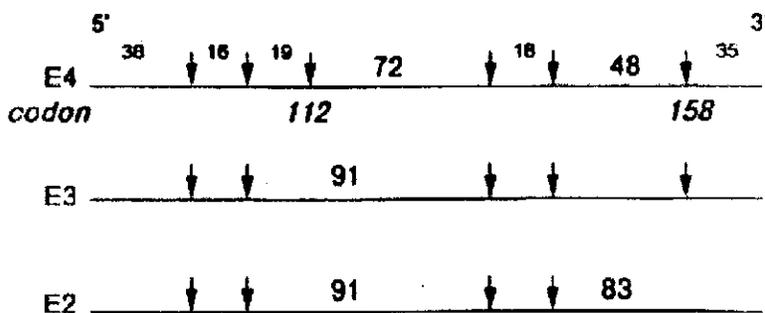


Figura 5. Mapa de los sitios de corte (indicados por las flechas) del gen de la Apolipoproteína E. La longitud de los fragmentos generados (en pares de bases, bp) se indica por encima de las líneas. Ann. Intern. Med. (Walden & Hegele, 1994).

La observación clave que relacionó a la EA con la ApoE fue la sobreexpresión del alelo ApoE4 en los pacientes con esta enfermedad

(Saunders, 1993; Poirier, Davignon, Bouthillier, Kogan, Bertrand & Gauthier, 1993). La frecuencia del alelo ApoE4 ha sido significativamente mayor en los pacientes con la EA que en pacientes controles, tanto en la EA de inicio tardío esporádica (Anwar, Lovestone, Cheetham, Levy & Powell, 1993; Amouyel, Brousseau, Fruchart & Dallongeville, 1993; Lucotte, David, Visvikis, Leininger-Müller, Siest, Babron, et al., 1993) como en la de inicio tardío familiar (Czech, Mönning, Tienari, Hartmann, Masters & Beyreuther, 1993; Ben-Shlomo, Lewis, & McKeigue, 1993). Dicha asociación se ha demostrado en pacientes documentados por toma de biopsias y en casos de autopsias (van Duijn, de Knijff, Cruts, et al, 1994).

Características clínicas de la Enfermedad de Alzheimer

La demencia del tipo de Alzheimer está caracterizada por el inicio gradual y la declinación progresiva de las funciones cognitivas. La memoria está incapacitada y por lo menos es visto uno de los siguientes signos: afasia, apraxia, agnosia y trastornos en la función ejecutiva. La secuencia general de los déficit es memoria, lenguaje y funciones visuoespaciales. Inicialmente, el paciente puede tener una incapacidad para aprender y recordar nueva información, presentando después una nominación alterada y finalmente una incapacidad para copiar figuras. La demencia temprana del tipo de Alzheimer puede ser difícil de diagnosticar, ya que el cociente intelectual (CI) puede ser normal (Kaplan, Sadock, & Grebb, 1994).

En la EA ocurren cambios de la personalidad tales como depresión, obsesión y suspicacias (Burns, Jacoby, & Leyy, 1990). Son comunes los brotes

de enojo y los actos violentos son un riesgo presente. La desorientación conduce a vagabundear y el paciente puede ser encontrado lejos de su casa y en una condición de aturdimiento. Es común la pérdida de iniciativa. Eventualmente aparecen defectos neurológicos, tales como alucinaciones (Burns, Jacoby, & Levy, 1990) trastornos de la marcha, afasia, apraxia y agnosia (Holmes, 2000; Gormley, Lyons, & Howard, 2001).

Variantes de la Enfermedad de Alzheimer

La EA se presenta principalmente en población mayor de 65 años de edad, mientras que la menor proporción de los casos se presenta antes de los 60 años de edad, condición conocida como Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. La sintomatología es similar en ambos casos y la única relación que se ha encontrado con esta aparición temprana de la enfermedad es la expresión anormal de una enzima que está involucrada en el procesamiento de la β -amiloide, la Presenilina 1 (Ross, C., et al, 2004).

Si bien el cuadro clínico característico de la EA es uno de demencia con deterioro progresivo de las funciones mentales con una edad de aparición posterior a los 65 años de edad, hay múltiples variantes de la EA que tienen un curso distinto y que son clasificadas de acuerdo al catálogo genético del OMIM (OnLine Mendelian Inheritance in Men).

La EA se clasifica en 15 tipos en base a su carga genética nuclear y existe otra variante debida a alteraciones mitocondriales. La mayoría de estas variantes son de tipo familiar, con un patrón de herencia Autosómica

Dominante y con una sintomatología similar al de la EA clásica, pero en algunos casos hay alteraciones motoras entre las que se incluyen mioclonías, paraparesias y alteraciones de la marcha, además de ser de inicio temprano (OMIM, #607822).

La EA tipo 1 (OMIM, #104300) está causada por una mutación en el gen que codifica para la proteína precursora del beta-Amiloide (β APP), en el cromosoma 21q y es de tipo familiar (también se conoce como EA Familiar Tipo 1). Está caracterizada por un déficit de memoria de inicio temprano, con una presentación usual antes de los 60 años de edad, procesamiento cognitivo lento y un déficit de atención ante tareas cognitivas complejas. La muerte inicia, en promedio, 6 años después del inicio de los síntomas (OMIM, #104300).

Problemas de cálculo, agnosia y apraxia, así como el déficit de memoria caracterizan a la EA tipo 2. También se conoce como EA de Inicio Tardío, o EA asociada con la Apolipoproteína E 4 (ApoE4), con locus génico en 19q13.2 (OMIM, #104310).

Las mutaciones en el gen de la Presenilina 1 (PSEN1), con locus en 14q24.3 son responsables de la EA tipo 3, caracterizada por presentar apraxia, paraparesia espástica y placas inusuales (algodonosas) con cuerpos de Lewy en el estudio histopatológico. Esta variante es familiar y de inicio temprano, con un rango de 40 a 60 años de edad al inicio de los síntomas (OMIM, #607822).

Otra variante familiar de la EA, asociada a mutaciones en el gen de la Presenilina 2 (PSEN2, locus 1q31-q32), es también de inicio temprano y constituye la EA tipo 4. El rango de edad al inicio de los síntomas va de los 45 a los 65 años. Clínicamente es indistinta a la EA de inicio tardío y al estudio histopatológico es similar a la EA tipo 3, aunque no presenta cuerpos de Lewy (OMIM, #606889).

La EA tipo 5 es una EA de tipo familiar, pero de inicio tardío, asociado a mutaciones en el gen del Factor de transcripción CP2 (asociado a la respuesta inmune), con locus en 12p11.23-q13.12. La enfermedad inicia en promedio a los 70 años de edad (OMIM; #602096).

En otro tipo de EA de inicio tardío, la EA tipo 6, el locus génico es 10q24 (sitio cercano al gen de la enzima de la degradación de la insulina) y está caracterizado por altos niveles de la β A42 (OMIM, #605526).

En la EA tipo 7 (OMIM, #606187) un gen con locus 10p13 está asociado a un mayor riesgo de desarrollar la EA de tipo familiar cuando se presenta el alelo ApoE4.

El gen *CST3* de la cistatina 3 (OMIM, #607116), cuyo locus se encuentra en el Cromosoma 20p11.21 en una región cercana al locus 20pter-p12 del gen *PRNP*, de la proteína priónica (OMIM, #176640), tiene un rango amplio de presentación, de los 48 a los 91 años de edad (Alzgene en *Alzforum*, 2006) y Esta variante corresponde a la EA tipo 8. Recientemente se ha demostrado un

papel epistásico entre los genes de la región 20p con el de la proteína del β -amiloide (β APP) (Olson, J., Goddard, K., Dudek, D., 2002).

En familias aisladas del centro de los Estados Unidos se ha encontrado asociación de la EA de inicio tardío con un marcador genético ubicado en 19p13.2, no asociado a la ApoE. Esta variante se conoce como EA tipo 9 (OMIM, % 608907).

En una familia holandesa y una comunidad árabe aislada de Israel se han encontrado asociaciones con la EA de tipo familiar con regiones génicas en 7q36 y 9p22.1, respectivamente. Estos casos constituyen la EA tipo 10 y 11 (OMIM, %609636; %609790). A su vez, en 12 familias suecas con numerosos miembros con EA, se ha encontrado asociación con un gen con locus 8p12-q22, las que constituyen a la EA tipo12 (OMIM; %611073).

En una población aislada del suroeste de Holanda, con EA de Inicio Tardío, se han catalogado las EA tipos 13, 14 y 15, que encuentran sus loci génicos en 1q21, 1q25 y 3q22-q24, respectivamente (OMIM, %611152; %611154; %611155).

Otro tipo de EA ha sido descrita, pero con mutaciones en el genoma mitocondrial (OMIM, #502500) en la posición 5460 en el codón 331 del gen del complejo 1 de la cadena respiratoria, el cual está asociado con EA de licio Tardío.

Finalmente, en una familia suiza se ha descrito una EA familiar de inicio temprano con patología coexistente con placas β -amiloide y positiva a anticuerpos para proteína priónica. No se encontraron mutaciones en el gen de la β APP, PSEN1 y PSEN2. Esta variante no ha sido catalogada como un tipo específico de EA.

Enfermedades por priones

Las enfermedades por priones también son llamadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) y son un grupo de enfermedades neurodegenerativas de carácter hereditario e infeccioso que se presentan tanto en humanos como en animales y ocurren mundialmente con una incidencia de alrededor de 1 caso por 1 millón de habitantes por año (Prusiner, 2004).

En animales, la transmisibilidad de la enfermedad se descubrió accidentalmente en un rebaño de ovejas vacunadas con material contaminado con *scrapie*, la manifestación de esta enfermedad en las ovejas (Soto & Castilla, 2004). En humanos se sospechó una vía de transmisión infecciosa por la propagación del *kuru*, una EET común en un grupo de caníbales de Papua-Nueva Guinea, lo que se demostró en 1966 por la transmisión del *kuru* a monos (Johnson & Gibbs, 1998). A su vez, la observación de que la neuropatología del *kuru* semejaba en gran parte a la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en humanos y al *scrapie* en ovejas terminó por agrupar a estos padecimientos en una nueva forma de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por su origen infeccioso (Prusiner, 2001; Figura 6).

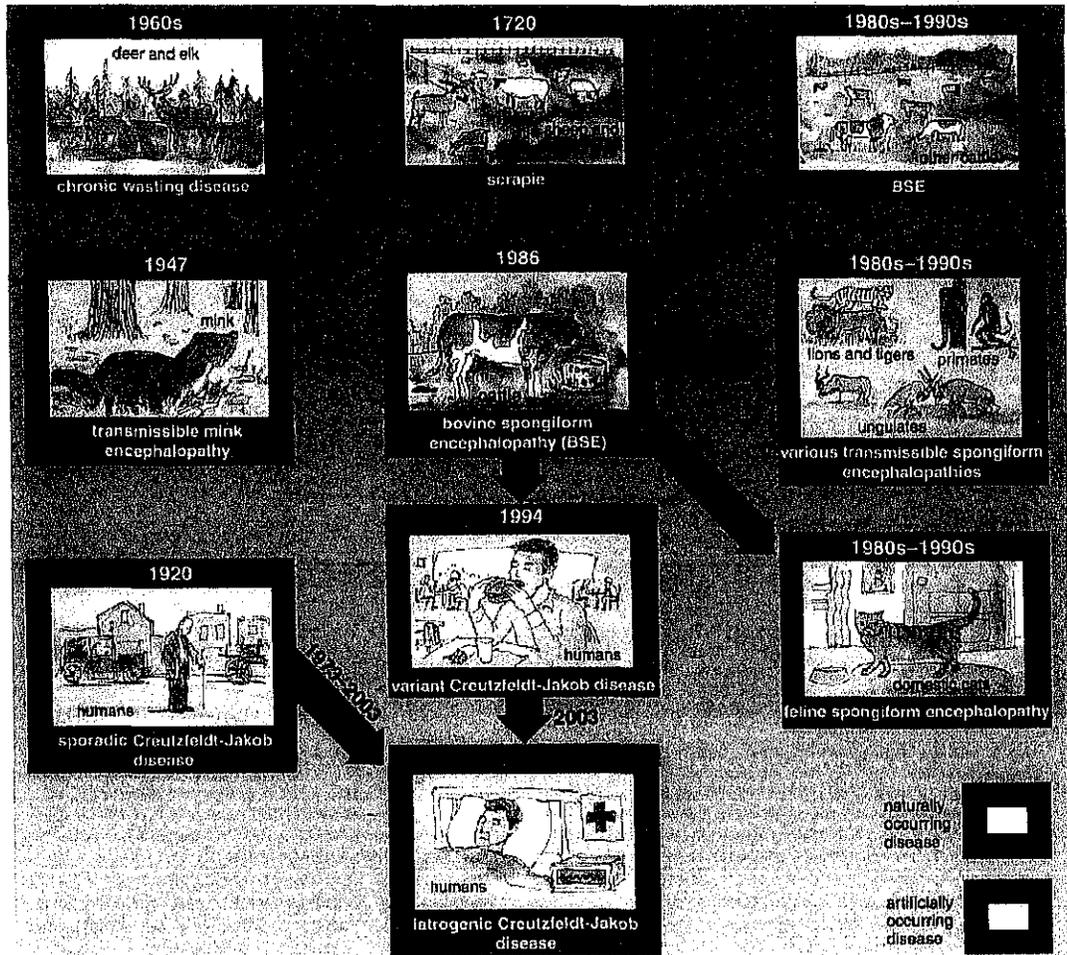


Figura 6. Cronograma de transmisión de las Encefalopatías Espongiformes, desde el primer caso registrado (en 1720) hasta la actualidad. Tomado de Brown, P. (2004) Am Sci. vol. 4

Características clínicas de las enfermedades por priones

Aunque en los humanos el cuadro típico es de demencia rápidamente progresiva, con mioclonus y un patrón electroencefalográfico típico de complejos trifásicos generalizados (Brown, P. 2004; Steinhoff, Racker, Herrendorf, Poser, Grosche, Zerr, et al, 1996), las enfermedades por priones tienen un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo demencia, ataxia, insomnio, paraplejia, parestesias y conducta extravagante (Will, R.,

Alpers, M., Dormont, D. & Schonberger, L., 2004). Actualmente se conocen varias enfermedades de este tipo, tanto en humanos como en animales (Cuadro 2). En los humanos, la ECJs abarca aproximadamente el 85% de todos los casos de enfermedades por priones, mientras que las formas infecciosas y hereditarias forman parte del resto.

