



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Frecuencia de los marcadores periféricos Proteína Precursora del β -Amiloide y Apolipoproteína E en la demencia de tipo Alzheimer

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)**

presenta

Víctor Javier Sánchez González

Comité tutelar

Dr. Genaro Gabriel Ortiz (Director)

Dr. Miguel Ángel Macías Islas

Dr. Emilio Gumá Díaz

Asesores

Dra. Martha Patricia Gallegos Arreola

Dr. Fermín P. Pacheco Moisés

Guadalajara, Jalisco

Diciembre de 2004

A mis Padres,
por el apoyo incondicional, el ejemplo y la entrega que me han brindado en mi vida.

A Abue y a Mamá Vicenta,
que ya no pueden ver lo que se está por aquí.

A Claudia,
mi inspiración; por su cariño, apoyo y tolerancia en todas las horas de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor, el Dr. Genaro Gabriel Ortiz, por su apoyo y enseñanzas en mi etapa de formación.

A los miembros de mi Comité Tutorial, el Dr. Miguel Ángel Macías Islas y el Dr. Emilio Gumá Díaz, por los consejos y enseñanzas ofrecidos para que este trabajo tuviera buen rumbo.

A la Dra. Martha Patricia Gallegos Arreola, por su infinita paciencia y su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Fermín P. Pacheco Moisés, por su apoyo y colaboración en las horas de trabajo en el laboratorio.

A la Dra. María de Lourdes Ramírez Dueñas, mi tutora en el Servicio Social y en las otras cuestiones que complementan y enriquecen la academia. Por su mediación en mi ingreso al Posgrado en Neurociencias.

A todos los maestros e investigadores del Instituto de Neurociencias, en especial a la Dra. Esmeralda Matute, por la oportunidad ofrecida para ingresar a este Posgrado, así como al Dr. Daniel Zarabozo, por su paciencia en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de la Maestría, por el tiempo académico y social compartido.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, por todo el apoyo ofrecido.

A los Pacientes y Personas que se ofrecieron voluntariamente para la realización de este estudio.

ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I.- INTRODUCCIÓN	5
II.- ANTECEDENTES	7
Enfermedades neurodegenerativas	7
Antecedentes históricos de la Enfermedad de Alzheimer	8
Anatomopatología de la Enfermedad de Alzheimer	8
Genética de la Enfermedad de Alzheimer	11
Características clínicas de la Enfermedad de Alzheimer	12
Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer	13
Proteína del β -amiloide como marcador periférico de la EA	14
Apolipoproteína E	15
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV.- HIPÓTESIS	19
V.- OBJETIVOS	20
VI.- MATERIALES Y MÉTODO	21
Diseño del estudio	21
Toma y transporte de las muestras	23
Determinación de la proteína precursora del β -amiloide	23
Determinación de los genotipos y alelos de la ApoE	24
Análisis estadístico	25
Flujograma del estudio	27
VII.- RESULTADOS	28
Variables demográficas de los grupos de estudio	28
Genotipificación ApoE	29
β -Amiloide	31

Análisis estratificado	32
VIII.- DISCUSIÓN	33
Genotipificación ApoE	33
β Amiloide	37
IX.- CONCLUSIONES	41
X.- PERSPECTIVAS	42
XI.- BIBLIOGRAFIA	43
XII.- ANEXOS	51
Anexo I Criterios de demencia del DSM-IV	51
Anexo II Criterios de la EA del NINCDS-ADRDA	52
Anexo III Escala de Isquemia de Hachinski	54
Anexo IV Extracción de ADN, micrométodo	55
Anexo V Extracción de ADN (Método de Miller)	57
Anexo VI Western blot	58
Anexo VII Carta de consentimiento informado	60

β-APP	Proteína precursora del beta amiloide
A	Adenina
ApoE	Apolipoproteína E
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
°C	Grados centígrados
C	Citosina
CI	Cociente intelectual
C.I.B.O.	Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente
CTAB	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
DE	Desviación estándar
dNTP	Dinucleótido trifosfatado
DO	Densidad óptica
DSM-IV	Diagnostic State Mental Evaluation IV
DTAB	Dodecil trimetil amonio
DV	Demencia Vascular
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Guanina
GABA_A	Ácido gamma- amino butírico
HCl	Ácido clorhídrico
Hhal	Haemophilus haemolyticus
IC	Intervalo de Confianza
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobases
KDa, Kd	Kilodalton
NINCDS	Nacional 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
OR	Odds-ratio
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido-ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
T	Timina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios
5-HT	Serotonina

Objetivo: Evaluar la presencia de la Proteína Precursora del β Amiloide y de los genotipos de la Apolipoproteína E en una población mexicana y determinar su asociación con la Enfermedad de Alzheimer (EA).

Metodología: Se analizaron muestras de sangre de 23 pacientes con probable EA, 3 con Demencia Vasculare (DV) y 26 controles de la población general sin la enfermedad y sin antecedentes familiares de demencia para la genotipificación de *ApoE* e identificación de la β APP mediante Western blot. A degradación de la β -APP, se obtuvo mediante una razón (en densidades ópticas) entre la banda superior (139 Kd) y la banda inferior (106-110 Kd). Por medio de la razón de momios se calculó la asociación de los genotipos de *ApoE* y la β APP con la EA.

Resultados: La razón de la β APP en los pacientes con EA fue menor en comparación con los controles: 0.4762 ± 0.266 vs. 0.7162 ± 0.2077 (media \pm DE, $p < 0.05$), siendo la del grupo de DV de 0.1808 ± 0.1284 , con un OR de 5.87 (95% CI 1.630-21.189, $p < 0.05$). En la población de EA, el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ fue el más común (OR 4.58; 95% CI 1.10-20.18, $p < 0.05$), seguido por el $\epsilon 4/\epsilon 4$ (OR 0.09; 95% CI 0.02-0.43, $p < 0.001$). La asociación entre la razón baja de la β APP y el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ mostró un OR estratificado de 5.15 (95% CI 1.92-14.30, $p < 0.001$), mientras que la razón baja de la β APP y el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ mostró un OR estratificado de 4.14 (95% CI 2.12-31.03, $p < 0.05$).

Conclusiones: El alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* y la razón baja de la β APP son factores de riesgo de la EA, independientemente de si son tomados en conjunto o no.

Objective: To evaluate the presence of ApoE genotypes and β APP ratio in a mexican population and to determine whether both compounds are risk factors of the disease.

Methods: Blood samples from 23 patients fulfilling NINCDS-ADRDA diagnostic criteria for AD, 3 Vascular Dementia subjects and 26 healthy control subjects were collected for ApoE genotyping and Western blotting for β APP. A ratio of the β APP isoforms, in optical densities, between the upper band (130 Kd) and the lower bands (106-110 Kd) was obtained. Odds ratios were obtained to determine risk factor of these components.

Results: β APP ratio on AD subjects was lower than that of control subjects: 0.4762 ± 0.266 vs. 0.7162 ± 0.2077 (mean \pm SD, $p < 0.05$), whereas that of VD was 0.1808 ± 0.1284 . A low β APP ratio showed an OR of 5.87 (95% CI 1.630-21.189). In the AD population, the $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype was the most common ApoE polymorphism (OR 4.58; 95% CI 1.10-20.18, $p=0.0342$), followed by the $\epsilon 4/\epsilon 4$ vs. the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype in control subjects (OR 0.09; 95% CI 0.02-0.43, $p=0.0008$). Both low β APP ratio and $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype showed a stratified OR of 5.15 (95% CI 1.92-14.30, $p=0.00056$), whereas low β APP ratio and $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype showed a stratified OR of 4.14 (95% CI 2.12-31.03).

