

Universidad Aut3noma de Barcelona
Departamento de Ciencias Morfol3gicas

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER:
ESTUDIO POBLACIONAL

Katrin Beyer

2002

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER:
ESTUDIO POBLACIONAL

Memoria presentada por
Katrin Beyer

Para optar al grado de Doctor

Tesis realizada bajo la dirección del
Dr. Aurelio Ariza
en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la
Universidad Autónoma de Barcelona

Aurelio Ariza

Katrin Beyer

Diciembre 2002

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas son las más importantes y a su vez las más difíciles de escribir ya que, por lo general, a lo largo de todo el trabajo que supone una tesis son tantas las personas que te brindan su apoyo que inevitablemente corres el riesgo de omitir un nombre. En mi caso, he tenido la suerte de encontrar a tantas personas que me han ayudado, muchas veces sólo con el hecho de comprender y aceptar mi estilo de trabajo, que podría escribir un capítulo entero. No obstante, intentaré encontrar las palabras justas para, de forma breve, tratar de incluirlas a todas sin que lo escueto del escrito sea reflejo de la magnitud, para mi siempre inconmesurable, del apoyo que me han brindado.

En primer lugar he de agradecer al Dr. Aurelio Ariza el interés que desde el inicio mostró por el proyecto de estudio de la genética de la enfermedad de Alzheimer, dándome un voto de confianza al brindarme la oportunidad de llevarlo a cabo. Agradezco la paciencia y la comprensión que ha mostrado aceptando el ritmo de trabajo de una madre de dos niños pequeños, por causa de los cuales el trabajo se ha visto interrumpido en más de una ocasión, transmitiéndome siempre su confianza en el resultado final. Además, he de agradecerle toda la ayuda y la siempre acertada orientación que me ha brindado en cada momento y en cada paso que he dado durante la realización de este proyecto.

Seguidamente, quiero agradecer al grupo de “Patología Estructural y Molecular” la acogida que me brindaron, haciéndome espacio, labor nunca fácil en un laboratorio con el ritmo de trabajo del nuestro, permitiéndome el uso de su equipamiento y ofreciéndome en cada momento su ayuda a la hora de resolver problemas teóricos y prácticos con los que pudiera tropezar en el desarrollo de la investigación.

Quedo muy agradecida a la Dra. Pilar Latorre, quien estuvo a mi lado cuando necesitaba información sobre la historia clínica de los pacientes (la mayoría de los cuales han sido el objeto principal de este estudio) y sobre las metodologías y criterios clínicos empleados para llegar al diagnóstico, mostrando siempre un interés especial en los resultados que se han ido generando a lo largo de su realización y comprendiendo desde el inicio el objetivo y la importancia de un trabajo de esta envergadura.

Un agradecimiento muy especial y entrañable es el que quiero dirigir a los enfermos de Alzheimer y sus familiares, muchos de los cuales he podido conocer personalmente, teniendo la oportunidad de compartir sus inquietudes. Podría haber tenido toda la disposición que se quiera y todo el soporte técnico, teórico-práctico y profesional, pero si no hubiera obtenido el consentimiento de estas personas para hacer uso de sus muestras con fines investigadores jamás hubiera sido posible llevar a cabo el estudio. Lo que deseo para devolverles algo a cambio es que estos resultados tengan alguna utilidad a tener en cuenta al emprender líneas de investigación encaminadas al desarrollo de tratamientos eficaces para atajar la enfermedad que padecen.

También doy las gracias muy especialmente al Dr. José Luis Mate, investigador principal del proyecto subvencionado por la Marató TV3, ya que ha sido una persona a quien pude recurrir en cada momento y del que siempre obtuve todo el apoyo y toda la ayuda posible cuando surgía algún problema organizativo o práctico.

Le agradezco al Dr. Nadal Riutort su colaboración en la obtención de las muestras y su apoyo a la hora de recoger los datos sobre los pacientes e individuos control.

Quiero agradecer a todo el Servicio de Anatomía Patológica haberme abierto sus puertas y hecho fácil la integración en su colectivo, sin que nunca me hicieran sentir extraña en un lugar nuevo. A todos, sin excepción y sin que exista distinción por cargos o responsabilidades, gracias por el compañerismo mostrado.

Asimismo, mi agradecimiento al Instituto de Neuropatología del ICS, proyecto ilusionante que sin duda elevará a la Neuropatología Catalana a nuevas cotas de calidad asistencial e investigadora.

Muchas gracias al Dr. José Ignacio Lao, mi marido, quien invirtió infinitas horas en ayudarme en el análisis estadístico aplicado en este trabajo.

Finalmente, y para hacer constar que el orden en que he ido nombrando no siempre refleja la importancia y la repercusión en este trabajo, no podría terminar sin agradecer al Dr. Alois Alzheimer su magistral descripción de la enfermedad, que me ha introducido, como a tantos durante tantos años, en este tema apasionante. A pesar de haber transcurrido tantos años desde su descripción, todavía hoy existen más preguntas que respuestas alrededor de este importante problema.

A mis hijos.

A mi marido.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1.	Características generales	3
1.1.1.	Caracterización	3
1.1.2.	Definición de la demencia	3
V.1.1.	Cambios neuropatológicos macroscópicos.....	4
V.1.2.	Cambios neuropatológicos microscópicos	4
V.2.	Clasificación de la EA	5
1.3.	La frecuencia de la EA y su impacto en la sociedad	6
V.1.1.	Frecuencia.....	6
V.1.2.	Impacto en la sociedad	7
1.4.	Diagnóstico y tratamiento precoz	7
2.	BETA-AMILOIDE.....	8
2.1.	El origen de la beta-miloide	8
2.2.	La producción de la beta-amiloide	9
V.1.1.	Alfa-secretasa	10
V.1.2.	Beta-secretasa	10
V.1.3.	Gamma-secretasa.....	11
2.3	Mutaciones en el gen deAPP	12
2.4.	La hipótesis amiloidea	13
3.	PRESENILINAS	14
3.1.	Descubrimiento de las presenilinas	14
3.2.	Mutaciones en los genes de las presenilinas.....	15
3.3.	Localización y posible función de las presenilinas.....	16
3.4.	El polimorfismo en el gen de la presenilina 1	18
4.	APOLIPOPROTEINA E	18
4.1.	Estructura y función de la proteína.....	18
4.2.	El polimorfismo común y su implicación en la EA.....	20
4.3.	ApoE y A β	22
4.4.	El promotor del gen de APOE	23

4.5.	El exón 3	24
5.	OTROS FACTORES GENÉTICOS	26
5.1.	Cistatina C (CST3)	26
V.1.	Butirilcolinesterasa (BChE).....	27
V.2.	Catepsina D (catD)	29
II.	OBJETIVOS	31
V.	OBJETIVO GENERAL	33
VI.	OBJETIVOS CONCRETOS	34
III.	SUJETOS Y MÉTODOS	37
1.	SUJETOS	39
1.1	Pacientes	39
1.1.1.	Pacientes con EA familiar	39
1.1.2.	Pacientes con EA esporádica precoz	40
1.1.3.	Pacientes con EA esporádica tardía.....	40
1.2.	Controles.....	41
2.	EXTRACCIÓN DE ADN	41
2.1.	Preparación	41
VI.1.1.	Soluciones stock necesarias para la preparación de los tampones de Extracción.....	41
VI.1.2.	Preparación de las columnas	42
VI.1.3.	El tubo colector de líquidos	42
VI.2.	Extracción.....	43
3.	AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR	43
3.1.	APP	43
3.2.	PS1	44
3.3.	PS2.....	46
3.4.	APOE – polimorfismo común	47
3.5.	APOE – exón 3	47

V.1.	Promotor APOE	48
V.2.	Polimorfismo de PS1	49
3.8	CST3	50
3.9	BChE.....	50
3.10	catD.....	51
4.	RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.....	52
4.1.	APP	52
V.1.	APOE: polimorfismo común	52
V.2.	APOE: exón 3	52
V.3.	APOE: promotor	53
V.4.	Polimorfismo PS1	53
V.5.	CST3	54
V.6.	catD.....	54
5.	ELECTROFORESIS.....	55
5.1.	Electroforesis en geles de agarosa	55
5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	55
6.	SSCP	56
6.1.	SSCP en minigeles y PhastSystem	56
V.1.	SSCP en geles de poliacrilamida en un secuenciador manual.....	56
V.2.	SSCP en geles de poliacrilamida en un sistema de electroforesis horizontal.....	58
7.	TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA	58
8.	SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA	59
V.1.	Preparación de la muestra.....	59
V.2.	Secuenciación en AlfExpress TM	59
8.3.	Secuenciación en ABIPRISM TM	60
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
9.1.	Preparación de la población.....	60
9.2.	La prueba de chi-cuadrado	61
V.1.	Prueba de regresión logística.....	62

V.2.	Análisis multivariante.....	62
IV.	RESULTADOS	63
V.	Genes causantes de la EA	
V.1.	El gen de APP	
V.1.1.	Detección de la mutación V717I mediante restricción	
V.1.2.	Detección de mutaciones mediante SSCP	
V.2.	El gen de PS1 y la detección de sus mutaciones mediante SSCP	
V.3.	El gen de PS2 y la detección de sus mutaciones mediante SSCP	
VI.	APOE - un gen de efecto mayor para el desarrollo de la EA	
VI.1.	El alelo APOE ϵ 4	
VI.1.1.	La acumulación del alelo APOE ϵ 4 en la población de enfermos con EA	
VI.1.2.	El alelo APOE ϵ 4 como factor de precipitación de la EA	
VI.2.	El promotor de APOE	
VI.2.1.	El polimorfismo -491AT	
VI.2.2.	El polimorfismo Th1/E47	
VI.3.	El exón 3 del gen APOE	
V.1.	El polimorfismo de CST3	
V.1.1.	El polimorfismo de CST3 en la EA precoz y tardía	
V.1.2.	El polimorfismo de CST3 en subgrupos separados por intervalos de 10 años	
V.1.3.	El polimorfismo de CST3 en subgrupos separados por intervalos de 5 años	
V.2.	El polimorfismo de PS1	
V.2.1.	El polimorfismo de PS1 en la EA precoz y tardía	
V.2.2.	El polimorfismo de PS1 en subgrupos separados por intervalos de 10 años	
V.2.3.	El polimorfismo de PS1 en subgrupos separados por intervalos de 5 años	
3.2.4.	Análisis de asociación entre el alelo APOE ϵ 4, el alelo CST3-A, el genotipo PS1 1-1 y la EA	
V.3.	El alelo K del gen BChE	
V.3.1.	El alelo K del gen BChE en la EA precoz y tardía	
V.3.2.	El alelo K del gen BChE en subgrupos separados por intervalos de 10 años	
3.4.	El alelo T del gen catD	

- V.1.1. El alelo T del gen catD en la EA precoz y tardía
- V.1.2. El alelo T del gen catD en subgrupos separados por intervalos de 10 años
- 3.4.3.El alelo T del gen catD en subgrupos separados por intervalos de 5 años
- 4.1. Pacientes con EA menores de 60 años de edad
- V.1. Pacientes con EA entre los 60 y 64 años de edad
- V.2. Pacientes con EA entre los 65 y 69 años de edad
- V.3. Pacientes con EA entre los 70 y 74 años de edad
- V.4. Pacientes con EA entre los 75 y 79 años de edad
- V.5. Pacientes con EA de 80 o más años de edad

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. Características generales

1.1.1. Caracterización

Alois Alzheimer publicó en 1907 su ahora famoso trabajo con la descripción de los cambios cognitivos e histopatológicos de la paciente Auguste D., a la que él atendía desde el año 1901 en un asilo de Francfort (Alzheimer, 1907). Pocos años después, en 1910, el alumno de Alzheimer Emil Kraepelin designó esta nueva entidad con el apellido de su maestro, y desde entonces el proceso se conoce como enfermedad de Alzheimer (Kraepelin, 1910). Con posterioridad, en 1911, Alzheimer describió con detalle un nuevo caso al presentar la historia clínica de Johann F., que acompañó con imágenes histopatológicas muy ilustrativas (Alzheimer, 1911).

Johann F. había ingresado en la Clínica Psiquiátrica el día 12 de noviembre de 1907 y, sin que tuviese antecedentes de consumir alcohol en exceso, en los seis meses anteriores se había vuelto olvidadizo, era incapaz de orientarse en su medio habitual, no podía llevar a cabo tareas cotidianas, había perdido la capacidad de hacer compras y no se lavaba. Falleció al cabo de tres años como consecuencia de una neumonía. El examen neuropatológico puso de manifiesto la presencia de abundantes placas seniles en su cerebro, descritas por primera vez por Alzheimer y características del proceso bautizado por Kraepelin en 1910 como enfermedad de Alzheimer.

1.1.2. Definición de la demencia

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente. Entre los múltiples intentos de definir las demencias, el DSM-IV (1994) las considera como “El desarrollo de múltiples déficits cognitivos que incluyen la discapacidad de la memoria y, al menos, una de las siguientes alteraciones cognitivas: afasia, apraxia, agnosia o anomalías en la ejecución de funciones. Los déficits cognitivos tienen que ser suficientemente graves como para causar discapacidad en el funcionamiento ocupacional o social y tienen que representar un declive con respecto a un nivel de funcionamiento previamente más elevado. Por otra parte, el ICD-10 (1992) prefiere la siguiente definición: “Un declive de la memoria y el deterioro del juicio y del pensamiento, la ausencia de conciencia, el declive en el control o la motivación emotiva o cambios en el comportamiento durante al menos 6 meses”. Por último, Grabowski y

Damasio (1996) las definen así: “Una discapacidad adquirida y persistente de las facultades intelectuales, que afecta diferentes dominios cognitivos con una gravedad suficiente como para impedir la capacidad de responsabilidad personal y social del paciente.”

1.1.3. Cambios neuropatológicos macroscópicos

Los cambios macroscópicos que se pueden observar en los cerebros de los pacientes con EA son: (1) tamaño medio más pequeño que el de los cerebros de las personas sanas, (2) atrofia cortical considerable y simétrica, con afectación de todos los lóbulos, (3) atrofia del lóbulo temporal medio y (4) afectación de las áreas de asociación de manera desproporcionada con respecto a las áreas motoras y sensoriales (Hof et al., 1990). Las estructuras subcorticales se hallan normalmente conservadas, excepto la amígdala, que se encuentra gravemente afectada. En general, la atrofia es simétrica entre los hemisferios, aunque no necesariamente entre los lóbulos. Prácticamente todos los casos de EA desarrollan un déficit de perfusión en las regiones parietotemporales posteriores.

1.1.4. Cambios neuropatológicos microscópicos

En las enfermedades neurodegenerativas tienen lugar los siguientes eventos: (1) se interrumpen circuitos principales como consecuencia de la pérdida sináptica y muerte neuronal, (2) existe una vulnerabilidad selectiva para la muerte neuronal, y (3) en cada enfermedad neurodegenerativa se destruyen circuitos específicos (Morrison y Hof, 1997).

En la EA, la degeneración se refleja no sólo por pérdida sináptica y muerte neuronal, sino también por formaciones neuropatológicas como los ovillos neurofibrilares (neurofibrillary tangles-NFT) y placas seniles (Mirra et al., 1993). Desde el punto de vista ultraestructural, los NFT están constituidos por filamentos rectos y estructuras helicoidales pareadas en que participa de forma importante la proteína tau fosforilada (Vickers et al., 1992; Hof et al., 1992; Giannakopoulos et al., 1994; Bierer et al., 1995). Por otra parte, las placas seniles son masas argirófilas de material granular o

filamentoso alrededor de un centro amiloideo. Los NFT y las placas seniles se encuentran también en cerebros de individuos mayores, cognitivamente normales, pero en la EA la distribución y densidad de ambos refleja una interrupción más importante de circuitos corticales claves (Hof y Morrison, 1996).

El neocórtex y el hipocampo presentan cambios llamativos en la EA, pero la patología no es uniforme, ni se afectan todos los tipos celulares. Las células piramidales del córtex entorrinal son vulnerables a los NFT y a la degeneración resultante, mientras las células granuladas del giro dentado son resistentes a la degeneración (Hof y Morrison, 1996). En el neocórtex existen grupos de neuronas vulnerables a la formación de NFT y a la degeneración, mientras otros grupos neuronales no lo son; así, las interneuronas inhibitorias no forman NFTs y son resistentes a la degeneración (Hof et al., 1993; Sampson et al., 1997). Las células piramidales que desarrollan largas proyecciones córtico-corticales son particularmente vulnerables a la degeneración en la EA, lo que lleva a la interrupción de conexiones entre distintas áreas del córtex de asociación, en tanto que las áreas motoras y sensoriales primarias sufren una pérdida neuronal mínima (Lewis et al., 1987; De Lacoste et al., 1993). En cuanto a las sinapsis, tiene lugar una pérdida sináptica extensa en áreas de asociación, lo cual refleja la interrupción estructural de los circuitos. Por el contrario, las proyecciones subcorticales y la mayoría de las proyecciones talámicas quedan intactas, mientras la proyección colinérgica del núcleo basal de Meynert degenera como uno de los primeros eventos de la enfermedad (Coyle et al., 1983).

1.2. Clasificación de la EA

En la EA pueden establecerse divisiones en grupos atendiendo a dos criterios diferentes: (1) división en dos grupos según la edad al comienzo de los primeros síntomas de la enfermedad y (2) división en dos grupos según la historia familiar (Mirra et al., 1991).

Los pacientes que debutan con la enfermedad antes de los 65 años de edad se consideran pertenecientes al grupo de la EA de comienzo precoz. Este grupo representa

aproximadamente el 30% de todos los casos de EA y la gran mayoría de los enfermos con historia familiar positiva pertenecen a él.

El 70% aproximadamente de los individuos que padecen la EA debutan después de los 65 años de edad y se les clasifica como enfermos con EA de comienzo tardío.

Una pequeña parte (aproximadamente el 1% de todos los pacientes con EA) presenta una historia familiar positiva caracterizado por un patrón de herencia autosómico dominante con enfermos en todas las generaciones. Estos casos se denominan EA familiar, mientras el resto de los enfermos pertenecen al gran grupo de la EA esporádica. Los pacientes con EA familiar pueden pertenecer al grupo de la EA de comienzo precoz habiendo (la enfermedad se inician antes de los 65 años) o al grupo de la EA de comienzo tardío (los primeros síntomas de la enfermedad se presentan después de los 65 años de edad).

1.3. La frecuencia de la EA y su impacto para la sociedad

1.3.1. Frecuencia

Las causas exactas de la demencia de tipo Alzheimer, cuyo impacto va creciendo a medida que aumenta la edad media de la población, siguen siendo desconocidas, aunque se las relaciona con múltiples influencias genéticas y ambientales.

En estudios poblacionales se ha comprobado que existe un aumento marcado de la proporción de la frecuencia respecto a la edad (Evans et al., 1989; Zhang et al., 1990; Rocca et al., 1990; Hofman et al., 1991). Si bien la frecuencia de la EA en la población general es del 1% aproximadamente, los resultados de estudios recientes han puesto de manifiesto que la frecuencia de la enfermedad se duplica cada cinco años con el incremento de la edad. Así, mientras que la frecuencia es del 4,1% en sujetos con una edad comprendida entre los 70 y 74 años, se eleva hasta el 32% en individuos entre los 85 y 89 años (Zhang et al., 1990; Rocca et al., 1990; Ott et al., 1995). Otros investigadores han descrito frecuencias del 18,7% en sujetos entre los 74 y 84 años y del 47,2% en personas mayores de 85 años (Evans et al., 1989). En cuanto al sexo, algunos, pero no todos, los estudios epidemiológicos han demostrado una frecuencia de

la EA más alta en mujeres que en hombres (Molsa et al., 1982; Jorm et al., 1987; Gussekloo et al., 1995).

1.3.2. Impacto para la sociedad

La población mundial aumenta cada año y, con la mejora de las condiciones de vida, la prevención de las enfermedades y los tratamientos cada vez más avanzados, se incrementa cada vez más el número de personas mayores. En el año 2000 había 410 millones de personas mayores de 65 años en el mundo, con una tasa de crecimiento anual esperado del 2,4% (Cooper, 1994). Entre el presente y el año 2025 Europa experimentará un incremento considerable en el número individuos mayores de 80 años y, según estimaciones conservadoras, en el año 2020 habrá 37 millones de personas con demencia en el mundo, de los cuales 6 millones serán europeos.

En el mundo desarrollado los pacientes con demencia representan ya en este momento una carga extraordinaria para los hospitales y la comunidad (ésta atiende a más del 90% de las personas con demencia), y estos problemas continuarán aumentando con el incremento de la longevidad.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, resulta de suma importancia la investigación básica y aplicada en este campo, con la esperanza de que los resultados obtenidos ayudarán al diagnóstico precoz de la enfermedad y al desarrollo de fármacos y tratamientos efectivos.

1.4. Diagnóstico y tratamiento precoz

Los cambios neuropatológicos (formación de las placas amiloideas y los ovillos neurofibrilares) comienzan mucho antes de la manifestación de los primeros síntomas de la EA. De ahí que resulte totalmente necesario el descubrimiento de marcadores de los primeros estadios de la enfermedad y el desarrollo de métodos que permitan su detección precoz (Selkoe, 1997).

Los tratamientos más efectivos para enfermedades complejas y crónicas normalmente son los que interrumpen la enfermedad en un paso obligatorio y temprano, antes de que se desencadene una cascada progresiva de eventos degenerativos. Cabe

considerar cuatro clases potenciales de fármacos para el tratamiento de la EA: (1) inhibidores de las proteasas, que disminuyen parcialmente la actividad de las enzimas que producen A β a partir de APP (β - y γ -secretasas); (2) compuestos que se unen a A β extracelular para prevenir su agregación y la formación de fibrillas amiloides citotóxicas; (3) drogas con acción antiinflamatoria específicas para el cerebro que bloquean la activación microglial, la liberación de las citocinas y la respuesta de fase aguda que tiene lugar en las regiones cerebrales afectadas; y (4) compuestos como los antioxidantes, los bloqueadores de los canales de calcio neuronales o los agentes antiapoptóticos que interfieren en los mecanismos de toxicidad mediada por A β (Selkoe, 1997).

2. Beta-amiloide

2.1. El origen de la beta-amiloide

La EA se está estudiando extensamente en muchos laboratorios potentes del mundo desde hace 25 años, pero sólo cuando hace unos escasos 17 años se determinó la secuencia proteica de la beta-amiloide extracelular (A β ; Glenner y Wong, 1984) se empezó a involucrar a la genética en la etiopatogenia de esta compleja enfermedad degenerativa.

La extracción y purificación de la amiloide de las placas extracelulares demostró que su componente principal es A β , que es una pequeña proteína de 4 kD (Masters et al., 1985; Beyreuther y Masters, 1991). La secuencia aminoacídica de A β fue utilizada para identificar el gen que codifica la proteína precursora de la beta-amiloide (APP) y caracterizar la APP como una glicoproteína transmembrana integral (Kang et al., 1987; König et al., 1992). APP está compuesta por un péptido señal, un dominio extracelular grande, un dominio transmembrana que traspasa una única vez la membrana y un dominio citoplasmático corto (Tanzi et al., 1988). El dominio extracelular es complejo y contiene una región globular, rica en cisteínas y sitios de unión para heparina (HBD-1), cobre (CuBD) y cinc (ZnBD-1); un dominio ácido, rico en glutaminas, aspartatos y treoninas; y los dominios glicosilados que incluyen una región promotora de crecimiento (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1988; König et al., 1992).