Cuadro 2. Enfermedades por priones

Enfermedad	Huésped	Mecanismo de patogénesis*
Kuru	Aborígenes de Nueva Guinea	Infección a través de canibalismo ritual
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob		
Iatrogénica	Humanos	Infección por HGH contaminada por priones, injertos de duramadre, etc.
Nueva variante	Humanos	Infección por priones bovinos
Familiar	Humanos	Mutaciones en líneas germinales del gen <i>PrP</i>
Esporádica	Humanos	Mutaciones somáticas o conversión espontánea de PrP ^C en PrP ^{Sc} ¿?
Gerstmann-Stráussler-Scheinker	Humanos	Mutaciones en líneas germinales del gen <i>PrP</i>
Insomnio Familiar Fatal	Humanos	Mutaciones en líneas germinales del gen <i>PrP</i>
Insomnio Fatal Esporádico	Humanos	Mutaciones somáticas o conversión espontánea de PrP ^C en PrP ^{Sc} ¿?
Scrapie	Ovejas	Infección en ovejas genéticamente susceptibles
Encefalopatía Espongiforme Bovina	Ganado	Infección con carne y huesos contaminados por priones
Encefalopatía del Mink	Mink	Infección con priones de ovejas o ganado
Transmisible		
Enfermedad Desgaste Crónico	Venados, Alces	Desconocido
Encefalopatía Espongiforme Felina	Gatos	Infección con carne contaminada por priones
Encefalopatía de Ungulados Exóticos	Kudu mayor, Nyala, Onix	Infección con carne y huesos contaminados por priones

* Los signos de interrogación indican que el mecanismo no ha sido confirmado
PrP refiere a Proteína priónica (Prusiner, 2001)

Anatomopatología de las enfermedades por priones

No hay anomalías macroscópicas reconocibles en los cerebros de pacientes con Enfermedades por priones. Los pacientes que han sobrevivido por varios años tienen diferentes grados de atrofia (Prusiner, 2001). Histológicamente, los hallazgos cruciales son el cambio esponjiforme acompañado de pérdida neuronal y gliosis. Las placas de amiloide se encuentran en el 10% de los cerebros en la forma esporádica de la ECJ. En cambio, las placas son comunes en el *kuru*, algunas EE familiares y la nueva variante de ECJ (Johnson & Gibbs, 1998), las que tienen una presencia característica de "placas floridas" compuestas de un núcleo de PrP^{Sc} amiloide rodeado de vacuolas (Brown, 2004; Figura 7).

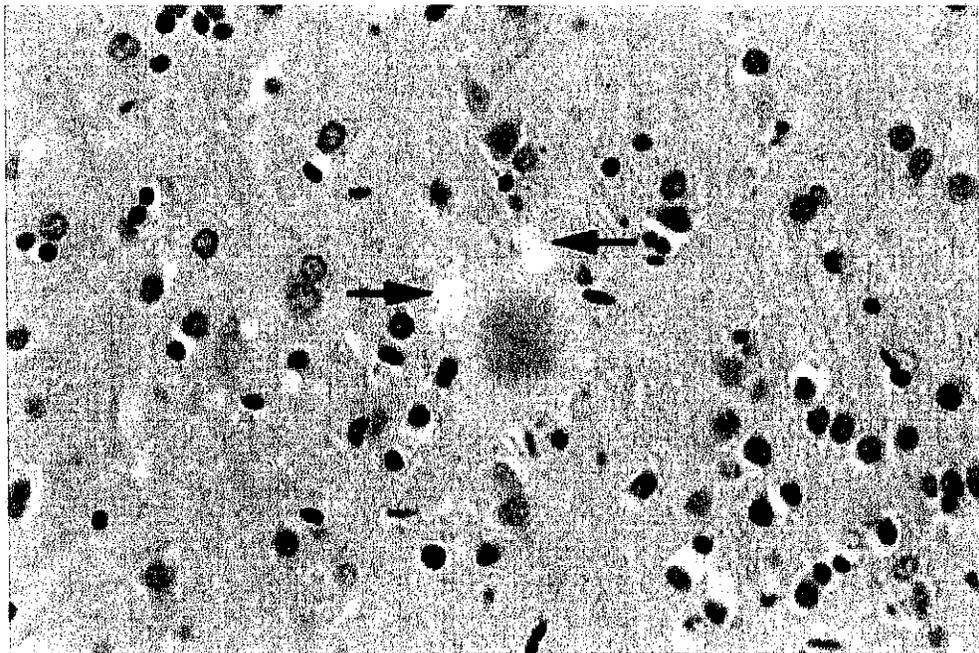


Figura 7. Placa 'Kuru' de proteína priónica (Sc). Se observa un patrón radiado de la proteína en la placa con vacuolas circundantes (flechas). Tomado de Johnson, R. T. (1998). et al. *N Engl J Med.* 339:1994-2004

Genética de las enfermedades por priones

Ambas isoformas de la PrP (PrP^C y PrP^{Sc}) son codificadas por un solo gen cromosómico, denominado *PRNP* en humanos, el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (Oesch, B., Westaway, D. & Walchli, M., 1985). Actualmente se han identificado 55 mutaciones patogénicas y 16 polimorfismos del gen *PRNP* (Figura 8; Kong, Q., Surewicz, W., Petersen, R., Zou, W., Chen, S., Gambetti, P, et al, 2004). El polimorfismo M/V (metionina/valina) en el codón 129 es muy común. Los sujetos son homocigotos M/M en un 43% y V/V en un 8%, mientras que los heterocigotos lo son en un 49% (Collinge, J., Palmer, M. & Dryden, A., 1991).

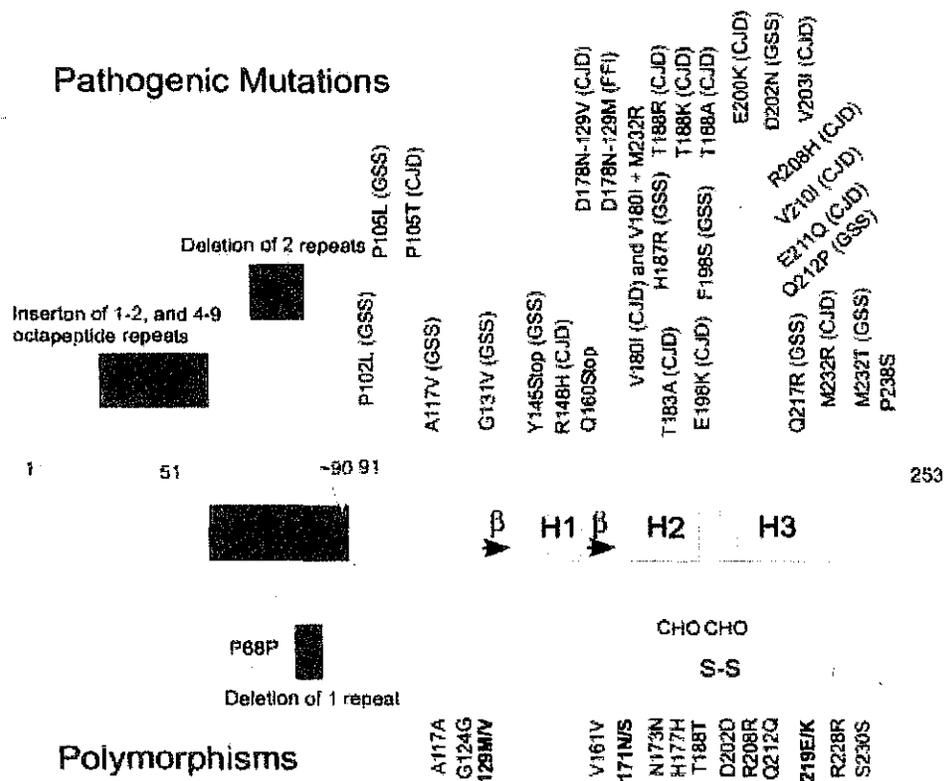


Figura 8. Esquema del gen PRNP. Se observan en el sitio superior todas las mutaciones patogénicas conocidas y en el inferior los polimorfismos conocidos. El polimorfismo M129V es el más importante y el que define fenotipos clínicos. Tomado de Prusiner, S. 2004.

La homocigocidad en el codón 129 está asociada con una mayor susceptibilidad para la ECJ esporádica o iatrogénica y se ha encontrado en virtualmente todos los tipos de enfermedades por priones de tipo hereditario (Prusiner, 1991). Se ha visto que este polimorfismo modifica aspectos básicos del fenotipo de la enfermedad cuando se encuentra localizado en un alelo mutante, mientras que en un alelo normal influencia la edad de inicio y la duración de la enfermedad (Prusiner, 2004).

Biología de los priones

Los priones son proteínas infecciosas. En los mamíferos, los priones se reproducen reclutando proteínas priónicas celulares normales (PrP^{C}) y estimulando su conversión a la isoforma causante de la enfermedad (*scrapie*, PrP^{SC}) (Prusiner, S., 1982). Un dato importante que distingue a los priones de los virus es que la PrP^{SC} es codificada por un gen cromosómico (Oesch, et al, 1985). La proteólisis limitada de la PrP^{SC} produce una molécula pequeña resistente a proteasas de aproximadamente 142 aminoácidos, designada PrP_{27-30} , la cual se polimeriza formando amiloide (McKinley, M., Meyer, R., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A, et al., 1991).

Las cadenas del polipéptido del PrP^{C} y PrP^{SC} son idénticas en su composición pero difieren en su estructura plegada tridimensional (conformaciones). La PrP^{C} es rica en hélices α (formaciones de aminoácidos a manera de espiral) y tiene pocas hojas β (hebras aplanadas de aminoácidos), mientras que la PrP^{SC} es menos rica en hélices y tiene muchas más hojas β (Pan, K., Baldwin, M., & Nguyen, J., 1993).

La PrP^C tiene tres hélices α y dos cortas hebras β ; en cambio, la PrP^{Sc} tiene solamente dos hélices α y más hebras β (Riek, R., Hornemañín, S., Wider, G., Billeter, M., Glockschuber, R., & Wüthrich, K., 1996). Esta transición estructural de las hélices α a la hoja β es el evento fundamental que subyace a las enfermedades por priones (Figura 9).

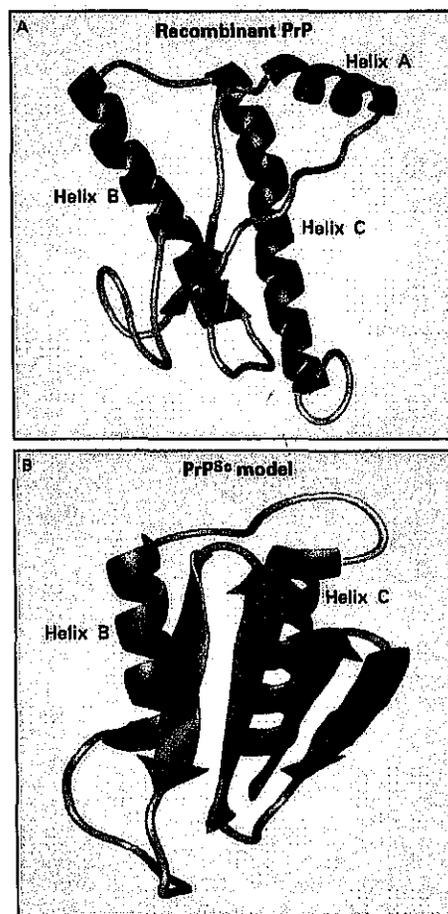


Figura 9. A. Estructura de la Proteína Priónica Celular (PrP^C). Se observan las 3 hélices alfa en la conformación normal. B. Estructura de la Proteína Priónica patológica ('Scrapie', PrP^{Sc}). Se observa cómo la Hélice A ha cambiado su estructura por una de hoja β plegada.

Diagnóstico de las enfermedades por priones

Actualmente el diagnóstico probable de la enfermedad se basa en el hallazgo de los signos clínicos de demencia, mioclonus, un patrón EEG característico y el carácter rápidamente progresivo de la enfermedad (Kretzschmar, H., Ironside, J., DeArmond, S. & Tateishi, J., 1996), así como la observación de la degeneración esponjiforme de la sustancia gris mediante biopsia o autopsia en ausencia de otra patología que pueda confundir el diagnóstico.

El diagnóstico definitivo requiere uno de los cuatro criterios adicionales: presencia de placas amiloides PrP, transmisión de la encefalopatía esponjiforme a los animales, presencia de PrP^{Sc} o presencia de una mutación patogénica del gen *PRNP* (DeArmond, S., Ironside, J., Bouzamondo-Bernstein, E., Peretz, D. & Fraser, J., 2004).

Los criterios diagnósticos hacen difícil el diagnóstico premortem de la enfermedad, por lo que se ha buscado otra forma de hacer el diagnóstico en humanos. Recientemente se ha encontrado la presencia de priones en tejidos extraneurales, como bazo y músculo estriado de humanos con la enfermedad, lo que podría ser un buen auxiliar en el diagnóstico (Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M., Aguzzi, A., 2003).

Semejanzas y diferencias entre los priones y la β APP

Hay algunas características que son compartidas entre los priones y la β APP (ver Cuadro 3.):

1. Son sintetizadas por un solo gen.

2. Ambas proteínas son transmembranales.
3. Parecen intervenir en el transporte o fijación de metales, especialmente el cobre.
4. Su estructura es modificada a una conformación de hoja plegada (hoja β), la cual induce una cascada de reacciones de tipo degenerativo.
5. Generan estructuras insolubles con subsecuentes agregados de placas amiloideas.
6. Provocan cambios neurológicos que conllevan a demencia.
7. Generan enfermedades hereditarias de patrón autosómico dominante sin un método eficaz de diagnóstico y tratamiento.

En cambio, las diferencias parecen no ser menores:

1. Los priones son infecciosos, mientras que el carácter infeccioso de la β APP no ha sido demostrado.
2. Los priones no evocan una respuesta inmune.
3. Las placas de amiloide no son frecuentes en los mal plegamientos de la proteína priónica, mientras que en la β APP sí lo son.
4. Los priones pueden tener una variedad de conformaciones, cada una de las cuales parece estar asociada con una enfermedad específica.
5. Las enfermedades por priones son muy poco frecuentes.
6. Se han encontrado proteínas que podrían participar en la modificación de la β APP, pero no con los priones.