Conclusions: ApoE e4 allele and a low β APP ratio are risk factors of the disease, whereas an association of both elements does not show any increased risk for the disease.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en el mundo y se caracteriza por pérdida de la memoria y neurodegeneración progresiva que conduce a daño mental grave y muerte. Los depósitos de proteína β -amiloide en las placas seniles parenquimatosas y en las paredes de los vasos sanguíneos, así como las marañas neurofibrilares dentro de las neuronas son los hallazgos pivote de la enfermedad. El locus del gen para la proteína precursora del β -amiloide (β APP) - una proteína transmembranal de 717 aminoácidos - está localizado en el cromosoma 21. Cuando esta proteína es degradada por un conjunto de proteasas - denominadas secretasas - se produce un péptido $A\beta_{1-40}$ y la variante $A\beta_{1-42}$ autoagregante implicada en el síndrome clínico de la EA.

La Apolipoproteína E (ApoE), una proteína transportadora de colesterol, ha sido relacionada con la EA. Desde que Strittmatter (1993) realizó el primer reporte de una frecuencia aumentada del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en pacientes con EA de inicio tardío, se han reportado en diferentes estudios evidencias que confirman esta relación. La presencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE aumenta el riesgo para la EA y disminuye la edad de inicio en personas homocigotas para este alelo en la EA de inicio tardío, mientras que se ha visto que el alelo $\epsilon 2$ funciona como "factor de protección" para esta enfermedad.

La hipótesis de que la EA puede ser una entidad sistémica ha llevado a los investigadores a buscar células periféricas que podrían albergar cambios relacionados con esta enfermedad. Se ha encontrado que en las plaquetas se

presenta un procesamiento proteolítico de una especie amiloidogénica de la β APP con una posterior secreción del fragmento β Amiloide.

El propósito de este estudio fue el de evaluar la presencia de estos dos componentes en una población mexicana y el de determinar su asociación como factores de riesgo para la EA. El análisis de los datos nos reveló que en la población de EA el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ fue el genotipo *ApoE* más común, seguido por el $\epsilon 4/\epsilon 4$, a diferencia del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ en el grupo control. Además, en pacientes con la EA se observó una mayor degradación de la β APP en comparación al grupo control ($p < 0.05$) y que esta condición no está influida por la presencia de alguno de los alelos de *ApoE*.

La conclusión de este estudio fue que los genotipos *ApoE* no tienen efecto en la baja razón de la β APP. Sin embargo, cuando ambos elementos son tomados aisladamente son factores de riesgo de la enfermedad.

Enfermedades neurodegenerativas

Al hablar de enfermedades neurodegenerativas se utilizan los términos de atrofia y degeneración como fenómenos inherentes el uno del otro. Si bien estos términos pueden tener ciertas similitudes, sólo son diferentes histopatológicamente. La atrofia especifica una caída gradual y pérdida de neuronas, sin dejar productos degradativos y solamente una gliosis fibrosa y celular. En cambio, la degeneración se refiere a un proceso más rápido de descomposición neuronal, mielínica o tisular, cuyos productos degradativos evocan una reacción más vigorosa de fagocitosis y gliosis celular. La diferencia entre ambos conceptos radica tanto en la velocidad como en el tipo de descomposición.

Las enfermedades incluidas en la categoría de degenerativas empiezan insidiosamente, después de un largo periodo funcional normal del sistema nervioso, y prosiguen un curso gradualmente progresivo que puede continuar por años, décadas o más.

Ya que no es posible una clasificación de las enfermedades neurodegenerativas en términos de su etiología (excepto en las que se pueda reconocer un factor genético o hereditario), se recurre, para propósitos prácticos, a una división basada en los síndromes clínicos presentes y en su anatomía patológica. La clasificación usual está determinada por los síndromes de demencia progresiva sin demás síndromes neurológicos,

demencia con anormalidades neurológicas, síndromes de alteración de la postura y del movimiento, síndromes de ataxia progresiva, síndromes de lento desarrollo de atrofia y debilidad muscular, síndromes de ceguera progresiva con otros trastornos neurológicos o sin ellos y síndromes caracterizados por sordera neurosensorial (Ropper & Maurice, 2001).

Antecedentes históricos de la 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 anormalidades 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, siendo este último el más gravemente atrofiado (Chan, Fox, Scahill, Crum, Whitwell, Leschziner, et al., 2001). Histológicamente, se han observado numerosas placas de amiloide rodeadas de neuritas distróficas, con pérdida de sinapsis, formación de marañas neurofibrilares y gliosis, 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) (Figura 1). 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, el cual se ha comprobado (Price, 2000) que promueve el crecimiento de neuritas, genera intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), induce estrés oxidativo citotóxico -observado en concentraciones plasmáticas disminuidas de α -tocoferol y retinol y niveles elevados de malondialdehído- (Bourdel-Marchasson, Delmas-Beauvieux, Peuchant, Richard-Harston, Decamps, Reignier, et al., 2001) y promueve la activación microglial (Koliastos, 1996).



Figura 1. Microfotografía de una placa de β amiloide. La letra A denota la placa con el depósito de la proteína β amiloide. Las cabezas de flecha señalan las neuritas distróficas con marañas neurofibrilares. Las flechas señalan neuronas citológicamente normales, muy probablemente astrocitos. *Basic Neurochemistry* (Siegel, et al., 1999).

A su vez, se han encontrado diversas alteraciones neuroendocrinológicas en los procesos demenciales, como lo son el aumento en la concentración de varios neuroquímicos en el SNC (receptor-1 de dopamina, monoaminoxidasa A, hormona foliculoestimulante, 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 enfermedad de Alzheimer parece ser una reducción de la función colinérgica hipotalámica (Rehman & Masson, 2001).

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 cuatro genes con la EA: el cromosoma 21 carga el gen que codifica para el precursor de la proteína 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).

Se ha visto que el gen de otra proteína, la Apolipoproteína E (ApoE), se encuentra en el cromosoma 19 (Borgaonkar, Schmidt, Martin, Kanzer, Edelsohn, Growdon, et al., 1993) y a su vez se encuentra en varias enfermedades neurodegenerativas (Saunders, Schmader, Breitner, Benson, Brown, Goldfarb, et al., 1993). El alelo de la ApoE tipo 4 (E4) se ha visto como

un factor de riesgo para la EA, con un riesgo atribuible estimado de un 45 a un 60%. (Nakawatase, et al., 1999)

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, & Levy, 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).

Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer

La demencia tiene un inicio insidioso y es progresiva. La sobrevida media para los pacientes con EA es de alrededor de 8 años, con un rango de 1 a 20 años (Kaplan, et al., 1994).

Es por eso que el diagnóstico de la EA debe ser realizado a tiempo; actualmente las armas diagnósticas paracéntricas disponibles para las demencias en general incluyen exámenes de sangre para buscar deficiencias de vitamina B₁₂ (Motter, 1995) o alteraciones en los niveles de hormona tiroidea y pruebas de funcionamiento hepático, pruebas serológicas de sífilis (Mahley, & Innerarity, 1983) y VIH (Petersen, 2000).

El enfoque racional de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia, en particular la enfermedad de Alzheimer, ha llevado a los investigadores alrededor del mundo a pensar esta entidad como un proceso sistémico que involucre alteraciones no sólo en cerebro, sino también en sitios periféricos, por lo que se ha comenzado a buscar los llamados "Marcadores Biológicos Periféricos" de la enfermedad (Gasparini, Racchi, Binetti, Trabucchi, Solerte, Halcon, et al., 1998). Los hallazgos que pueden encontrarse en plaquetas, linfocitos, cultivos de fibroblastos y muestras de líquido cefalorraquídeo de los pacientes afectados tienen su fundamento en los hallazgos obtenidos en por lo menos dos elementos: el β -amiloide y la Apolipoproteína E.