APP se expresa en muchos tejidos como una familia de moléculas de APP de diferentes tamaños, con transcriptos que varían entre 695 y 770 aminoácidos. Las dos formas más largas, conocidas como APP751 y APP770, contienen un dominio de 56 aminoácidos que presenta homología con los inhibidores de proteasas serínicas de la familia Kunitz (Ponte et al., 1988). La forma soluble de APP es funcionalmente idéntica a la proteasa nexina II (Oltersdorf et al., 1989), y además el dominio Kunitz presenta una actividad inhibidora hacia algunas proteasas serínicas (Sinha et al., 1990). Estos datos dieron pie a la hipótesis de que el dominio soluble de APP funciona como un inhibidor de proteasas circulantes (Sinha y Lieberburg, 1999).

2.2. La producción de la beta-amiloide

El péptido de A β se genera por proteólisis de APP (Kang et al., 1987). La proteasa β -secretasa inicia la formación de A β cortando el extremo amino-terminal del dominio A β . De esta forma se genera el ectodominio β -APP, que se secreta, y el fragmento carboxi-terminal C99, que está anclado a la membrana (Vassar et al., 1999). Una segunda proteasa, llamada γ -secretasa, corta el fragmento C99 y se forma el extremo carboxi-terminal del péptido A β maduro. En una vía no amiloidógena, APP se procesa mediante la proteasa α -secretasa, que produce el ectodominio α -APP soluble y el fragmento C83 anclado a la membrana. C83 es cortada por la γ -secretasa y se produce el fragmento no tóxico p3.

Las β - y γ -secretasas, necesarias para la formación de A β , liberan los extremos amino-terminal y carboxi-terminal de A β , que se generan de diferentes tamaños. Esta variabilidad del extremo carboxi-terminal afecta la solubilidad de A β : las formas más largas, de 42 y 43 amino ácidos (A β ₄₂ y A β ₄₃), se depositan en las placas (Kang et al., 1987), y las formas más cortas, de 39 y 40 amino ácidos (A β ₃₉ y A β ₄₀), se acumulan alrededor de los vasos sanguíneos (Prelli et al., 1988).

La mayoría de las moléculas de APP experimentan un procesamiento proteolítico desde la membrana celular a través de la activación de la α -secretasa, que corta la APP en la porción central del dominio A β (Esch et al., 1990).

2.2.1. Alfa-secretasa

La APP sintetizada de novo se glicosila en el retículo endoplasmático y madura en la vía secretora cuando se le añaden residuos O-glicosílicos y cuando en el aparato de Golgi se produce sulfación por tirosina (Weidemann et al., 1989). La APP soluble se detecta en el plasma y líquido cefalorraquídeo, lo cual sugiere una vía metabólica conservada. El procesamiento endoproteolítico de APP, que genera APP soluble y el fragmento C-terminal correspondiente, tiene lugar entre los aminoácidos 16 y 17 de la secuencia de A β (Esch et al., 1990).

La proteasa responsable de este procesamiento, la α -secretasa, corta a una determinada distancia del dominio transmembrana, siendo de menor importancia la secuencia aminoacídica (Sisodia, 1992). El procesamiento por la α -secretasa está ligado a la actividad colinérgica en las neuronas (Buxbaum et al., 1990; Nitsch et al., 1992). Estos datos refuerzan la hipótesis de que, en los cerebros de enfermos con EA, el procesamiento de APP por la α -secretasa está disminuido como consecuencia la pérdida de estímulos colinérgicos.

2.2.2. Beta-secretasa

La generación de A β y su liberación extracelular forman parte del metabolismo normal de APP (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1993).

Con la ayuda de anticuerpos específicos se ha determinado que la APP soluble truncada termina precisamente en el aminoácido metionina-596 (Seubert et al., 1992). Esta APP soluble truncada está presente en una proporción más elevada en cultivos neuronales en comparación con otros cultivos (Seubert et al., 1993), sugiriendo que este procesamiento por la β -secretasa es más frecuente en células derivadas del sistema nervioso central. Además, las neuronas exhiben una actividad de β -secretasa más elevada que los astrocitos (Zhao et al., 1996).

Recientemente, la proteína con actividad enzimática que corta la APP en el sitio de corte β (beta-site APP cleaving enzyme, BACE) ha sido aislada y caracterizada como β -secretasa (Vassar et al., 1999). La proteína BACE contiene un péptido señal de 21 aminoácidos, un gran dominio luminal, un único dominio transmembránico de 17 amino

ácidos y un extremo carboxi-terminal citosólico corto de 24 aminoácidos. La expresión de BACE se solapa con la expresión de APP, que tiene lugar en casi todas las células y tejidos, aunque es moderadamente más elevada en el cerebro. Intracelularmente, la actividad de la β -secretasa es más elevada en los compartimientos de la vía secretora, incluyendo el aparato de Golgi, las vesículas secretoras y los endosomas. Los siguientes datos apoyan la definición de la proteína BACE como β -secretasa: (1) la sobreexpresión de BACE causa un incremento de la actividad de la β -secretasa; (2) BACE corta APP exactamente en los sitios conocidos para el procesamiento de APP por β -secretasa y (3) la actividad de β -secretasa se inhibe totalmente por oligonucleótidos "antisense" (Vassar et al., 1999).

2.2.3. Gamma-secretasa

Como substrato para γ -secretasa sirven los fragmentos C99 y C83 generados a partir de la molécula de APP por α -secretasa y β -secretasa, respectivamente, y se genera un fragmento de 4kD (A β a partir del C99) o un péptido de 3kD (el fragmento p3 a partir del C83) (Haass et al., 1992).

Se conoce que γ -secretasa presenta algunas de las propiedades de las proteasas aspartílicas (Wolfe et al., 1999b). Resulta llamativo que dos aspartatos situados en medio de dos dominios transmembrana vecinos (TM6 y TM7) de las presenilinas sean absolutamente necesarios para cortar ambos fragmentos (C83 y C99) carboxi-terminales de APP (Wolfe et al., 1999a). En consecuencia, se ha propuesto que: (1) las presenilinas pudieran ser cofactores de γ -secretasa, análogos a la proteína activadora del procesamiento del esteroles, que también posee varios dominios transmembrana (ver capítulo 3.1; Hua et al., 1996), o (2) que las mismas presenilinas pudieran ser γ -secretasas. Los dos aspartatos transmembrana se alinean uno con el otro y pueden asociarse, y también con el sitio en el dominio transmembrana de APP cortado por γ -secretasa, con lo que podrían catalizar una proteólisis intramembrana (Wolfe et al., 1999a).

Una mutación en uno de los dos aspartatos anula la actividad como γ -secretasa de las presenilinas (Wolfe et al., 1999b; Kimberly et al., 2000). Como la substitución de

uno de los dos aspartatos por un glutamato también interrumpe la actividad de γ -secretasa, se comprobó que es crítica la presencia de los aspartatos, y no simplemente la carga. Estos datos favorecen la hipótesis de que las mismas presenilinas son las proteasas aspartílicas.

2.3. Mutaciones en el gen de APP

En 1987 se demostró la existencia de ligamiento genético entre marcadores de ADN de la parte proximal del brazo largo del cromosoma 21 y la EA familiar en un estudio que se basaba en cuatro grandes pedigrees con una edad de comienzo de la EA menor de 65 años (St George-Hyslop et al., 1987). Tras este primer estudio ha habido trabajos adicionales apoyando o rechazando el descubrimiento (Goldgaber et al., 1987; Pericak-Vance et al., 1988; Schellenberg et al., 1988; Goate et al., 1989; Schellenberg et al., 1991b). En conjunto estos estudios han sugerido la posibilidad, para la EA familiar, de una heterogeneidad que más tarde se ha comprobado con la aparición de nuevos genes involucrados en la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

El gen de APP está localizado en la región 21 del brazo largo del cromosoma 21 y está constituido por 17 exones. Los últimos dos exones, 16 y 17, codifican la porción de APP que, tras el procesamiento proteolítico, constituye el fragmento A β .

La primera mutación descrita en asociación a la EA familiar afectaba al codón 717 (APP717Val \rightarrow Ile) del gen de APP, dentro de la región transmembrana cerca del extremo C-terminal del dominio A β (Goate et al., 1991). Rápidamente fueron estudiadas familias ya caracterizadas con enfermos de EA en todas las generaciones y se identificó esta mutación puntual en seis de esas familias (Goate et al., 1991; Lucotte et al., 1991; Naruse et al., 1991; Yoshioka et al., 1991; Karlinsky et al., 1992), en tanto que en más de 175 familias no pudo detectarse la mutación (Chartier-Harlin et al., 1991a; Crawford et al., 1991; Goate et al., 1991; Schellenberg et al., 1991a; Van Duijn et al., 1991). Más tarde se detectaron dos mutaciones en el mismo codón 717 del gen de APP. En una familia con EA precoz la valina de este codón está sustituida por una fenilalanina (APP717Val \rightarrow Phe; Murrell et al., 1991), y en otra familia esta misma valina está cambiada por una glicina (APP717Val \rightarrow Gly; Chartier-Harlin et al., 1991b).

2.4. La hipótesis amiloidea

La identificación de mutaciones de APP como causa de la EA apunta hacia el metabolismo alterado de APP como evento central en la etiología y patogenia de la enfermedad (Glennner y Murphy, 1989; Hardy y Allsop, 1991). La detección de estas mutaciones apoyó la teoría de una cascada patológica que transcurriría de la siguiente manera: (1) metabolismo alterado de APP, (2) incremento de la síntesis de A β , (3) deposición de A β , (4) formación de placas amiloideas, (5) formación de ovillos neurofibrilares, y (6) muerte neuronal (Hardy y Higgins, 1992).

El papel primario de la amiloidogénesis alterada como causante de la EA ha recibido el apoyo de los resultados convincentes de muchos investigadores (Masters et al., 1985; Yamazaki et al., 1995; Selkoe, 1998; Geula et al., 1998). La gran cantidad de datos que avalan la hipótesis amiloidea hace que ésta se haya convertido en la construcción central de la patogenia de la EA. La síntesis incrementada de A β en las formas de EA precoz familiar debida a mutaciones en los genes de APP, presenilina 1 y presenilina 2 es un soporte central de la hipótesis amiloidea, que afirma que la amiloidogénesis o la eliminación anormal de A β es la causa primaria de la patogenia de la EA. Otros acontecimientos moleculares tendrían una importancia secundaria.

También a favor de la hipótesis amiloidea militan los siguientes hallazgos: (1) los cerebros de enfermos con EA contienen un número elevado de placas de A β , (2) la deposición del A β comienza mucho antes de la manifestación de los primeros síntomas (Selkoe, 1993), (3) la eliminación de A β a través del sistema nervioso central está disminuida en pacientes con EA esporádica, (4) los pacientes esporádicos presentan una agregación aumentada o un metabolismo disminuido de A β (Yamazaki et al., 1996), (5) la concentración de A β está elevada en personas mayores de 65 años que más tarde desarrollan la EA, en comparación con individuos control de la misma edad (Selkoe, 1997), y (6) los pacientes con síndrome de Down desarrollan la EA debido a la presencia de una copia adicional del gen de APP en el cromosoma 21 (Masters et al., 1985).

Un punto central de la hipótesis es la acumulación de los péptidos amiloidógenos $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$, que ocurre como acontecimiento temprano en la enfermedad y es debida a la actividad elevada de β - y γ -secretasas o al metabolismo disminuido de los péptidos $A\beta$. Estos péptidos presentes en exceso se agregan para formar primero las placas neuríticas difusas y más tarde las placas maduras. La amiloide polimerizada en las placas neuríticas presenta una configuración beta-plegada que contribuye a su neurotoxicidad. Es interesante mencionar que la $A\beta$ de las placas colocaliza con varias moléculas claves involucradas en la patogenia de la EA, incluyendo butirilcolinesterasa, alfa-1-antiquimotripsina, apoE y ambas presenilinas.

3. LAS PRESENILINAS

3.1. Descubrimiento de las presenilinas

En los casos de EA familiar precoz la enfermedad se hereda con un patrón autosómico dominante. Sólo entre el 2 y el 3% de las familias con EA presentan mutaciones en el gen de APP. Desde que en 1992 varios autores describieron la existencia de ligamiento genético para la EA familiar en el cromosoma 14 (Schellenberg et al., 1992), se ha procedido a investigar varios genes localizados en el cromosoma 14 como posibles responsables de la aparición de EA. Entre ellos se encuentran el gen de alfa-1-antiquimotripsina (Mullan et al., 1992), cFos (Rogaev et al., 1993) y los genes de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 (Haltia et al., 1994).

La colaboración de varios grupos llevó en 1995 al descubrimiento de un nuevo gen, el de la presenilina 1 (PS1), localizado en la región 24.3 del brazo largo del cromosoma 14 (Sherrington et al., 1995). Se describieron cinco mutaciones puntuales en cinco familias. El hecho de que cada mutación fuese específica para cada familia hacía anticipar que se encontrarían mutaciones diferentes mientras más familias se estudiaran. Estudios comparativos de secuencias de aminoácidos en los bancos de datos llevó al descubrimiento de la presenilina 2 (PS2), el gen de la cual está situado en la región 31-42 del brazo largo del cromosoma 1 (Rogaev et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995), identificándose dos mutaciones de este gen en dos familias con EA.

Los genes de las presenilinas están constituidos por 12 exones, de los cuales los exones 3 a 12 son codificantes (Levy-Lahad et al., 1996; Rogaev et al., 1997). La región reguladora del gen contiene los exones 0-2. Las presenilinas son proteínas transmembrana integrales con al menos 8 dominios transmembrana (TM) unidos por secuencias hidrofílicas cortas (Sherrington et al., 1995, Rogaev et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). Si bien existe una homología del 67% entre la secuencia aminoacídica de ambas presenilinas, éstas contienen dos regiones no homólogas que confieren especificidad a PS1 y PS2. Las dos regiones divergentes, que sobresalen hacia el citoplasma, son el extremo N-terminal y un gran "loop" hidrofílico situado entre TM6 y TM7 (DeStrooper et al., 1997).

3.2. Mutaciones en los genes de las presenilinas

Hasta ahora se han descrito más de 70 mutaciones diferentes para el gen de la PS1 en 106 familias y 7 para el gen de la PS2 en 6 familias. En la EA las frecuencias de éstas mutaciones son del 6% para la PS1 y del 1% para la PS2. En casos familiares la frecuencia de mutaciones en PS1 se eleva al 9% y al 18% en casos de herencia autosómica dominante (Cruts et al., 1998).

Existen regiones en ambos genes de las presenilinas, denominados "puntos calientes" (hot spots), donde se concentra un número elevado de las mutaciones encontradas hasta ahora. Para el gen de PS1 estas regiones son TM2, codificada por el exón 5, con el 7,5% de todas las mutaciones encontradas; TM3, codificado por el exón 6, representando el 8,2% de las mutaciones; TM6, codificada por la parte 3' del exón 7 y la parte 5' del exon 8, con el 10,0% de las mutaciones; y la primera parte del gran "loop" hidrofílico, codificada por el exón 8, que concentra el 11,5% de todas las mutaciones del gen.

Las mutaciones en el gen de PS1 dan lugar a la EA precoz, caracterizándose cada mutación por una edad específica de debut de la enfermedad. Los miembros afectados de familias con EA que presentan mutaciones localizadas en TM2, o el exón 5, debutan antes de los 45 años, mucho más precozmente que otras familias con EA causada por una mutación de PS1 (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995;

Campion et al., 1995; Boteva et al., 1996; Crook et al., 1997; Yasuda et al., 1999; Finckh et al., 2000).

De las seis mutaciones descritas en el gen de PS2, las dos que están situadas en TM2 causan EA de debut tardío (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Lao et al. 1998), al contrario del resto de las mutaciones que dan lugar a la EA precoz..

Todas las mutaciones de PS1 y PS2 son mutaciones puntuales, que resultan en el cambio de un aminoácido por otro en la estructura primaria de las presenilinas. Las mutaciones observadas en las presenilinas son conservadoras desde el punto de vista clínico, probablemente porque mutaciones más drásticas (inserciones, deleciones o mutaciones causantes de un cambio del marco de lectura) interfieren con las funciones fisiológicas vitales de las presenilinas (Shen et al, 1997; Wong et al, 1997), haciendo que los individuos portadores no sean viables.

3.3. Localización y posible función de las presenilinas

Las presenilinas están localizadas en el retículo endoplasmático (RE) y en los compartimentos subcellulares del aparato de Golgi (Walter et al., 1996; De Strooper et al., 1997). Las presenilinas endógenas tiene una distribución subcelular relativamente limitada, encontrándose en los compartimentos tempranos de la biosíntesis (Annaert et al., 1999). Estudios de microscopia electrónica y confocal combinados con experimentos de fraccionamiento subcellular han puesto de manifiesto que las presenilinas de las neuronas se encuentran en el RE liso y rugoso, en el compartimento intermedio de RE-Golgi y en el cis-Golgi, sin extenderse más allá (Annaert et al., 1999). La localización de las presenilinas en la membrana nuclear (Li y Greenwald, 1998) es compatible con su localización en el RE, dada la continuidad de la membrana nuclear con el RE.

Estas proteínas politópicas de membrana sufren endoproteólisis regulada donde se generan fragmentos NH₂-terminales (N-terminal fragment - NTF) y fragmentos COOH-terminales (C-terminal fragment - CTF) estables, que se acumulan como representantes de las presenilinas in vivo (Thinakaran et al., 1996; Thinakaran et al., 1997). La gran mayoría de las NTF no forman complejos estables y se degradan

rápidamente (Steiner et al., 1998; Saura et al., 1999). El procesamiento endoproteolítico no es necesario para la actividad biológica de las presenilinas (Steiner et al., 1999a; Steiner et al., 1999b), pero, in vivo, los NTF y CTF juntos forman la unidad funcional de las presenilinas (Sisodia et al., 1999).

La localización celular de las presenilinas en el RE y el Golgi se solapa con los sitios intracelulares de generación del péptido altamente amiloidógeno A β ₄₂ (Xia et al., 1998). Además, la APP inmadura está localizada en el RE y el Golgi temprano y co-inmunoprecipita con las presenilinas (Xia et al., 1997). En experimentos con ratones PS1^{-/-} se ha demostrado que las presenilinas juegan un papel importante en la generación de A β , observándose que las células obtenidas de estos ratones carecían totalmente de producción de A β (De Strooper et al., 1998; Naruse et al., 1998). Las mutaciones descritas para familias con EA aumentan selectivamente la producción y deposición de A β ₄₂ en cultivos celulares (Scheuner et al., 1996; Tomita et al., 1997; Xia et al., 1997), tanto en los cerebros de ratones transgénicos (Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1996 y 1997; Citron et al., 1997) como en los cerebros de pacientes con EA (Lemere et al., 1996). Además, mediante experimentos in vitro se ha demostrado que A β ₄₂ se agrega y polimeriza en fibrillas con mayor facilidad que A β ₄₀ (Xia et al., 1997). El descubrimiento de que la deficiencia de PS1 inhibe el procesamiento normal de APP y reduce la producción de A β ₄₀ y A β ₄₂ sugiere que PS1 facilita la actividad de gamma-secretasa (De Strooper et al., 1998). La región funcional de PS1 necesaria para la producción de A β fue localizada en dos residuos aspartáticos dentro de los dominios transmembrana 6 y 7 (Wolfe et al., 1999a). La sustitución de uno de los dos aspartatos, el aspartato del codón 257 (TM6) o el aspartato del codón 385 (TM7), por una alanina interfiere con la endoproteólisis de PS1 y disminuye la producción de A β en un 60%. Del resto de la actividad gamma-secretasa es responsable PS2, como se ha demostrado en experimentos similares a los realizados para PS1: los aspartatos de los codones 263 y 366 de PS2 se sustituyeron con alaninas, y la presencia de ambas presenilinas mutadas suprime totalmente el procesamiento de APP por gamma-secretasa (Kimberly et al., 2000).

3.4. El polimorfismo en el gen de la presenilina 1

El gen de PS1 presenta en el intrón 8 un polimorfismo que se caracteriza por los alelos 1 (T en la posición 17 del intrón 8) y 2 (G en la posición 17 del intrón 8). Ambos alelos tienen una frecuencia similar en enfermos con EA y controles, pero se ha comprobado una acumulación del genotipo 11 en los enfermos (Wragg et al., 1996; Owen et al., 1996).

La localización del polimorfismo en el intrón entre los exones 8 y 9 sugiere que el modo de acción más probable es la modulación del "splicing" alternativo, particularmente de los exones 8 y 9 del gen de PS1. En algunos tejidos el exón 8 experimenta "splicing" alternativo (Rogaev et al., 1995), y una mutación en el sitio aceptor en el mismo intrón provoca EA en una familia a través de la pérdida del exón 9 (Perez-Tur et al., 1995).

Sin embargo, si el polimorfismo fuera una causa relevante para la aparición de la EA, la asociación descrita se repetiría en todas las poblaciones.

4. LA APOLIPOPROTEINA E

4.1. Estructura y función de la proteína

La apolipoproteína E (apoE) es una proteína de 299 aminoácidos, constituida por una única cadena polipeptídica. ApoE está plegada en dos dominios estructurales independientes que corresponden a dos funciones diferentes de la proteína (Weisgraber, 1994). Uno de los dos fragmentos corresponde a los aminoácidos 1-191 (22kD) y el otro a los aminoácidos 216-299 (10 kD). El extremo N-terminal incluye el sitio de interacción con el receptor (aminoácidos 136-158), una región rica en aminoácidos básicos (Weisgraber et al., 1986; Cardin et al., 1988). En el extremo carboxi-terminal los aminoácidos 263-286 son responsables de la interacción de apoE con los lípidos y la asociación de apoE a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; Sparrow et al., 1992).

ApoE presenta un polimorfismo que se caracteriza por tres isoformas diferentes de la proteína, llamadas E2, E3 y E4 (Rall y Mahley, 1992). ApoE3 es la isoforma más frecuente en la población general. La base molecular de este polimorfismo consiste en intercambios de cisteína y arginina. ApoE3 contiene una cisteína en el residuo 112 y

una arginina en el codón 158, en tanto que apoE2 contiene cisteínas en ambos codones y apoE4 está representada por dos argininas en los codones 112 y 158.