Cuadro 3. Características de las proteínas PrP y β APP

	PrP	βAPP
Génicas		
Gen	<i>PRNP</i>	<i>APP</i>
Locus	20pter-p12	21q21.2
pb	2461, 2 exones	3601, 19 exones
Herencia	AD	AD
Estructurales		
Aminoácidos	253	770 a 751 b 695 c
Variantes	Múltiples; <i>cepas</i>	3; Isoformas
Variantes anormales	Hoja β -plegada Tipo I Tipo II	Hoja β -plegada β A40 β A42
Fisiológicas		
Ubicación	Transmembranal	Transmembranal
Función	Desconocida, pbe. fijación Cu ⁺⁺ Pbe. receptor Pbe. Transductor de señales	Desconocida, pbe. fijación Cu ⁺⁺ Pbe. receptor Pbe. Transductor de señales
Pbe. inhibidor factor IXa coag.		

PrP: Proteína priónica
 β APP: Proteína precursora del β -amiloide
 pb: Pares de bases
 AD: Autosómica dominante
 (Prusiner, 2001; OMIM *176640 para *PRNP* y *104760 para *APP*)

Si bien las diferencias parecen anular las relaciones entre ambas proteínas, las semejanzas apuntan a que éstas están involucradas en algún momento temprano de la cascada de eventos de neurodegeneración. No habría por qué descartar, además, su participación en algunos momentos de la patogénesis de ambas enfermedades, como el mecanismo epistásico, el cual está demostrado existe en una región del cromosoma 20p y que se ha visto coexiste con el gen de la β APP para modificar la expresión de la EA (Olson, J. M.; Goddard, K. A. B.; Dudek, D. M, 2002).

III. Planteamiento del problema

Recientemente ha aumentado la evidencia de que diversas enfermedades neurodegenerativas tales como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica y las Enfermedades por Priones tienen mecanismos celulares y moleculares en común que incluyen la agregación de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión (Ross, et al. 2004). Los agregados generalmente consisten de fibras que contienen proteínas con un plegamiento anormal en una conformación de hoja β , denominada amiloide (Selkoe, 2003).

La explicación más recurrida es que las inclusiones y otros agregados proteicos visibles representan una etapa terminal de una cascada molecular de varios pasos, y de que los pasos iniciales en dicha cascada pueden estar más directamente ligados a la patogénesis de lo que puedan estarlo las inclusiones. A pesar de algunas diferencias en su presentación clínica y anatomopatológica, la Enfermedad de Alzheimer y las Enfermedades por priones presentan una gran semejanza en sus mecanismos estructurales y probablemente compartan un mecanismo primario de degeneración, por lo que pueden influir entre sí en la manifestación de las enfermedades.

En nuestra población de pacientes hemos encontrado una alta proporción de pacientes de EA de inicio temprano (54.5%). Los factores asociados con esta variante de la EA están más relacionados con mecanismos que conllevan a una conformación alterada de la β APP que con otro tipo de factores de riesgo (el polimorfismo $\epsilon 4$ de ApoE y un mayor estrés oxidativo, entre otros),

como una disfunción enzimática (Presenilinas) o problemas postraduccionales. Un probable factor condicionante para tal proporción en este grupo de pacientes es la de un diagnóstico deficiente por no incluir en el diagnóstico diferencial a pacientes con otro tipo de enfermedades neurodegenerativas inducidas por proteínas. Además, estudios realizados previamente en nuestro laboratorio no han podido encontrar en la totalidad de los casos una relación con polimorfismos $\epsilon 4$ de la ApoE (Sánchez-González, V. J., Ortiz G. G., Gallegos-Arreola P., Macías-islas, M. A., et al. 2006), mutaciones de las Presenilinas, ni con mutaciones mitocondriales (información no publicada).

En cuanto a la presentación clínica, del 5 al 10% de los pacientes con Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob tienen un curso clínico de más de 2 años de duración y están caracterizados por una presentación familiar, con una lenta etapa de neurodegeneración y cuyos síntomas están limitados a un deterioro intelectual y anormalidades conductuales. La diferenciación clínica de otros procesos neurodegenerativos, particularmente la Enfermedad de Alzheimer, puede resultar imposible (Brown, et al, 1984), incluso al tratar de dirimirlos por patrón de herencia, ya que, a excepción de la variante mitocondrial de la EA, ambas entidades tienen una herencia del tipo Autosómico Dominante (OMIM, *176640; OMIM, #104300).

La relación entre las variantes génicas de las proteínas priónicas sobre la forma clínica de la ECJ está empezando a dilucidar el efecto de la conformación proteica sobre el proceso de neurodegeneración (Glatzel, 2003). Se ha encontrado, además, que un sitio extenso del cromosoma 20p (región que incluye al gen *PRNP*, de la PrP^C) participa en mecanismos epistáticos con

el gen de la β APP (Olson, J., Goddard, K., Dudek, D., 2002), pudiendo, quizás, modificar el fenotipo clásico de la EA. Además, el polimorfismo M129V es determinante en el fenotipo clínico de las Enfermedades por Priones, siendo la variante VV (o con un alelo V) el que está más relacionado con las variantes de tipo familiar (Parchi, P., Zou, W., Wang, W., Brown, P., Capellari, S., et al. 2004). Por lo tanto, el alelo V del gen *PRNP* sería un buen candidato para buscar el efecto génico de la PrP sobre la EA de Inicio Temprano (EAITe). Sin embargo, la influencia del polimorfismo MM, el más frecuente en la población general, debe ser descrita en la población con la EA. Lo anterior nos lleva a plantear la siguiente pregunta: ¿Cuál es la expresión de los distintos genotipos *PRNP* en pacientes con Probable Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano y qué riesgo proveen para esta variante de la enfermedad?

IV.- Hipótesis

Los pacientes con la Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano presentan una mayor frecuencia del polimorfismo V/V del gen *PRNP* en comparación con los pacientes con Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío.

General

Determinar la frecuencia de las variantes alélicas del gen *PRNP* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano y tardío.

Específicos

Determinar la frecuencia de las Enfermedades por Priones en la población derechohabiente de las diferentes instituciones de salud de la Área Metropolitana de Guadalajara.

Determinar la frecuencia del polimorfismo M129V del gen *PRNP* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano y tardío.

Determinar el riesgo atribuible de los polimorfismos del gen *PRNP* con la Enfermedad de Alzheimer.

Tipo de Estudio

Casos y controles.

Universo de estudio

- Pacientes con signos y síntomas de demencia atendidos en la Clínica de Trastornos de la Conducta del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, de marzo del 2000 a agosto del 2007.
- Pacientes con Enfermedades por priones evaluados en el Servicio de Neurología y Patología del Centro Médico Nacional de Occidente, de marzo del 2005 a agosto del 2007.

Ventana diagnóstico para los casos de EAITE. Los criterios del NINCDS-ADRDA (ver anexo II) indican realizar el diagnóstico de Demencia (ver anexo I) previo al de EA, el cual no suele ser inmediato en la mayoría de los casos. Esto afecta principalmente a los pacientes con EAITE, ya que la EA tarda un promedio de 5 años antes de manifestar los síntomas, por esto, los pacientes con Enfermedad de Alzheimer fueron considerados como pacientes con EAITE cuando el diagnóstico de EA probable haya sido realizado entre los 60 y 64 años de edad en todo paciente que haya sido estudiado con un cuadro demencial. Así, el proceso patológico de la enfermedad debió haber empezado antes de los 60 años de edad, límite considerado para todo caso de EAITE.

Selección de pacientes con Enfermedades por Priones. Debido a la baja incidencia de las Enfermedades por Priones (1 caso por millón de habitantes al

año), se incluyeron en el estudio a todos los pacientes diagnosticados con alguna de estas entidades de acuerdo a los criterios del UK CJD Surveillance Unit (ver anexo III).

Selección de los sujetos de estudio

- A todos los pacientes valorados en la clínica de demencias del HECMNO-IMSS se les realizó el estudio neuropsicológico del Minimental State Examination (Kokmen, Naessens & Offord, 1987) y se tomaron en cuenta los criterios de demencia del DSM-IV (Kaplan, et al., 1994, ver anexo I) y del NINCDS-ADRDA (Chui, et al., 1992, ver anexo II) para el diagnóstico de la EA.
- El diagnóstico de Enfermedad por Priones se realizó tomando en cuenta los criterios diagnósticos de la Unidad de Vigilancia Nacional (UK) de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ver anexo III).

Criterios de inclusión

- Todos aquellos pacientes estudiados en la clínica de demencias del departamento de neurología del HECMNO, IMSS diagnosticados con probable Enfermedad de Alzheimer.
- Pacientes con EA que hayan aceptado ingresar al estudio firmando personalmente o por un familiar, con consentimiento informado.
- Pacientes con evidencia clínica de Enfermedad por Priones cuyos familiares hayan aceptado que ingrese al estudio firmando con un testigo una carta de consentimiento informado.

Criterios de no inclusión

- Pacientes con síndrome demencial el cual pueda ser atribuido a otras causas definidas.
- Pacientes con olvidos benignos.
- Pacientes que en general no llenen los criterios del DSMIV, NINCDS-ADRDA o de la Unidad de Vigilancia Nacional (UK) de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- Pacientes que sin carta de consentimiento informado.

Criterios de eliminación

- Cualquier paciente que durante cualquier etapa del proceso de estudio haya decidido (él o sus familiares) retirarse del estudio.
- Pacientes que por sus características de reserva funcional hayan mostrado algún riesgo en la obtención de las muestras.

Estudio de frecuencia de las enfermedades por priones

Se realizó en el Servicio de Patología del Centro Médico Nacional de Occidente mediante la revisión de expedientes de los pacientes que habían sido diagnosticados con EE mediante estudio histopatológico de tejido cerebral (ver anexo VIII). A su vez, se revisaron los casos de Enfermedades por Priones reportados clínicamente en el Servicio de Neurología del Centro Médico Nacional de Occidente. Se estudiaron las variables demográficas (edad, sexo, tiempo de duración de la enfermedad, entre otros) y clínicas de estos pacientes. El tejido cerebral de casos recibidos por autopsia fueron sometidos

a fijación por ácido fórmico y a tratamiento con Inmunoquímica (ver anexo VIII).

Toma y transporte de las muestras.

A los pacientes seleccionados para el estudio se les tomaron 5 ml de sangre para la extracción de ADN. En el caso del estudio de pacientes con sospecha de Enfermedades por Priones, se realizó el diagnóstico mediante el estudio histopatológico, para lo cual se extrajo el cerebro del paciente.

Las muestras de sangre se congelaron a -20°C en recipientes térmicos protegidas de la luz, en el laboratorio de Desarrollo y Envejecimiento del C.I.B.O, mientras que un hemisferio cerebral fue almacenado en las mismas condiciones a -80°C y el otro guardado en recipientes plásticos con paraformaldehído al 10% a temperatura ambiente.

Determinación de los genotipos y alelos del gen *PRNP*.

El DNA fue extraído de sangre pretratada con ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), de acuerdo al Método de Miller (Miller, Dykes & Polesky 1988) (Ver anexos IV, V). Descrito en forma breve, el exón del polimorfismo 129 del gen *PRNP* se amplificó por RCP con modificación para RCP de un solo estado. Los primers a utilizar fueron:

PrP1 (5'-AAGAATTCTCTGACATTCTCCTCTTCA-3', corriente arriba);

PrP2 (3'-AAGGATCCCTCAAGCTGGAAAAAGA-5', corriente abajo);

PrP8 (5'-GATGCTGGTTCTCTTTGTGGC-3', corriente arriba);

PrP3 (3'-GATGGGCCTGCTCATGGCAC-5', corriente abajo).

El PrP1 y PrP2 se localizan corriente arriba y corriente abajo de la secuencia de codificación del gen PRNP, mientras que PrP8 y PrP3 flanquean las regiones de codificación de las repeticiones octapeptídicas. Cada tubo de RCP contuvo 50 ng de ADN, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmol de cada *primer*, 10% dimetil-sulfóxido, 1.5 mM de cloruro de magnesio, y 2.5 U de Taq ADN polimerasa en un volumen final de 25 μ l y 1x buffer del fabricante. La RCP se llevó a cabo en un termociclador a 94°C durante 5 minutos para una desnaturalización inicial, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 1 minuto a 72°C (Berr, C., Richard, F., Dufouil, C., Amant, C., Alperovitch, A. & Amouyel, P., 1998).

Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron evaluados en corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y secuenciados directamente en ambas bandas por el método dideoxido de cadena terminal utilizando un secuenciador automatizado (ver anexo VII). A su vez, se identificaron los alelos M y V del codón 129 del gen *PRNP*, buscando las frecuencias alélicas y la determinación de los polimorfismos existentes: MM, VV, MV.

Análisis estadístico.

La información fue analizada con el programa informático SPSS v. 10 y EPIINFO 2002. Las variables demográficas fueron analizadas con medidas de

dispersión y tendencia central y su significancia estadística con la prueba estadística de la t de Student.

Análisis de los genotipos *PRNP*. Se realizó en base al método de conteo génico y se expresó la frecuencia tanto de los genotipos como de los alelos del gen *PRNP*. Para calcular la asociación de la EA con las variables genotípicas *PRNP* entre los grupos de EAITe vs. EAITa se utilizó la razón de momios (Odds-Ratio) y la prueba no paramétrica de Chi cuadrada, con nivel alfa de 0.05.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

De un total de 67 pacientes con probable Enfermedad de Alzheimer diagnosticados en la Clínica de Trastornos Cognitivos y Demencias de acuerdo a los criterios del NINCDS-ADRDA se presentan resultados de 31 pacientes. Siete pacientes fueron excluidos por defunción, 4 por ser diagnosticados como pacientes con Demencia Vasculosa y 3 por cambio de lugar de residencia fuera del estado. En 7 pacientes la muestra de ADN obtenido fue de baja calidad y se prefirió no realizar el estudio para evitar tener falsos resultados, mientras que en 15 pacientes no se ha realizado la toma de la muestra.