Proteína del β -amiloide como marcador periférico de la EA

El β -amiloide es un derivado degradativo y no obligatorio del catabolismo de la llamada proteína precursora del β -amiloide (β APP) (Lawrence, Keats & Morton, 1992), y contiene secuencias de agregación y neurotoxicidad (Barinaga, 1994) (Figura 2). En su forma soluble es liberado durante el curso del metabolismo normal en neuronas, astrocitos, células endoteliales y microglia (Szabó, 1996), 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).

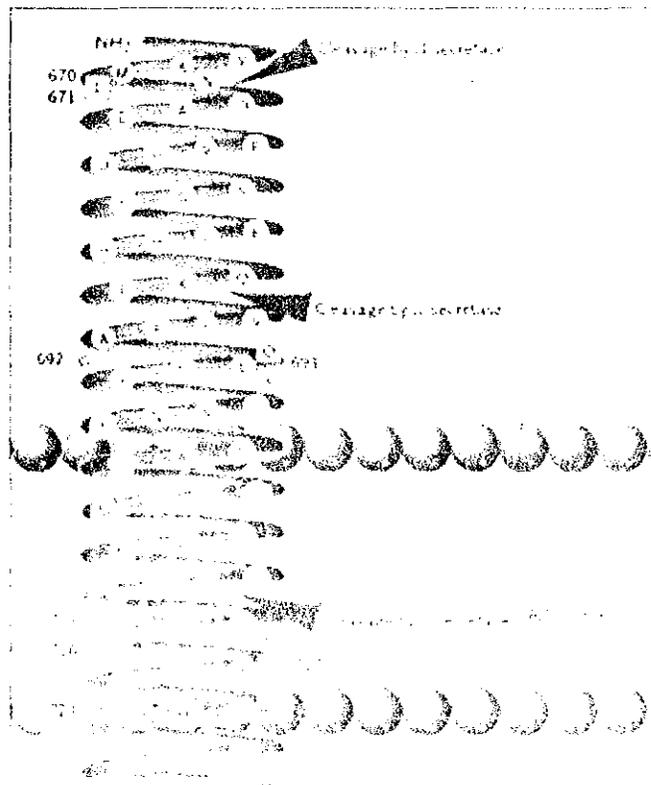


Figura 2. Proteína precursora del β amiloide y sitios de ruptura más comunes que conllevan a la formación de la proteína del β amiloide. N. Engl. J. Med. (Guttmacher & Collins, 2003).

La presencia del β -amiloide₁₋₄₂ en fluidos corporales como líquido cefalorraquídeo (Motter, 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).

Apolipoproteína E

El enfoque racional para el diagnóstico 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 inmunoquímica 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 3):

- ApoE2 (alelo $\epsilon 2$), 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 (alelo $\epsilon 3$), con aminoácidos 112Cys y 158Arg, está presente en forma predominante en la población en general (Walden & Hegele, 1994) y
- ApoE4 (alelo $\epsilon 4$), 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).

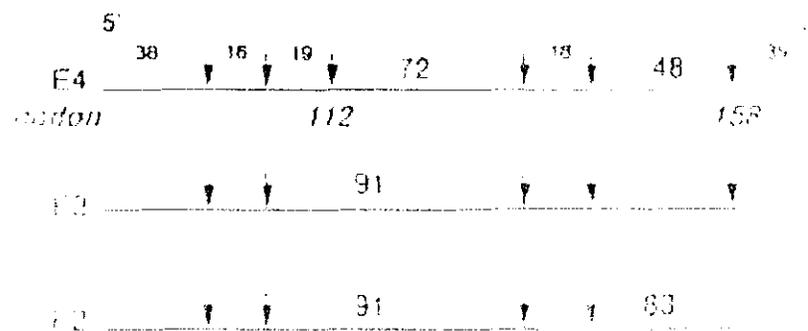


Figura 3. Mapa de los sitios de corte (indicados por las flechas) del gen de la Apolipoproteína E. La longitud de los fragmentos generados (en pares de bases, bp) se indica por encima de las líneas. Ann. Intern. Med. (Walden & Hegele, 1994).

La observación clave que relacionó a la EA con la ApoE fue la sobreexpresión del alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* en los pacientes con esta enfermedad (Saunders, 1993; Poirier, Davignon, Bouthillier, Kogan, Bertrand & Gauthier, 1993). La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* 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. Este hecho ha sido demostrado en países como los E.E.U.U., Japón, Finlandia, Italia y Holanda (Dai, Nanko, Hattori, Fukuda, Nagata, Isse, et al., 1994; van Duijn, de Knijff, Cruts, et al, 1994; Reiman, E., Caselli, R., Yun, L., et al, 1996; Benjamin, R., Leake, A., Edwardson, J. A., et al, 1994) y su asociación con la EA en nuestra población aún no ha sido bien determinada.

III.- Planteamiento del problema

Las enfermedades neurodegenerativas, en particular aquellas que cursan con síntomas de demencia, son un problema creciente de salud pública en nuestro país. La principal enfermedad neurodegenerativa, la Enfermedad de Alzheimer, es el resultado de la degeneración progresiva de las poblaciones neuronales en la corteza y núcleos subcorticales que lleva a quien la padece a limitación funcional, mala calidad de vida y muerte. Hasta el momento no se dispone de un indicador confiable anterior a la muerte para establecer el diagnóstico.

A pesar de que existen herramientas suficientes para acercar al clínico al diagnóstico diferencial más preciso de las demencias -mediante el análisis de laboratorio de muestras de sangre, plaquetas y líquido cefalorraquídeo-, en la población mexicana de pacientes con demencia del tipo Alzheimer no se ha precisado la presencia de ciertas sustancias que puedan ser consideradas como marcadores periféricos de la enfermedad.

Se han detectado residuos específicos de la β APP en plaquetas, los que se han visto asociados con la EA. Además, ha aumentado el número de reportes que muestran una sobreexpresión del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en los pacientes con esta enfermedad, por lo que nos preguntamos: ¿Cuál es la frecuencia de estos marcadores periféricos en la Enfermedad de Alzheimer en nuestra población y qué factor de riesgo confieren para esta enfermedad?

En pacientes con probable Enfermedad de Alzheimer, la elevada degradación de la proteína precursora del β -amiloide y del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE en sangre son factores de riesgo de la enfermedad.

General.

Determinar si la frecuencia elevada de los marcadores periféricos proteína precursora de β -amiloide y del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE en sangre de pacientes con Enfermedad de Alzheimer es factor de riesgo de la enfermedad.

Específicos.

Determinar la frecuencia del marcador periférico proteína precursora de β -amiloide en una población con probable Enfermedad de Alzheimer y en una población control.

Determinar la frecuencia de las variantes alélicas del marcador periférico Apolipoproteína E en una población con pbe. Enfermedad de Alzheimer y en una población control.

Determinar la asociación de los marcadores periféricos proteína precursora de β -amiloide y Apolipoproteína E con la Enfermedad de Alzheimer.

Diseño del estudio

Tipo de Estudio Estudio de casos y controles.

Universo de estudio Pacientes con signos y síntomas de demencia tipo Alzheimer atendidos en la Clínica de Demencias del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente del 1º de marzo del 2000 al 30 de junio del 2003.

Tamaño de la muestra Se estudiaron todos los pacientes atendidos en el período antes mencionado, por lo que no se calculó el tamaño de la muestra ni se hizo uso del tipo de muestreo.

Metodología 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) y del NINCDS-ADRDA (Chui, et al., 1992) (Anexos I y II) para el diagnóstico de la EA, así como la Escala de Isquemia de Hachinski (McKhann, Drachman, Folstein, Katzman, Price & Stadlan, 1984) (Anexo III) para el diagnóstico de Demencia Vascular.