En los humanos apoE se sintetiza sobre todo en el hígado y en el cerebro, pero también en otros tejidos, incluyendo monocitos y macrófagos (Basu et al., 1982). ApoE participa en la distribución del colesterol entre las células de los órganos donde se produce y este colesterol se usa para diferentes procesos de biosíntesis, incluyendo la síntesis de membranas o la producción de hormonas esteroideas. Además de su papel en el transporte del colesterol y el metabolismo de las partículas lipoproteicas, apoE ejerce otras funciones en los humanos (Mahley, 1988). Entre estas se encuentran la inmunoregulación (Cardin et al., 1988), la regeneración de los nervios (Handelmann et al., 1992) y la activación de diferentes enzimas lipolíticas, como la lipasa hepática, la lipasa lipoproteica y la lecitín-colesterol acetiltransferasa (Thuren et al., 1991; Thuren et al., 1992). De particular interés resulta la función de apoE como ligando de diferentes receptores. La interacción específica entre apoE y el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un mecanismo esencial para el control de la eliminación de lipoproteínas ricas en apoE, así como las VLDL, quilomicrones y lipoproteínas de densidad intermedia, contribuyendo a mantener el equilibrio del colesterol y los triglicéridos (Brown y Goldstein, 1986). Las tres isoformas de apoE se diferencian por su afinidad por el receptor de LDL. ApoE3 y apoE4 tienen la misma afinidad, mientras apoE2 presenta una actividad de interacción drásticamente disminuida al 1% en comparación con las otras dos isoformas. Las VLDL y quilomicrones que contienen apoE2 se eliminan lentamente del plasma, lo cual induce una regulación positiva de la expresión del receptor de LDL y, en consecuencia, la concentración de colesterol en plasma es muy baja. Las VLDL que contienen apoE4 se eliminan más rápidamente del plasma que las VLDL que contienen apoE3, induciendo una regulación negativa de la expresión del receptor de LDL. Por eso la presencia de apoE4 está asociada a niveles elevados de colesterol (Boerwinkle et al., 1987).

4.2. El polimorfismo común y su implicación para la EA

Como consecuencia de su importancia biológica, el polimorfismo de apoE ha sido estudiado extensamente en muchos laboratorios clínicos y de investigación. Se han determinado en la población general de muchas regiones del mundo las frecuencias alélicas de APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4, siendo APOE ϵ 3 el más común. En Europa, la distribución de la frecuencia del alelo ϵ 4 presenta un gradiente que, en general, disminuye de norte a sur. Así, las frecuencias son del 22,7% en Finlandia, 20,6% en Suecia, 17,4% en Dinamarca, 16,7% en los Países Bajos, 16,5% en Islandia, 14,8% en el Reino Unido, 13,6% en Alemania, 13,0% en la costa mediterránea española y 11,6% en Francia. La frecuencia alélica de APOE ϵ 4 en poblaciones asiáticas es muy baja, oscilando entre el 4,9% y el 11,2%. Por el contrario, en poblaciones africanas asciende hasta el 29,1% o el 29,7%. La población general de América del Norte presenta valores de la frecuencia alélica de APOE ϵ 4 situados entre el 11,6% y el 15,3% (Siest et al., 1995).

Las variaciones polimórficas del locus de apoE actúan como factores de riesgo heredados y afectan la susceptibilidad genética para la EA esporádica de comienzo tardío (Strittmatter et al., 1993a; Saunders et al., 1993). Diferentes genotipos tienen un efecto más acusado sobre la distribución del riesgo y la edad de comienzo de la EA. El alelo APOE ϵ 4 está asociado a edades más tempranas de comienzo de la EA (Corder et al., 1993), mientras la presencia del alelo APOE ϵ 2 disminuye el riesgo de aparición de la enfermedad (Corder et al., 1994). Como cada individuo hereda dos alelos, la asociación al riesgo y la edad de comienzo varía con los diferentes genotipos. Los individuos portadores del genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 presentan mayor riesgo que otros individuos, habiéndose demostrado que el alelo APOE ϵ 4 incrementa el riesgo a padecer la enfermedad de manera dosis-dependiente (Corder et al., 1993; Meyer et al., 1998) y que el genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 precipita el comienzo de la enfermedad (Corder et al., 1993). Desde el punto de vista estadístico, en el 50% de los portadores de este genotipo la enfermedad comienza antes de los 70 años de edad, mientras que los portadores del genotipo APOE ϵ 2/ ϵ 3 no manifiestan la enfermedad hasta los 90 años. La duración de la enfermedad parece estar influenciada más por la edad de comienzo que por el genotipo (Corder et al., 1995). Como el genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 está asociado a un debut precoz de

la EA, generalmente se observa en estos pacientes un curso prolongado de la enfermedad. En los pacientes con el genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 y en aquellos con el genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 3 que debutaron en el mismo rango de edad, la duración de la enfermedad es similar e independiente del factor de riesgo.

El alelo APOE ϵ 4 también está asociado a la EA esporádica de debut precoz (Chartier-Harlin et al., 1994; Van Duijn et al., 1994) y a la EA familiar también de debut precoz en familias que presentan mutaciones en los genes de APP y las presenilinas (Houlden et al., 1998). Además se ha demostrado que existe una interacción entre el genotipo APOE y la edad de comienzo de la EA en las familias donde la enfermedad está causada por una mutación en el gen de APP. Los pacientes con la mutación en el gen de APP y los portadores de un alelo APOE ϵ 4 debutan varios años antes que los pacientes con la misma mutación pero con el genotipo APOE ϵ 2/ ϵ 3. Una interacción similar puede existir entre APOE y las mutaciones en los genes de las presenilinas (Nochlin et al., 1998).

Durante varios años la literatura clínica ha sido testigo de una discusión considerable sobre el uso del genotipo APOE en el diagnóstico diferencial de la EA en pacientes con síntomas leves o signos de EA probable. Para llegar a una conclusión en esta cuestión se han genotipado grupos amplios de pacientes con EA posible y EA probable en los que el diagnóstico se confirmó mediante autopsia. Estos estudios han demostrado un valor predictivo para los genotipos APOE ϵ 3/ ϵ 4 y APOE ϵ 4/ ϵ 4 que se aproxima al 99,5% (Saunders et al., 1996; Kakulas et al., 1996; Welsh-Bohmer et al., 1997). Estos dos genotipos de APOE son responsables de aproximadamente el 65% de todos los enfermos con EA tardía (Saunders et al., 1996). A estos trabajos les siguió un estudio de más de 2000 pacientes de 26 centros especializados en EA, evaluando el diagnóstico clínico, el diagnóstico postmortem y el genotipo APOE (Mayeux et al., 1998). Este estudio concluía que, si se usa el genotipado de APOE como prueba complementaria en combinación con criterios clínicos, se lograría un diagnóstico específico. El genotipado de APOE aislado, sin pruebas complementarias, no proporciona resultados diagnósticos concluyentes y, además, la ausencia del alelo APOE ϵ 4 no significa que el individuo no vaya a desarrollar la enfermedad.

Aunque el riesgo relativo a padecer la EA aumenta con la presencia de uno o dos alelos APOE ϵ 4, no es posible predecir si o cuando una persona intacta cognitivamente va a desarrollar la enfermedad (Roses, 1995). Por esta razón, el genotipo APOE no tiene valor predictivo en la población general.

4.3. ApoE y A β

Normalmente se observan variaciones en los depósitos de A β en diferentes pacientes e individuos no demenciados (Katzman et al., 1988). Al examinar la correlación entre la carga amiloidea y el genotipo APOE, se ha comprobado que la carga amiloidea es mayor en pacientes con el genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 (Schmechel et al., 1993). Diferentes estudios han confirmado un aumento de la deposición amiloidea en individuos portadores de un alelo APOE ϵ 4, con o sin EA (Berr et al., 1994; Gearing et al., 1995; McNamara et al., 1998). El aumento de la deposición amiloidea se puede atribuir al aumento de la cantidad de A β 1-40 y 1-42 (McNamara et al., 1998). La evidencia de que apoE juega un papel fundamental en los depósitos de amiloide se ha obtenido a partir de un modelo de ratón transgénico en el que la ausencia del gen de APOE reducía dramáticamente la deposición de A β (Bales et al., 1997). Los ratones deficientes en APOE fueron cruzados con ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen humano de una APP mutante. Los ratones de seis meses de edad que portaban el gen de APP mutante y además el gen salvaje de APOE presentaban numerosos depósitos amiloideos en el neocórtex y el hipocampo. Por el contrario, los ratones de seis meses de edad que portaban el gen de APP mutante y carecían del gen salvaje de APOE no presentaban depósitos amiloideos (Bales et al., 1997; Holtzman et al., 1999). Estos datos apoyan la teoría de la importancia de apoE en la deposición de A β in vivo.

Ensayos in vitro han demostrado de forma consistente que apoE se une a A β , pero la especificidad de cada isoforma depende del origen y estado de la proteína de apoE. La naturaleza de apoE en el cerebro todavía se desconoce, pero las discrepancias en los resultados obtenidos en diferentes estudios (Strittmatter et al., 1993a; Strittmatter, 1993b; Chan et al., 1996; Haass et al., 1997) subrayan la importancia de las diferencias mínimas que pueda haber en su conformación y actividad. Además, la interacción

depende mucho del estado conformacional del péptido A β que se haya usado en cada estudio, ya que apoE se une con preferencia a péptidos de A β con conformación de láminas beta (Golabek et al., 1996). Inicialmente se describió que la apoE del líquido cefalorraquídeo se une a A β sintética. Los siguientes estudios han demostrado que las isoformas apoE3 y apoE4 purificadas y deslipidadas forman complejos con A β sintética. El complejo de apoE4 con A β se formaba en pocos minutos, mientras el de apoE3 con A β tardaba en formarse varias horas (Strittmatter et al., 1993b). Por el contrario, la apoE3 presente en células transfectadas y en VLDL humanas se une a A β con mucha más afinidad que apoE4 (Haass et al., 1997). Dos trabajos recientes han destacado que la apoE del interior de la placas amiloides es diferente (posiblemente se encuentra degradada) de la apoE del suero (Aizawa et al., 1997; Yamada et al., 1997).

4.4. El promotor del gen de APOE

La hipótesis de la existencia de mutaciones cerca del gen de APOE cobró aun más importancia cuando se publicaron datos de diferentes niveles de expresión de apoE (Wavrant-De Vrièze et al., 1997). Estos datos sugirieron que podían existir polimorfismos en la región no codificante del gen de APOE. Poco más tarde se describieron tres nuevos polimorfismos: (1) en la posición -491 una adenina se substituye por una timina (-491AT; Bullido et al., 1998); (2) en la posición -427 se substituye una timina por una citosina (-427TC; Artiga et al., 1998); y (3) en la posición -186 de la TATA-box la substitución de una timina por una guanina se denomina Th1/E47cs, porque está localizada en la secuencia de unión del factor transcripcional Th1/E47 (Lambert et al., 1998a).

Estudios de expresión in vitro han puesto de manifiesto los efectos de estas tres mutaciones. El alelo T del polimorfismo -491AT disminuye el nivel de expresión del gen de APOE, el alelo C del polimorfismo -427TC disminuye ligera, pero no significativamente, los niveles de expresión del gen y el alelo G del polimorfismo Th1/E47cs aumenta significativamente los niveles de expresión del gen (Artiga et al., 1998, Lambert et al., 1998a).

Estudios poblacionales han confirmado lo que hacían sospechar los estudios de expresión. Sólo los polimorfismos -491AT y Th1/E47 tienen implicación en la etiopatogenia de la EA. Mientras el polimorfismo -491AT ejerce efectos protectores por los bajos niveles de expresión del gen, de lo cual se benefician los portadores de uno o dos alelos APOE ϵ 4 por la menor cantidad de isoforma presente (Lambert et al., 1998b), el polimorfismo Th1/E47 ejerce efectos negativos. Si los niveles de expresión de APOE se encuentran elevados como consecuencia de una mutación en uno de los alelos presentes, se esperarían las siguientes implicaciones: (1) la modulación de la expresión aumenta el riesgo a padecer la EA conferido por el alelo APOE ϵ 4 al mismo tiempo que aumenta también el efecto protector que confiere el alelo APOE ϵ 2; (2) este polimorfismo en el promotor de APOE tiene un efecto diferente para genotipos de APOE homocigotos o heterocigotos; y (3) el efecto de este polimorfismo en individuos heterocigotos depende de la coincidencia de alelos. En individuos heterocigotos para el polimorfismo Th1/E47 y el polimorfismo de APOE común el alelo APOE ϵ 4 puede estar en combinación con el alelo T o G del polimorfismo Th1/E47. Una de estas combinaciones puede aumentar el nivel relativo de expresión del alelo APOE ϵ 4 y bajar el nivel relativo de expresión del alelo APOE ϵ 3; en otra combinación sucedería lo contrario (Lambert et al., 1998b; Bullido et al., 1998). Así que, aunque el alelo APOE ϵ 4 confiere riesgo a padecer la EA, este riesgo será diferente en individuos con el genotipo APOE3/4 dependiendo de los polimorfismos presentes en el promotor de APOE.

4.5. El exón 3 del gen de APOE

Una de las posibilidades que se han propuesto para explicar el riesgo generado por el polimorfismo del gen de APOE es el desequilibrio por ligamiento del alelo APOE ϵ 4 con una mutación funcional dentro del gen de APOE. Aparte del polimorfismo común en el exón 4 del APOE, se ha descrito un polimorfismo C/G en el "enhancer" (IE1) del intrón 1 con una asociación entre los alelos APOE IE1 G y APOE ϵ 4 (Mui et al., 1996). Además, hace poco se ha identificado otro polimorfismo en el exón 3, en cuyo codón 28 se sustituye una leucina por una prolina, lo que equivale a la sustitución

de una citosina por una timina en la posición 2912 (Kamboh et al., 1999). Este polimorfismo se denominó APOE-Pittsburgh (E4P), por la ciudad donde se describió. Kamboh et al. han estudiado un total de 1118 casos de EA y 607 controles para la nueva mutación E4P y han obtenido una frecuencia del 2,42% en los enfermos, en comparación con el 0,18% en los controles. Además de esta ligera acumulación de la mutación en los pacientes, se detectó una fuerte asociación entre la mutación E4P y el alelo APOE ϵ 4. Las muestras del estudio venían de tres centros diferentes, lo cual significaba que no se trataba de una coincidencia, y se propusieron tres posibilidades para explicar una frecuencia elevada de la mutación E4P en casos de EA tardía: (1) la mutación está representada en exceso en personas mayores debido a la diferencia en supervivencia (esto queda descartado por la baja frecuencia de la mutación en el grupo control); (2) la mutación está relacionada etiológicamente con el fenotipo de debut tardío; y (3) la asociación de la mutación E4P a la EA es una coincidencia histórica. La frecuencia de la mutación E4P estaba significativamente elevada al comparar el total de portadores de la mutación y el total de portadores del alelo APOE ϵ 4 en casos y controles, lo cual indica su efecto independiente del alelo APOE ϵ 4 (Kamboh et al., 1999). Al calcular las odds-ratios para APOE4P/APOE ϵ 4 en comparación con no-APOE4P/APOE ϵ 4, el valor fue de 29,06, lo que contrasta con las odds-ratios para APOE ϵ 4 en comparación con no-APOE ϵ 4 y para APOE4P en comparación con no-APOE4P, que fueron de 4,49 y 5,35, respectivamente. Así pues, el polimorfismo E4P confiere un riesgo adicional al del alelo APOE ϵ 4, pudiendo precipitar el comienzo de la EA. La mutación E4P se detectó en dos familias con EA, donde sólo los enfermos de más edad eran portadores de la mutación, mientras los individuos asintomáticos mayores de 65 años no presentaban la mutación. Los individuos jóvenes asintomáticos y portadores de la mutación de estas familias se seguirán de cerca para, si debuta la enfermedad, detectarla con los primeros síntomas (Kamboh et al., 1999).

La sustitución de una leucina por una prolina en el codón 28 puede tener un impacto directo sobre el funcionamiento de apoE, porque la prolina en esta localización se asocia a una menor libertad conformacional de la proteína (Kamboh et al., 1999).

5. OTROS FACTORES GENÉTICOS

5.1. Cistatina C

La cistatina C, una proteína amiloidógena, es el inhibidor de proteasas cistatínicas más abundante en el medio extracelular (Bobek y Levine, 1992). El depósito de A β en las paredes arteriolares cerebrales, dando lugar a la angiopatía cerebral amiloidea (cerebral amyloid angiopathy - CAA) es una de las anomalías más frecuentes que se detectan en los cerebros de los pacientes con EA, estando presente en el 83% de los casos (Ellis et al., 1996). Estudios inmunohistoquímicos en cerebros de EA y CAA han demostrado la colocalización de A β y cistatina C en las paredes arteriolares (Wang et al., 1997).

La hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo islandés (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis - Icelandic type - HCHWA-I), de herencia autosómica dominante, presenta los mismos síntomas clínicos y cambios neuropatológicos que la HCHWA-D, con deposición amiloidea masiva en los vasos leptomeníngeos y corticales (Luyendijk et al., 1986). En el caso de la HCHWA-I, los depósitos amiloideos se hallan restringidos a las arterias y arteriolas cerebrales y espinales y están integrados por una variante de la cistatina C (Cohen et al., 1983). La deposición vascular de la cistatina C lleva a la pérdida progresiva de células musculares lisas, degeneración microvascular y hemorragia cerebral (Wang et al., 1997). La proteína amiloidógena aislada de los cerebros de estos pacientes comenzaba en el codón 11 de la cistatina C normal y, además, presentaba la sustitución de una leucina por un residuo de ácido glutámico en el codón 68 (Cohen et al., 1983; Gisho et al., 1986). Estudios *in vitro* demostraron una disminución de la síntesis y secreción de la cistatina C (Thorsteinson et al., 1992) y que la proteína mutante forma dímeros mucho más estables que la proteína de tipo salvaje, lo cual tiene como consecuencia una reducción en la secreción y, por consiguiente, la acumulación intracelular (Bjarnadottir et al., 1998; Benedikz et al., 1999).

Un estudio reciente concluía: (1) la cistatina C se codeposita con A β en el neurópilo y las paredes de los vasos en enfermos con EA, al igual que en individuos normales y (2) existe una subpoblación de neuronas en regiones vulnerables de cerebros

de enfermos con EA que es inmunorreactiva para anticuerpos anti-cistatina C y anti-A β (Levy et al., 2001). Estos resultados pudieran sugerir que la cistatina C juega un papel inicial en la acumulación local de A β . La hipótesis de que la asociación de la cistatina C a A β juega un papel primario en la amiloidogénesis en la EA puede defenderse además con la observación de que la cistatina C tiene la capacidad intrínseca de formar fibrillas amiloideas. La interacción entre proteasas e inhibidores de proteasas también puede estar involucrada en la formación de amiloide y/o en la patogenia de cambios relevantes en los tejidos. Es probable que la deposición del inhibidor de proteasas cistatina C cause un desequilibrio entre las proteasas y sus inhibidores en las paredes de los vasos y contribuya de esta manera a la degeneración de los microvasos cerebrales (Levy et al., 2001).

El gen de la cistatina C, CST3, está localizado en la región 11.2 del brazo largo del cromosoma 20. Se ha descrito un polimorfismo en la posición 73 perteneciente al exón 1 del gen, con un cambio de guanina por adenina (Balbín et al., 1993). El polimorfismo lleva a la sustitución de alanina por treonina en el último aminoácido del péptido señal.

En un estudio reciente se analizaron 309 pacientes con EA y 134 sujetos sanos. El rango de edad de los enfermos era de 60 a 90 años y al analizar la muestra completa no se observaron diferencias entre las frecuencias alélicas o de genotipos de enfermos y controles (Crawford et al., 2000). Al subdividir en tres el grupo de los pacientes de acuerdo con la edad de comienzo de la enfermedad (de 60 a 69 años, de 70 a 79 años y de 80 años o mayores), pudo observarse la acumulación del genotipo GG en los pacientes de 80 años o mayores, lo que indica que el genotipo CST3-GG actúa como factor de riesgo para la aparición de la EA de debut tardío.

5.2. Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BChE) es una enzima hidrolítica que se expresa en el plasma y en la mayoría de los tejidos (Darvesh et al., 1998). Mientras en los cerebros normales se detectan niveles bajos de BChE, en los cerebros de pacientes con EA se encuentran grandes cantidades de BChE unidas a las placas amiloideas y los ovillos

neurofibrilares (Mesulam y Geula, 1990). La localización de BChE en placas y ovillos sugiere un origen extraneuronal, probablemente en la neuroglia. Además, la pérdida severa de neuronas colinérgicas en los cerebros de enfermos con EA se acompaña de niveles de BChE por encima de los normales (Perry et al., 1978).

Aunque la función principal de BChE hasta ahora sigue siendo desconocida, se sabe que participa en diferentes procesos neurobiológicos, como el crecimiento neurítico y la adhesión celular (Layer et al., 1993). Por su localización en las placas amiloideas y los ovillos neurofibrilares se piensa que pudiera participar en la transformación de la forma inicialmente benigna de A β a la forma neurotóxica (Guillozet et al., 1997).

El gen de esta glicoproteína de 574 amino ácidos está localizado en el cromosoma 3q26.1-26.2 y forma parte de un grupo de genes en ligamiento al cual pertenecen el gen de la transferrina, BChE, ceruloplasmina y alfa-2HS glicoproteína (Allderdice et al., 1991; Gaughan et al., 1991). Al menos se han descrito siete variantes genéticas de la BChE hasta el momento, de las cuales la variante K es la más frecuente (Bartels et al., 1992). El alelo BChE-K se caracteriza por una transición de guanina a adenina en la posición 1615, lo que causa un cambio aminoacídico de treonina por alanina en el codón 539. Este cambio se asocia a una reducción del 30% de la actividad enzimática de BChE (Rubinstein et al., 1978). Se ha encontrado el polimorfismo BChE-K en diferentes poblaciones con frecuencias de los homocigotos entre el 1% y el 4% (Gaffney y Campbell, 1994; Maekawa et al., 1997).

En 1997 se describió por primera vez el alelo BChE-K como factor de riesgo para la EA de comienzo tardío (Lehmann et al., 1997). El grupo de Lehmann y cols observaron una frecuencia alélica de BChE-K elevada en un grupo de 79 pacientes con EA_t en comparación con un grupo de 104 sujetos control y, además, la asociación se limitaba a aquellos casos de EA identificados como portadores del alelo APOE ϵ 4. En siete estudios en diferentes poblaciones se discutieron los resultados obtenidos por el grupo de Lehmann y sólo en uno de ellos se obtuvieron resultados similares, que confirmaban la asociación entre el alelo BChE-K y la EA, aunque no se detectó la asociación sinérgica entre el alelo BChE-K y el alelo APOE ϵ 4 (McIlroy et al., 2000).

Los resultados de los otros seis estudios no confirmaron ni la asociación entre el alelo BChE-K y la EA ni la interacción entre los alelos BChE-K y APOE ϵ 4 (Crawford et al., 1998; Hiltunen et al., 1998; Roses et al., 1998; Russ et al., 1998).