Los pacientes fueron evaluados inicialmente por la prueba de tamizaje del Mini Mental State Examination (MMSE) y sujetos a los criterios diagnósticos del DSM-IV para el diagnóstico de Demencia. Finalmente, se aplicaron las pruebas necesarias de acuerdo al NINCDS-ADRDA para descartar otras enfermedades.

Del total de pacientes con EA, 17 son mujeres (54.84%), contra 14 hombres (45.16%). La media de edad de los pacientes es de 70.6 ± 11.53 (DE, mediana: 74). La escolaridad promedio es de 5.16 ± 3.1 (DE, mediana: 5.5) y el MMSE en su primera evaluación de 16.84 ± 5.73 (DE, mediana: 17) y de 11.54 ± 7.29 (DE, mediana: 11.5, $p = 0.006$, t de Student) en su última evaluación (periodo promedio entre primera y última evaluación de 4 ± 2 años, mediana: 4).

El grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano (EAITE) está constituido por 10 personas (32.25%), mientras que 21 personas

(67.74%) constituyen el grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío (EAITa). La media de edad para el grupo de EAITe es de 55.8 ± 3.82 (DE, mediana: 55.5) vs. 78.15 ± 5.23 (DE, mediana: 79) en el grupo de EAITa. (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Variables demográficas en los pacientes con EA.

	<u>Pacientes con EA</u>	<u>EAITe</u>	<u>EAITa</u>
Edad	70.6 ± 11.53	55.8 ± 3.82	$78.15 \pm 5.23^*$
Masculino/Femenino	14/17	7/3	6/14
MMSE	16.84 ± 5.73	15.5 ± 7.46	17.68 ± 4.40
Escolaridad en años	5.16 ± 3.1	7.8 ± 5	3.89 ± 2.55

Fuente: Directa
 Valores representados en media \pm DE
 * $p < 0.001$, al comparar EAITe vs. EAITa, t de Student

La proporción Masculino:Femenino en los casos en la EAITe es de 2.3 : 1, al igual que en los casos con EAITa, pero cuando son valorados en proporción Femenino:Masculino. A su vez, se observa un ligero mayor deterioro en las funciones mentales en la primera valoración en los casos con EAITe vs. EAITa ($p > 0.05$, t de Student), así como una mayor escolaridad ($p > 0.05$, t de Student).

Casos de Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar

Hay tres hermandades con EA, todas de inicio temprano y con un rango de 40 a 51 años de edad al momento de iniciar la sintomatología. En la última evaluación, el MMSE osciló de No aplicable (NA) a un puntaje de 23/30, resultando en dos hermandades con integrantes con una demencia de tipo Grave, mientras que en otra es de tipo Moderada en dos miembros y Leve en uno. Todas las hermandades tienen antecedentes heredofamiliares de demencia (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Variables demográficas en los pacientes con EA de tipo familiar.

	<u>Hermandad 1</u>		<u>Hermandad 2</u>		<u>Hermandad 3</u>		
	1°	2°	1°	2°	1°	2°	3°
Edad*	46	51	40	41	45	46	47
MMSE**	15	NA	NA	3	17	16	23
Escolaridad***	9	5	14	12	9	9	9
Gravedad§	G	G	G	G	M	M	L
AHF&	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Directa

* Edad en años al inicio de la sintomatología de la demencia

** Mini Mental State Examination, valores en la última evaluación

*** Escolaridad en años cursados

§: Gravedad de la demencia; L: Leve, M: Moderado, G: Grave

&: Antecedentes Heredofamiliares de Demencia; +: al menos un familiar de primer grado con demencia

NA: No aplicable

Genotipificación *PRNP*

Se realizó la genotipificación *PRNP* de 31 pacientes con EA. Se obtuvo una mayor frecuencia del polimorfismo MM en un 54.83% de los casos. Comparando los genotipos con la edad de inicio de la enfermedad, se observó que el polimorfismo VV se encuentra en el 40% de los casos de EAITe, contra un 4.76% de los casos de EAITa (OR 13.3, IC 95% 1.01-385, $p = 0.027$, χ^2 , test de Fisher). En cambio, los polimorfismos MM y MV fueron más frecuentes en los casos con EAITa, con un 61.90% y 33.33% del total, respectivamente, vs. 40% y 20% en la EAITe (ver cuadro 3 y Figura 1).

Cuadro 3. Distribución de los genotipos *PRNP* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

<u>Genotipo</u>	<u>Sujetos EA N. (%)</u>	<u>EAITe N. (%)</u>	<u>EAITa N. (%)</u>	<u>OR (IC, 95%)</u>	<u>p</u>
MM	17 (54.83%)	4 (40%)	13 (61.90%)	0.41 (0.07-2.42)	0.44
MV	9 (29.03%)	2 (20%)	7 (33.33%)	0.50 (0.06-3.80)	0.67
VV	5 (16.12%)	4 (40%)	1 (4.76%)	13.3 (1.01-385)	0.027*

Fuente: Directa

EAITe: Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano, EAITa: Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío
* p significativo para la distribución de los genotipos entre los sujetos con EAITe y EAITa; χ^2 cuadrada, test de Fisher

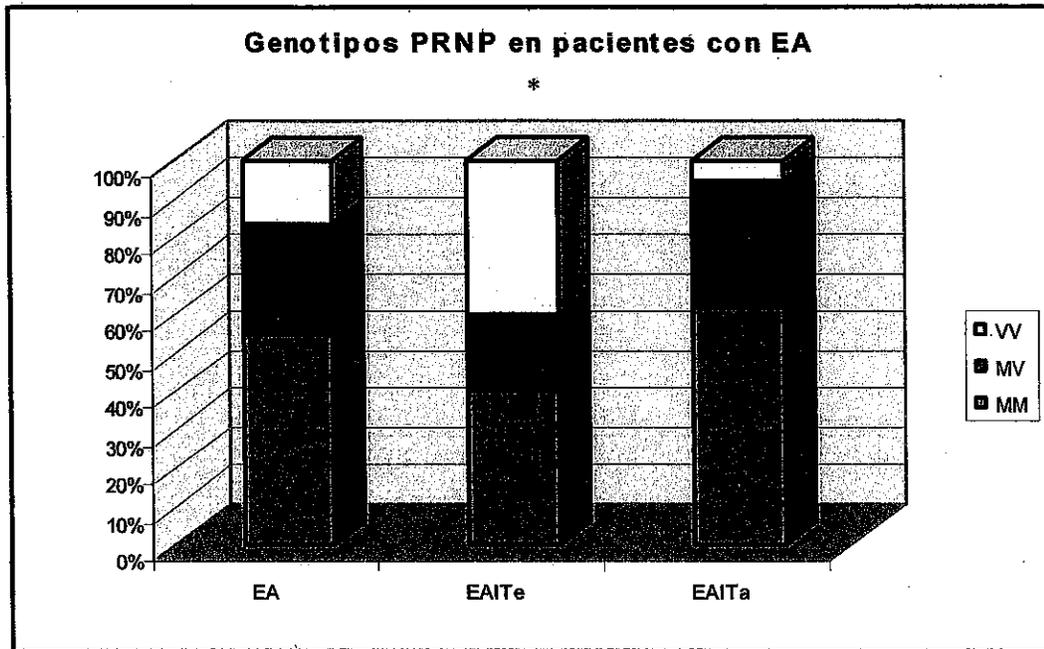


Figura 1. Distribución de los genotipos *PRNP* en pacientes con EA. * $p < 0.05$ en la distribución de VV entre EAITe vs. EAITa, χ^2 .

Analizando las frecuencias alélicas del gen *PRNP* en los casos con EA, se encontró una mayor frecuencia del alelo M (69.35%). Comparando entre los casos con EAITe vs. EAITa, el alelo V fue más frecuente, con un 50% de los casos vs. 19.51% (OR 4.13, IC 95% 1.11-15.79, $p = 0.031$, χ^2). Por el contrario, el alelo M tuvo una frecuencia de 50% en los casos con EAITe vs. 80.48% en los casos de EAITa (OR 0.24, IC 95% 0.06-0.90, $p = 0.031$, χ^2 , ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia de los alelos M, V del gen PRNP en sujetos con Enfermedad de Alzheimer.

<u>Alelo</u>	<u>sujetos EA, N(%)</u>	<u>EAITe, N(%)</u>	<u>EAITa, N(%)</u>	<u>OR (95% IC)</u>	<u>p</u>
M	43 (69.35%)	10 (50.00%)	33 (80.48%)	0.24 (0.06-0.90)	0.031*
V	19 (30.64%)	10 (50.00%)	8 (19.51%)	4.13 (1.11-15.79)	0.031*

Fuente: Directa

EAITe: Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano, EAITa: Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío
 * p significativo para la distribución de los genotipos entre los sujetos con EAITe y EAITa; chi cuadrada, test de Fisher

Un OR < 1 con una p < 0.05 es considerado como protector
 Un OR > 1 con una p < 0.05 es considerado como factor de riesgo
 p < 0.05

Para descartar alguna mutación en el gen *PRNP* en los casos con la EA, se realizó secuenciación del mismo, en la que sólo se encontró una delección de 24bp en el sitio 129V en dos casos, uno VV de inicio temprano y otro MM de inicio tardío; un polimorfismo silente en el sitio 117 en un caso VV y una coexpresión del polimorfismo E219K (común en asiáticos) con una variante P102P (no descrita anteriormente en la literatura) en un caso MM, ambos de inicio tardío (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Genotipificación PRNP en la población con Enfermedad de Alzheimer.

<u>Pacientes con EA*</u>	<u>Edad/sexo</u>	<u>MMSE^{&}</u>	<u>Polimorfismo</u>	<u>Secuenciación</u>
A5	56/M	12	MM	(-)
A9	79/M	17	MV	(-)
A11	56/M	11	MM	(-)
A12	80/F	21	MV	(-)
A14	64/M	NA	VV	(-)
A16	72/M	11	MM	(-)
A17	49/F	19	MM	(-)
A21	82/F	22	MM	(-)
A31	70/F	16	MV	(-)
A33	80/F	2	MM	(-)
A34	54/M	NA	MV	(-)
A37 ¹	54/F	23	VV	(-)
A38	81/M	NA	MV	(-)
A39	56/F	23	VV	del 24bp-129V
A40	92/F	15	MM	(-)
A41	83/M	21	MM	(-)
A42	79/M	18	MM	(-)
A43	55/M	NA	MV	(-)
A44	77/M	14	MM	(-)
A45	74/F	NA	MV	(-)
A46	79/F	18	MM	del 24bp-129V
A47	73/F	9	MM	(-)

Fuente: Directa

* Pacientes con criterios de demencia (DSM-IV) y Dx. de probable EA (NINCDS-ADRDA)

&: Valores del MMSE en relación a la última consulta; NA: No Aplicable

1: Miembro perteneciente a una hermandad con EA (*vide supra*)

Cuadro 5 (Cont.) Genotipificación PRNP en la población con Enfermedad de Alzheimer.

<u>Pacientes con EA*</u>	<u>Edad/sexo</u>	<u>MMSE^{&}</u>	<u>Polimorfismo</u>	<u>Secuenciación</u>
A48	70/F	23	VV	Pol. silente, 117
A49	59/M	24	VV	(-)
A51	84/F	23	MM	(-)
A52	79/F	NA	MM	E219K, P102P
A53	55/M	20	MM	(-)
A54	74/M	NA	MM	(-)
A55	68/M	NA	MM	(-)
A56	79/F	14	MV	(-)
A57	76/F	NA	MV	(-)

Fuente: Directa

* Pacientes con criterios de demencia (DSM-IV) y Dx. de probable EA (NINCDS-ADRDA)
&: Valores del MMSE en relación a la última consulta; NA: No Aplicable
1: Miembro pertenecientes a una hermandad con EA (*vide supra*)

Sujetos con Enfermedades por Priones

Para determinar la cantidad de pacientes con pbe. Enfermedad por Priones que hayan sido atendidos en el Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS, se revisaron un total de 2886 expedientes de los archivos del Servicio de Patología, comprendidos de los años de 1990 a 2005. Se obtuvieron un total de 391 expedientes de pacientes neurológicos (13.55%), de los cuales 12 (3% del total de casos neurológicos, 0.4% del total) correspondieron a un diagnóstico (probable) de Encefalopatía Espongiforme (EET). Sólo en 3 casos se sospechó de una Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (25% del total de casos con EET). El promedio de edad de los pacientes con pbe. EET fue de 54 ± 22 años (Rango de 14 a 79 años, mediana de 63.5) (ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Variables demográficas de los pacientes con EET estudiados en el Servicio de Patología del CMNO, IMSS, en el periodo 1990-2005.

<u>Pacientes con EET*</u>	<u>Edad/Sexo⁺</u>	<u>Dx. Presuntivo[§]</u>	<u>Hallazgo Histopatológico[#]</u>
164-90	ND	ND	ND
10-92	43/M	Pbe. ECJ	VCf, MN
26-94	66/F	Esquizofrenia	VCf, p; MN
45-94 [§]	38/F	Arteritis Takayasu	Vsb, Vasculitis
161-95	69/M	Pbe. ECJ	ND
64-96 [§]	77/F	Granulomatosis	Isb, c, t; CA
47-97	62/F	ND	ND
49-98	ND	ND	ND
59-98 [§]	28/F	Crisis convulsivas	Ic generalizada
145-2000 [§]	14/M	Infarto Tallo cerebral	Ic generalizada
147-2000	79/M	Pbe. ECJ	VCf, p; MN
147-2001 [§]	65/M	Craneofaringioma	Vsb, Vasculitis

Fuente: Directa

* Encefalopatía Espongiforme Transmisible (probable). Los números corresponden al registro patológico & Reporte histopatológico confirmado mediante revisión de las laminillas de la autopsia + Edad en años

ND: No disponible

§ ECJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

VC: Vacuolización cortical de predominio: f, frontal; p, parietal. Vsb: Vacuolización en sustancia blanca. MN: Muerte neuronal. Isb: Isquemia en sustancia blanca; c, cortical; t, talámica. CA: Células atípicas.

Se obtuvieron laminillas de 6 autopsias (ver Figura 2), en las que se confirmaron los hallazgos descritos (reportados de forma breve en la bitácora del Servicio de Patología). El hallazgo de EE pudo ser confirmado en dos de los tres casos con sospecha de ECJ (en uno no pudo encontrarse ni el reporte ni las laminillas de la autopsia) así como en el caso con reporte de Esquizofrenia. El resto de los casos no mostraron hallazgos concluyentes de EE.