Criterios de inclusión

Todos aquellos pacientes estudiados en la clínica de demencias del departamento de neurología del HECMNO, IMSS que satisfagan los criterios de la Asociación Americana de Psiquiatría de acuerdo con el DSM IV. Así

como los criterios del Instituto Nacional para los Trastornos Neurológicos (NINCDS-ADRDA) para el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer.

Pacientes con los criterios del DSM-IV y de Hachinski para el grupo de Demencia Vascul.

Pacientes que acepten ingresar al estudio firmando personalmente o por un familiar, con consentimiento informado (Anexo VII).

Pacientes clínicamente sin Enfermedad de Alzheimer excluida mediante los criterios de la Asociación Americana de Psiquiatría y del Instituto Nacional para los Trastornos Neurológicos (NINCDS-ADRDA), que acepten ingresar al estudio firmando carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

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 o NINCDS-ADRDA.

Pacientes que no cuenten con carta de consentimiento informado.

Criterios de eliminación

Cualquier paciente que durante cualquier etapa del proceso de estudio decida (él o sus familiares), retirarse del estudio.

Pacientes que por sus características de reserva funcional corran algún riesgo en la obtención de muestras séricas.

Toma y transporte de las muestras.

A los pacientes y controles seleccionados para el estudio de marcadores de Alzheimer se les tomaron 10 ml de sangre: 5 ml fueron centrifugados para la obtención de plaquetas y 5 ml para la extracción de ADN.

Todas las muestras se congelaron a -20°C en recipientes térmicos protegidas de la luz, en el laboratorio de Desarrollo y Envejecimiento del C.I.B.O.

Determinación de la proteína precursora de β -amiloide.

Se recolectaron 5 ml de sangre en 3 ml de citrato sódico al 3.8% (en presencia de 136 mM de glucosa), los que se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm para ser centrifugados nuevamente a 3000 rpm por 15 minutos. El plasma rico en plaquetas se separó del pellet sanguíneo. Se lavó dos veces, y se resuspendió a una concentración de 5mg/ml en Tris-HCl frío 10 mM a pH 7.4, conteniendo ácido etilenglicoltetraacético 1mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 0.1mM; y un set completo de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind) (Di Luca, Pastorino, Cattabeni, Zanardi, Scarone, Racagni, et al., 1996).

Las proteínas plaquetarias totales se separaron mediante electroforesis y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa durante dos horas a 200 mA. Tras el bloqueo con leche desgrasada al 5%, se realizaron las reacciones de inmunotinción con el anticuerpo primario (anticuerpo β APP, Cell Signaling

Technology Inc., Beverly, MA, no. De catálogo: 2452) capaz de detectar varias isoformas de la β APP. Después de la incubación con los anticuerpos secundarios IgG antiratón de cabra, los blots fueron desarrollados con quimioluminiscencia intensificada y expuestos a películas de revelado (Li, et al., 1995) (Anexo VI).

Determinación de los genotipos y alelos de la ApoE.

El DNA fue extraído de sangre pretratada con ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), de acuerdo al Método de Miller (Miller, Dykes & Polesky 1988) (Anexo IV y V). Descrito en forma breve, el exón 4 del gen *ApoE* se amplificó por RCP (Kontula, 1990) con modificación para RCP de un solo estadio. Los primers a utilizar fueron, corriente arriba, el 5'-TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACA-3', y corriente abajo, el 5'-GAACAAGTGAAGCCCGGTGGCGG-3'.

Cada tubo de RCP contuvo 50 ng de DNA genómico, 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 DNA polimerasa en un volumen final de 25 μ l y 1x buffer del fabricante. La RCP fue llevada a cabo en un termociclador a 94°C durante 5 minutos para una desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 3 minutos a 60°C, y 1 minuto a 70°C. Una alícuota de 10 μ l del producto de RCP fue tratada con 10 U de *Hha I* en el tampón apropiado del fabricante, durante toda la noche a 37°C. Los productos de digestión fueron separados a través de un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida

(19:1) al 12%. Previa tinción con nitrato de plata, fueron identificados los alelos de ApoE (Figura 4.), buscando las siguientes secuencias:

- $\epsilon 2$ 91 y 83 pb
- $\epsilon 3$ 91 y 48 pb
- $\epsilon 4$ 72, 48 y 35 pb

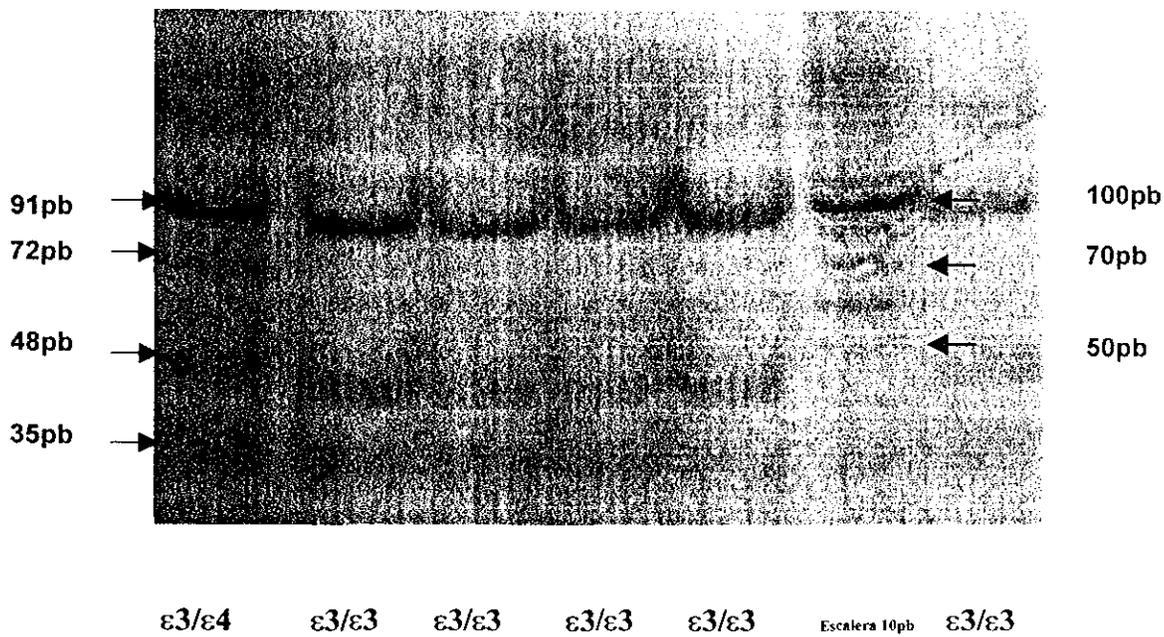


Figura 4. Identificación de alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ del polimorfismo ApoE.