Para llegar a una conclusión en esta controversia, Wiebusch y cols estudiaron los polimorfismos de BChE-K y APOE en 135 pacientes con diagnóstico postmortem de EA y 70 controles libres de enfermedad neurológica (también con confirmación autopsica) (Wiebusch et al., 1999). El estudio puso de manifiesto una asociación importante entre el alelo BChE-K, el alelo APOE ϵ 4 y la EA. Mientras el alelo BChE-K, por sí solo, no presentaba una asociación significativa a la enfermedad, el alelo BChE-K (junto con el alelo APOE ϵ 4) presentaba odds-ratios de 12,7 en los pacientes entre 60 y 74 años de edad y de 17,5 en los pacientes de 75 años de edad o mayores. Wiebusch y cols concluían su trabajo postulando que el alelo K del gen BCHE es un factor de susceptibilidad para la EA y refuerza el riesgo definido por el alelo APOE ϵ 4 de una manera que es dependiente de la edad.

5.3. Catepsina D

La catepsina D (catD) es una proteasa ácida intracelular y se ha propuesto su implicación en la etiopatogenia de la EA por sus propiedades similares a la beta-secretasa in vitro, pues genera fragmentos de A β a partir de APP (Cataldo et al., 1997; Chevallier et al., 1997). En los cerebros de pacientes con EA catD se localiza en los endosomas tempranos (Cataldo et al., 1997), que son sitios de internalización y procesamiento inicial de APP (Peraus et al., 1997) y apoE (Cataldo et al., 1996). Además, catD genera in vitro fragmentos de tau con dominios de unión a los microtúbulos intactos (Kenessy et al., 1997) y la expresión de catD se encuentra elevada en las neuronas con ovillos neurofibrilares (Callahan et al., 1998). El gen de catD está localizado en la región 15.5 del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) y contiene 9 exones (Henry et al., 1989). En la posición 224, localizada en el exón 2 del gen de catD, se caracterizó un polimorfismo que consiste en el cambio de una citosina por una timina y resulta en una substitución de un residuo de alanina por un residuo de valina. Este polimorfismo se asocia a un aumento de la secreción de pro-catD y una alteración de la

maduración intracelular (Touitou et al., 1994). Ya que esta mutación podría tener consecuencias funcionales en términos de un incremento de la actividad enzimática, el procesamiento aumentado de APP generaría más cantidad de componentes amiloidogénicos, lo que a su vez elevaría el riesgo de padecer la EA.

En 1999 se llevó a cabo un estudio poblacional en el cual se estudiaron los polimorfismos de APOE y catD en dos grupos, uno de ellos compuesto por 102 pacientes con EA y 191 sujetos sanos (Papassotiropoulos et al., 1999). Los resultados de este estudio sugirieron que el genotipo catD, en particular la presencia del alelo catD-T, modifica significativamente el riesgo de padecer la EA. Además, el efecto del alelo catD-T es independiente del polimorfismo de APOE, aunque ambos factores actúan con asociación sinérgica (Papassotiropoulos et al., 2000). Los datos obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que catD posee las propiedades de una de las secretasas involucradas en el procesamiento de APP. Además, los resultados parecen sugerir efectos aditivos, pero independientes, de catD y apoE sobre el procesamiento de APP. Sin embargo, la asociación encontrada entre el gen de catD y la EA también pudiera apuntar hacia otro gen cercano al locus de catD.

Los resultados de otro estudio de dos grupos similares de pacientes con EA y controles en la población irlandesa no pudieron confirmar la asociación entre el gen de la catD y la EA (McIlroy et al., 1999). Las frecuencias alélicas para el alelo catD-T fueron de 0,079 en los enfermos y de 0,058 en los controles, sin que se identificasen diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario, los resultados de Papassotiropoulos et al., que describieron frecuencias alélicas de catD-T de 0,142 para el grupo de pacientes y de 0,068 para el grupo control, presentaban una acumulación significativa del alelo catD-T en el grupo de pacientes con EA.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Ya al describirse en el año 1991 la implicación directa del gen de APP en la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA), se supuso que hay genes adicionales involucrados en la patogenia de la EA, específicamente porque eran muy pocas las familias con EA que eran portadoras de una mutación en el gen de APP.

Diez años de investigaciones intensas han puesto de manifiesto que la EA es una enfermedad genéticamente heterogénea. Existen formas familiares de la enfermedad causadas por una mutación puntual en un único gen. Este gen, según las observaciones realizadas hasta ahora, puede ser el de APP, el de PS1 o el de PS2, cuyas mutaciones son en conjunto responsables de aproximadamente el 80% de los casos de EA familiar.

Por otro lado, se ha comprobado que el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE actúa como un importante factor de riesgo que explica aproximadamente el 50% de los casos de EA esporádica y tardía. El alelo $\epsilon 4$ confiere riesgo, pero su presencia no es ni imprescindible ni suficiente para causar la enfermedad. Otros factores genéticos interactúan con la apolipoproteína E y el resultado de esta interacción es la aparición de la enfermedad.

En relación con la etiopatogenia de la EA se están investigando los genes de muchas proteínas presentes junto a β -amiloide en las placas seniles, así como los genes de los receptores necesarios durante el metabolismo de los distintos factores involucrados. Para muchos de estos genes se han descrito polimorfismos responsables de conferir riesgo para la aparición de la EA.

La investigación de muchos loci de efecto menor que probablemente confieren riesgo genético para la EA ha llevado a la obtención de resultados controvertidos. Estas discrepancias se podrían explicar por las diferencias entre los pacientes en cuanto a la edad de comienzo de la enfermedad, por la heterogeneidad de los grupos de pacientes estudiados en las diversas poblaciones y por la incorrecta selección de los grupos de control en lo referente a la edad. Sólo un locus que confiere un riesgo mayor, como APOE, sería detectable en una muestra en la que no se distinga la edad de comienzo de la enfermedad y sin un grupo control correspondiente. Para la detección de una asociación entre la EA y genes con un efecto menor pudiera ser decisiva la división en subgrupos tanto de la muestra como de los controles.

El objetivo general de este trabajo ha sido, pues, el análisis exhaustivo de varios factores genéticos para determinar su papel en el desarrollo de diferentes tipos de EA y explorar una estrategia para la detección de la posible asociación entre loci de efecto menor y la EA. Para la caracterización de la EA familiar se determinó la frecuencia de mutaciones puntuales en los genes causantes de la enfermedad (APP, PS1 y PS2) en familias bien caracterizadas. El análisis de varios genes involucrados en la aparición de la EA esporádica se llevó a cabo en subgrupos con diferentes edades de comienzo de la enfermedad para investigar su papel real en el desarrollo de la EA.

2. OBJETIVOS CONCRETOS

1.- Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes de APP, PS1 y PS2 en la población analizada

Los tres genes se analizaron en familias caracterizadas con EA para detectar posibles mutaciones en uno de los genes causantes de la enfermedad, con el fin de determinar y comparar la frecuencia de mutaciones de estos genes en nuestra población .

2.- Conocer el papel del alelo $\epsilon 4$ de APOE en la población estudiada

Se obtuvieron las frecuencias alélicas de APOE $\epsilon 4$ en seis subgrupos de pacientes con EA para determinar su influencia real en cada uno de ellos y comprobar en qué grupo APOE $\epsilon 4$ es el factor genético más importante para el desarrollo de la enfermedad y en cuál no ejerce influencia.

3.- Determinar la influencia de otros polimorfismos del gen de APOE en la aparición de la EA

Se analizaron dos polimorfismos en el promotor del gen de APOE, uno de efectos reguladores positivos sobre la expresión del gen y el otro de efectos contrarios, para determinar si la mera presencia del alelo APOE $\epsilon 4$ confiere riesgo de padecer la EA. Además, se estudió un polimorfismo descrito recientemente en el exón 3 del gen.

4.- Comprobar el efecto de loci menores representados por los polimorfismos en los genes de PS1, BChE, catD y CST3 y en el promotor de APOE en el desarrollo de la EA en los diferentes subgrupos de EA

Se estudiaron los polimorfismos funcionales de los genes de PS1, BChE, catD y CST3 involucrados previamente en la etiopatogenia de la EA en los diferentes subgrupos de la EA para determinar en qué grupo de edad tienen un efecto detectable e importante.

5.- Agrupar los enfermos de Alzheimer en relación con los genotipos encontrados y determinar los diferentes subtipos de EA

Se analizaron los resultados de todos los estudios llevados a cabo para unificarlos y poder así diferenciar varios tipos o subtipos de EA.

III. SUJETOS Y MÉTODOS

8. SUJETOS

8.1. Pacientes

En el estudio fueron incluidos un total de 157 pacientes diagnosticados clínicamente de EA probable en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario “Germans Trias i Pujol” de Badalona. El rango de edad de los enfermos era de 48 a 84 años, con un promedio de 71,8 años. La proporción de mujeres a hombres entre los pacientes era de 1:1,6. En todos los enfermos el diagnóstico clínico se efectuó de acuerdo con los criterios del *National Institute of Neurological and Communicative Disorders* y de la *Stroke-Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann, 1984), así como los criterios del DSM-IV.

A fin de agrupar a los pacientes según posibles subtipos de la enfermedad, se procedió a dividir a los enfermos siguiendo los tres pasos siguientes:

- I- Los pacientes se dividieron de modo convencional en dos subgrupos: (1) enfermos con EA precoz (EAp), con la edad de comienzo de la enfermedad antes de los 65 años, y (2) enfermos con EA tardía (EAt), que debutaron a los 65 años de edad o más tarde.
- II- Los pacientes se dividieron en cuatro subgrupos separados por intervalos de 10 años, teniendo en cuenta la edad de comienzo de la enfermedad: (1) antes de los 60 años de edad, (2) entre los 60 y 69 años de edad, (3) entre los 70 y 79 años de edad y (4) a los 80 o más años de edad.
- III- Los pacientes se dividieron en seis subgrupos separados por intervalos de 5 años, donde la edad de debut de la EA era determinante: (1) menores de 60 años de edad, (2) entre los 60 y 64 años, (3) entre los 65 y 69 años, (4) entre los 70 y 74 años, (5) entre los 75 y 79 años y, finalmente, (6) de 80 años de edad o mayores.

8.1.1. Pacientes con EA familiar

Para el análisis de los genes causantes de la enfermedad fueron seleccionados 58 pacientes pertenecientes a familias con historia familiar positiva para la EA. 35 de ellos eran menores de 65 años cuando presentaron los primeros síntomas de la enfermedad y 23 tenían 65 o más años. Todos estos enfermos tenían al menos un familiar de primer

grado (padres, hermanos) y otro de segundo grado (abuelos, tíos, primos) con el diagnóstico clínico de posible o probable EA.

El grupo de los enfermos con EA familiar estaba formado por pacientes de edades comprendidas entre los 43 y 79 años, con un promedio de 69,9 años y una proporción de mujeres a hombres de 1:1,5.

1.1.2. Pacientes con EA esporádica precoz

En el grupo de pacientes con EA precoz se incluyeron los enfermos que debutaron con la enfermedad antes de los 65 años de edad. Este grupo estaba constituido por 46 pacientes, siendo el rango de edad de 48 a 64 años, el promedio de 59,7 años y la proporción de mujeres a hombres de 1: 1,4.

Los pacientes con EA precoz se dividieron en dos subgrupos: (1) subgrupo A con 25 pacientes menores de 60 años y (2) subgrupo B, con 13 pacientes entre los 60 y 64 años de edad.

8.1.1. Pacientes con EA esporádica tardía

En el grupo de pacientes con EA tardía se incluyeron los enfermos que debutaron a los 65 o más años de edad. Este grupo estaba constituido por 113 pacientes cuyo rango de edad era de 65 a 84 años, el promedio de 76,2 años y la proporción de mujeres a hombres de 1: 1,7.

Los pacientes con EA tardía se dividieron en tres subgrupos: (1) subgrupo C con 34 pacientes que tenían entre 65 y 69 años de edad cuando debutaron, (2) subgrupo D, que incluía 35 pacientes entre los 70 y 74 años de edad y (3) subgrupo E, con 44 pacientes de 75 o más años. Para analizar la influencia del polimorfismo de CST3 se procedió a dividir aun más el último subgrupo, quedando constituidos el subgrupo E, con 28 sujetos de edades comprendidas entre los 75 y 79 años, y el subgrupo F, integrado por 16 pacientes mayores de 80 años.

8.2. Controles

El grupo control se componía de un total de 119 sujetos. El rango de edad era de 50 a 84 años, con un promedio de 70,3 años, y la proporción de mujeres a hombres de 1:1,5. Los sujetos control no presentaban síntomas de trastornos neurodegenerativos y, además, estos individuos tenían antecedentes familiares de demencia.

El grupo control también se dividió en diferentes subgrupos mediante el análisis de la muestra de acuerdo con los tres pasos siguientes:

- I- Los controles se dividieron en dos subgrupos: (1) individuos menores de 65 años de edad y (2) individuos de 65 o más años de edad.
- II- El grupo control se dividió en cuatro subgrupos separados por intervalos de 10 años: (1) individuos menores de 60 años, (2) individuos entre los 60 y 69 años, (3) individuos entre los 70 y 79 años y (4) individuos de 80 o más años.
- III- Los individuos control se dividieron en seis subgrupos separados por intervalos de 5 años, donde la edad del debut de la EA era determinante: (1) individuos menores de 60 años de edad, (2) individuos entre los 60 y 64 años, (3) individuos entre los 65 y 69 años, (4) individuos entre los 70 y 74 años, (5) individuos entre los 75 y 79 años y, finalmente, (6) individuos de 80 o más años.

9. EXTRACCIÓN DE ADN

2.1. PREPARACIÓN

2.1.1. Soluciones stock necesarias para la preparación de los tampones de extracción

1.- 5M NaCl: 29,25 g de NaCl se disolvieron en 80 ml de agua destilada, llevando el volumen final a 100 ml. La solución se esterilizó mediante autoclave y se guardó a temperatura ambiente.

2.- 0.5M Tris: 6,05 g de Tris se disolvieron en 80 ml de agua destilada, llevando el volumen final a 100 ml. La solución se esterilizó mediante autoclave y se guardó a temperatura ambiente.

3.- 0.25M MgCl₂: 25 ml de 1M MgCl₂ se añadieron a 75 ml de agua destilada estéril y la solución se guardó a temperatura ambiente.

4.- 1.6M Sacarosa: 54,75 g de sacarosa se disolvieron en 40 ml de agua destilada, llevando el volumen final a 100 ml. La solución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm y se guardó a 4°C.

5.- 6M NaI: 89,94 g de NaI se disolvieron en 40 ml de agua destilada, llevando el volumen final a 100 ml. La solución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm y se guardó protegida de la luz.

6.- Etanol absoluto.

7.- Tritón X-100.

2.1.2. Preparación de las columnas

1.- Un microtubo de 1,5 ml se cortó a 0,5 cm aproximadamente debajo del cinturón de la tapa. El fondo se perforó con una aguja de jeringa gruesa o con la punta de tijeras muy finas.

2.- Un filtro GF/C (Whatmann) con un diámetro de 20 mm se cortó en cuatro partes y una de ellas se introdujo hasta el fondo del tubo perforado.

3.- La columna así preparada se esterilizó y se guardó en condiciones estériles hasta su uso.

2.1.3. El tubo colector de líquidos

Como tubos recolectores se utilizaron microtubos de 2 ml a los cuales se les había cortado la tapa.

2.2. EXTRACCIÓN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de muestras de sangre periférica de cada paciente y cada sujeto control en tubos Eppendorf de 1,5 ml. A 200 µl de sangre

total se añadieron 300 µl de tampón de lisis (5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, 0,5 M sacarosa, 1% Tritón X-100), se mezclaron mediante inversión repetida del tubo y se añadieron 200 µl de 6 M NaI. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se aplicó a una columna preparada con filtros GF/C (Whatmann) introducida en un tubo recolector, lo que se siguió de una centrifugación a 15000 rpm a +4°C. El filtro se lavó 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (70% etanol, 10 mM Tris, 10 mM NaCl) mediante centrifugaciones a 15000 rpm a +4°C. El último lavado se efectuó con 20 µl de H₂O desionizada y estéril, repitiendo la centrifugación. El tubo recolector se cambió por un tubo de almacenamiento de ADN marcado con el código de la muestra y el ADN fue extraído del filtro con dos aplicaciones de 40 µl de H₂O desionizada y estéril, con sus respectivas centrifugaciones.

La presencia de ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

10. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

10.1. APP

Para la amplificación de fragmentos específicos de ADN se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction – PCR). Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos de 0,5 ml en un volumen total de 15 µl para cada muestra. Cada tubo contenía 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 6,6 mM MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los exones 16 y 17 del gen de APP fueron:

APP-16U: TAg gCT TTg TCT TAC AgT gT

APP-16L: TTg gCA AgA CAA ACA gTA gT.

APP-17U: gTT ggg Cag AgA ATA TAC TgA

APP-17L: gCC TAA TTC TCT CAT AgT CT.

Para la amplificación de ambos fragmentos en una PCR-diplex y su ulterior análisis mediante PCR se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 97°C, 50 segundos a 59°C y 1 minuto y 10 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

La concentración de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose fragmentos de 227 y 319 pares de bases correspondientes a los exones 16 y 17, respectivamente.

10.2. PS1

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Se usaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación de los exones 3 a 12 del gen de PS1:

PS1-3U: CTg gAg gAg AAC ACA TgA AA

PS1-3L: ggA gAT gAT Aag TgA ATC CAg

PS1-4U: CTT gATT CTg CTg AgA ATC Tg

PS1-4L: ACA AAA CTC ATA CgT ACA gCT

PS1-5U: TgT Tgg Agg Tgg TAA TgT g

PS1-5L: CCC AAC CAT AAg AAg AAC Ag

PS1-6U: TCT gTA CTT TTT Aag ggT TgT

PS1-6L: ACT TCA gAg TAA TTC ATC ACC A

PS1-7U: AAA CAA ATT ATC AgT CTT ggg

PS1-7L: TTT Cag ggA AgT gTT TAA AA

PS1-8U: CAC CCA TTT ACA AgTT Tag C

PS1-8L: gAT gAg ACA AgT CCC CTg AA

PS1-9U: ATA CTT TgT gTg TCC AgT gCT

PS1-9L: AAA AgT TAC CTA CTT TCT gCA TT

PS1-10U: TgT AAC TTC CAC TTT CTC TTg A

PS1-10L: TgC ACA TAC TTT CCT CTg g

PS1-11U: ggT TgA gTA ggg Cag TgA T

PS1-11L: Tag CTg gAA TAT TTA ACC CAC

PS1-12U: gTC TTT CCC ATC TTC TCC A

PS1-12L: AAA CAT CCA Tgg gAT TCT AA.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 50 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los fragmentos correspondientes a 8 y 9 se amplificaron en una PCR diplex (DP1) y los exones 11 y 12 en una reacción similar (DP2), mientras que los exones 4, 5 y 6 se amplificaron en una PCR-triplex (TP1), igual que los exones 3, 7 y 10 (TP2), para su ulterior análisis por SSCP.

Después de la amplificación de todos los fragmentos en las PCRs multiplex su presencia fue verificada y su concentración estimada mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 3%. En la DP1 se visualizaron fragmentos de 224 y 148 pares de bases para los exones 8 y 9 respectivamente. En la DP2 la presencia de dos fragmentos de 318 y 209 pares de bases indicaba la correcta amplificación de los exones 11 y 12, mientras que la identificación de fragmentos de 320, 268 y 228 pares de bases

en la TP1 y de fragmentos de 310, 254 y 207 pares de bases en la TP2 demostraba los productos de amplificación de los exones 4, 5 y 6 y de los exones 3, 7 y 10.

10.3. PS2

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 4,2 mM MgCl₂, 2% de formamida (Sigma) y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los dominios transmembrana (TM) 2 y 5 del gen de PS2 fueron los siguientes (Levy-Lahad et al., 1995):

PS2TM2U: ggA CAC ACC CTC ggT ggg CC

PS2TM2L: gTg ggg CAg ACg gAg AgA A

PS2TM5U: gCA Tgg TgT gCA TCC CAC T

PS2TM5L: GgA CCA CTC Tgg gAg gTA.

Para la amplificación mediante PCR se usó el mismo programa que para la amplificación de los exones del gen de PS1, procediéndose a la amplificación de ambos fragmentos en una PCR-diplex para su ulterior análisis mediante SSCP. La presencia de los productos de PCR fue verificada y su concentración estimada mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 3%, visualizándose fragmentos de 190 y 135 pares de bases correspondientes a los TM2 y TM5, respectivamente.

10.4. APOE – polimorfismo común

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-

HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 7,5% de dimetilsulfoxid (DMSO, Sigma) y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de una parte del exón 4 del gen de APOE fueron:

APOE-NI: TCC Aag gAg CTg Cag gCg g

APOE-NII: GCT CgC ggA Tgg CgC TgA.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 45 segundos a 95°C, 50 segundos a 67°C y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose un fragmento de 244 pares de bases.

10.5. APOE – exón 3

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del exón 3 del gen de APOE fueron (Kamboh et al., 1999):

ApoEx3-U: Tgg ACg ggg TCA gAA ggA CCC TgA CC

ApoEx3-L: gCC CAC CAg gAg ggT CAA ggg CCA.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 45 segundos a 95°C y 45 segundos a 70°C y una extensión final de 5 minutos a 70 °C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose un fragmento de 284 pares de bases.

10.6. Promotor de APOE

El promotor de APOE contiene dos polimorfismos importantes en la etiopatogenia de la EA: (1) el polimorfismo -491AT en la posición -491 y (2) el polimorfismo Th1/E47 en la posición -219. Para la detección de estos polimorfismos se desarrolló una “nested” PCR. En el primer paso se amplificó un fragmento de 418 pares de bases con los siguientes oligonucleótidos:

APOE491A: CAC CAT gTT ggC CAg gCT ggT CTC AA

TH1/E47L: ggA ggA Agg Agg Tgg ggC ATA gAg g.

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen). Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto a 70°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Para la detección del polimorfismo -491AT se amplificó un fragmento de 227 pares de bases usando los siguientes oligonucleótidos (Artiga et al., 1998):

491AT-U: TgT Tgg CCA ggC Tgg TTT TAA

491AT-L: CTT CCT TTC CTg ACC CTg TCC,

Para la detección del polimorfismo Th1/E47 los oligonucleótidos usados fueron (Artiga et al, 1998):

TH1/E47U: CAg AAT ggA ggA ggg TgT CTC

TH1/E47L: ggA ggT ggg gCA TAg Agg TCT.

Las reacciones de PCR contenían 0,5 µl del producto de la primera PCR diluido 1:10, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 10% de DMSO (Sigma) y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen). El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 30 segundos a 95°C, de 30 segundos a 55°C, de 30 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 70°C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

10.7. Polimorfismo de PS1

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 10% de DMSO y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de la parte del intrón 8 del gen de PS1 fueron (Wragg et al., 1996):

PS1polU: CAC CCA TTT ACA AgT TTA gC

PS1polL: CAC TgA TTA CTA ATT Cag gAT.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 45°C y 45 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose un fragmento de 199 pares de bases.

8.1. CST3

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del exón 1 del gen CST3 fueron (Crawford et al., 2000):

CST3-U: gCg ggT CCT CTC TAT CTA gC

CST3-L: ggT CTA gAA CTC Agg gCA TTC CCg gAC A.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose un fragmento de 500 pares de bases.