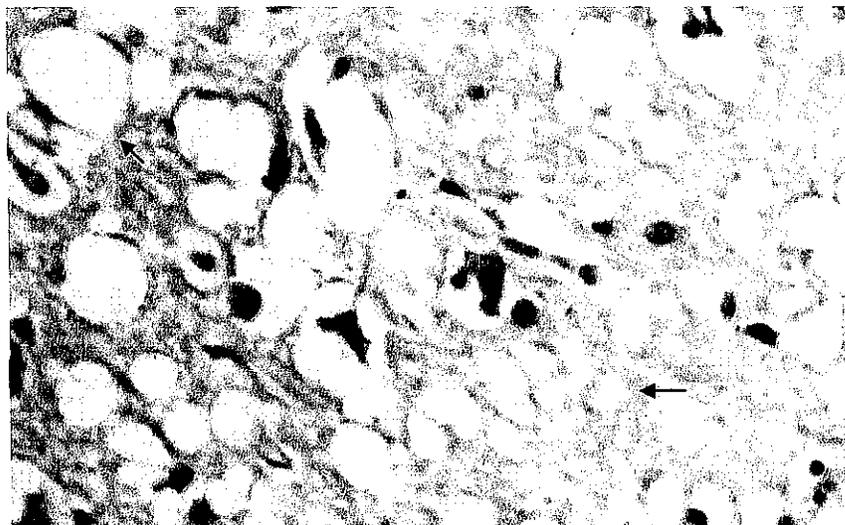


Figura 2. Microfotografía de Corteza Frontal de paciente con diagnóstico presuntivo de ECJ (código de patología: 147-2000). Se observan vacuolas de pequeño y mediano tamaño (flechas) con pérdida celular.

La extracción de ADN de los tejidos incluidos en parafina dio un ADN de baja calidad, degradado, que no pudo restituirse con técnicas de dilución, por lo que la genotipificación *PRNP* de las muestras no ha podido ser determinada. La determinación inmunohistoquímica de la proteína PrP^{Sc} en los bloques de tejido cerebral aún no ha sido realizada.

Cuadro 7. Variables demográficas de los pacientes con ECJ comprobados por IHC.

<u>Pacientes con ECJ^{\$}</u>	<u>Sexo/Edad⁺</u>	<u>Inmunohistoquímica[#]</u>	<u>PRNP^{&}</u>
01	F/61	PrP ^{Sc} +, Patrón granular	MM
02	M/34	PrP ^{Sc} +, Patrón granular	MM
03	M/54	ND	

Fuente: Directa
 IHC: Inmunohistoquímica
 \$ ECJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
 + Edad en años
 # PrP^{Sc} Proteína Priónica anormal
 & PRNP: Gen de la Proteína Priónica, M: Metionina, V: Valina
 ND: No disponible

Se ha realizado autopsia de 3 pacientes con ECJ probable (ver cuadro 7), en dos de los cuales ya ha sido realizado el estudio inmunohistoquímico, demostrando en ambos casos un patrón de agregación granular en corteza cerebral, de predominio frontotemporal y en ganglios basales (ver Figura 3). Lo anterior confirma el diagnóstico de ECJ. La genotipificación PRNP demostró un polimorfismo MM en el codón 129 (M129M).

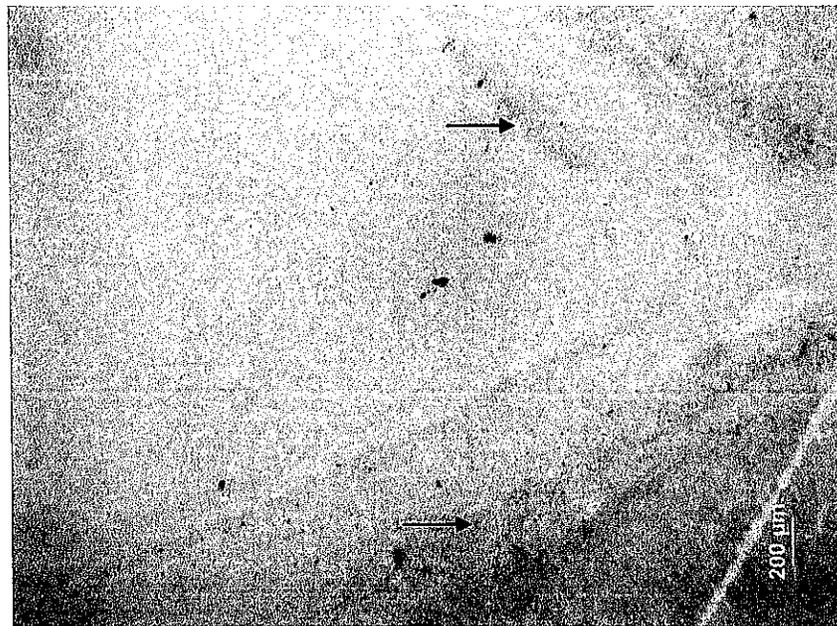
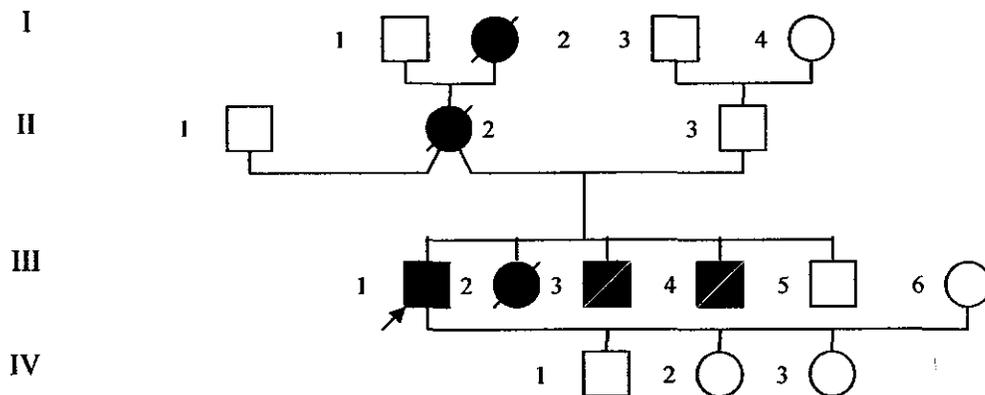


Figura 3. Corte de Región Hipocampal en la que se observa depósito granular de PrP^{Sc} en corteza entorrinal y giro dentado (flechas). Este hallazgo confirma el diagnóstico de ECJ (Paciente 02). El Genotipo PRNP fue M129M (ver Cuadro 2).

Un cuarto caso con ECJ ha sido evaluado, consta de una familia con 6 miembros afectados, sólo uno de los cuales vive. En 2 hermanos se realizó la autopsia, encontrando señal positiva en la IHC en ambos y la mutación E200K en el gen PRNP. Esta mutación también fue encontrada en el caso índice, además del polimorfismo M129M. Su mamá y una abuela fallecieron con un cuadro demencial, al parecer del mismo tipo (ver pedigree).



- I-2 : Demencia, Pbe. ECJ familiar
- II-2 : Demencia, Pbe. ECJ familiar
- III-1 : Demencia, ECJ familiar (Mutación E200K), M129M
- III-2 : Demencia, Pbe. ECJ familiar
- III-3 : Demencia, ECJ familiar (Mutación E200K), M129M
- III-4 : Demencia, ECJ familiar (Mutación E200K), M129M
- IV-1,2,3 : Sin estudio genético realizado, 50% de heredar la mutación

En esta familia no se ha realizado la genotipificación PRNP en la hermandad de la cuarta generación, aunque se sabe que por el carácter Autosómico Dominante del modo de herencia del gen PRNP, todos los hijos tienen 50% de probabilidad de heredar la mutación.

Este estudio se encuentra en los parámetros de una población típica con EA: edad de los casos de 70 años (mediana de 74), con una duración promedio de la enfermedad de 4 años, una incidencia ligeramente mayor en mujeres que hombres, baja escolaridad y con un deterioro cognitivo de moderado a grave. Sin embargo, cuando se estudian los pacientes en relación a la edad de inicio, los pacientes con EAITe son mayoritariamente hombres, con un MMSE ligeramente inferior, pero con mayor escolaridad, mientras que los casos con EAITa son principalmente mujeres, con mayor MMSE y menor escolaridad.

Al igual que en estudios previos de nuestra población con EA (Sanchez-Gonzalez, V.J., 2006), la presencia de EAITe es elevada, debida principalmente a que se estudió una población pequeña y al hecho de que este estudio haya sido realizado en un hospital de concentración tanto de una ciudad capital como de sus poblaciones vecinas. Si bien se presentan datos de 31 pacientes, con una proporción de casos con EAITe del 32.25%, ésta ha disminuido en relación a estudios previos, en donde era de 56.5% (Sanchez-Gonzalez, V.J. 2004). Tomando en cuenta los 67 casos con EA evaluados en la Clínica de Demencias, la proporción de EAITe se mantiene en un 33% (22 casos de 67), valores visto sólo en población árabe (Bowirrat, A., Friedland, R. P., Chapman, J. & Korczyn, A. D. 2000). Si bien este nivel parece constante, una población más amplia probablemente disminuya esta proporción a niveles más cercanos a lo reportado (6-10%, Nussbaum, R. L. & Ellis, C. E. 2003; OMIM, # 104300).

El hecho de que haya un mayor proporción de hombres que mujeres en la EAITe puede apuntar a una influencia genética hacia este tipo de EA. Los estudios en familias con EAITe han encontrado una asociación con los genes de la β APP (Farlow, M., Murrell, J., Ghetti, B., Unverzagt, F., Zeldenrust, S. & Benson, M. 1994.; Rossi, G., Giaccone, G., Maletta, R., Morbin, M., Capobianco, R., Mangieri, M., et al. 2004), PSEN1 (Rogaeva, E. A., Fafel, K. C., Song, Y. Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., et al. 2001; Raux, G., Guyant-Marechal, L., Martin, C., Bou, J., Penet, C., Brice, A., et al. 2005) y PSEN2 (Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., et al. 1995), principalmente. Un estudio reciente en 11,884 pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos, en 392 de los cuales uno o ambos gemelos tenían EA se encontró una heredabilidad de un 58% y sin predominancia en ningún sexo (Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., et al. 2006). Todos estos estudios han demostrado tener una herencia Autosómico Dominante sin efecto materno (OMIM, #104300) haciendo difícil atribuir una mayor frecuencia de EAITe en varones a un efecto puramente genético.

Entre los factores que se han visto como favorecedores de una función mental preservada en el largo plazo se encuentran leer, escribir, una buena alimentación y realizar una actividad física con frecuencia (Verghese J., Lipton R.B., Katz M.J., Hall C.B., Derby C.A., Kuslansky G., et al. 2003). Aunque estos han sido factores no analizados en este estudio, a excepción de la escolaridad (en donde un mayor grado de estudios puede atribuirse más bien la hecho de que los hombres han tenido más disponibilidad que las mujeres a mayor educación), la muy temprana presencia de EA en algunos casos (40 años) hace

pensar en una influencia genética de mayor peso que la de un factor ambiental por exclusivo. De nuevo, el estudio de Gatz (2006) no descarta la influencia ambiental, pero la equilibra con la carga genética.

Genotipificación *PRNP*

Enfocados en el lado genético de la enfermedad, este estudio estuvo dirigido a valorar la influencia que sobre la EA tiene el alelo V del gen *PRNP*. La selección de este alelo no es arbitraria: se ha encontrado que este alelo influye en la duración de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Kong, Q., et al. 2004), prolongándola y modificando a su vez el cuadro clínico hasta un punto más parecido al de la EA (Parchi, P., et al. 2004).

En este estudio se encontró que el genotipo MM es el más frecuente en la población con EA (54.83%), al igual que en la población sana. Estos datos concuerdan con los publicados previamente en estudios de casos y controles en población caucásica, pero distintos a los de la población asiática (AlzGene, 2008, ver cuadro 1).

La frecuencia del genotipo VV, sin embargo, resultó ser mayor que la observada en población caucásica, y como consecuencia, la frecuencia del genotipo MV estuvo ligeramente disminuida; esto muy probablemente debido al alto porcentaje de casos con EAITE, población en donde se encontró la mayoría de los genotipos VV, que están sobrerrepresentados en nuestra población.

Cuadro 1 . Metanálisis de estudios de Casos/Controles de los genotipos PRNP en la EA.

	<u>Muestras</u> §	<u>Alelos</u>		<u>Genotipos</u>		
		<u>V</u>	<u>M</u>	<u>V/V</u>	<u>V/M</u>	<u>M/M</u>
<u>Caucásicos</u>	10					
EA		0.31	0.69	231 (0.101)	943 (0.414)	1106 (0.485)
C		0.34	0.66	325 (0.110)	1332 (0.453)	1286 (0.437)
<u>Asiáticos</u>	3					
EA		0.03	0.97	0 (0.0000)	74 (0.066)	1042 (0.934)
C		0.03	0.97	1 (0.0001)	53 (0.058)	865 (0.941)
<u>Total</u>	13					
EA		0.22	0.78	231 (0.068)	1017 (0.299)	2148 (0.633)
C		0.26	0.74	326 (0.084)	1385 (0.359)	2151 (0.557)

§ Número de estudios de Casos/Controles
EA: Enfermedad de Alzheimer, C: Controles
M: Metionina, V: Valina

Tomado de AlzGene, 2008, <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/meta.asp?geneID=67>

Para valorar si la frecuencia de los genes encontrados en nuestro estudio estaba en concordancia con la distribución esperada en la población abierta, calculamos el equilibrio de Hardy-Weinberg, en donde no encontramos una distribución equilibrada para los genotipos estudiados. Sin embargo, las proporciones de los genotipos observados resultó muy similar a la de los estudios caucásicos. Lo anterior avala la necesidad de realizar un estudio con un mayor número de casos o con una proporción de EAITE/EAITa más cercana a los valores ya reportados, donde seguramente se mostraría el equilibrio genético poblacional.