E. Análisis estadístico.

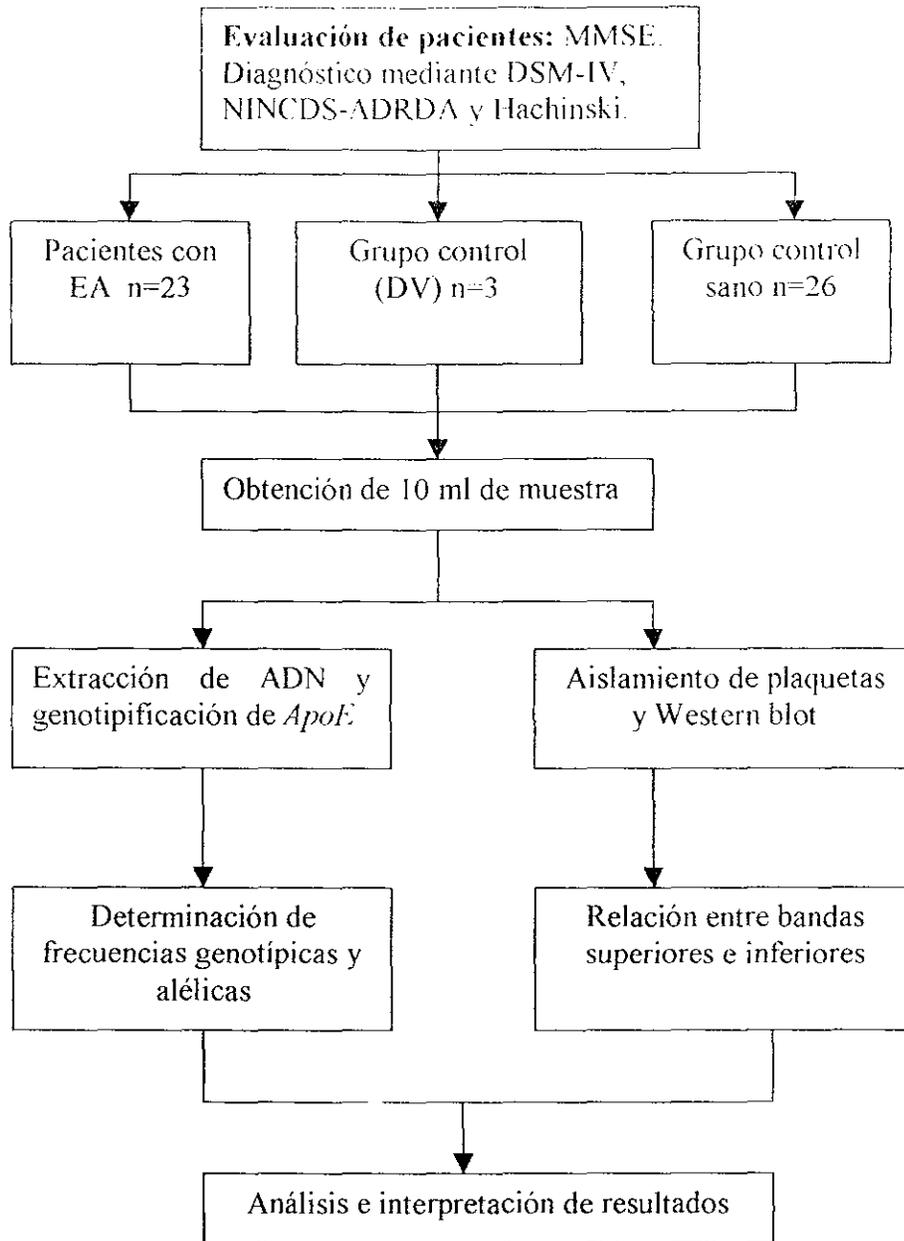
La información fue analizada utilizando el programa informático EPIINFO 2002. La información está expresada como media \pm DE. Se utilizó un nivel alfa de 0.05.

Análisis de genotipos. Se realizó con base al método de conteo génico y se expresó la frecuencia tanto de los genotipos como de los alelos de la ApoE. Para calcular la asociación de la EA con las variables ApoE y β APP se utilizó la razón de momios (Odds-Ratio) y la prueba no paramétrica de Chi cuadrada, con nivel alfa de 0.05.

Análisis de Western blots. Se expresa la densidad óptica (DO) de las bandas observadas y se determina una razón entre la banda superior y la inferior. Para el análisis estadístico se utilizó la razón de momios (Odds-Ratio) y la prueba de la *t* de Student de dos colas con un valor de significancia de 0.05.

Se realizó un análisis estratificado para determinar la influencia de los genotipos de la ApoE sobre la significancia de la razón de la β APP.

Flujograma del estudio.



Variables demográficas de los grupos de estudio

Se presentan resultados de un total de 23 pacientes con EA que acudieron a la Clínica de Trastornos Cognitivos y Demencias y de 3 pacientes con DV así como de 26 pacientes sin la enfermedad y sin antecedentes familiares de cualquier tipo de demencia.

Un total de 8 (34.8%) mujeres y de 15 (65.2%) hombres conformaron el grupo de pacientes con la EA, mientras que 19 (73%) mujeres y 7 (27%) hombres integraron el grupo control, así como 2 hombres (67%) y una mujer (33%) el grupo de DV. El promedio de edad de la población con EA fue de 60.30 ± 13.77 años, el del grupo control de 67.73 ± 9.46 años y el de los pacientes con DV de 70.2 ± 9.34 años. El promedio de la evaluación de la prueba del Mini-mental fue de 14.64 ± 13.77 puntos, a diferencia del grupo control, que obtuvo un promedio de 28.33 ± 1.96 puntos y del grupo de DV, con 21.23 ± 2.31 puntos. La escolaridad en los pacientes con Alzheimer fue de 8 ± 5.19 años, siendo la del grupo control de 11.71 ± 3.81 años y en el grupo de DV de años 10 ± 3.23 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variables demográficas en los pacientes con EA, Controles sanos y con DV.

	<u>Pacientes con EA</u>	<u>Grupo control sano</u>	<u>DV</u>
Edad	60.30 \pm 13.77	67.73 \pm 9.46	70.2 \pm 9.34
Masculino/Femenino	15/8	7/19	2/1
MMSE	14.64 \pm 5.31	28.33 \pm 1.96	21.23 \pm 2.31
Escolaridad en años	8 \pm 5.19	11.71 \pm 3.81	10 \pm 3.23

Fuente: Directa
Valores representados en media \pm DE

Genotipificación de ApoE

La genotipificación se realizó en todos los pacientes y controles, mientras que en los pacientes con DV sólo fue posible realizarla en un caso, debido a degradación del ADN que impidió obtener resultados confiables. La distribución de los genotipos puede verse en el cuadro 2. En la población de pacientes con EA, el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ fue el más común (12, en comparación con 5 en el grupo control, $p < 0.05$), seguido del polimorfismo $\epsilon 4/\epsilon 4$ (5, en comparación con ninguno en los sujetos controles, $p < 0.05$), mientras que en la población control el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ fue el más común (18 vs. 4 en los sujetos con la EA, $p < 0.05$). En el caso del paciente con DV, el genotipo encontrado fue el $\epsilon 4/\epsilon 4$, aunque no fue anotado en el cuadro por la inconveniencia de realizar un análisis estadístico con este único dato.

Cuadro 2. Distribución de los genotipos ApoE en pacientes con EA y en un grupo control

Genotipo	Sujetos EA n (%)	Sujetos control n (%)	OR (IC) ^{95%}	p
ε2/ε2	0 (0)	0 (0)	!	
ε2/ε3	1 (4.35)	3 (11.54)	0.35 (0.01-4.29)	0.61
ε2/ε4	1 (4.35)	0 (0)	!	
ε3/ε3	4 (17.40)	18 (69.23) *	0.09 (0.02-0.43)	0.0008
ε3/ε4	12 (52.17) *	5 (19.23)	4.58 (1.10-20.2)	0.0342
ε4/ε4	5 (21.74) *	0 (0)	!	

Fuente: Directa

!: OR indefinido con un correspondiente valor indeterminado de p

* p<0.05 para la distribución de los genotipos entre los sujetos con EA y los sujetos control

No hubo diferencia significativa en los genotipos *ApoE* entre hombres y mujeres en los pacientes con la EA y en el grupo control. El genotipo ε3/ε3 mostró un OR de 0.09 (95% IC 0.02-0.43, $p < 0.01$). El OR para el genotipo ε3/ε4 fue de 4.58 (95% IC 1.10-20.18, $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas cuando los genotipos *ApoE* fueron analizados en función de la edad.