8.2. BChE

Para detectar los posibles alelos de este polimorfismo del gen de BChE se usó una PCR “mutación-específica” (mutation specific PCR, MS-PCR). Cada uno de los oligonucleótidos para la cadena complementaria se diseñó para amplificar de forma específica el alelo presente (“W” en el caso del alelo salvaje y “K” en el caso del alelo mutado).

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 μ M de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 2% de DMSO (Sigma) y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del exón del gen de BChE fueron los siguientes (Wiebusch et al., 1999):

BCHE-K-U: CTg TAC TgT gTA gTT AgA gAA AAT ggC,

BCHE-K-K: ATg gAA TCC TgC TTT CCA CTC CCA TTC CgT

BCHE-K-W: ATC ATg TAA TTg TTC CAg CgT Agg AAT CCT gCT TTC
CAC TCC CAT TCT CC.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C y 50 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El resultado se obtuvo por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 3%, visualizándose un fragmento de 169 pares de bases en presencia del alelo “W” y de 149 pares de bases en presencia del alelo “K”.

8.3. *catD*

Las reacciones de PCR contenían 300 ng de ADN total, 10 pmol de cada oligonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM de cada dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2% de formamida (Sigma) y 0,5 unidades de Taq polimerasa (EcoGen).

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del exon 2 del gen de la *catD* fueron (McIlroy et al., 1999):

catD-U: gTg ACA ggC Agg AgT TTg gT

catD-L: ggg CTA AgA CCT CAT ACT CAC g.

Para la amplificación se usó el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C y 2 minutos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La presencia de los productos de PCR se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizándose un fragmento de 343 pares de bases.

9. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

9.1. APP

Para la digestión del fragmento amplificado del exón 17 de APP se utilizó la enzima de restricción BclI (New England Biolabs, Hardy y Allsop, 1991). El tampón de enzima 3 (NEB3, New England Biolabs) se preparó al 1x, siendo la concentración final de la enzima de 0,5u/μl. Se aplicaron 2 μl de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 50°C durante 2 horas.

En el caso de la mutación se crearía un sitio de restricción, y el producto de PCR de 355 pares de bases se cortaría en dos fragmentos de 208 y 147 pares de bases. En un individuo heterocigoto se detectarían tres bandas, en lugar de una en individuos sin mutación.

9.2. APOE - polimorfismo común

La enzima de restricción HhaI (New England Biolabs) se usó para la digestión del fragmento amplificado del exón 4 del gen de APOE (Roses et al., 1995). El tampón de enzima 4 (NEB4, New England Biolabs) se preparó al 1x y se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/μl. Se aplicaron 2 μl de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

Los patrones de banda esperados eran: genotipo ApoE 2.2, dos bandas de 81 y 91 pares de bases; genotipo APOE 2.3, tres bandas de 48, 81 y 91 pares de bases; genotipo APOE 3.3, dos bandas de 48 y 91 pares de bases; genotipo APOE 3.4, tres bandas de 48, 72 y 91 pares de bases; genotipo APOE 2.4, cuatro bandas de 48, 72, 81 y 91 pares de bases; y genotipo APOE 4.4, dos bandas de 48 y 72 pares de bases.

9.3. APOE – exón 3

La enzima de restricción MspI (New England Biolabs) se usó para la digestión del fragmento amplificado del exón 3 del gen de APOE (Kamboh et al., 1999). El tampón de enzima 2 (NEB2, New England Biolabs) fue preparado al 1x y se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/μl. Se aplicaron 2 μl de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

El alelo normal estaba representado por dos bandas de 194 y 90 pares de bases, mientras el alelo mutado se distinguía por dos bandas adicionales de 130 y 64 pares de bases.

9.4. APOE – promotor

El fragmento del promotor de APOE que contenía el polimorfismo -491AT se digirió con la enzima de restricción DraI (New England Biolabs; Artiga et al., 1998). El tampón de enzima 4 (NEB4, New England Biolabs) fue preparado al 1x y se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/ μ l. Se aplicaron 2 μ l de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

El alelo T del polimorfismo de -491AT se caracterizaba por una banda de 227 pares de bases que representa el fragmento de PCR sin digerir, mientras el alelo A se identificaba por una banda de 208 pares de bases.

El fragmento del promotor de APOE que contenía el polimorfismo Th1/E47 se digirió con la enzima de restricción TaqI (New England Biolabs; Artiga et al., 1998). El tampón de enzima TaqI (NEB TaqI, New England Biolabs) fue preparado al 1x conteniendo 1x de BSA. Se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/ μ l. Se aplicaron 2 μ l de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

El alelo G del polimorfismo de Th1/E47 se caracterizaba por una banda de 93 pares de bases correspondiente al fragmento de PCR sin digerir, mientras el alelo T se identificaba por una banda de 73 pares de bases.

9.5. Polimorfismo de PS1

La enzima de restricción BamHI (New England Biolabs) se usó para la digestión del fragmento amplificado del intrón 8 del gen de PS1 (Wragg et al., 1996). El tampón de enzima BamHI (NEB BamHI, New England Biolabs) fue preparado al 1x conteniendo 1x de BSA. Se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración

final de 0,5 unidades/ μ l. Se aplicaron 2 μ l de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

El alelo 1 del polimorfismo de PS1 se caracterizaba por una banda de 199 pares de bases correspondiente al fragmento de PCR sin digerir, mientras el alelo 2 se identificaba por una banda de 181 pares de bases.

9.6. CST3

La enzima de restricción SacII (New England Biolabs) se usó para la digestión del fragmento amplificado del exón 1 del gen CST3 (Crawford et al., 2000). El tampón de enzima 4 (NEB4, New England Biolabs) fue preparado al 1x. Se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/ μ l. Se aplicaron 2 μ l de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

Tres patrones de banda diferentes caracterizaban los tres genotipos posibles de la cistatina C: (1) el genotipo GG, con dos bandas de 357 y 143 pares de bases, (2) el genotipo AG, con tres fragmentos de 500, 357 y 143 pares de bases y (3) el genotipo AA, con un único fragmento de 500 pares de bases correspondiente al producto de PCR sin digerir.

9.7. catD

La enzima de restricción MwoI (New England Biolabs) se usó para la digestión del fragmento amplificado del exón 2 del gen de catD (McIlroy et al., 1999). El tampón de enzima MwoI (NEB MwoI, New England Biolabs) fue preparado al 1x. Se diluyeron 20 unidades de enzima hasta una concentración final de 0,5 unidades/ μ l. Se aplicaron 2 μ l de enzima diluida por muestra y las muestras fueron digeridas a 37°C durante la noche.

Dos bandas de 168 y 82 pares de bases caracterizaban el alelo catDC, mientras una banda de 250 pares de bases distinguía el alelo catDT.

10. ELECTROFORESIS

10.1. Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (Ecogen) en tampón TBE 1x (98 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) al porcentaje necesario para cada aplicación (Maniatis et al., 1982):

- (1) ADN total, en geles de agarosa de resolución media al 0,8%.
- (2) Productos de PCR de un tamaño mayor de 180 pares de bases en geles de agarosa de resolución media al 1,5%.
- (3) Productos de PCR pequeños y fragmentos de restricción mayores de 150 pares de bases (exón 3 de APOE, catD, CST3), en geles de agarosa de resolución media al 2%.
- (4) Fragmentos de restricción con tamaños entre los 70 y 150 pares de bases, o fragmentos más grandes con sólo 10 a 20 pares de bases de diferencia entre sus tamaños (promotor de APOE, BchE, polimorfismo de PS1, ACT), en geles de agarosa de alta resolución al 3%.

Los geles contenían 0,4 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma). Se mezclaron 10 µl de cada muestra con 4 µl de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa, 0,01M EDTA pH 8,0, 0,5% SDS) y la electroforesis se llevó a cabo en minicubetas para electroforesis horizontal (EcoGen) usando tampón TBE 1x durante 60 minutos a 90 voltios, con un marcador de 100 pares de bases (Gibco BRL) para verificar el tamaño de los fragmentos analizados. Se visualizó el ADN mediante un transiluminador de luz ultravioleta y la imagen fue captada con el sistema de análisis de imagen “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120” (Kodak).

10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la resolución de los fragmentos menores de 100 pares de bases y con poca diferencia de tamaño entre sí fue necesario el uso de geles de poliacrilamida al 8% (acrilamida:bisacrilamida=19:1, AmershamPharmaciaBiotech, Maniatis et al., 1982). El sistema para electroforesis vertical usado fue el MiniProtein (Biorad), con dos geles para 10 muestras cada uno. Tras la aplicación de 10 µl de muestra mezclada con 5 µl de tampón de carga, la muestra entraba en el gel a 100 voltios a temperatura ambiente.

Luego, la electroforesis se mantenía a 150 voltios a +4°C hasta que el bromofenol azul del tampón de carga salía del gel. El marcador de 50 pares de bases (Gibco BRL) sirvió de referencia para los tamaños de los fragmentos obtenidos. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con 0,4 mg/ml de bromuro de etidio y se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen fue después captada y analizada con el sistema de análisis de imagen “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120” (Kodak).

11. SSCP

11.1. SSCP en minigeles y PhastSystem

Los productos de PCR fueron diluidos con tampón para SSCP (0,1% bromofenol azul, 0,1% xilen xianol y 98% de formamida desionizada) hasta una concentración aproximada de 10 ng/μl. Las muestras fueron desnaturalizadas mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos seguido por rápido traslado a hielo.

Para el análisis de las PCR-díplex de los genes de APP y PS2 se utilizaron minigeles prefabricados con gradiente de concentración de poliacrilamida de 8 a 25% (Amersham Pharmacia Biotech). Tras someter a los geles a una pre-carrera durante 100 horas-voltio (volt-hours, Vh) a 400 voltios, se aplicó 1 μl de cada muestra con peines preparados para 12 muestras. El voltaje para las SSCP fue de 400 voltios a 4°C durante 90 Vh en el caso de los TM2 y TM5 del gen de PS2 y de 400 voltios a 8°C durante 150 Vh para los exones 16 y 17 del gen de APP.

Los resultados obtenidos se visualizaron mediante tinción de plata.

6.2. SSCP en geles de poliacrilamida en un secuenciador manual

Las PCR-multiplex de PS1 se analizaron por SSCP en geles de tamaño más grande que los minigeles de PhastSystem para obtener mejor resolución para cada uno de los fragmentos y no tener que renunciar al análisis de varios exones a la vez. Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (acrilamida:bisacrilamida=29:1, Amersham Pharmacia Biotech) con 20 pocillos en placas de 21 cm para el MacroPhor System, que

es un secuenciador manual (Pharmacia Biotech) con sistema de refrigeración en una de las dos placas que soportan el gel.

Para ello la placa refrigeradora se trató con silano repelente para prevenir la adhesión de la poliacrilamida a la misma, lo cual hubiera imposibilitado su siguiente tinción y análisis. Se esparcieron 5 ml de silano repelente por la placa con la ayuda de un papel absorbente, y después de su acción durante 5 minutos se eliminaron los restos con etanol absoluto. En la otra placa se aplicó un tratamiento con silano adherente para la unión de la poliacrilamida a esta placa y la facilitación de su despegue y tinción con nitrato de plata. Se añadieron 9,4 μ l de silano adherente a 2,5 ml de etanol absoluto y 675 μ l de ácido acético al 10%, que fueron mezclados y esparcidos por la placa a tratar con un papel absorbente. Después de cinco minutos se eliminaron los restos de silano con etanol absoluto.

Se colocó la placa refrigerada en posición horizontal con los espaciadores de un grosor de 0,4 mm a cada lado. La otra placa, tratada con silano adherente, fue deslizada desde la parte inferior de la placa refrigeradora hacia arriba vertiendo la acrilamida de un vaso de precipitado lentamente. Al final, ambas placas fueron unidas a presión usando presillas y se insertó el peine de 20 pocillos entre ellas. Después de una hora de polimerización se insertaron las placas unidas en el equipo y se añadió el tampón de 0,5xTBE a los recipientes correspondientes. A continuación se retiró el peine y se cargaron los pocillos con el tampón de carrera.

Los productos de PCR se diluyeron con tampón para SSCP (0,1% bromofenol azul, 0,1% xilen cianol y 98% de formamida desionizada) hasta una concentración aproximada de 100ng/ μ l. Las muestras se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos seguido por traslado rápido a hielo. Se cargaron 15 μ l de muestra en cada pocillo.

El análisis por SSCP de la PCR-triplex 1 (exones 4, 5, 6) se realizó a 4°C, aplicando 1000 voltios durante 2 horas y 30 minutos. La PCR-triplex 2 (exones 3, 7, y 10) se analizó a 10°C y 1000 voltios durante 2 horas y las PCRs diplex 1 y 2 (exones 8, 9 y exones 11, 12, respectivamente) a 12 °C y 1000 voltios durante 1 hora y 50 minutos.

Los resultados obtenidos se visualizaron mediante tinción de plata.

6.3. SSCP en geles de poliacrilamida en un sistema de electroforesis horizontal

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% para el análisis de los fragmentos menores de 200 pares de bases y las TGGE perpendiculares y geles al 10% para fragmentos de 200 o más pares de bases conteniendo 0,1xTBE, 2% glicerol y 7M urea entre las placas destinadas a este fin. Una de estas placas contenía los pocillos pegados (un único pocillo para la TGGE perpendicular y 8, 12 o 18 pocillos para la TGGE paralela) y antes de su uso había que tratarla con una solución repelente (Acryl-Glide solution, Biometra). A la otra placa se adhería, mediante una gota de agua, una película de plástico tratada con una solución que permitía que el gel se adhiriera al plástico y, tras la tinción, pudiera guardarse.

12. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

La tinción de fragmentos de ADN con plata se llevó a cabo en siete pasos a temperatura ambiente:

- (1) **FIJACIÓN:** Los fragmentos de ADN se fijaron en los geles de poliacrilamida adheridos mediante silano a una placa de vidrio o a un plástico, en una solución de ácido acético al 10% (EcoGen) durante al menos 5 minutos en un agitador.
- (2) **LAVADOS:** Los geles se lavaron tres veces durante 1 minuto en agua desionizada.
- (3) **TINCIÓN:** Los geles se incubaron durante 30 minutos en una solución de plata al 1% usando un agitador.
- (4) **LAVADO:** Este lavado fue de sólo 10 segundos con agua desionizada.
- (5) **REVELADO:** Los fragmentos de ADN se revelaron con una solución de carbonato de sodio (EcoGen) al 2,5% conteniendo 0,4 µl/ml de formaldehído (Sigma) al 37%. La solución fue cambiada 3 veces, prolongándose en cada paso el contacto de la solución con los geles.
- (6) **PARADA:** La reacción de revelado fue preparada en una solución de ácido acético (EcoGen) al 5%, al menos durante 10 minutos.
- (7) **CONSERVACIÓN:** Los geles fijados al plástico (geles del PhastSystem, geles para TGGE) pueden conservarse protegidos de la luz durante un tiempo muy prolongado.

Para evitar que la poliacrilamida se fragmente al secarse, se incuban los geles durante 30 minutos como mínimo en una solución de ácido acético al 5% y de glicerol (EcoGen) al 12,5%.

8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

8.1. Preparación de la muestra

Para la eliminación de restos de oligonucleótidos de la reacción de PCR, los productos de PCR a secuenciar se pasaron por columnas de sefadex 300 de alta resolución (S-300 HR, Amersham Pharmacia Biotech). Las columnas se colocaron en tubos de Eppendorf limpios y se centrifugaron a 3000 rpm durante un minuto para eliminar el tampón sobrante. Luego se aplicaron entre 30 y 50 μ l de la muestra a la columna, que fue colocada en un tubo Eppendorf nuevo y se repitió la centrifugación a 3000 rpm durante 1 minuto. La concentración del producto de PCR limpio se calculó mediante electroforesis, para usar la cantidad adecuada en la reacción de PCR.

8.2. Secuenciación en AlfExpress™

Cada reacción de secuenciación se componía de cuatro tubos, uno para cada nucleótido: A, C, G y T. Se preparó una mezcla de 17 μ l conteniendo 1x del tampón de secuenciación, 1,5 pmol/ μ l del oligonucleótido marcado con Cy5 en 5' prima, 1 unidad de Taq-polimerasa y entre 20 y 50 ng de producto de PCR. Se añadieron 4 μ l de esta mezcla a 2 μ l de cada mezcla de d/ddNTPs (d/ddATP, d/ddCTP, d/ddGTP, d/ddTTP). El programa para la secuenciación cíclica consistía en una desnaturalización inicial de 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, de 20 segundos a 58°C y de un minuto a 72°C. Se añadieron 4 μ l de tampón de carga a cada tubo y, tras la mezcla, se desnaturalizaron las muestras a 95°C durante 4 minutos y fueron trasladadas inmediatamente después al hielo. Finalmente, se cargaron 8 μ l de cada muestra en cada pocillo. La secuenciación se llevó a cabo a 2500 voltios durante 4 a 6 horas, dependiendo del tamaño de cada fragmento.

8.3. Secuenciación en ABIPRISM™

La secuenciación en ABIPRISM™ se llevó a cabo con la utilización del kit de secuenciación cíclica BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer). A 4 µl del tampón BD (BigDye), que contenía dNTPs, ddNTPs marcados y Taq polimerasa, se añadieron 10 pmol/µl del oligonucleótido y de 20 a 50 ng de producto de PCR, hasta un volumen total de 10 µl. Para la secuenciación de fragmentos del gen de APOE, se añadieron 5% de DMSO (Sigma) a la reacción de secuenciación. El programa de secuenciación cíclica se componía de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C y de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a la temperatura de *annealing* específica para cada producto de PCR (58°C para la PS1 y la PS2, 59°C para el APP, 67°C para el APOE), seguido por una extensión durante 2 minutos a 60°C.

Después de la amplificación los productos de secuenciación se precipitaron para su reconstitución en el tampón de carga. A los 10 µl de volumen total se añadieron 3,3 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 25 µl de etanol absoluto. Después de mezclar vigorosamente los tubos, se incubaron durante 15 minutos en hielo y se centrifugaron durante 30 minutos a 15.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se desechaba y el precipitado se lavaba con 200 µl de etanol al 70% durante 2 minutos a 15.000 rpm a 4°C. Tras desechar el sobrenadante, los precipitados se secaban con los tubos abiertos en una estufa de 37°C. Si la secuenciación no se realizaba en el mismo día, los tubos se guardaban a -20°C hasta su resuspensión. Los precipitados se resuspendían en 25 µl del tampón de TCR (Perkin Elmer) y las muestras se desnaturalizaban durante 5 minutos a 95°C y se llevaban a hielo seguidamente.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

9.1 Preparación de la población

Para controlar el efecto de la edad sobre la influencia de los factores genéticos analizados en esta muestra, se procedió a dividir los grupos de pacientes y controles en subgrupos edad-dependientes al analizar los resultados. Este análisis se llevó a cabo en tres pasos.

En el primer paso (paso I), se dividió a los pacientes con EA en dos subgrupos, dependiendo de la edad de comienzo de la enfermedad. Los pacientes que debutaron antes de los 65 años quedaron encuadrados en el subgrupo de la EA precoz, mientras que los enfermos que presentaron los primeros síntomas de la enfermedad a partir de los 65 años fueron incluidos en el subgrupo de la EA tardía. Asimismo, se dividió el grupo control en dos subgrupos: individuos control menores de 65 años de edad e individuos control de 65 o más años de edad.

En el paso intermedio (paso II), los resultados se analizaron cuatro subgrupos de pacientes diferentes, así como los correspondientes subgrupos de controles: (1) pacientes y controles menores de 60 años de edad, (2) controles y pacientes entre los 60 y 69 años de edad, (3) pacientes y controles entre los 70 y 79 años de edad, y (4) pacientes y controles de 80 o más años de edad.

En el paso último paso (paso III), el subgrupo 1 incluía pacientes con una edad inferior a los 60 años al debut de la enfermedad y el respectivo subgrupo control incluía individuos sanos menores de 60 años de edad. El subgrupo 2 se componía de enfermos entre los 60 y 64 años de edad y sus respectivos controles, el subgrupo 3 de enfermos entre los 65 y 69 años de edad y sus respectivos controles, el subgrupo 4 de enfermos entre los 70 y 74 años de edad y sus respectivos controles, el subgrupo 5 de enfermos entre los 75 y 79 años de edad y sus respectivos controles y, finalmente, el subgrupo 6 de individuos de 80 o más años de edad.

9.2. La prueba de chi-cuadrado

Se utilizó la prueba de chi-cuadrado del programa estadístico SPSS, versión IX, para validar las diferencias encontradas entre las frecuencias de los diferentes genotipos en los grupos y subgrupos de enfermos y controles. Igualmente se analizaron las diferencias entre las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en los grupos y subgrupos de los enfermos y controles.

9.3. Prueba de regresión logística

Se aplicó la prueba de regresión logística del programa estadístico SPSS, versión IX, para analizar la asociación entre la EA y los diferentes marcadores genéticos. La EA era la variable dependiente en estos análisis, en tanto que las principales variables independientes de interés eran cambiantes: (1) la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4; (2) la presencia o ausencia del genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4; (3) la presencia o ausencia del genotipo PS1 1-1, incluyendo la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4 como variable independiente adicional; (4) la presencia o ausencia de alelo BChE-K, incluyendo la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4 como variable independiente adicional; (5) la presencia o ausencia del alelo catD-T, (6) la presencia o ausencia del alelo CST3-A, incluyendo la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4 como variable independiente adicional.

9.4. Análisis multivariante

En este proyecto se aplicaron análisis multivariante para obtener las correcciones necesarias en un estudio de múltiples marcadores genéticos en la misma población. Los resultados de estos análisis se expresaron en valores de odds-ratio (OD) y se obtuvieron para los polimorfismos del intrón 8 de PS1, BChE, catD y los dos polimorfismos analizados en el promotor de APOE.

IV. RESULTADOS

1. Genes causantes de la EA

Hasta ahora se han descrito tres genes (APP, PS1 y PS2) cuyas mutaciones causan la EA. Se estima que las mutaciones en estos tres genes son responsables del 80% aproximadamente de los casos de EA familiar. En el presente estudio se ha investigado la presencia de mutaciones en estos tres genes en 35 pacientes con EA familiar precoz. Asimismo, se han analizado los genes APP y PS2 en 23 pacientes con EA familiar tardía, ya que se han descrito mutaciones en estos dos genes en familias con EA de debut tardío.

1.1. El gen de APP

Entre los genes responsables de la EA, el gen APP fue el primero en describirse. Poco tiempo tras su descubrimiento y análisis mutacional en diferentes familias con EA conocidas y bien caracterizadas, se comprobó que la frecuencia de mutaciones en este gen en diferentes poblaciones es muy baja (del 2 al 5%). En este trabajo hemos investigado la mutación más frecuente de APP mediante restricción y las mutaciones nuevas de APP mediante SSCP.

1.1.1. Detección de la mutación V717I mediante restricción

La mutación V717I en el exón 17 del gen APP fue una de las primeras que se describieron y se repetía en familias de diferente origen étnico. Para la detección de esta mutación se amplificó un fragmento de 355 pares de bases del gen APP que contenía el exón 17 y se digirió a continuación con la enzima de restricción BclI. El ADN de los 58 pacientes con EA familiar se analizó mediante PCR y restricción, detectándose la presencia de esta mutación en una enferma (Figura 1).