Genotipos PRNP como factores de riesgo de la EAITe

El Odds-Ratio demostró que el alelo V es un factor de riesgo de la EAITe, aumentando en gran proporción la probabilidad de desarrollar esta variante de la enfermedad, en comparación con la EAITa. Al considerar la heterocigocidad MV, el riesgo atribuible al alelo V se ve anulado, pero se mantiene en la homocigocidad, VV. En cambio, el alelo M muestra un factor de disminución de riesgo de padecer EAITa, tanto en homocigocidad como en heterocigocidad.

La asociación del polimorfismo MM con la forma clásica de la ECJ está bien establecida (De Armond, S., et al. 2004). En su variante 1, es la principal forma de la PrP, siendo responsable de cerca del 60% de los casos de ECJs, en la que el inicio de los síntomas es a los 65 años, con una duración clínica de 4 meses. Esta es la variante encontrada en los casos estudiados en la autopsia y en el caso de ECJ familiar (con una mutación asociada). Así, esta forma de la PrP confiere 'protección' para la EAITe, pero está ligada con la EAITa, que tiene una topografía de afección similar a la de la ECJ. En cambio, la variante 2 es menos común, pero también se presenta alrededor de los 65 años de edad, aunque con una duración promedio de 16 meses (Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P. & Chen, S. 2003).

Por el contrario, el polimorfismo VV, en su variante 1, es la forma más rara de PrP, pero está relacionada con los casos de ECJ de inicio temprano, con una edad promedio al inicio de los síntomas de 39 años. La variante 2 es la segunda causa de ECJ, con un 16% de los casos y tiene una edad al inicio de los

síntomas de 60 años (en el límite entre inicio temprano y tardío) (Gambetti, P., et al., 2003).

El sitio de afección de ambos tipos es distinto: mientras la forma MM1 tiene una mayor afección rostral, cerebelosa y entorrinal (como el caso de la imagen 1) y la forma MM2 a la corteza y ganglios basales, la forma VV1 tiene un predominio frontotemporal y la forma VV2 a la corteza frontal, giro hipocampal y corteza entorrinal (Gambetti, P., 2003).

No se sabe hasta qué punto el polimorfismo por sí mismo modifica la función de la proteína, porque las variantes 1 y 2 se presentan en la PrP^{Sc} (la forma patológica), pero la variante 1 y 2 debe coexistir con una forma específica para modificar el curso de la enfermedad (Parchi, P., Giese, A., Capellari, S. 1996). Así, el polimorfismo está más asociado con la función que la variante proteica. De esta manera, las formas de la PrP podrían influir en el cuadro clínico no sólo de la ECJ, sino de cualquier otra enfermedad neurodegenerativa que comparta una vía común con la PrP, manifestándose en parte como lo harían en la ECJ.

Papel regulador de la PrP^C

Recientemente, Parkin, E. T., et al (2007), tomando en cuenta que tanto la PrP^C como la β APP son escindidas de la membrana celular por metaloproteasas dependientes de zinc y sujetas a endoproteólisis por las enzimas ADAM10 y 17 (Dominio de disintegrina y metaloproteína), buscaron si la PrP^C altera el proceso proteolítico de la β APP y encontraron

que la PrP^C inhibe la escisión de la β APP por la β -secretasa (BACE1) reduciendo la formación de beta-amiloide (β A). Los autores encontraron, además, que dos variantes mutantes de la PrP^C que están involucradas con ECJ familiar (una de ellas con alelo V) es incapaz de inhibir la escisión de la β APP por la BACE1. Los autores concluyen que este mecanismo regulador de la actividad de la BACE1 por parte de la PrP^C puede tener implicaciones tanto para la EA como para las enfermedades por priones.

Este papel de la PrP^C trae implicaciones cruzadas que van desde el papel de la β A con la ocurrencia de las enfermedades por priones hasta el papel de la PrP^C en la aparición de la EA. La presencia de alguna de las formas de la PrP^C puede brindar mayor afinidad a sitios específicos de la BACE1 (una especie de "tropismo proteico"), lo que provocaría que, al ser anormal la PrP^C, se generaría un distinto patrón de degradación de la β APP con una tasa mayor o menor de producción de β A, influyendo en la edad de inicio y en el cuadro clínico de ambas enfermedades. La medición de la degradación de la β APP y su correlación con las variantes genóticas PRNP puede ser un indicador indirecto del efecto de la PrPC sobre el mecanismo generador del β A.

1. Las frecuencias del polimorfismo MM y MV *PRNP* en la Enfermedad de Alzheimer es similar a la observada en distintas poblaciones caucásicas con EA, mientras que la frecuencia del polimorfismo VV es mayor.
2. La frecuencias del polimorfismo VV *PRNP* en la Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano es significativamente mayor que en la Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío.
3. El alelo V tiene un riesgo atribuible de hasta 7 veces mayor con la Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano.
4. El genotipo MM *PRNP* es el de mayor frecuencia en la ECJ.

Alzgene. (2003). Gene overview of all published AD-association studies for CST3, en Alzheimer Research Forum. <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene>

Alzgene. (2008). Gene overview of all published AD-association studies for PRNP, en Alzheimer Research Forum. <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/geneoverview.asp?geneid=67>

AlzGene (2008). Meta-analysis of all published AD association studies (Case-Control only) rs1799990, en Alzheimer Research Forum. <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/meta.asp?geneID=67>

Amouyel, P., Brousseau, T., Fruchart, J. C. & Dallongeville, J. (1993). Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1309.

Anwar, N., Lovestone, S., Cheetham, M., Levy, R. & Powell, J. F. (1993). Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1308-09.

Barinaga, M. (1994). Neurotrophic factors enter the clinic. *Science*, 264(5160),772-774.

Barger, S. & Harmon, A. D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*, 388, 878-881.

Ben-Shlomo, Y., Lewis, G. & McKeigue, P. (1993). Apolipoprotein E-ε4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1310.

Berr, C., Richard, F., Dufouil, C., Amant, C., Alperovitch, A. & Amouyel, P. (1998). Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly. The EVA study. *Neurology*, 51, 734-37.

Borgaonkar, D., Schmidt, L., Martin, S., Kanzer, M. D., Edelson, L., Growdon, J., et al. (1993). Linkage of late-onset Alzheimer's disease with apolipoprotein E type on chromosome 19. *Lancet*, 342, 625.

Bowirrat, A., Friedland, R. P., Chapman, J. & Korczyn, A. D. (2000). The very high prevalence of AD in an Arab population is not explained by APOE epsilon-4 allele frequency. *Neurology* 55: 731 only.

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.

Brown, P., Rodgers-Johnson, P., Cathala, F., Gibbs, C. & Gajdusek, G. (1984). *Ann. Neurol.*, 16 (3): 295-304.

Brown, P. (2004). Mad Cow Disease in Cattle and Human Brains. *Am Sci*, 92 (4), 334-341.

Burns, A., Jacoby, R. & Levy R. (1990). Psychiatric Phenomena in Alzheimer's Disease. II: Disorders of Mood. *Brit J Psy*, 157, 76-81.

Chan D., Fox N., Scahill R., Crum, W. R., Whitwell, J. L., Leschziner, G., et al. (2001). Patterns of temporal lobe atrophy in Semantic Dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 49, 433-442.

Citron M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., et al (1994). Excessive production of amyloid β protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11993-11997.

Collinge, J., Palmer, M. & Dryden, A. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt – Jakob Disease. *Lancet*, 337, 1441-42.

Czech, C., Mönning, U., Tienari, P., Hartmann, T., Masters, C. & Beyreuther, K. (1993). Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1310.

DeArmond, S., Ironside, J., Bouzamondo-Bernstein., E., Peretz, D. & Fraser, J. (2004). Neuropathology of Prion Diseases. En Prusiner, S. (Ed.), *Prion Biology and Diseases*, vol 15 (pp. 777-856). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Del Bo, R., Angeretti, N., Lucca, E., De Simoni, M. G. & Forloni, G. (1995). Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. *Neurosc. Lett.*, 1881(1), 70-74.

Farlow, M., Murrell, J., Ghetti, B., Unverzagt, F., Zeldenrust, S. & Benson, M. (1994). Clinical characteristics in a kindred with early-onset Alzheimer's disease and their linkage to a G-to-T change at position 2149 of the amyloid precursor protein gene. *Neurology* 44: 105-111.

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P. & Chen, S. (2003). Sporadic and familial CJD : classification and characterisation. *Brit Med Bull*, 66: 213-39.

Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., et al. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiat.* 63: 168-174.

Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M. & Aguzzi, A. (2003). Extraneural pathologic Prion Protein in Sporadic Creutzfeldt – Jakob Disease. *N Eng J Med*, 349, 1812-20.

González, R. (2007). Expresión del Gen Restringido Neuronal y de la Colina Acetil Transferasa en la Enfermedad de Alzheimer. (Tesis de Posgrado). Universidad de Guadalajara

Gormley, N., Lyons, D. & Howard R. (2001). Behavioural management of aggression in dementia: a randomized controlled trial. *Age and Ageing*, 30,141-145.

Holmes C. (2000). Alzheimer's disease-cognitive impairment. *Medicine*, 35-36.

Johnson, R. & Gibbs, C. (1998). Creutzfeldt - Jakob Disease and Related Transmissible Spongiform Encephalopathies. *N. Engl. J. Med.*, 339 (27), 1994-2004.

Kaplan, H., Sadock, B. & Grebb, J. (1994). Geriatric Psychiatry. En Kaplan, H., Sadock, B. & Grebb, J. (Eds.), *Synopsis of Psychiatry*, vol. 50 (pp. 1155-1170). Williams and Wilkins.

Kokmen, E., Naessens, J. & Offord, K. (1987). A Short Test of Mental status: Description and preliminary results. *Mayo Clin Proc*, 62, 281-288.

Koliastos, V. E. (1996). Biological therapies for Alzheimer's disease: focus on trophic factors. *Crit. Rev. Neurobiol*, 10(2), 205-238.

Kong, Q., Surewicz, W., Petersen, R., Zou, W., Chen, S., Gambetti, P, et al. (2004). Inherited Prion Diseases. En Prusiner, S. (Ed.), *Prion Biology and Diseases*, vol 14 (pp. 673-775). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Lawrence, S., Keats, B. J. & Morton N. E. (1992). The AD1 locus in familial Alzheimer disease. *Ann Hum Genet.*, 56, 295-301.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977.

Li, Q.-X., Whyte, S., Tanner, J., Evin, G., Beyreuther, K. & Masters, C. L. (1998). Secretion of Alzheimer's disease A β amyloid peptide by activated human platelets. *Lab. Invest.*, 78, 461-469.

Lucotte, G., David, F., Visvikis, S., Leininger-Müller, B., Siest, G., Babron, M. C., et al. (1993). Apolipoprotein E- ϵ 4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1309.

Maccioni, R., Muñoz, J. & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*, 32, 367-381.

Mahley, R.W. & Innerarity, T.L. (1983). Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochem. Biophys. Acta*, 737,197-222.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E. (1984). Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group. *Neurology*, 34, 939-944.

McKinley, M., Meyer, R., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A, et al. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol*, 65, 1340-1351.

Miller S. A., Dykes, D. D & Polesky, H. F.. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, 16, 1215-1218.

Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., et al. (1991). The Consortium to establish a registry for Alzheimer's Disease (CERAD). *Neurology*, 41, 479-486.

Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Jonson-Wood, K., Galasko, D., et al. (1995). Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.*, 38, 643-648.

Nakawatase, T. V. & Cummings, J. L. (2000). Alzheimer's Disease and Related Dementias. En L. Goldman & J. C. Bennett (Eds.) *Cecil, Textbook of Medicine*. (pp. 2042-2045). Saunders Company.

Nussbaum, R. L. & Ellis, C. E. (2003). Genomic Medicine: Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *N Eng J Med*, 348, 14, 1356-64.

Oesch, B., Westaway, D. & Walchli, M. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-746.

Olson, J. M., Goddard, K. A. B., Dudek, D. M. (2002). A second locus for very-late-onset Alzheimer disease: a genome scan reveals linkage to 20p and epistasis between 20p and the amyloid precursor protein region. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 154-161.

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #104300. (2008). Alzheimer Disease. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #104310. (2008). Alzheimer Disease 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #607822. (2008). Alzheimer Disease type 3, Familial Alzheimer Disease with spastic paraparesias and unusual plaques. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #606889. (2008). Alzheimer Disease 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %602096. (2008). Alzheimer Disease 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %605526. (2008). Alzheimer Disease 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %606187. (2008). Alzheimer Disease 7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %607116. (2008). Alzheimer Disease type 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %608907. (2008). Alzheimer Disease 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %609636. (2008). Alzheimer Disease 10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #609790. (2008). Alzheimer Disease 11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %611073. (2008). Alzheimer Disease 12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %611152. (2008). Alzheimer Disease 13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %611154. (2008). Alzheimer Disease 14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %611155. (2008). Alzheimer Disease type 15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM #502500. (2008). Alzheimer Disease, Susceptibility to, Mitochondrial. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM %611154. (2008). Alzheimer Disease, Familial Early Onset, with coexisting Amyloid an Prion Pathology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OnLine Mendelian Inheritance in Men, OMIM *176640. (2008). Prion Protein, PRNP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Pan, K., Baldwin, M. & Nguyen, J. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10962-6.

Parchi, P., Giese, A., Capellari, S. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic CJD. *Ann Neurol*, 39: 767-78.

Parchi, P., Zou, W., Wang, W., Brown, P., Capellari, S., et al. (2004). Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 8322-27.

Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., et al. (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 26;104(26):11062-7.

Perl, D. (2000). Neurohistopatología de la Enfermedad de Alzheimer y los trastornos afines. En S. T. Dekosky (Ed.), *Clínicas Neurológicas de Norteamérica*. vol. 4 (pp. 911-930). McGraw-Hill/Interamericana.

Petersen, R. (2000). Envejecimiento, Deterioro Cognitivo Leve y Enfermedad de Alzheimer. En S. T. Dekosky (Ed.), *Clínicas Neurológicas de Norteamérica*. vol. 4 (pp. 845-863). McGraw-Hill/Interamericana.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. & Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 697-99.

Polvikovski, T., Sulkava, R., Haltia, M., Kainulainen, K., Vuorio, A., Verkkoniemi, A., et al. (1995). Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of β -amyloid protein. *N. Eng. J. Med.*, 333 (19), 1242-47.

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.

Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-44.

Prusiner, S. (2001). Shattuck Lecture – Neurodegenerative Diseases and Prions. *N. Engl. J. Med.*, 334 (20), 1516-1526.