El cuadro 3 muestra las frecuencias alélicas en ambas poblaciones. La frecuencia del alelo ε4 está aumentada en los sujetos con la EA (OR 9.40, 95% IC 2.88-32.66; $p < 0.001$) mientras que en los sujetos control el alelo ε3 predomina sobre los demás alelos (OR 0.15, 95% IC 0.05-0.43; $p < 0.001$).

Cuadro 3. Frecuencia de los alelos ApoE en sujetos con EA y en sujetos control

Alelo	sujetos EA. n (%)	sujetos control. n (%)	OR (95% IC)	<i>p</i>
ε2	2 (4)	3 (6)	0.74 (0.08-5.83)	1
ε3	21 (46)	44 (84)	0.15 (0.05-0.43)	0.00011
ε4	23 (50)	5 (10)	9.40 (2.88-32.66)	0.00002

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

β-Amiloide

En la técnica de Western blot se observaron dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de 106 a 110 Kd y a los 130 Kd. La banda superior (130 Kd) corresponde a la APP de forma madura, mientras que la banda inferior (106-110 Kd) a las isoformas de la APP. La relación entre la banda superior y la inferior de la βAPP da una razón en el que un valor superior (cercano a 1) está relacionado con una menor degradación de la βAPP, mientras que una razón inferior (cercano a 0) está relacionada a una mayor degradación de la βAPP. La razón de la βAPP en lo sujetos con la EA fue menor que el de los sujetos controles: 0.3793 ± 0.276 vs. 0.7162 ± 0.2077 (media \pm DE, *p* < 0.05), mientras que la razón de la βAPP en el grupo de DV fue de 0.1808 ± 0.1284 (media \pm DE). No hubo diferencias significativas

cuando la razón disminuida de la β APP fue comparada entre los pacientes con EA de inicio temprano y tardío.

Análisis estratificado

Cuando la razón disminuida de la APP (tomada como una razón menor que 0.5) y el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ son analizados en su conjunto, se obtiene un OR estratificado de 5.15 (95% IC 1.92-14.30, $p < 0.05$). El análisis de la razón disminuida de la β APP con el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ mostró un OR de 4.14 (95% IC 2.12-31.03, $p < 0.05$). El análisis de la razón disminuida de la β APP con otros genotipos no dio resultados significativos.

Genotipificación ApoE

Nuestro estudio concuerda con los resultados obtenidos por Strittmatter et al. (1993), concernientes con una frecuencia mayor del alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* en la población con EA. También se encontró un riesgo de 4.5 veces de presentar la EA en personas con el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ y de 9.4 veces relacionado con el alelo $\epsilon 4$. Esto concuerda con los estudios publicados anteriormente que muestran un riesgo aumentado de presentar la EA cuando están relacionados tanto con una homocigocidad como con una heterocigocidad del alelo $\epsilon 4$ (Czech, et al., 1993; Ben-Shlomo, 1993).

El estudio demostró que la población mexicana con la EA puede ser considerada como una población de EA de inicio temprano. Esto se debe a que en el grupo de la EA se encuentra una alta proporción de pacientes menores que 60 años de edad (13 pacientes, 56.5%), por lo que se realizó un análisis entre los pacientes con la EA de inicio temprano y tardío con los genotipos ApoE en el que no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos. Este resultado no concuerda con los reportes previos que marcan que un aumento en la heterocigocidad/homocigocidad del alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* se encuentra relacionado con los casos de EA de inicio tardío. Sin embargo, no podemos excluir una diferente proporción epidemiológica del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en cualquiera de los dos grupos, ya que se estudió una población

pequeña. El hecho de que este estudio haya sido realizado en un hospital de concentración tanto de una ciudad capital como de sus poblaciones vecinas pudo haber contribuido en cierta medida a la selectividad de la población estudiada.

Se conoce que la ApoE está relacionada con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares así como con un perfil lipídico alterado (Utermann, 1987). Creemos que la estricta adhesión a los criterios del NINCDS-ADRDA que empleamos al seleccionar a estos pacientes pudo haber contribuido a eliminar tanto los casos de demencia mixta como aquellos casos en los que se tenía una sospecha de algún trastorno vascular, reduciendo por lo tanto la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en los pacientes con la EA de inicio tardío y explicar así el desacuerdo con la información de otros autores (Strittmatter, et al., 1993; Saunders, 1993). Sugerimos que el tomar esto en cuenta podría reducir la tendencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en los pacientes con la EA de inicio tardío en posteriores estudios, así como el observar otros elementos que pudieran influir en la incidencia de esta variante en el proceso patológico de la enfermedad.

Otro hallazgo importante fue el de un OR disminuido para la frecuencia del alelo $\epsilon 3$ de la ApoE (OR 0.15, 95% IC 0.05-0.43; $p < 0.001$) y para el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (OR 0.09, 95% IC 0.02-0.43; $p < 0.001$). Estos ORs bajos no convierten al genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ ni al alelo $\epsilon 3$ en factores de "protección de la enfermedad", debido a que se conoce la alta frecuencia (hasta un 50%) de estas variantes en la población en general (Saunders, et al., 1993; Silva-Escobedo, Berumen-Campos, Valdés-Espinosa, Franco-Lira, Siller-Leyva,

Moguel-Mondragón, et al., 2002). Debemos ser cautos al hablar de dicha condición y limitarnos a decir que este alelo contribuye en la disminución del riesgo de presentar la EA y considerar, además, que estos elementos podrían contribuir a retrasar el inicio de la enfermedad.

La ausencia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ de la ApoE en los sujetos sanos es un tema relevante, considerando los reportes previos que indican que este genotipo es un "factor protector" de la EA. Esta variante, además de las ya mencionadas, podrían ser influidas por cuestiones étnicas, ya que se ha encontrado una alta incidencia del alelo $\epsilon 2$ como elemento protector en las poblaciones Europeas y Norteamericanas, a diferencia del alelo $\epsilon 3$ en los sujetos sanos en sujetos latinoamericanos (Utermann, 1987; Silva-Escobedo, et al., 2002).

El efecto de la diferencia racial en la expresión de la ApoE en pacientes con EA podría estar relacionado con:

- a) Diferencias entre poblaciones en la variación de las secuencias que codifican a las tres isoformas de la Apolipoproteína E.
- b) La presencia de otros genes que modifican la entidad clínica.
- c) Interacciones genes-ambiente específicas de cada región en donde se desenvuelva un determinado grupo étnico.

Las dos primeras opciones ameritan un mayor escrutinio genético tanto para determinar las secuencias específicas de cada una de las variantes del gen

como de las secuencias de otros genes que pudieran estar interactuando con el de la ApoE, incluido el de la β APP, pero también el de la ApoB, el cual se ha visto asociado con el gen de la ApoE y con alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas y del colesterol, así como con un mayor riesgo para enfermedad vascular coronaria (Eichner, Dunn, Perveen, Thompson, Stewart & Stroehla, 2002).

La tercera opción llevaría a buscar otros factores, como nutrición, uso de medicamentos y antecedentes patológicos, por mencionar algunos de ellos, los cuales podrían actuar sinérgicamente en el desarrollo de la EA (Nathoo, Chetty, van Dellen & Barnett, 2003).

En cuanto al uso diagnóstico de este factor, varios estudios previos han demostrado que la genotipificación de la ApoE no provee suficiente sensibilidad o especificidad para ser utilizada como única prueba diagnóstica de la EA (Roses, Strittmatter, Pericack-Vance, Corder, Saunders, & Schmechel, 1994; Nussbaum, & Ellis, 2003), por lo que sugerimos que se haga un mayor escrutinio y de que esta información debe ser empleada como un auxiliar en el diagnóstico de la EA. El estudio patológico del cerebro post-mortem brindará la suficiente información adicional para comparar estos hallazgos con lo que estaría sucediendo en realidad en el cerebro. Hasta este momento, hay pocos cerebros disponibles de los pacientes con la EA en nuestra población, por lo que esta información aún no es lo suficientemente significativa para realizar tales análisis.