La paciente presentó un debut precoz de la EA, habiendo comenzado los primeros síntomas a los 56 años de edad. El curso de la enfermedad fue rápido durante los primeros estadios y se enlenteció a partir de la fase V, llevando la paciente ya un total de diez años afectada.

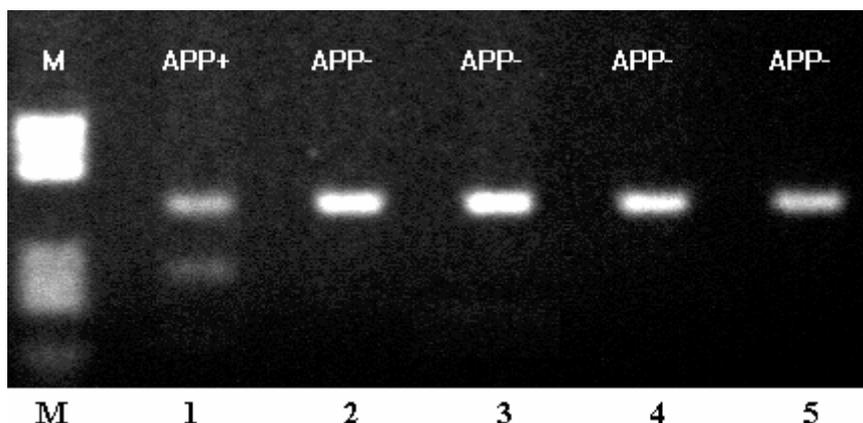


FIGURA 1: *Detección de la mutación V717I mediante restricción.* El carril M contiene el marcador de peso molecular pBR322 digerido con HaeIII. En los carriles 2 - 5 se observan productos de PCR intactos después de la incubación con la restrictasa BclI, indicando la ausencia de la mutación. El carril 1 contiene una muestra positiva en la cual, después de la restricción, se observa aparte de la banda de 355 pb una banda de 208 pb, lo que coincidía con el patrón de bandas descrito para un individuo heterocigoto para esta mutación.

1.1.2. Detección de mutaciones mediante SSCP

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en una PCR diplex, amplificando los exones 16 y 17 del gen APP en una misma reacción. El análisis por SSCP puso de manifiesto en tres casos un patrón de bandas que no coincidía con el del resto de las muestras analizadas (Figura 2A-C). La secuenciación de las tres muestras que habían resultado positivas mediante SSCP permitió detectar la presencia de dos mutaciones diferentes.

Ambas mutaciones eran intrónicas y estaban situadas en el intrón 16, una de ellas en la posición -65, hacia el exón 17 (Figura 3C y D). Esta mutación se repetía en dos de los pacientes, en los cuales la enfermedad había debutado después de los 65 años de edad. La segunda mutación estaba situada en la posición -75, hacia el exón 17 (Figura 3B) y el paciente tenía 63 años cuando se observaron los primeros síntomas de la EA.

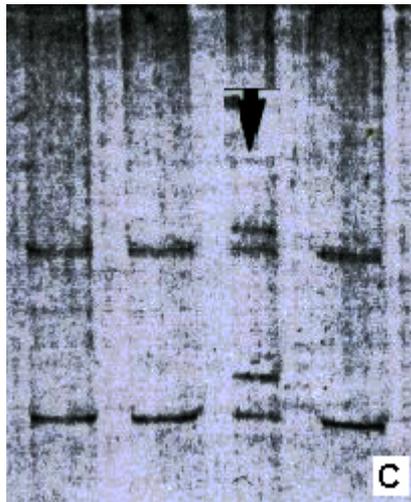
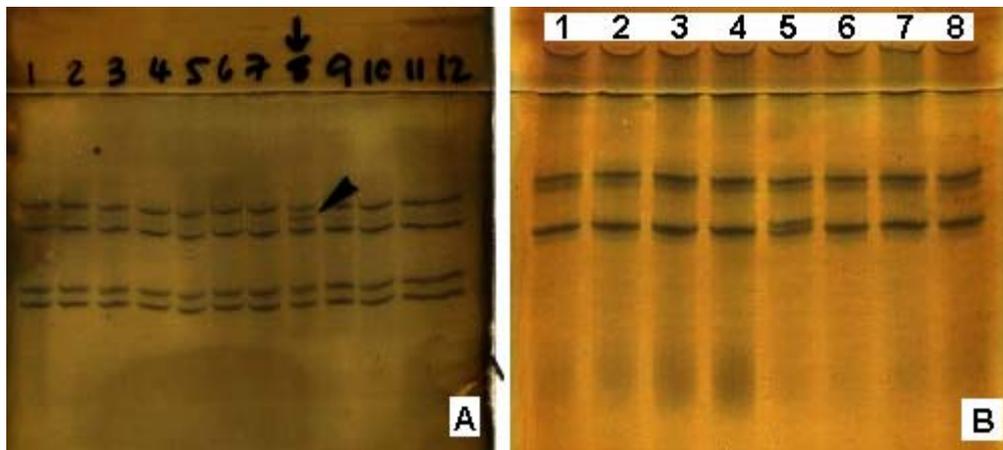


FIGURA 2: Análisis de APP por SSCP. (A) En el carril 8 se observa un patrón de bandas diferente que en el resto de las muestras. (B) El patrón de bandas del carril 5 sugiere la presencia de una mutación. (C) El carril indicado por una flecha presenta un total de cuatro bandas en lugar de dos, como en el resto de las muestras.

(A) y (B): SSCP en minigeles del PhastSystem, teñidos con nitrato de plata.

(C): SSCP en un secuenciador manual utilizando placas de 21 cm de longitud.

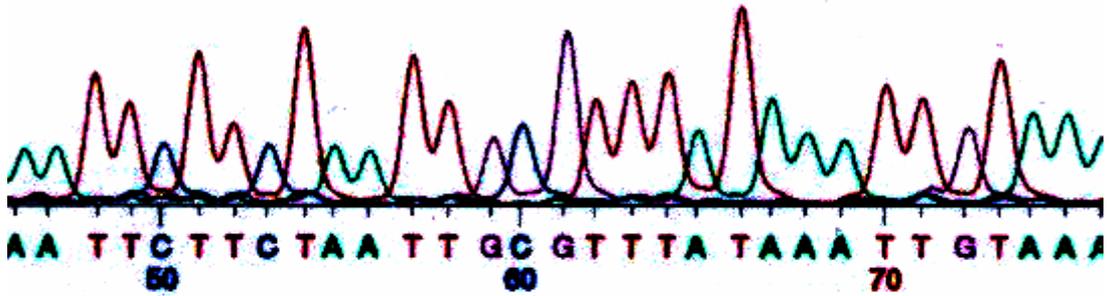


Al ser ambas mutaciones intrónicas, es muy poco probable que se trate de mutaciones funcionales, ya que no hay alteración directa de la estructura primaria de APP. Para determinar si una de estas mutaciones es patológica, sería necesario estudiar familiares (afectados y no afectados) de los pacientes. Si se repitieran las mutaciones en los familiares afectados pero no en los familiares sanos, se podría proponer que se trata de mutaciones patológicas que afectarían, por ejemplo, al splicing normal de la proteína.

La detección de un solo portador de una mutación de APP entre los 58 pacientes analizados representa el 1,7% de la muestra y coincide con la incidencia de mutaciones causantes de la EA en este gen (del 2 al 5%).

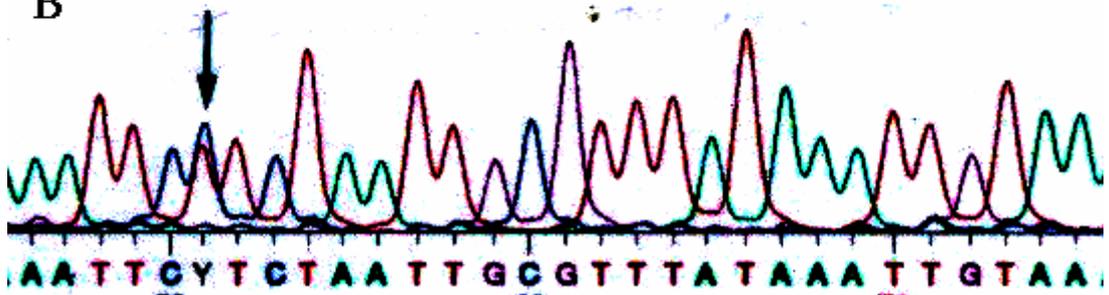
DATA\121297.AL F Clone: 7. (R)

A



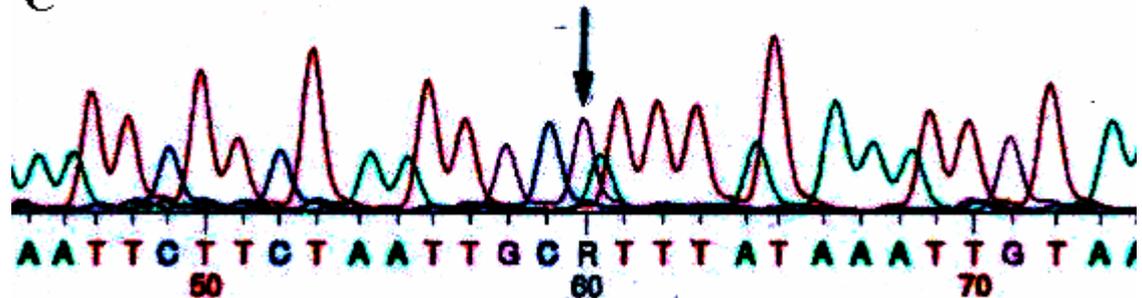
DATA\121297.AL F Clone: 8. (R)

B



DATA\11397.AL F Clone: 1. (R)

C



DATA\11397.AL F Clone: 2. (R)

D

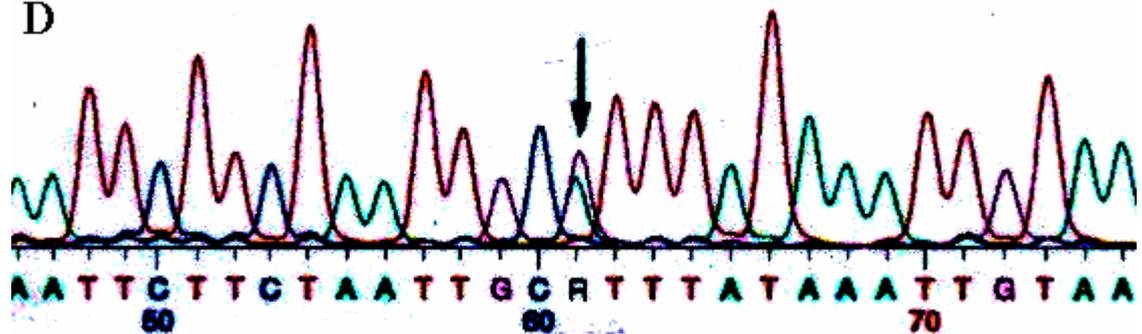


FIGURA 3: *Secuenciación del exón 17 de APP incluyendo partes de los intrones 16 y 17. (A) Secuencia de una muestra control sin alteraciones en su secuencia. (B) Muestra con una mutación C → T en la posición -75 (flecha) del intrón 16 de APP. (C) y (D) Dos muestras que presentaban diferentes patrones en el análisis por SSCP con la misma mutación A → G en la posición -65 (flecha) del intrón 16 de APP.*

1.2. El gen PS1 y la detección de sus mutaciones mediante SSCP

Hasta el momento se conocen 69 mutaciones de PS1 en 108 familias. Todas estas mutaciones son patogénicas y, en cada familia, los miembros portadores de una mutación desarrollarán la EA, que, en la gran mayoría de los casos, se presenta a edades muy tempranas (entre los 40 y los 50 años).

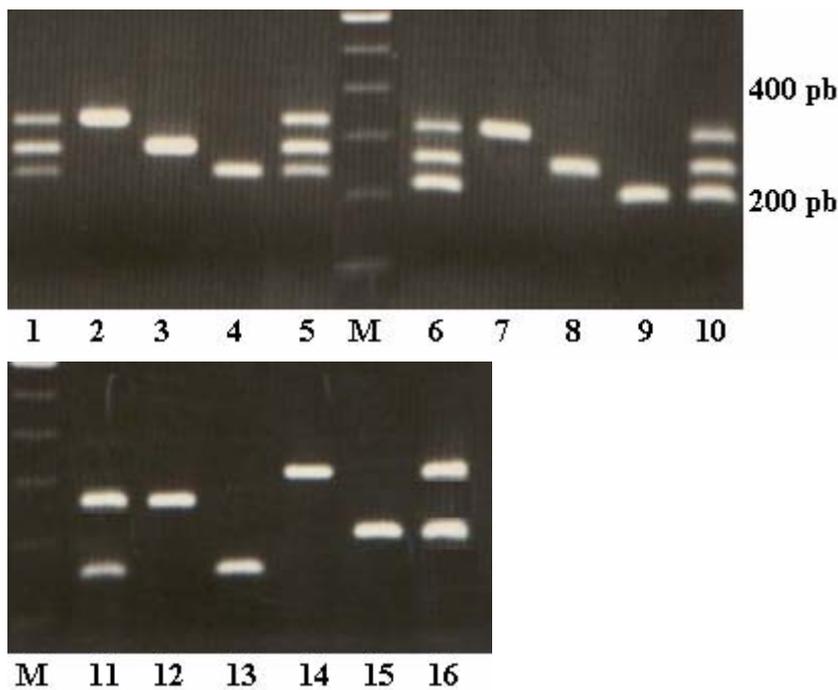


FIGURA 4: *PCRs multiplex, diseñadas para la detección rápida de mutaciones en el gen de PS1. Carriles M: marcador de 100 pares de bases. Carriles 1 y 5: PCR triplex 1, incluyendo los exones 4, 5 y 6. Carril 2: exón 4 (320 pb), carril 3: exón 5 (268 pb) y carril 4: exón 6 (228 pb). Carriles 6 y 10: PCR triplex 2, incluyendo los exones 3, 7 y 10 de la PS1. Carril 7: exón 3 (310 pb), carril 8: exón 7 (254 pb) y carril 9: exón 10 (207 pb). Carril 11: PCR diplex 1, incluyendo los exones 8 (carril 12, 224 pb) y 9*

(carril 13, 148 pb). Carril 14: PCR diplex 2, incluyendo los exones 11 (carril 115, 318 pb) y 12 (carril 16, 209 pb).

Para detectar mutaciones en uno de los diez exones codificantes de PS1 se desarrollaron dos PCR-diplex (DP) y dos PCR-triplex (TP). Específicamente, se amplificaron los exones 8 y 9 mediante DP1, los exones 11 y 12 mediante DP2, los exones 4, 5 y 6 mediante TP1, y los exones 3, 7 y 10 mediante TP2 (Figura 4). Al recurrir a SSCP para el análisis de estas PCR multiplex de los 35 pacientes con EA familiar precoz, se detectó una única mutación con un patrón de bandas anormal en el exón 4 (Figura 5A). La secuenciación de la muestra reveló que se trataba de una mutación silente, al estar sustituida una citosina por una timina en la posición 234 de la secuencia del gen (Figura 5B). Esta sustitución corresponde a la tercera posición del triplete; ambos tripletes (GGC y GGT) codifican una glicina en el codón 78 de la proteína.

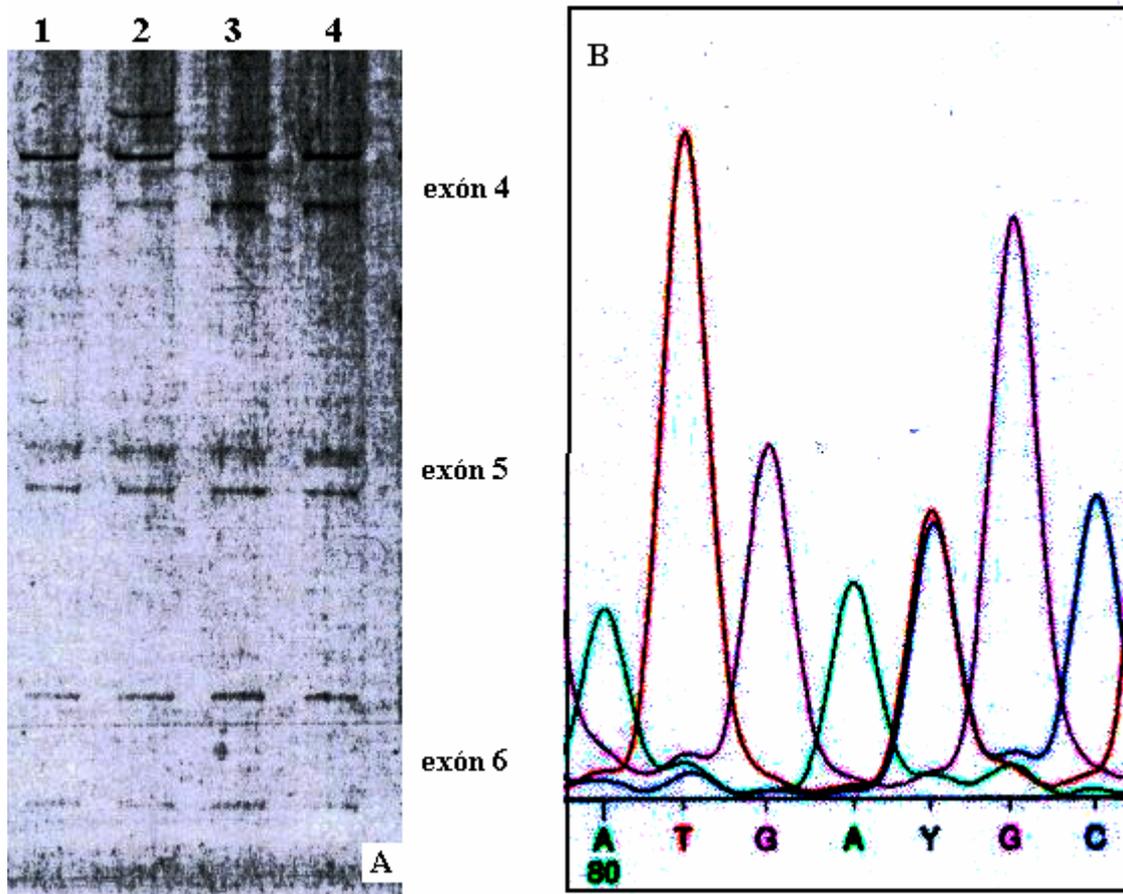


FIGURA 5: SSCP y secuenciación del exón 4 de la PS1. (A) Análisis de la PCR-triplex 1, conteniendo los exones 4, 5 y 6, por SSCP en el secuenciador manual con placas de 21 cm. El exón 4 en el carril 2 presenta una banda adicional, indicando la presencia de una mutación. (B) Secuenciación del exón 4 detectado como positivo por SSCP. Se observa la presencia de una timina y una citosina en la posición 234, lo cual representa una mutación silente al tratarse de la tercera posición del triplete (GGC y GGT, ambos codifican una glicina).

1.3. El gen PS2 y la detección de sus mutaciones mediante SSCP

Hasta el momento se han detectado seis mutaciones diferentes en el gen PS2 en siete casos con EA familiar. Cuatro de estas seis mutaciones están localizadas en dos "hot spots" ("puntos calientes"): TM2 y TM5. Aunque la mayoría de estas mutaciones se identificaron en individuos que debutaron antes de los 65 años de edad, algunos de los miembros afectados de la familia portadora de la mutación N141I en el dominio transmembránico 2 (TM2) presentaron los primeros síntomas de la EA después de los 75 años.

Por estos motivos, se analizaron tan sólo los dos dominios transmembrana descritos como "hot spots", tanto en los 35 pacientes con EA familiar precoz como en los 23 pacientes con EA familiar tardía.

En una PCR duplex se amplificaron los hot spots TM2 y TM5, que forman parte de los exones 5 y 7, respectivamente. En dos casos la SSCP presentó un patrón de bandas diferentes al del resto de las muestras analizadas: la primera mutación detectada se encontraba en el exón 5 (TM2) (Figura 6A) y la segunda mutación en el exón 7 (TM5) (Figura 6B).

El resultado de la secuenciación de la muestra con cambios en TM2 fue la identificación de una nueva mutación de PS2 (Figura 7A), en la que se sustituía una guanina por una adenina en la posición 442 del gen. Dicha mutación provocaba el cambio de una valina por una isoleucina en el codón 148 (V148I) de la proteína, a una distancia de siete aminoácidos de la primera mutación (mutación N141I) descrita en el gen PS2. El paciente afectado debutó a los 76 años, lo cual concuerda con la otra mutación capaz de causar EA tardía descrita en TM2. La secuenciación de TM5 en la

muestra cuya SSCP presentaba un patrón de bandas alterado puso de manifiesto que se trataba de una mutación silente (Figura 7B), donde una timina en la posición 711 estaba sustituida por una citosina, con permanencia de una serina en el codón 237.