Prusiner, S. (2004). An introduction to Prion biology and diseases. En Prusiner, S. (Ed.), *Prion Biology and Diseases*, vol 1 (pp. 1-87). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Raux, G., Guyant-Marechal, L., Martin, C., Bou, J., Penet, C., Brice, A., et al. (2005). Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. (Letter) *J. Med. Genet.* 42: 793-795.

Rehman, H. & Masson, E. (2001). Neuroendocrinology of ageing. *Age and Ageing*, 30, 279-287.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockschuber, R., & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse protein domain PrP(121-231). *Nature*, 382, 180-2.

Rogaeva, E. A., Fafel, K. C., Song, Y. Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., et al. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology* 57: 621-625.

Ropper, A., & Maurice V. (2001). Degenerative diseases of the nervous system. En M. J. Monsiewicz, M. P. Medina & M. Navrózov (Eds.), *Adams and Victor's Principles of Neurology*, vol. 39 (pp. 1106-1174). McGraw-Hill.

Ross, C. & Poirier, M. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative diseases. *Nat Med*, S10-17.

Rossi, G., Giaccone, G., Maletta, R., Morbin, M., Capobianco, R., Mangieri, M., et al. (2004). A family with Alzheimer disease and strokes associated with the A713T mutation of the APP gene. *Neurology* 63: 910-912.

Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., et al. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, 4, 1157-65.

Sanchez-Gonzalez, V.J., Ortiz, G.G., Gallegos-Arreola, P., Macias-Islas M.A., Arias-Merino, E.D., Loera-Castaneda, V., et al. (2006). Altered beta-amyloid precursor protein isoforms in Mexican Alzheimer's Disease patients. *Dis Markers*, 22(3):119-25.

Sanchez-Gonzalez, V.J. (2004). Presencia de los marcadores periféricos Apolipoproteína E y Proteína precursora del β -Amiloide en la Demencia del tipo Alzheimer (Tesis de Posgrado). Universidad de Guadalajara.

Saunders, A.M. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1467-1472.

Schenk, D., Lieberburg, I., Motter, R. & Seubert, P. (1996). The effect of Apolipoprotein E genotype on biochemical markers of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 802, 92-100.

Selkoe, D. (1996). The amyloid cascade hipotesis. Fifth International Conference on Alzheimer's Disease in Osaka, Japan. En Alzheimer Research Forum. <http://www.alzforum.org/res/adh/cur/knowntheamyloidcascade.asp>

Selkoe, D. (2000). Genética y bases moleculares de la Enfermedad de Alzheimer. En S. T. Dekosky (Ed.), *Clínicas Neurológicas de Norteamérica*. vol. 4 (pp. 973-994). McGraw-Hill/Interamericana.

Selkoe, D. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426, 900-904.

Selkoe, D. & Lansbury, P. J. (1999). Biochemistry of Alzheimer's and Prion Diseases. En G. Siegel, B. Agranoff, W. Albers, et al. (Eds.) *Basic Neurochemistry*, vol. 46 (pp. 949-968). Lippincott Williams and Wilkins.

Soto, C. & Castilla, J. (2004) The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med*, S63-67,

Steinhoff, B., Racker, S., Herrendorf, G., Poser, S., Grosche, S., Kretzschmar, H., et al. (1996). Accuracy and reliability of Periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt - Jakob disease. *Arch Neurol*, 53, 162-166.

Strittmatter, W., Saunders, A., Schmechel, D., Pericack-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G., et al. (1993). Apolipoprotein E: High avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 1977-81.

Szabó, C. (1996). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, 41(3), 131-141.

Talbot, C., Lendon, C., Craddock, N., Shears, F., Morris, J. C. & Goate, A. (1994). Protection against Alzheimer's disease with apoE ϵ 2. *Lancet*, 343, 1432-33.

Turner, R. S., Suzuki, N., Chyung, A. S., Younkin, S. G. & Lee, V. M. (1996). Amyloid beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J. Biol. Chem.* 77, 8966-70.

van Duijn, C.M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L., Hofman, A., et al. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.*, 7, 74-78.

Verghese J., Lipton R.B., Katz M.J., Hall C.B., Derby C.A., Kuslansky G., et al. (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *N Engl J Med.* 19;348(25):2508-16.

Walden, C. C. & Hegele, R. A. (1994). Apolipoprotein E in Hyperlipidemia. *Ann. Intern. Med.*, 120, 1026-36.

Weisgraber, K.H. & Mahley, R.W. (1996). Human apolipoprotein E: The Alzheimer's disease connection. *FASEB J.*, 10, 1485-1494.

Will, R., Alpers, M., Dormont, D. & Schonberger, L. (2004). Infectious and Sporadic Prion Diseases. En Prusiner, S. (Ed.), *Prion Biology and Diseases*, vol 13 (pp. 629-71). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yan, S. D., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Al-Mohanna, F., Collison, K., et al. (1997). An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 389, 689-695.

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 anatomo-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.

ANEXO III
CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA UNIDAD DE VIGILANCIA NACIONAL
(UK) DE LA ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB

1. CJD Esporádica

1.1 Definitiva

Confirmación neuropatológica/
inmunohistoquímica

1.2 Probable

1.2.1. I + 2 II + III

1.2.2. Posible + 14-3-3 positivo

1.3 Posible

I + 2 II + Duración < 2 años

2. EET Accidentalmente Transmitida

2.1 Definitiva

ECJ Definitiva con un factor de riesgo
iatrogénico reconocido (ver cuadro).

2.2 Probable

2.2.1. Síndrome predominantemente
cerebeloso y progresivo

2.2.2. ECJ Probable con un factor de
riesgo iatrogénico reconocido (ver
cuadro).

I Demencia rápidamente Progresiva

II A. Mioclonus

B. Problemas visuales o cerebelosos

C. Rasgos piramidales o extrapiramidales

D. Mutismo acinético

III EEG típico

**Riesgos de exposición relevante para la
clasificación como ECJ Iatrogénica**

*La relevancia de cualquier exposición para la
causa de la enfermedad debe tomar el tiempo
de la exposición en relación con el inicio de la
enfermedad.*

- Tratamiento con GH, GnH humana
pituitaria o injerto de duramadre.
- Injerto corneal en el que el donador
corneal haya sido clasificado con
Enfermedad por priones humana
probable o definitiva.
- Exposición a instrumentos
neuroquirúrgicos previamente usados
en un caso de Enfermedad por
priones humana probable o definitiva.

*La lista es provisional ya que pueden
ocurrir mecanismos previamente no
reconocidos de Enfermedad por priones
humana.*

3. EET Genética

3.1 Definitiva

3.1.1. EET Definitiva + EET Definitiva o Probable en un familiar de primer grado.

3.1.2. EET Definitiva con una mutación patogénica en *PRNP* (ver cuadro).

3.2 Probable

3.2.1. Un trastorno neuropsiquiátrico progresivo + EET Definitiva o Probable en un familiar de primer grado.

3.2.2. Un trastorno neuropsiquiátrico progresivo + Una mutación patogénica en *PRNP* (ver cuadro).

- **Mutaciones en PRNP asociadas con un fenotipo neuropatológico de GSS**
P102L, P105L, A117V, G131V, F198S, D202N, Q212P, Q217R, M232T, 192 bpi
- **Mutaciones en PRNP asociadas con un fenotipo neuropatológico de ECJ**
D178N – 129V, V180I, V180I + M232R, T183A, T188A, E196K, E200K, V203I, R208H, V210I, E211Q, M232R, 96 bpi, 120 bpi, 144 bpi, 168 bpi, 48 b~~pi~~
- **Mutaciones en PRNP asociadas con un fenotipo neuropatológico de IFF**
D178N – 129M
- **Mutaciones en PRNP asociadas con PRP Amiloide Vascular**
Y145S
- **Mutaciones en PRNP asociadas con Enfermedad por priones probada pero no clasificada**
H187R, 216 bpi
- **Mutaciones en PRNP asociadas con un trastorno neuropsiquiátrico pero sin Enfermedad por priones comprobada**
I138M, G142S, Q160S, T188K, M232R, 24 bpi, 48 bpi, 48 bpi + sustituciones de nucleótidos en otros octapéptidos.

Anexo IV

EXTRACCION DE ADN

Existen diferentes protocolos para la extracción de los ácidos nucleicos. La mayoría se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que rompen los núcleos de las células y remueven las proteínas adheridas al ADN, seguidos por la precipitación de éste con sales y alcoholes. De esta manera son utilizados en la amplificación *in vitro* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

Micrométodo de extracción de ADN por CTAB/DTAB:

Método rápido de extracción de ADN partiendo de poco material biológico. Descrito por Gustincich en 1991, se basa en el empleo de dos detergentes, bromuro de dodecil trimetil amonio (DTAB) y bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB). El DTAB lisa las células blanco y el CTAB detergente catiónico se une al ADN para precipitarlo.

Procedimiento:

- Tomar 300 μ l de sangre periférica con EDTA como anticoagulante y colocarla en un tubo Eppendorf de 2.0 ml previamente rotulados (6 tubos para cada muestra).
- Añadir 700 μ l de buffer de lisis DTAB, mezclar suavemente.
- Incubar durante 5 min a 68°C.
- Retirar los tubos de la incubación e inmediatamente añadir 900 μ l de cloroformo, tapar bien los tubos y agitar vigorosamente durante 1 min.
- Centrifugar 15 min a 10,000 rpm. En esta etapa se formarán tres capas: la capa inferior de cloroformo, la intermedia corresponde a la lisis celular y la superior acuosa donde se encuentra el ADN.
- Transferir a tubos nuevos la capa superior acuosa con una pipeta de punta estéril (cuidadosamente).
- Agregar 100 μ l de CTAB y 800 μ l de agua inyectable y agitar suavemente.
- En este paso se pueden refrigerar los tubos a 4°C durante 5 min para agilizar la precipitación del ADN (paso opcional).
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- Desechar el sobrenadante y recuperar el botón de ADN, añadir 100 μ l de NaCl 1.2 M más 1 ml de etanol absoluto frío, mezclar suavemente.
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado, añadir 1 ml de etanol al 70%, mezclar suavemente.
- Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min, eliminar el sobrenadante.
- Repetir este paso 3 veces.
- Juntar en un solo tubo los 6 botones de ADN de la misma muestra.
- Eliminar completamente el etanol.
- Resuspender el ADN en buffer TE, agitar suavemente y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para estimar la cantidad de ADN genómico y verificar su pureza se determina la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm por medio de un espectrofotómetro. Una relación de DO 260/280 nm mayor que 2.0 indica que el ADN tiene una pureza adecuada; mientras que si es menor que 2.0, se debe considerar contaminación de la muestra, principalmente por sales o proteínas.

Procedimiento:

- Colocar 5 μ l de la muestra de ADN en una celda de cuarzo conteniendo 1 ml de agua destilada, mezclar suavemente y leer a 260 y 280 nm.
- Mediante la aplicación de la siguiente fórmula se determina la concentración del ADN:

$$\text{ADN ng/ml} = \text{DO 260 nm} \times \text{dilución (1005/5 } \mu\text{l)} \times 50 \text{ (factor constante)}$$

- Para determinar la pureza del ADN (cantidad de proteínas), el valor de la relación DO 260/280 nm debe ser de 2.0 en adelante para considerarse satisfactoria.

VERIFICACIÓN DEL ADN

La electroforesis a través de geles de agarosa o poliacrilamida es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, por lo que es un método alternativo para determinar su integridad. En el corrimiento electroforético se utiliza como control una muestra de ADN de concentración conocida, la presencia en el gel de una banda nítida es indicativo de que el ADN aislado tiene una pureza adecuada, mientras que si se observa un barrido o un patrón de varias bandas indica contaminación por sales y degradación del ADN, respectivamente.

Procedimiento:

- Aplicar 2 μ l de ADN genómico en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de ADN con 3 ml de jugo azul 6X.
- Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento con un voltaje constante (60V) durante 1 h 30 min o hasta que el colorante con mayor peso molecular (xilencianol) haya migrado 3 cm a partir del punto de aplicación.
- Tefñir el gel sumergiéndolo en solución bromuro de etidio 0.5 mg/ml durante 5 min, enjuagar y visualizar el ADN con un transiluminador UV.

El bromuro de etidio es un compuesto que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases del ADN cuando éste se encuentra en doble cadena y fluoresce cuando incide en él luz ultravioleta. Estas propiedades son aprovechadas para la visualización del ADN que se ha sometido previamente a un corrimiento electroforético.

Anexo V

EXTRACCIÓN DE ADN (Método de Miller)

- Se toman de 5 a 10 ml de sangre periférica, en tubo con anticoagulante y se colocan en un tubo plástico de 50 ml.
- Se agregan 2 volúmenes de la solución para lisis de eritrocitos ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 10:1).
- La mezcla se refrigera a 4°C por 10 min para ayudar a la lisis de eritrocitos.
- Se centrifuga a 5,000 rpm durante 10 min.
- Se descarta el sobrenadante y el botón de leucocitos se lava las veces necesarias hasta remover todos los eritrocitos (hasta que el botón quede blanco).
- El botón de leucocitos se resuspende en 3 ml de buffer de lisis de núcleos (Tris HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA Na_2 2 mM, pH 8).
- El lisado de leucocitos se deja en digestión toda la noche a 37°C (12, 24 o 48 hs) con 0.2 ml de SDS 10%, 0.5 ml de sol. de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en SDS 1% y EDTA Na_2 2 mM).
- Agregar 1 ml de solución saturada de NaCl (6 mM).
- Agitar vigorosamente por 15 seg.
- Centrifugar a 2,500 rpm durante 15 min.
- Recuperar el sobrenadante (que contiene el ADN) y transferirlo a otro tubo.
- Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar por inmersión varias veces hasta que se forme un precipitado (el ADN "limpio" flota en la superficie).
- Transferir el ADN precipitado a un microtubo de 1.5 ml y lavarlo con etanol al 70 % frío las veces necesarias para eliminar las sales.
- Se deja evaporar el etanol del ADN limpio.
- Disolver el ADN en buffer TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.5) por 2 h a 37°C.