Es conveniente enfatizar la precaución que debe tomarse al realizar un asesoramiento genético, ya que varios estudios revelan que la genotipificación

ApoE no puede ser utilizada para predecir si una persona no afectada va a desarrollar la enfermedad o cuándo va a desarrollarla (Mayeux, Saunders, Shea, Mirra, Evans, Roses, et al., 1998).

β Amiloide

El β -Amiloide es un componente importante en la patogénesis de la EA. Se ha demostrado su presencia en las plaquetas y se ha pensado que puede ser un buen marcador periférico de la enfermedad. En este estudio se demostró una degradación aumentada de esta proteína en los pacientes con la EA. En concordancia con estudios previos (Reiman, Caselli, Yun, Chen, Bandy, Minoshima, et al., 1996; Di Luca, et al., 1996), en este estudio se observó una razón disminuida de la APP en los sujetos con la EA, en comparación con lo observado en los sujetos control. Esto significa que se lleva a cabo una mayor degradación de esta proteína precursora en los tejidos periféricos. Aún es tema de controversia el que este fenómeno refleje un proceso similar al que pudiera llevarse a cabo en los cerebros de los pacientes con la EA. Sin embargo, no puede minimizarse la simple existencia de este fenómeno, ya que el procesamiento y la secreción de esta proteína precursora ya han sido demostrados y recientemente se ha comprobado su importancia como un predictor de la conversión a demencia de tipo Alzheimer en los sujetos con deterioro cognitivo moderado (Borroni, Colciaghi, Caltagirone, Rozzini, Broglio, Cattabeni, et al., 2003).

El mecanismo preciso de la disminución de la concentración de la APP aún no ha sido descifrado. Las modificaciones en el mecanismo de procesamiento, en la estabilidad del RNA mensajero que codifica a la APP 751/770 o en la regulación del proceso de traslación son tan sólo algunas hipótesis que han sido postuladas (Di Luca, et al., 1996) y que necesitan más investigación. El desequilibrio en el estrés oxidativo (Andersen, 2004) y la pérdida de la fluidez membranar son procesos que pueden contribuir significativamente al deterioro de las enzimas transmembranales y al estado mismo de la APP, lo que influiría así en el desarrollo de este fenómeno.

Al igual que con la ApoE, debe tomarse en cuenta la interacción de la β APP con otras proteínas. Unas de estas proteínas son las secretasas, o presenilinas, responsables de la degradación de la β APP en sus elementos solubles e insolubles (Nussbaum, et al., 2003). El estudio tanto en la secuenciación de estas enzimas como el de su función podría no sólo determinar la interacción de ambas proteínas, sino incluso excluir por completo el papel único de la β APP en el desarrollo de la EA y enfocar el estudio de la EA como el de una enfermedad de tipo metabólica si es que se llegaran a encontrar alteraciones en las vías de degradación de esta proteína.

Por mucho tiempo se ha investigado la coexistencia del alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* con la proteína β -amiloide en la patogénesis de la EA (Weisgraber, et al., 1996). Un mayor riesgo en presentar la EA en los portadores del alelo $\epsilon 4$ de la *ApoE* así como una mayor degradación de la β APP en las plaquetas ha llevado a considerar la probabilidad de relacionar ambos factores para determinar la participación de ambos factores en su conjunto en la patogénesis de la EA.

Para corroborar lo anterior, se realizó un análisis de regresión logística, en el que no se observó relación entre alguna de las variedades de la ApoE y la razón baja de la β APP con un mayor riesgo de presentar la EA. Esta información sugiere que los alelos de la ApoE no representan un elemento aditivo a la β APP en la determinación de los factores de riesgo de la EA. Aún así, creemos que ambos elementos por separado son buenos indicadores para la determinación de factores de riesgo para la enfermedad.

Por último, cabe mencionar los hallazgos en la población con DV. En este grupo sólo fue posible determinar la genotipificación en un paciente, por lo que la presencia del genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ no fue suficiente para afirmar que esta población presenta con exclusividad esta variante ApoE. De la misma forma, la razón disminuida de la β APP no es determinante para esta población, ya que el análisis sólo fue realizado en 3 pacientes. Esta reducida población es atribuida a la alta "volatilidad" de este grupo, ya que la mayoría de los pacientes captados como pacientes con DV llegan a la consulta en condiciones graves y su poca disponibilidad para realizar el traslado a la Clínica de Demencias limita su posterior evaluación. Nosotros esperamos seguir realizando estudios en esta población para poder dirimir si los hallazgos encontrados son exclusivos de la población con la EA o si pueden presentarse en pacientes con otro tipo de demencias. Por el momento podemos señalar la existencia de una tendencia a presentar una reducida razón de la β APP, aunque aún no puede decirse si es igual a la de los pacientes o si se encuentra en un estado intermedio entre la de los pacientes con la EA y la de los sujetos sanos.

Nosotros concluimos que la variante $\epsilon 4$ de la ApoE es predominante en los pacientes con la EA y de que sí es un factor de riesgo de la enfermedad, así como la baja razón de la β APP y que la evaluación de un factor de riesgo agregado no es significativa en esta población.

1. La frecuencia de los alelos de la Apolipoproteína E son similares a la de otras poblaciones estudiadas, a excepción de una menor frecuencia del alelo $\epsilon 2$.
2. El alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E confiere un riesgo de casi 10 veces de presentar la enfermedad.
3. La razón disminuida de la β APP es similar a la de otras poblaciones y es un factor de riesgo de la Enfermedad de Alzheimer, aumentando hasta 5 veces la probabilidad de presentar la enfermedad.
4. Ambos factores en su conjunto no presentan un mayor riesgo de padecer la enfermedad que cuando el riesgo de cada uno de estos factores es comparado aisladamente.

1. Deben buscarse otros factores asociados que pudieran ayudar a aclarar la disparidad con otros grupos étnicos y a entender las interacciones entre ellos como participantes en el desarrollo de la EA.
2. Los resultados deben compararse con hallazgos histopatológicos de cerebros de pacientes con la EA, para correlacionar la sucesión de eventos periféricos con los de origen en el SNC.

Amouyel, P., Brousseau, T., Fruchart, J. C. & Dallongeville, J. (1993). Apolipoprotein E-ε4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1309.

Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Neuroscience*, S18-S25.

Anwar, N., Lovestone, S., Cheetham, M., Levy, R. & Powell, J. F. (1993). Apolipoprotein E-ε4 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.

Benjamin, R., Leake, A., Edwardson, J. A., McKeith, I. G., Ince, P. G., Perry, R. H., et al (1994). Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson's disease. *Lancet*, 343, 1565.

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.

Borroni, B., Colciaghi, F., Caltagirone, C., Rozzini, L., Broglio, L., Cattabeni, F., et al., (2003). Platelet Amyloid Precursor Protein abnormalities in Mild Cognitive

Impairment predict conversion to Dementia of Alzheimer type. *Arch. Neurol.*, 60, 1740-44.

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.

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

Burns, A., Jacoby, R. & Levy R. (1990). Psychiatric Phenomena in Alzheimer's Disease. III: Disorders of Mood. *Brit J Psy*, 157, 81-86.

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.

Chui, H.C., Victoroff, J.I., Margolin, D., Jagust, W., Shankle, R. & Katzman, R. (1992). Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology*, 42, 473-480.

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.

Czech, C., Mönning, U., Tienari, P., Hartmann, T., Masters, C. & Beyreuther, K. (1993). Apolipoprotein E- ϵ 4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 1310.