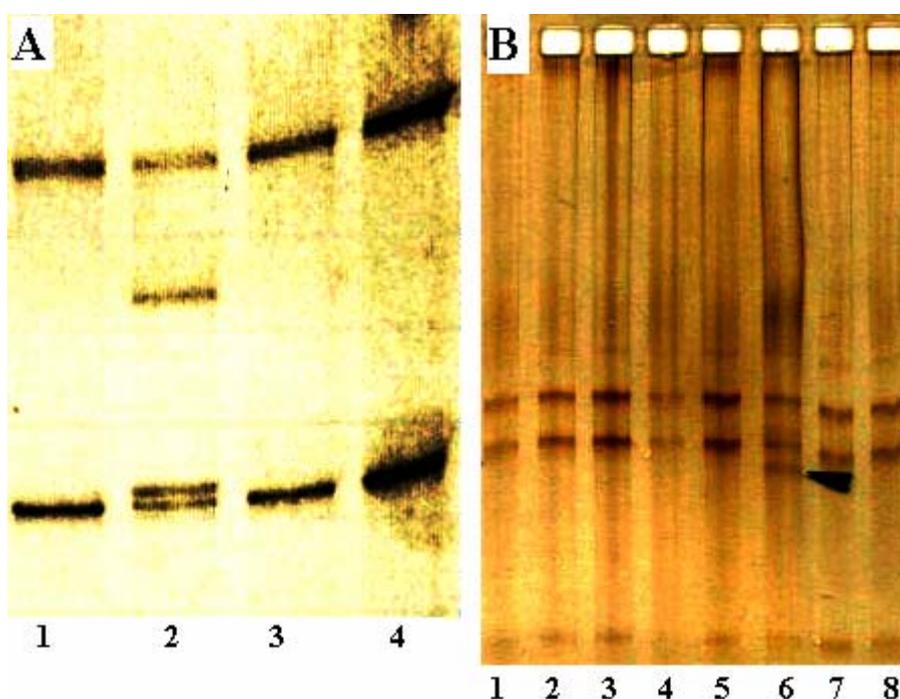


FIGURA 6: *Análisis de los dominios transmembrana 2 y 5 de PS2 por SSCP. (A) Análisis del TM 2 (exón 5) de PS2: en el carril dos se observa un patrón de banda diferente que para el resto de las muestras. (B) Análisis del TM5 (exón 7) de PS2: el carril 6 presenta un patrón de banda que difiere del resto de las muestras, indicando la presencia de una mutación.*

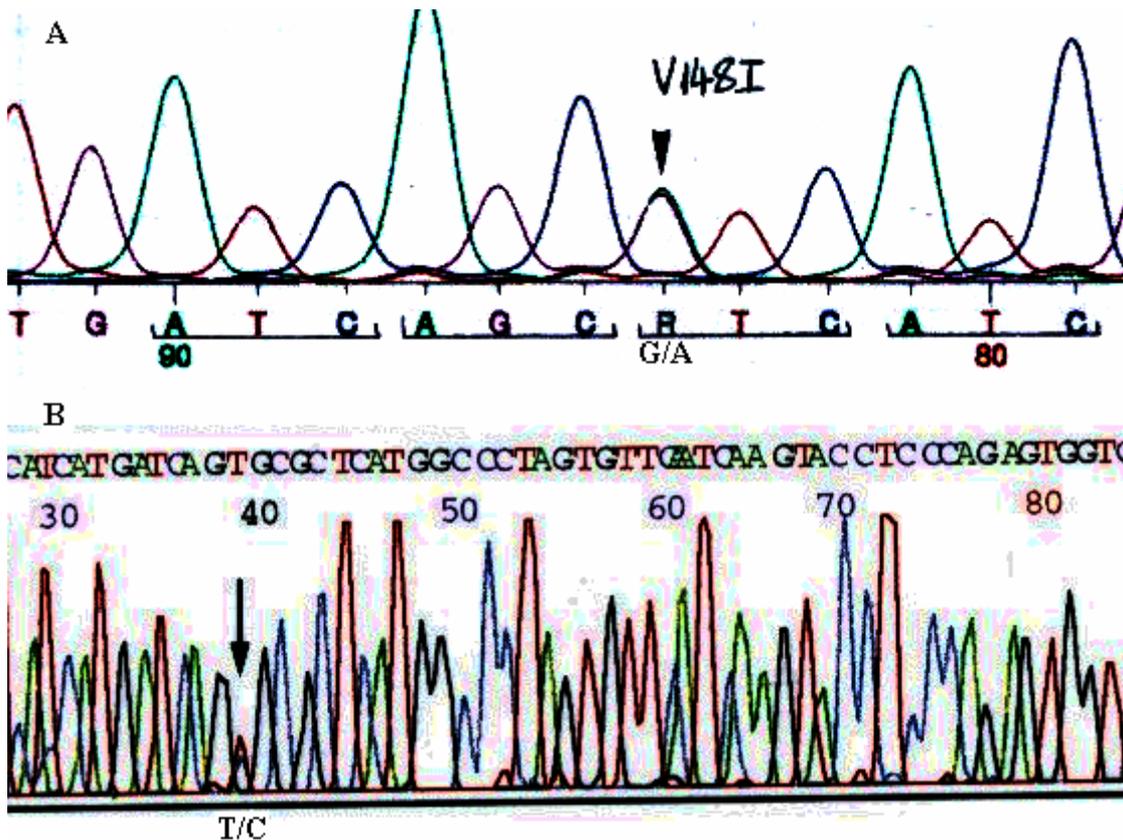


FIGURA 7: *Secuenciación de los fragmentos de PCR correspondientes a los SSCP positivos.* (A) *Detección de la nueva mutación V148I en el TM2 de PS2 (Lao et al., 1998).* (B) *La mutación fue detectada en la posición 711, donde un alelo contenía una T y el otro una C, siendo los tripletes correspondientes TGG y CGG. Ambos tripletes codifican serina.*

2. APOE - un gen de efecto mayor para el desarrollo de la EA

2.1. El alelo APOE ϵ 4

El genotipo APOE se determinó mediante el análisis de restricción del fragmento de PCR de la parte del exón 4 de APOE que contenía el polimorfismo a estudiar (Figura 8).

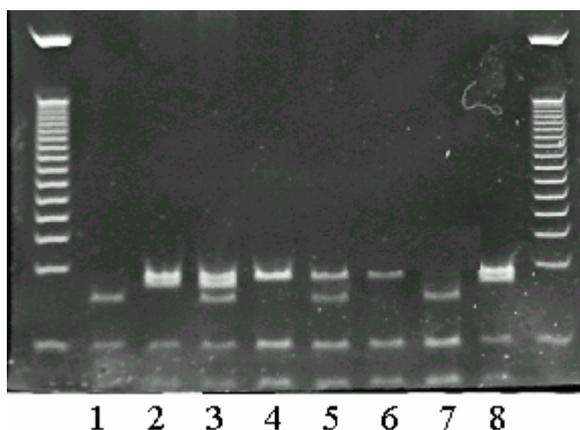


FIGURA 9: GENOTIPADO APOE. En los carriles de ambos extremos del gel fue cargado un marcador de 50 pares de bases (pb), teniendo la primera banda un tamaño de 50 pb, la segunda de 100 pb, etc. En los carriles 1 y 7 se observa el genotipo APOE4/4 con dos bandas de 48 pb y 72 pb características para el alelo APOE ϵ 4. Los carriles 2 y 8 contienen muestras con el genotipo APOE2/3 representando las bandas de 91 y 82 pb el alelo APOE ϵ 2 y las bandas de 91, 82 y 48 pb el alelo APOE ϵ 3. En el carril 3 se separó una muestra con el genotipo APOE2/4 (bandas de 91 y 82 pb – alelo 2; bandas 72 y 48 pb – alelo 4). El carril 4 representa una muestra con el genotipo APOE3/3 (bandas de 91, 82 y 48 pb) y el carril 5 una muestra con el genotipo APOE3/4 (bandas de 91, 82 y 48 pb – alelo 3; bandas 72 y 48 pb – alelo 4).

Se observó que el alelo APOE ϵ 4 se halla acumulado, en general, en los enfermos con EA en comparación con los controles, que presentaban con mayor frecuencia el alelo APOE ϵ 3. Además, el genotipo APOE4/4 estuvo presente sólo en los enfermos, pero no en los controles.

2.1.1. La acumulación del alelo APOE ϵ 4 en la población de enfermos con EA

Para determinar con la mayor exactitud posible su papel en la aparición de la EA, se investigó el papel del alelo APOE ϵ 4 en tres pasos:

Análisis de los resultados en la EA precoz y tardía

En primer lugar dividimos el grupo de los pacientes con EA en EA precoz (EAp, <65 años) y EA tardía (EAt, \geq 65 años). El grupo control fue asimismo dividido en

individuos menores de 65 años de edad e individuos de 65 o más años de edad. Las frecuencias alélicas detectadas para el alelo APOE ϵ 4 eran similares en ambos subgrupos de EA (0,28 en la EAp y 0,26 en la Eat) y se encontraban significativamente aumentadas en comparación con los controles, cuyas frecuencias alélicas de APOE ϵ 4, eran de 0,10 y 0,12, respectivamente ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2 , para ambos subgrupos)). Pudo comprobarse la existencia de una asociación importante entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA (OR 6,1; 95% CI 3,77-13,1, y OR 5,2; 95% CI 3,08-11,9, para EAp y EAt respectivamente).

Análisis de los resultados en subgrupos separados por 10 años de edad

Como segundo paso, dividimos a los dos grupos de pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 10 años cada uno: menores de 60 años, entre 60 y 69 años, entre 70 y 79 años y de 80 años o mayores. En el grupo de los menores de 60 años no se observó una acumulación importante del alelo APOE ϵ 4, obteniéndose una frecuencia de 0,19 en los enfermos en comparación con 0,10 en los controles ($p = 0,003$ por la prueba de χ^2) y la desaparición casi completa de la asociación entre este alelo y la enfermedad (OR 1,8; 95% CI 0,4-8,7). Las diferencias significativas entre las frecuencias del alelo APOE ϵ 4 en pacientes y controles desaparecieron por completo en el grupo de enfermos de 80 años o mayores, con valores de 0,15 en los pacientes en comparación con 0,19 en los controles ($p = 0,308$ por la prueba de χ^2). Al mismo tiempo aumentaron las diferencias entre las frecuencias del alelo APOE ϵ 4 entre los pacientes y los controles en los dos subgrupos restantes, siendo marcadas en el subgrupo de 60 a 69 años, con valores de 0,37 en pacientes y 0,08 en controles ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2), y en el subgrupo entre 70 y 79 años, con valores de 0,30 en los pacientes y 0,12 en los controles ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). La asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA también fue estrecha en ambos subgrupos (OR 9,9; 95% CI 5,5-22,7, y OR 5,8; 95% CI 3,7-15,4, respectivamente).

Análisis de los resultados en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Por último, se dividieron los grupos de pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 5 años: menores de 60 años, de 60 a 64 años, de 65 a 69 años, de 70 a 74 años, de 75 a 79 años y de 80 años o mayores. Utilizando esta división

se pudo detectar que el alelo APOEε4 ejerce una gran influencia en el subgrupo de 60 a 64 años. La asociación del alelo APOEε4 y la EA fue muy marcada en este subgrupo (Tabla 1), sugiriendo que es aquí donde este alelo tiene su mayor importancia como factor de riesgo para desarrollar la EA. También se observó la acumulación del alelo APOEε4 en los tres subgrupos siguientes hasta los 79 años, con la disminución de la asociación entre el alelo APOEε4 y la EA poco a poco a través de estos cuatro subgrupos, hasta desaparecer completamente a partir de los 80 años de edad (Tabla 1).

TABLA 1

Frecuencias alélicas de APOE en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo		Alelos					
	N	2, 3	4	Valor P ^a	OR ^b	95% CI ^c	
<60	EA	30	0,81	0,19	0,003	1,8	0,4-8,7
	C	28	0,90	0,10			
60-64	EA	16	0,58	0,42	<0,001	14,9	6,2-28,4
	C	18	0,90	0,10			
65-69	EA	34	0,68	0,32	<0,001	8,4	5,2-14,6
	C	33	0,95	0,05			
70-74	EA	35	0,67	0,33	<0,001	7,2	4,1-14,2
	C	32	0,91	0,09			
75-79	EA	32	0,74	0,26	0,002	3,4	1,2-13,9
	C	27	0,85	0,15			
≥80	EA	16	0,85	0,15	0,308	1,2	0,8-2,2
	C	17	0,81	0,19			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas de APOEε4 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo APOEε4 sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%.

2.1.2. El alelo APOEε4 como factor de precipitación de la EA

Para el análisis del alelo APOE ϵ 4 como factor de precipitación del debut de la EA se determinaron las frecuencias del genotipo APOE4/4 en pacientes y controles. La mayor importancia de este genotipo se investigó dividiendo cada vez más los grupos de EA y controles.

Análisis de los resultados en la EA precoz y tardía

Tras la primera división de la muestra en enfermos con EAp y enfermos con EAt y la división de los controles en sujetos menores de 65 años y sujetos de 65 años o mayores, se comprobó una concentración del genotipo APOE4/4 en el grupo de la EAp. A este grupo pertenecía el 14,4% de los portadores del genotipo APOE4/4, en comparación con ninguno entre los controles ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). Además, la asociación entre el genotipo APOE4/4 y la EA era relevante en este subgrupo (OR 14,9; 95% CI 6,2-28,1). La presencia del 4,6% de los portadores del genotipo APOE4/4 en los pacientes del grupo de EAt no constituía una diferencia significativa con respecto a los controles ($p = 0,019$ por la prueba de χ^2).

Análisis de los resultados en subgrupos separados por 10 años de edad

En el segundo paso, dividimos a los grupos de pacientes y controles en cuatro subgrupos separados por intervalos de 10 años, quedando en evidencia la importancia del genotipo APOE4/4 en el subgrupo de 60 a 69 años. El 18,5% de los pacientes en este subgrupo eran portadores del genotipo APOE4/4, en tanto que ningún individuo control presentó este genotipo ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). La asociación entre el genotipo APOE4/4 y la EA era muy marcada (OR 14,9; 95% CI 6,23-28,1), lo que indica que este genotipo confiere por sí mismo un riesgo adicional para el desarrollo de la EA. Por el contrario, en los subgrupos de individuos menores de 60 años y de individuos entre 70 y 79 años la frecuencia del genotipo APOE4/4 fue muy baja (3,8% y 3,6%, respectivamente) y no significativamente elevada en comparación con los controles ($p = 0,024$ y $p = 0,027$, respectivamente, por la prueba de χ^2). En estos dos subgrupos el genotipo APOE4/4 no presentaba ningún riesgo adicional al del alelo APOE ϵ 4 para el desarrollo de la EA (OR 1,8; 95% CI 0,3-7,6 y 1,6; 95% CI 0,3-6,2, respectivamente). En el subgrupo de individuos de 80 años de edad o mayores no se identificó el genotipo APOE4/4, ni en los pacientes ni en los individuos control.

Análisis de los resultados en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Para delimitar con exactitud la importancia del genotipo APOE4/4, dividimos a los grupos de pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 5 años. En el subgrupo de 60 a 64 años, la cuarta parte de los pacientes presentó el genotipo APOE4/4, en tanto que ningún individuo control era portador de este genotipo (Tabla 2). La odds-ratio muy elevada obtenida al calcular el efecto del genotipo APOE4/4 sobre el riesgo para la EA en este subgrupo subrayó la relevancia del genotipo APOE, primero por la acumulación del alelo APOE ϵ 4 y, segundo, por la presencia elevada del genotipo APOE4/4. Ambos hechos confirman el efecto dosis-dependiente y precipitante del alelo APOE ϵ 4. La acumulación del genotipo APOE4/4 fue disminuyendo con el aumento de la edad de los pacientes, al igual que su efecto sobre el riesgo para la EA, siendo mínimo a partir de los 70 años de edad. La presencia del genotipo APOE4/4 desapareció por completo a partir de los 75 años (Tabla 2).

2.2. El promotor de APOE

En el promotor de APOE se han encontrado cuatro polimorfismos diferentes, dos de los cuales tienen un efecto directo sobre los niveles de expresión del gen. La presencia de ciertos genotipos en estos dos polimorfismos confieren riesgo para la EA.

2.2.1. El polimorfismo -491AT

Este polimorfismo está localizado en la posición -491 respecto al codón de comienzo de la traducción y los dos alelos son una adenina, presente con una frecuencia del 68 al 88 % en la población normal, y una guanina, que es menos frecuente. El alelo T en esta posición disminuye el nivel de expresión del gen APOE.

Los resultados se analizaron en seis subgrupos separados por intervalos de 5 años: menores de 60 años, de 60 a 64 años, de 65 a 69 años, de 70 a 74 años, de 75 a 79 años y de 80 años o mayores. De este modo se podrían comparar los resultados de este estudio directamente con los obtenidos en el estudio del polimorfismo común de APOE y comparar si se modifican de alguna manera estos resultados.

TABLA 2

Frecuencias del genotipo APOE ε4/ε4 en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo	Genotipo				Valor P ^a	OR ^b	95%CI
	N	Otros	4-4				
<60	EA	30	96,2	3,8	0,024	1,8	0,3-7,6
	C	28	100	0			
60-64	EA	16	75,0	25,0	<0,001	17,8	8,2-37,7
	C	18	100	0			
65-69	EA	34	88,9	11,1	0,008	6,2	4,2-12,6
	C	33	100	0			
70-74	EA	35	92,8	7,2	0,018	3,6	1,1-10,6
	C	32	100	0			
75-79	EA	32	100	0	1	1	
	C	27	100	0			
≥80	EA	16	100	0	1	1	
	C	17	100	0			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias del genotipo APOEε4/ε4 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del genotipo APOEε4/ε4 sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%.

En primer lugar se analizaron los resultados sin aplicar ningún tipo de corrección. Se encontraron frecuencias del alelo T similares en los pacientes y los controles de todos los subgrupos estudiados, con excepción de los controles hasta los 64 de edad, en los que se observó una acumulación del alelo -491-T del promotor de APOE (Tabla 3.1).

TABLA 3.1

Frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE -491AT en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

RESULTADOS

Subgrupo		N	Alelos		Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
			A	T			
<60	EA	30	0,88	0,12	0,002	1,7 (0,5 - 3,2)	1,5 (0,5 - 2,7)
	C	28	0,75	0,25			
60-64	EA	16	0,81	0,19	0,005	1,3 (0,3 - 2,7)	1,2 (0,3 - 2,5)
	C	18	0,68	0,32			
65-69	EA	34	0,88	0,11	0,275	0,6 (0,06 - 2,3)	0,5 (0,04 - 2,1)
	C	33	0,84	0,16			
70-74	EA	35	0,85	0,15	0,356	0,2 (0,01 - 1,7)	0,2 (0,01 - 1,5)
	C	32	0,88	0,12			
75-79	EA	32	0,86	0,14	0,134	0,7 (0,09 - 2,9)	0,7 (0,08 - 2,7)
	C	27	0,80	0,20			
≥80	EA	16	0,88	0,12	1	1	
	C	17	0,88	0,12			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del APOE -491AT en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo -491AT-T sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo -491AT-T sobre el riesgo para la EA tras aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

El alelo G del polimorfismo Th1/E47 tiene efectos contrarios a los del alelo T del presente polimorfismo, aumentando la expresión del gen. Por lo tanto, para no distorsionar los resultados, se aplicó una corrección de la muestra que permitió omitir los portadores de ambos alelos en los homocigotos para el polimorfismo común, como eran los individuos APOE3/3 o APOE4/4.

De este modo descendió la frecuencia del alelo -491-T a la mitad de los valores anteriores (Tablas 3.1 y 3.2), siguiendo significativamente elevada en los grupos control hasta los 64 años de edad (Tabla 3.2).

TABLA 3.2 *Frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE -491AT rectificadas según la presencia del alelo Th1/E47-G en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes*

Subgrupo	Alelos			Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
	N	A	T			
<60 EA	30	0,93	0,07	<0,001	2,4 (0,3 - 5,9)	2,1 (0,2 - 5,5)
	C	28	0,79			
60-64 EA	16	0,94	0,06	<0,001	2,7 (0,5 - 6,4)	2,5 (0,4 - 6,1)
	C	18	0,79			
65-69 EA	34	0,94	0,06	0,06	0,4 (0,02 - 2,6)	0,4 (0,04 - 1,8)
	C	33	1,00			
70-74 EA	35	0,96	0,04	0,217	0,2 (0,01 - 1,9)	0,2 (0,01 - 1,5)
	C	32	1,00			
75-79 EA	32	0,94	0,06	0,012	1,4 (0,2 - 5,9)	1,1 (0,08 - 5,2)
	C	27	0,85			
≥80 EA	16	0,93	0,07	0,124	0,5 (0,12 - 2,6)	0,3 (0,1 - 2,5)
	C	17	0,88			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del APOE -491AT en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo -491AT-T sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo -491AT-T sobre el riesgo para la EA después de aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

El genotipo APOE según el polimorfismo común no tuvo influencia sobre estos resultados, ni los resultados obtenidos aquí cambiaron los anteriormente obtenidos en los apartados 2.1.1 y 2.1.2.

2.2.2. El polimorfismo Th1/E47

Este polimorfismo está localizado en la posición -219 respecto al inicio de la traducción, siendo el alelo G el más frecuente en comparación con el alelo T. El alelo G

se encuentra con una frecuencia de entre el 59 y el 65% en la población general y su presencia conlleva al aumento de la expresión del gen APOE.

Los resultados obtenidos en el estudio de ambos alelos de este polimorfismo se analizaron en seis subgrupos separados por intervalos de 5 años: menores de 60 años, de 60 a 64 años, de 65 a 69 años, de 70 a 74 años, de 75 a 79 años y de 80 años o mayores. Esta división permitiría la comparación directa de los datos obtenidos en este estudio con los resultados del análisis del polimorfismo común de APOE.

En primer lugar los resultados fueron analizados sin la aplicación de correcciones según el genotipo del polimorfismo -491AT, o el genotipo del polimorfismo común. Se observó que la frecuencia del alelo G es más elevada en los controles de los primeros cuatro subgrupos que en los pacientes con EA. En el subgrupo de los individuos entre 65 y 69 años de edad el alelo G estaba significativamente acumulado en los controles en comparación con los enfermos (Tabla 4.1). La frecuencia del alelo TH1/E47-G descendió bruscamente en los individuos control a partir de los 75 años de edad. En los últimos dos subgrupos la frecuencia alélica de Th1/E47-G representó solamente una cuarta o quinta parte de los valores anteriores, y estaba significativamente disminuida en comparación con los pacientes (Tabla 4.1).

Tras aplicar las correcciones necesarias para obviar las influencias del alelo -491-T, los resultados de los primeros cuatro subgrupos fueron más homogéneos. Las frecuencias del alelo Th1/E47-G fueron menores de 0,50, pero la disminución marcada de la frecuencia de este alelo se mantuvo para los individuos de los subgrupos control a partir de los 75 años de edad (Tabla 4.2).

TABLA 4.1

Frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE Th1/E47 en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo		Alelos			Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
	N	T	G				
<60	EA	30	0,53	0,47	0,004	1,9 (0,6 - 4,2)	1,5 (0,4 - 3,9)
	C	28	0,39	0,61			
60-64	EA	16	0,50	0,50	0,067	0,8 (0,1 - 2,9)	0,7 (0,1 - 2,8)
	C	18	0,41	0,59			
65-69	EA	34	0,53	0,47	<0,001	2,4 (0,8 - 5,6)	2,3 (0,4 - 4,8)
	C	33	0,37	0,63			
70-74	EA	35	0,43	0,57	0,684	0,2 (0,01 - 1,8)	0,2 (0,01 - 1,7)
	C	32	0,41	0,59			
75-79	EA	32	0,54	0,46	<0,001	4,4 (2,1- 17,9)	4,1 (1,8 - 15,7)
	C	27	0,90	0,10			
≥80	EA	16	0,38	0,62	<0,001	3,5 (1,8 - 12,8)	3,3 (1,5 - 12,5)
	C	17	0,75	0,25			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE Th1/E47 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo Th1/E47-G sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo Th1/E47-G sobre el riesgo para la EA después de aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

Las diferencias entre las frecuencias alélicas fueron significativas al comparar los dos subgrupos de individuos control con los subgrupos de pacientes respectivos, así como al comparar los dos subgrupos control de los individuos de más de 75 años con los restantes subgrupos control, que incluían los individuos sanos menores de 75 años de edad ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). Además se observó un aumento significativo de la frecuencia del alelo Th1/E47-G en los pacientes de 80 años de edad o mayores en

comparación con los valores de las frecuencias de este alelo en los otros subgrupos de pacientes ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2 ; Tabla 4.2).