Anexo VI

TÉCNICA DE PRECIPITACIÓN DEL ADN

Material

50 μ l de ADN
500 μ l de Etanol 70%
Solución TE

Procedimiento

1. Refrigerar la muestra a 24°C por 5 minutos
2. Centrifugar por 10' a 5000 RPM
3. Decantar sobrenadante
4. Lavar con Etanol 70% 1 ml, 3 veces (centrifugar por 5 minutos a 5000 RPM)
5. Dejar los tubos abiertos a 37°C durante 24 horas
6. Agregar 25 μ l de Sol. TE y agitar
7. Dejar los tubos cerrados a 37°C durante 2 horas
8. Correr la muestra en gel de agarosa 1.5% en cámara horizontal

ANEXO VII

Protocolo de secuenciación del gen PRNP

Instalando la reacción de secuenciación utilizando ABI PRISM Big Dye Terminator v 1.1

1. Descongelar todos los reactivos: productos de la PCR, BigDye, Buffer e iniciadores. Mantenga los reactivos en hielo.
2. Para una reacción de "tamaño completo" el volumen total de reacción es de 20 μ l. Este está compuesto de 8 μ l de BigDye (el cual debe estar diluido con el buffer), 1 μ l del iniciador (a 5 pmol/ μ l), aproximadamente 1 μ l de ADN. El volumen de reacción se completa a 20 μ l con agua graduada para biología molecular.
3. Centrifugue en pulso la placa y colóquela en el termociclador. Utilice el siguiente programa:
 - a. 96° C por 30 seg.
 - b. 50° C por 15 seg.
 - c. 60° C por 30 seg.
 - d. Repita los pasos a-c por 29 ciclos adicionales.

Precipitación de productos de secuenciación utilizando precipitación por la reacción de tamaño completo de Etanol/Acetato de Sodio

1. Agregue 50 μ l de etanol 95% a cada pozo.
2. Agregue 2 μ l 3M de acetato de sodio a cada pozo. Mezcle y deje precipitar los productos durante 15 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. en hielo.
3. Centrifugue el plato a 3000G por 35 min. para condensar los precipitados de los productos de secuenciación.
4. Inmediatamente después de que pare el ciclado, voltee la placa y golpee ligeramente sobre una toalla de papel.
5. Transfiera la placa a una toalla fresca y centrifugue boca abajo a 50G por 30 seg.
6. Agregue 80 μ l de etanol 70% a cada pozo. Cubra la placa y el vortex.
7. Centrifugue a 3000G por 10 min.
8. Repita los pasos 4 y 5.
9. Deje secar la placa por aprox. 10 min. para asegurarse de que se ha secado todo el etanol residual.
10. Las placas deben ser almacenadas secas en esta etapa o preparadas para cargarse a un gel de secuenciación.

Limpiando las placas de vidrio y agregando el gel de secuenciación.

1. Tan pronto como haya terminado la corrida previa, remueva las placas de vidrio del secuenciador.
2. Coloque en la tarja y remueva la tapadera del tanque del buffer permitiendo que este drene hacia la tarja.
3. Limpie con agua el marco de plástico que contiene las placas de vidrio, especialmente donde el vidrio hace contacto con el marco.

4. Gentilmente aplique presión para separar las placas de vidrio. Coloque una toalla de papel en el interior de cada placa para absorber el gel de acrilamida, este debería salir junto con la toalla de papel.
5. Enjuague cada placa con agua graduada para biología molecular utilizando una toalla de papel para remover el gel restante.
6. Haga una solución muy débil de detergente y aplique a las placas con una toalla de papel.
7. Enjuague las placas con agua.
8. Enjuague las placas con agua hirviendo.
9. Enjuague finalmente con agua y deje secar las placas contra la pared con la cara interna hacia la pared.
10. Cuando las placas estén completamente secas junte las placas de la siguiente manera: Coloque las placas una encima de la otra con las caras internas juntas y los espaciadores entre ellas. Coloque las placas de vidrio en el cassette con la placa frontal en la cima. Asegure los sujetadores.
11. Inmediatamente antes de verter el gel mezcle los siguientes reactivos en un matraz de vidrio:
 - a. 40 ml de Sol. Monomérica SequaGel XR
 - b. 10 ml de Buffer SequaGel XR
 - c. 400 μ l de APS 10%, Sigma
12. Agite gentilmente y coloque en una jeringa de 50 ml.
13. Libere gentilmente el gel en las muescas de la cima del gel mientras golpea levemente la placa, esto impide que se formen burbujas en el gel.
14. Inserte un peine limpio de 48 pozos en las muescas en la cima del gel, con la cara plana dirigida hacia el gel. Esto forma un borde plano el cual será la base de los pozos.
15. Deje polimerizar por 2 horas a temperatura ambiente.

Preparando las placas y operando el secuenciador

1. Asegure que los reactivos de secuenciación están en la etapa del pellet seco y que el gel de secuenciación ha estado al menos 2 horas en polimerización (pero menos de 6 horas).
2. Encienda el secuenciador y reinicie la computadora.
3. Llene una hoja de muestras con el código correspondiente seguido por el iniciador utilizado, el archivo y el número de gel en las columnas correspondientes. Anote esto como el número del gel.
4. Abra un nuevo archivo y seleccione lo siguiente:
 - a. Checar Placa E
 - b. SeqPR36E-1200 (o 2400 para una velocidad de corrimiento 2x)
 - c. SeqRun36E-1200 (o 2400 para una velocidad de corrimiento 2x)
 - d. Líneas: 48
 - e. Modo de corrimiento: XL Scan
 - f. Archivo: Utilice el actual
 - g. Guarde el archivo con el número del gel.
5. Gentilmente remueva el peine de las placas, asegurándose que la "salchicha" que viene con él sea removida del área. Haga esto utilizando una combinación o chorreando con agua y utilizando una punta para remover cualquier tipo de gel.

6. Limpie ambos lados del gel con agua concentrándose en la región de lectura en la base de las placas, esta área debe estar extremadamente limpia.
7. Limpie el peine con agua e insértelo gentilmente, primero los dientes, en el gel de tal manera que los dientes se inserte en el gel aprox. 1 a 2 mm. Una vez que el peine esté en el gel no lo jale de nuevo ya que se formarán goteras entre los pozos.
8. Asegure la placa posterior de calentamiento, rodeando las áreas y los broches que posicionan las placas de vidrio por la distancia correcta.
9. Cargue el cassette que contenga las placas de vidrio en la máquina y asegure los broches.
10. Corra el módulo de chequeo de la placa. Revise en la ventana de rastreo que todos los 4 canales muestren un trazo lento y plano. Si no, puede ser necesario volver a limpiar la zona de lectura.
11. Fije la cámara del buffer al cassette y llene tanto ambas cámaras del buffer con 1xTBE. Fije la placa frontal de calentamiento. Rocíe gentilmente todos los pozos con el Buffer TBE. Corra el módulo de precorrido por 10-20 min. (no más).
12. Mientras el secuenciador está realizando el precorrimiento, prepare los productos de secuenciación. Añada 2 μ l de solución de carga de formamida a cada pellet seco, agite (en vortex) y centrifugue a pulso.
13. Desnaturalice la muestra manteniendo la placa a 95°C por 3 min. 30 seg. Transfiera inmediatamente a hielo para prevenir el reanillamiento.
14. Cuando el precorrimiento lleve de 10-20 min, haga pausa en el módulo el cual detendrá la electroforesis pero mantendrá la temperatura control (fije la temperatura a 51°C).
15. Cuando la temperatura del gel esté cercana a los 51°C empiece a cargar las muestras. Primero rocíe gentilmente todos los pozos. Empiece cargando todas las líneas nones, cargue 1-1.1 μ l de cada muestra.
16. Reinicie el precorrimiento y corra por 3 min. hacia el gel las muestras en las líneas nones.
17. Rocíe gentilmente todos los pozos y después cargue las líneas pares.
18. Cargue 2 pozos antes de la primera muestra y 2 pozos después de la última muestra con formamida solamente para contrarrestar cualquier difusión.
19. Coloque la tapadera encima del tanque del buffer, cancele el precorrimiento e inicie el corrimiento. Guarde el archivo del gel con el número del gel. El tiempo de corrimiento es de 7 horas.

ANEXO VIII

INMUNOHISTOQUÍMICA, PrP^{Sc}

Anticuerpo: 3F4 (Búsqueda de epítotope 109-112).

La concentración del anticuerpo primario varía:

- Cerebro 1:3000
- Nervios periféricos 1:500
- Bazo: 1:50 (biotinilado)
- Apéndice 1:50

Procedimiento

Desparafinar a través de 3 cambios de Xileno, 2 cambios de alcohol 100% a través de alcohol de 90% y 70%.

Pretratamiento:

- Cerebro humano (Con poco tiempo de fijación) Poner al microondas por 25 minutos.
- Cerebro humano (Con mucho tiempo de fijación) Poner en olla de alta presión por 5 minutos y 5 minutos a baja presión.

Coloque una olla de presión en un calentador a alta temperatura conteniendo 1 ½ litros de sol. Tris-EDTA 1x precalentada, espere hasta que hierva antes de colocar las laminillas. Reemplace el cubreobjetos y ajuste a alta presión. Después de que se emita un chorro constante de vapor, apague el calentador y empiece a contar otros 5 minutos, después de lo cual coloque la olla a presión en el lavabo y deje las laminillas bajo un chorro de agua fría.

Coloque las laminillas en ácido fórmico (80-99%) por 5 minutos. Lave en agua corriente.

Lave las laminillas con PBS

Agregue inhibidores DAB por 10'

Lave con PBS

Agregue Superblock por 15'

Lave con PBS

Agregue proteasa débil por 4'

Lave con PBS

Agregue anticuerpo 3F4 por toda la noche

Lave con PBS

Agregue Ig biotinilado por 30'

Lave con PBS

Agregue peroxidasa de rábano por 15'.

Lave con PBS

Agregue reactivo de cobre por 5'

Lave con PBS

Agregue reactivo azul (Eosina) por 15-20'

Lave con PBS

Agregue reactivo azul por 20'

Lave con PBS

ANEXO IX

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Guadalajara, Jalisco, a _____ de _____ de 200__

El (la) que suscribe hace constar que acepta la participación de su familiar en el proyecto de investigación titulado "Frecuencia del polimorfismo M129V del gen *PRNP* en la demencia de tipo Alzheimer", cuyo objetivo es determinar la frecuencia de los alelos como de los genotipos *PRNP* en sujetos con Enfermedad de Alzheimer.

Se me ha informado que mi participación consistirá en donar una muestra de sangre periférica con el fin de realizar el análisis de los polimorfismos del gen *PRNP*. Los resultados obtenidos serán confidenciales y me serán dados a conocer.

Adicionalmente se ha fijado el compromiso de los investigadores responsables de este proyecto, el Dr. Miguel Ángel Macías Islas y el Dr. Genaro Gabriel Ortiz, para responder a cualquier pregunta o duda que le plantee acerca de los procedimientos que se realizarán. Asimismo, estoy enterado(a) de los riesgos potenciales, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en este proyecto.

Los investigadores responsables me han confirmado que permaneceré en el anonimato en las presentaciones y publicaciones que se generen de este proyecto.

Nombre y firma del familiar

Nombre y firma del responsable

Nombre y firma del investigador



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

**"2006, año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas,
Don Benito Juárez García"**

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Ref. 09-B5-61-2800/589

Febrero 23, 2006

DOCTOR GENARO GABRIEL ORTIZ

Centro de Investigación Biomédica de Occidente,
Guadalajara, Jal.

Informo a usted que el proyecto titulado: **"Frecuencia del polimorfismo M129V y de la proteína priónica SC en pacientes con probable enfermedad de Alzheimer de inicio temprano"**, fue sometido nuevamente a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas éticas vigentes y la carta de consentimiento informado es suficientemente explícita, por lo cual tengo el agrado de hacerle saber que con base en las opiniones de los vocales de esta Comisión, se ha emitido dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2006-785-022**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar semestralmente a esta Comisión, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente

DOCTORA DOLORES MINO LEÓN

Secretario Ejecutivo
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Doctor José Sánchez Corona, Director del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Guadalajara, Jal.

DML'brs



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

COMITÉ DE ÉTICA

**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA AL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

Frecuencia del polimorfismo M129V en pacientes con probable enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.

CON NÚMERO DE REGISTRO ET072008-56

RESPONSABLE Dr. Genaro Gabriel Ortíz

NOMBRE DEL ALUMNO Víctor Javier Sánchez González

APROBADO SIN MODIFICACIONES

RECHAZADO

SUGERENCIAS:

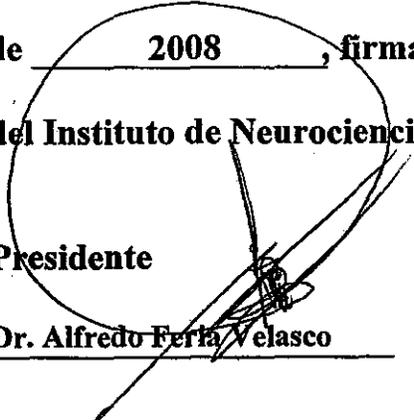
RECHAZADO DEBIDO A: _____

En caso de haber sido evaluado con sugerencias, se requiere someter a re-evaluación el proyecto de investigación, en primera instancia, al comité tutelar y posteriormente al Comité de Ética en un lapso máximo de 2 semanas a partir de esta fecha.

Se emite el presente DICTAMEN el día 9 de Julio

de 2008, firmando los integrantes del Comité de Ética del Instituto de Neurociencias.

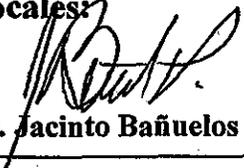
Presidente

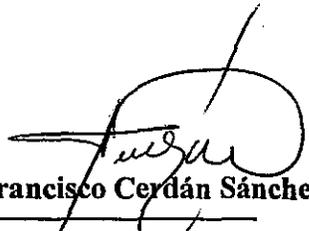

Dr. Alfredo Feria Velasco

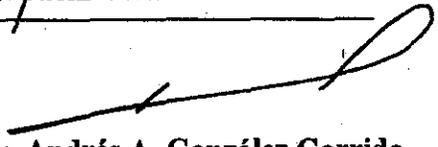
Secretaria


Dra. Marisela Hernández González

Vocales:


Dr. Jacinto Bañuelos Pineda


Dr. Luis Francisco Cerdán Sánchez


Dr. Andrés A. González Garrido


Dr. Jorge Juárez González

Ccp. Comité Tutelar correspondiente.