Dai, X.Y., Nanko, S., Hattori, M., Fukuda, R., Nagata, K., Isse, K., et al (1994). Association of Apolipoprotein E4 with sporadic Alzheimer's disease is more pronounced in early onset type. *Neurosci. Lett.*, 175, 74-76.

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. *Neurosci. Lett.*, 1881(1), 70-74.

Di Luca, M., Pastorino, L., Cattabeni, F., Zanardi, R., Scarone, S., Racagni, G., et al. (1996). Abnormal pattern of platelet APP isoforms in Alzheimer disease and Down syndrome. *Arch. Neurol.*, 53, 1162-1166.

Eichner, J. E., Dunn, S. T., Perveen, G., Thompson, D. M., Stewart, K. E. & Stroehla, B. C. (2002). Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.*, 155, 487-95.

Gasparini, L., Racchi, M., Binetti, G., Trabucchi, M., Solerte, S. B., Alkon, D., et al. (1998). Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 12, 17-34.

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.

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.

Kontula, K. (1990). Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clin. Chem.*, 36, 2087-2092.

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

Li, Q. X., Evin, G., Small, D. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Masters, C. L. (1995). Proteolytic processing of Alzheimer's disease β A4 Amyloid precursor protein in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 270, 4140-4147.

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.

Mayeux, R., Saunders, A., Shea, S., Mirra, S., Evans, D., Roses, A. D., et al (1998). Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 338(8), 506-511.

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.

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). Redution 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.

Nathoo, N., Chetty, R., van Dellen, J. R. & Barnett, G. H. (2003). Genetic vulnerability following traumatic brain injury: the role of Apolipoprotein E. *Mol. Pathol.*, *56*, 132-36.

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

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.

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

Reiman, E., Caselli, R., Yun, L., Chen, K., Bandy, D., Minoshima, S., et al. (1996). Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the ϵ 4 allele for Apolipoprotein E. *N. Engl. J. Med.*, 334 (12), 752-58.

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

Roses, A., Strittmatter, W., Pericack-Vance, M., Corder, E. H., Saunders, A.M. & Schmechel, D. (1994). Clinical application of apolipoprotein E genotyping to Alzheimer's disease. *Lancet*, 343, 1564-65.

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

Saunders, A., Schmechel, K., Breitner, J. C. S., Benson, M. D., Brown, W. T., Goldfarb, L., et al. (1993). Apolipoprotein E ϵ 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*, 342, 710-11.

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. (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. & 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.

Silva-Escobedo, J., Berumen-Campos, J., Valdés-Espinosa, R., Franco-Lira, M. O., Siller-Leyva, J. J., Moguel-Mondragón, J., et al. (2002). Genotipificación de la Apolipoproteína E en individuos de la población mexicana con demencia tipo Alzheimer. *Rev Neur Neur Psiqu.*, 35(3), 119-124.

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.

Transmission of genetic traits in families. (1991). *Continuum of the American Academy of Neurology-Genetics.*, 8-22.

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.

Utermann G. (1987). Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J*, 113, 433-40.

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.

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.

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 anatómicamente, 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 anormalidades 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

ESCALA DE ISQUEMIA DE HACHINSKI (ISCHEMIC SCORE)

	Puntos
Inicio súbito	2
Deterioro por brotes	1
Curso con fluctuaciones	2
Confusión nocturna	1
Preservación relativa de la personalidad	1
Depresión	1
Síntomas somáticos	1
Labilidad emocional/Incontinencia emotiva	1
Antecedente de hipertensión arterial	1
Antecedentes de accidentes cerebrovasculares	2
Evidencia de aterosclerosis asociada	1
Síntomas neurológicos focales	2
Signos neurológicos focales	2
PUNTUACIÓN MÁXIMA	18
4 Puntos sugiere demencia degenerativa primaria (Enfermedad de Alzheimer)	
7 Puntos o más sugiere Demencia Vasculare o multiinfarto	

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 µl 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 µl de buffer de lisis DTAB, mezclar suavemente.
- Incubar durante 5 min a 68°C.
- Retirar los tubos de la incubación e inmediatamente añadir 900 µl 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 µl de CTAB y 800 µl 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 µl 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 µl 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.

- Aplicando 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 µl 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.
- Teñir el gel sumergiéndolo en solución bromuro de etidio 0.5 mg/ml durante 5 min, enjuagar y visualizar el ADN con un transiluminador UV.

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

WESTERN BLOT

El Western blot es extremadamente útil para la identificación y cuantificación de proteínas específicas en mezclas complejas de proteínas que no son radiomarcadas. La técnica es casi tan sensible como un radioinmunoensayo estándar y, a diferencia de la inmunoprecipitación, no requiere que la proteína blanco sea radiomarcada.

Procedimiento:

- Aplicar 25 μ g de proteínas plaquetarias en un gel de poliacrilamida al 5% y 20% (gel apilador y separador, respectivamente) en buffer separador.
- Mezclar la muestra de proteínas con 3 ml de jugo azul.
- Utilizar buffer separador como buffer de corrimiento con un voltaje constante (100V, 200 mA) 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.
- Después de correr el gel, incubarlo en buffer de transferencia con agitación suave por 15 minutos.
- Cortar un trozo de membrana (PVDF) de aproximadamente el tamaño del gel e incubarlo en metanol 5 min en agitación.
- Incubar otros 5 min la membrana en buffer de transferencia.
- Cortar dos pedazos de papel filtro un poco más grandes que el gel y la membrana para ensamblarlos de tal manera que la membrana afronte el gel en dirección del ánodo para facilitar la transferencia.
- Colocar el "sándwich" en la cámara de transferencia con la membrana del lado del ánodo (+).
- Correr la transferencia a aprox. 100 V, 350 mA por 1 hora, con agitación constante.
- Al terminar la transferencia, incubar la membrana en TPBS + 5% de leche en polvo sin grasa por al menos 1 hora para bloquear pegado inespecífico de anticuerpos a la membrana.
- Enjuagar la membrana 3 veces 5 min con TPBS.
- Incubar (1-2 hs, de preferencia toda la noche en cuarto frío) la membrana con el anticuerpo primario en el volumen mínimo de TPBS + 5% de leche sin grasa en polvo. Usar dilución óptima.
- Enjuagar la membrana dos veces con TPBS.
- Incubar 1 hora la membrana con anticuerpo secundario (dilución 1:3000, para este método, IgG anti-ratón de cabra acoplado a fosfatasa alcalina) para unirlo al anticuerpo primario.
- Enjuagar una vez (5 min) con TPBS y dos veces (5 min) con PBS.

- Mezclar el buffer de revelado con dilución 1:200 de NBT y BCIP, revelar la membrana el tiempo necesario evitando el desarrollo de color inespecífico por sobreexposición. Detener la reacción con agua bidestilada.
- Secar las membranas en papel filtro y guardarlas en oscuridad de preferencia envueltas en hule delgado.

Anexo VII

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Guadalajara, Jalisco, a _____ de _____ de 200__

El (la) que suscribe hace constar que acepta participar de forma voluntaria y conciente en el proyecto de investigación titulado "Frecuencia de los marcadores periféricos Proteína precursora del beta amiloide y Apolipoproteína E en la demencia de tipo Alzheimer", cuyo objetivo es determinar la frecuencia de los alelos como de los genotipos de la ApoE y la presencia de la proteína del beta amiloide en individuos con demencia pero sin la Enfermedad de Alzheimer.

Se me ha informado que mi participación consistirá en donar una muestra de sangre periférica con el fin de realizar las pruebas bioquímicas del beta amiloide y el análisis de los polimorfismos de la Apolipoproteína E. 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 paciente

Nombre y firma del responsable

Nombre y firma del investigador