TABLA 4.2

Frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE Th1/E47 rectificadas según la presencia del alelo -491-A en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo		Alelos				Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
	N	T	G					
<60	EA	30	0,56	0,44	0,548	0,1 (0,02 - 1,4)	0,1 (0,02 - 1,3)	
	C	28	0,53	0,47				
60-64	EA	16	0,61	0,39	0,419	0,3 (0,08 - 1,8)	0,3 (0,07 - 1,6)	
	C	18	0,57	0,43				
65-69	EA	34	0,56	0,44	0,045	0,9 (0,1 - 2,4)	0,7 (0,09 - 2,2)	
	C	33	0,46	0,54				
70-74	EA	35	0,48	0,52	0,224	0,4 (0,06 - 2,2)	0,3 (0,06 - 2,0)	
	C	32	0,42	0,58				
75-79	EA	32	0,57	0,43	<0,001	3,7 (2,2 - 10,9)	3,6 (1,9 - 9,7)	
	C	27	0,90	0,10				
≥80	EA	16	0,39	0,61	<0,001	3,5 (2,1 - 9,8)	3,3 (1,9 - 9,5)	
	C	17	0,75	0,25				

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor de APOE Th1/E47 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo Th1/E47-G sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo Th1/E47-G sobre el riesgo para la EA tras aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

2.3. El exón 3 del gen APOE

Para la detección de la mutación E4P se amplificó el exón 3 de APOE y se llevó a cabo restricción enzimática. En nuestra muestra de 157 pacientes se detectó un único portador de la mutación E4P, lo que corresponde a una frecuencia de 0,64. En el grupo control no se detectó la mutación.

El portador de la mutación E4P tenía 62 años cuando fue diagnosticado de EA probable, siendo los primeros síntomas pérdida de memoria y desorientación a los 57 años de edad. El paciente era portador del genotipo APOE4/4 y la enfermedad siguió un curso acelerado, con una disminución abrupta del GDS del paciente de 23 a 11 durante el primer año tras el diagnóstico.

3. Loci de efecto menor

3.1. El polimorfismo de CST3

El polimorfismo en el gen CST3, que involucra el penúltimo aminoácido del péptido señal, está constituido más a menudo por una guanina y con menos frecuencia por una adenina. Tres trabajos recientes han detectado la implicación de este polimorfismo en la aparición de la EA como factor de riesgo. En estos trabajos se ha discutido cuál de los alelos es el responsable de conferir riesgo y a qué edad ((Crawford et al., 2000; Finck et al., 2000; Beyers et al., 2001).

3.1.1. El polimorfismo de CST3 en la EA precoz y tardía

En el primer paso se analizaron los resultados teniendo en cuenta dos grandes subgrupos: (1) pacientes con EAp (menores de 65 años) y controles menores de 65 años, y (2) pacientes con EAt (de 65 años de edad o mayores) y sujetos control de 65 años de edad o mayores.

En el grupo de los pacientes con EAp se observó la acumulación del alelo A, con una frecuencia alélica de 0,26, en comparación con 0,14 para el respectivo grupo control ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). En el grupo de los pacientes con EAt, los

resultados indicaron una tendencia contraria, aunque no significativa, con acumulación del alelo A en los controles ($p = 0,085$ por la prueba de χ^2).

Además, se investigó la influencia del alelo CST3-A teniendo en cuenta la presencia o no del alelo APOE ϵ 4. Así, en el grupo de pacientes con EAp se encontró una asociación sinérgica entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4 (OR 5,62; 95% CI 1,65-18,4), mientras que en el grupo de la EAt no se pudo detectar esta asociación (OR 1,17; 95% CI 0,37-3,42).

3.1.2. El polimorfismo de CST3 en subgrupos separados por intervalos de 10 años

En el segundo paso del análisis de los resultados se procedió a acortar las diferencias de edad, con lo que se formaron cuatro subgrupos de enfermos y controles: (1) pacientes que debutaron con la EA antes de los 60 años de edad e individuos control menores de 60 años, (2) pacientes con el comienzo de la enfermedad comprendido entre los 60 y 69 años y controles entre los 60 y 69 años de edad, (3) pacientes con el debut de la EA entre los 70 y 79 años de edad y sus respectivos controles entre los 70 y 79 años, y (4) pacientes que debutaron a los 80 años o después. De este modo se delimitaría mejor hasta qué edad el alelo CST3-A es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la EA y cuándo comienza a disminuir su efecto hasta desaparecer.

En el primer subgrupo (pacientes menores de 60 años de edad) se observó una sobrerrepresentación del alelo CST3-A, con una frecuencia alélica de 0,27 en comparación con 0,13 en los controles ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). La acumulación de este alelo en los pacientes con EA se mantuvo, aunque con menos importancia, en los enfermos entre los 60 y 69 años de edad, con una frecuencia alélica de 0,23 en los pacientes y de 0,13 en los controles ($p = 0,003$ por la prueba de χ^2). En el subgrupo de pacientes y controles entre los 70 y 79 años de edad se detectó una tendencia invertida, no significativa (frecuencia alélica de 0,14 en pacientes y de 0,20 en los controles; $p = 0,134$ por la prueba de χ^2). En el último subgrupo, el de los enfermos y controles de 80 años de edad o mayores, el efecto del alelo CST3-A fue contrario al inicial, con frecuencias alélicas de 0,31 en los controles y 0,08 en los pacientes ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2).

El análisis de los datos según el genotipo APOE puso de manifiesto una asociación sinérgica entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4 en el primer subgrupo (OR 2,42; 95% CI 0,81-6,42), siendo esta asociación muy marcada en el subgrupo de pacientes y controles entre los 60 y 69 años de edad (OR 7,72; 95% CI 2,03-27,7). Esta asociación desapareció en los dos subgrupos siguientes (OR 0,08; 95% CI 0,05-1,22, y OR 1,31; 95% CI 0,56-3,97, respectivamente).

3.1.3. El polimorfismo de CST3 en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Finalmente, en el tercer paso del análisis de los resultados, dividimos a los pacientes y controles en seis subgrupos, teniendo cada subgrupo de enfermos a estudiar su respectivo grupo control: (1) menores de 60 años, (2) entre los 60 y 64 años de edad, (3) entre los 65 y 69 años de edad, (4) entre los 70 y 74 años de edad, (5) entre los 75 y 79 años de edad y (6) de 80 años de edad o mayores. Este último paso de análisis de los resultados permitiría delimitar con la mayor exactitud posible el papel del alelo CST3-A en el desarrollo de la EA.

Se observó una acumulación significativa del alelo CST3-A en los tres primeros subgrupos, en los que disminuía progresivamente su presencia con el aumento de la edad de debut de la EA (Tabla 5). Las frecuencias alélicas de CST3-A fueron bajas y constantes en los controles hasta los 75 años de edad, para después aumentar drásticamente hasta alcanzar valores dobles del inicial en el grupo de individuos de 80 años de edad o mayores (Tabla 5). Por el contrario, las frecuencias alélicas de CST3-A descendieron desde valores elevados en pacientes menores de 60 años de edad, hasta alcanzar sólo una tercera parte en los enfermos de 80 años de edad o mayores (Tabla 5).

El análisis del efecto del alelo CST3-A según el genotipo APOE puso de manifiesto que su influencia como factor de riesgo era independiente en el grupo de pacientes menores de 60 años, debido a su presencia independiente del alelo APOE ϵ 4 (Tablas 5 y 6), con el cual no presentaba una asociación sinérgica.

En los tres siguientes subgrupos (pacientes entre los 60 y 64 años, entre los 65 y 69 años y entre los 70 y 74 años) se detectó una asociación sinérgica entre los alelos CST3-A y APOE ϵ 4. Esta asociación fue muy marcada para los pacientes entre los 60 y

64 años y fue disminuyendo paulatinamente en los subgrupos hasta los 74 años (Tabla 6). Así, el efecto del alelo CST3-A se detectó en los pacientes de hasta 74 años de edad, mientras sus efectos independientes del genotipo APOE desaparecían ya a partir de los 70 años (Tablas 5 y 6).

TABLA 5

Frecuencias alélicas de CST3 en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo	Alelos			Valor P ^a	OR ^b	95% CI ^c
	N	G	A			
<60	EA	30	0,73	<0,001	3,4	1,2-13,9
	C	28	0,87			
60-64	EA	16	0,75	0,002	2,8	0,9-8,4
	C	18	0,86			
65-69	EA	34	0,79	0,005	2,1	0,8-6,7
	C	33	0,88			
70-74	EA	35	0,85	0,785	0,2	0,05-1,5
	C	32	0,84			
75-79	EA	32	0,87	0,005	2,2	0,8-7,1
	C	27	0,75			
≥80	EA	16	0,92	<0,001	4,2	1,8-21,7
	C	17	0,69			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas de APOE ϵ 4 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo APOE ϵ 4 sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%.

TABLA 6 *Frecuencias alélicas de CST3-A en pacientes con EA y controles y odds ratios (OR) con su intervalo de confianza del 95% (CI) para evaluar la asociación entre el alelo APOEε4, el alelo CST3-A y la EA.*

Status de APOE ¹	Subgrupo	EA	C	OR	95%CI
APOEε4(+)	<60	0,13	0,35	2,4	0,8 – 6,4
	60-64	0,35	0,00	8,7	2,1 – 29,0
	65-69	0,24	0,00	6,7	1,9 – 25,2
	70-74	0,14	0,00	4,2	0,1 – 14,1
	75-79	0,07	0,20	2,7	0,9 – 7,9
	≥80	0,19	0,37	1,3	0,6 – 3,9
APOEε4(-)	<60	0,33	0,14	1,1	0,7 – 1,8
	60-64	0,07	0,27	2,6	1,0 – 6,6
	65-69	0,14	0,21	1,0	0,4 – 5,7
	70-74	0,08	0,24	2,2	1,1 – 9,9
	75-79	0,09	0,50	4,3	1,8 – 13,4
	≥80	0,01	0,50	7,4	2,4 – 24,2

¹ Genotipo APOE, con o sin alelo APOEε4. ² Porcentaje de pacientes con EA. ³ Porcentaje de controles.

3.2. El polimorfismo de PS1

Poco después del descubrimiento de las presenilinas se describió el polimorfismo intrónico de PS1 y la asociación del genotipo 1-1 con la EA. Si bien existen estudios que confirman esos resultados, hay otros en los que no se ha encontrado ninguna relación entre el genotipo 1-1 de PS1 y la enfermedad. Por otra parte, se ha identificado una asociación sinérgica entre el genotipo 1-1 y el alelo APOEε4 en algunos de los trabajos con resultados afirmativos, en tanto que otros grupos no han detectado tal asociación.

3.2.1. El polimorfismo de PS1 en la EA precoz y tardía

En un primer paso del análisis de los resultados, dividimos a los pacientes y controles en dos grandes subgrupos: (1) pacientes con EAp (menores de 65 años) y controles menores de 65 años, y (2) pacientes con EAt (65 años de edad o mayores) y sujetos control de 65 años de edad o mayores.

Primero se analizó la frecuencia del genotipo PS1 1-1 independientemente de la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4. Se encontró una importante sobrerrepresentación del genotipo PS1 1-1, con una frecuencia del 39,5% en los pacientes en comparación con 13,3% en el grupo control ($p < 0,001$ por la prueba de χ^2). Con la ayuda de este resultado se pudo detectar una asociación entre este genotipo y la EA independiente del alelo APOE ϵ 4 (OR 10,2; 95% CI 3,8-22,6). Por el contrario, en el grupo de EAt no se detectó acumulación alguna del genotipo investigado, siendo las frecuencias genotípicas del 25,9% en el grupo de los pacientes y del 20,9% en el grupo control ($p = 0,219$ por el test χ^2).

En un segundo paso del análisis de este locus se estudió la interacción entre el genotipo PS1 1-1, el alelo APOE ϵ 4 y la EA. En el grupo de los pacientes menores de 65 años el 32,7% de los portadores del alelo APOE ϵ 4 presentó el genotipo PS1 1-1, mientras ningún portador del alelo APOE ϵ 4 del grupo control mostró este genotipo. Estos valores indicaban una importante asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1-1 y el alelo APOE ϵ 4 (OR 7,22; 95% CI 3,49-20,1). Esta asociación resultó menos representativa en el grupo de la EAt, siendo el 11% de los enfermos portadores del alelo APOE ϵ 4 al mismo tiempo que del genotipo PS1 1-1, en comparación con el 5,3% para los controles (OR 3,08; 95% CI 1,24-7,37).

3.2.2. El polimorfismo de PS1 en subgrupos separados por intervalos de 10 años

Para delimitar la influencia del genotipo PS1 1-1 teniendo en cuenta la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4, el grupo de los pacientes con EA y el grupo control se dividieron en subgrupos separados por intervalos de 10 años: (1) pacientes que debutaron con la EA antes de los 60 años de edad e individuos control menores de 60

años, (2) pacientes con el comienzo de la enfermedad situado entre los 60 y 69 años y controles entre los 60 y 69 años de edad, (3) pacientes con el debut de la EA entre los 70 y 79 años de edad con sus respectivos controles entre los 70 y 79 años, y (4) pacientes que debutaron a los 80 años o después.

El estudio de la acumulación del genotipo PS1 1-1 independientemente de la presencia del alelo APOE ϵ 4 puso de manifiesto su sobrerrepresentación en el grupo entre los 60 y 69 años, siendo la frecuencia del 38,5% en los pacientes y del 14,0% en los controles ($p < 0,001$ por el test χ^2). Como resultado de esta acumulación se detectó la asociación del genotipo PS1 1-1 y la EA independientemente de la presencia del alelo APOE ϵ 4 (OR 9,8; 95% CI 3,3-20,5). El análisis de los tres subgrupos restantes no puso de manifiesto acumulación del genotipo PS1 1-1, con diferencias de la presencia de PS1 1-1 mínimas entre pacientes y controles: (1) 23,1% en los pacientes y 20% en los controles ($p = 0,453$ por el test χ^2) para los menores de 60 años, (2) 25,5% en los pacientes y 25% en los controles ($p = 0,908$ por el test χ^2) para los sujetos comprendidos entre los 70 y 79 años y (3) 28,6% en los pacientes y 33,3% en los controles para los individuos de 80 años o mayores ($p = 0,318$ por el test χ^2).

La segunda parte del análisis tuvo en cuenta la presencia o ausencia del alelo APOE ϵ 4. En los tres primeros subgrupos se detectó una asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1-1 y el alelo APOE ϵ 4, la cual fue importante en los subgrupos de menor edad, es decir, el subgrupo de los menores de 60 años y el de los individuos entre 60 y 69 años de edad (OR 6,17; 95% CI 2,57-14,8 y OR 6,38; 95% CI 2,62-15,9, respectivamente). En el subgrupo de enfermos y controles entre los 70 y 79 años esta asociación disminuyó de forma notable (OR 2,27; 95% CI 0,98-8,13), llegando a desaparecer en el subgrupo de individuos de 80 años de edad o mayores (OR 0,52; 95% CI 0,21-2,03).

3.2.3. El polimorfismo de PS1 en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Finalmente, para el análisis exhaustivo del papel del genotipo PS1 1-1, dividimos a los pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 5 años: (1) menores de 60 años, (2) entre los 60 y 64 años de edad, (3) entre los 65 y 69 años de

edad, (4) entre los 70 y 74 años de edad, (5) entre los 75 y 79 años de edad y (6) de 80 años de edad o mayores.

Utilizando este marco estrecho de división y analizando los resultados obtenidos en grupos separados por intervalos de 5 años de edad, se consiguió determinar en qué pacientes el genotipo PS1 1-1 juega un papel importante como factor de riesgo. Sólo en uno de los seis subgrupos (entre los 60 y 64 años) se mantuvo la acumulación de este genotipo y, al aplicar la delimitación por edad, resultaron muy elevados los valores de asociación a la enfermedad, independientemente del genotipo APOE (Tabla 7). En el resto de los subgrupos no se observaron diferencias significativas de las frecuencias genotípicas entre los pacientes y controles.

Al tener en cuenta el genotipo APOE, se encontró una asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1-1 y el alelo APOE ϵ 4 en cuatro de los seis subgrupos analizados. La sinergia más importante se observó en los pacientes entre los 60 y 64 años de edad (Tabla 8), lo que era de esperar por la acumulación del alelo APOE ϵ 4 (Tabla 1) de un lado y además del genotipo PS1 1-1 (Tabla 7) de otro. La asociación entre ambos factores genéticos seguía siendo importante en los pacientes menores de 60 años y en los pacientes entre 65 y 69 años de edad. En el siguiente subgrupo esta asociación desaparecía, para reaparecer en los pacientes entre 75 y 79 años de edad y volver a desaparecer en los pacientes de 80 años y mayores (Tabla 8).

3.3. Análisis de asociación entre el alelo APOE ϵ 4, el alelo CST3-A, el genotipo PS1 1-1 y la EA

El genotipo PS1 1-1 se encontró asociado sinérgicamente al alelo APOE ϵ 4 en tres de los seis subgrupos analizados (Tabla 8). Asimismo, se detectó una sinergia entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4 en los primeros cuatro subgrupos analizados (Tabla 6).

TABLA 7

Frecuencias del genotipo PS1 1-1 en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo		N	Genotipos %		Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
			Otros	1-1			
<60	EA	30	76,9	23,1	0,438	0,2 (0,03-1,4)	0,2 (0,02-1,1)
	C	28	80,0	20,0			
60-64	EA	16	25,0	75,0	<0,001	24,8 (8,2-52,6)	21,6 (7,9-49,1)
	C	18	83,4	16,6			
65-69	EA	34	77,8	22,2	0,250	0,4 (0,05-2,3)	0,3 (0,04 -1,8)
	C	33	82,2	17,8			
70-74	EA	35	76,9	23,1	0,925	0,08 (0,01-0,2)	0,08 (0,01-0,3)
	C	32	76,5	23,5			
75-79	EA	32	72,0	28,0	0,879	0,1 (0,03-0,9)	0,1 (0,05-0,7)
	C	27	72,7	27,3			
≥80	EA	16	71,4	28,6	0,318	0,5 (0,1-1,8)	0,4 (0,09-1,5)
	C	17	67,7	33,3			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias de los genotipos de PS1 en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del genotipo PS1 1-1 sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del genotipo PS1 1-1 sobre el riesgo para la EA tras aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

Para determinar si existe alguna relación o asociación entre los tres polimorfismos, se estudió su presencia en los tres primeros subgrupos: (1) menores de 60 años de edad, (2) entre los 60 y 64 años y (3) entre los 65 y 69 años de edad.

TABLA 8

Frecuencia de portadores del genotipo 1.1 del polimorfismo de PS1 en pacientes con EA y controles y odds-ratios (OR) con su intervalo de confianza del 95% (CI) para evaluar la asociación entre el alelo APOEε4, el genotipo PS1 1.1 y la EA.

Status de APOE ¹	Subgrupo	EA% ²	C% ³	OR	95%CI
APOEε4(+)	<60	15,4	0,0	6,2	2,6 – 14,8
	60-64	50,0	0,0	12,7	4,1 – 39,0
	65-69	18,5	3,4	5,9	1,8 – 20,0
	70-74	3,7	5,8	0,4	0,14 – 1,3
	75-79	18,8	5,8	4,3	1,1 – 14,1
	≥80	3,1	6,2	0,5	0,2 – 2,1
APOEε4(-)	<60	7,7	20,0	1,1	0,7 – 1,8
	60-64	25,0	6,6	2,4	0,8 – 6,4
	65-69	3,7	14,8	1,0	0,4 – 5,7
	70-74	18,5	17,6	0,1	0,08 – 0,9
	75-79	12,5	17,6	0,4	0,2 – 1,2
	≥80	15,6	18,7	0,2	0,1 - 1,0

¹ Genotipo APOE, con o sin alelo APOEε4. ² Porcentaje de pacientes con EA. ³ Porcentaje de controles.

En el subgrupo B se detectó cierta acumulación del genotipo PS1 1-1 en presencia de los alelos CST3-A y APOEε4. Esta acumulación representaba sólo dos terceras partes del genotipo PS1 1-1 acumulado en presencia del alelo APOEε4, pero en ausencia del alelo CST3-A (Tabla 9). La misma relación del genotipo PS1 1-1 acumulado se observaba en ausencia del alelo APOEε4: la acumulación del genotipo

PS1 1-1 en presencia del alelo CST3-A representaba dos terceras partes de la acumulación del genotipo PS1 1-1 en ausencia del alelo CST3-A (Tabla 9).

TABLA 9

Frecuencia de portadores del genotipo 1.1 del polimorfismo de PS1 en pacientes con EA y controles y odds-ratios (OR) con su intervalo de confianza del 95% (CI) para evaluar la asociación entre el alelo APOEε4, el alelo CST3-A, el genotipo PS1 1.1 y la EA.

Status de APOE ¹	Status de CST3-A ²	Subgrupo	EA% ³	C% ⁴	OR (95%CI)
APOEε4(+)	CST3-A(+)	<60	8,0	0,0	3,2 (1,4–12,8)
		60-64	18,2	0,0	7,8 (2,9–19,7)
		65-69	6,2	0,0	2,9 (1,2–10,9)
	CST3-A(-)	<60	4,0	0,0	1,2 (0,3–4,8)
		60-64	27,3	0,0	12,7 (4,3–33,6)
		65-69	9,4	6,1	1,4 (0,5–6,7)
APOEε4(-)	CST3-A(+)	<60	8,0	4,5	1,6 (0,6–6,8)
		60-64	9,1	0,0	7,9 (2,1–24,3)
		65-69	3,1	0,0	1,1 (0,08–6,0)
	CST3-A(-)	<60	15,4	6,8	2,1 (0,6–11,7)
		60-64	18,2	9,1	1,7 (0,1–9,8)
		65-69	3,1	12,2	3,9 (1,8–12,4)

¹ Genotipo APOE, con o sin alelo APOEε4. ² Genotipo CST3, con o sin alelo A. ³ Porcentaje de pacientes con EA. ⁴ Porcentaje de controles.

3.4. El alelo K del gen BChE

En los últimos años ha sido muy discutida la implicación del alelo K del gen de la butirilcolinesterasa y, a causa de los resultados contradictorios obtenidos, no se ha alcanzado aún una conclusión sobre su papel en el desarrollo de la EA.

3.4.1. El alelo K del gen BChE en la EA precoz y tardía

En primer lugar se procedió a la división de los grupos de pacientes con EA y controles en dos grandes subgrupos: (1) pacientes con EAp (menores de 65 años) y controles menores de 65 años, y (2) pacientes con EAt (de 65 años de edad o mayores) y sujetos control de 65 años de edad o mayores.

Las frecuencias alélicas de BChE-K obtenidas para los dos grupos fueron de 0,15 en el grupo de EAp y de 0,10 en su respectivo grupo control, sin que esta diferencia fuese significativa ($p = 0,095$ por el test χ^2). La tendencia a cierta acumulación del alelo K en los pacientes con EA se manifestó más en el grupo de EAt, donde la frecuencia alélica de BChE-K era de 0,18 en comparación con 0,10 en los respectivos controles, siendo esta diferencia significativa ($p = 0,008$ por el test χ^2).

3.4.2. El alelo K del gen BChE en subgrupos separados por intervalos de 10 años

Al seguir el análisis e intentar delimitar bien la influencia del alelo K de BChE, los dos grandes grupos se dividieron en subgrupos separados por intervalos de 10 años: (1) pacientes que debutaron con la EA antes de los 60 años de la edad e individuos control menores de 60 años, (2) pacientes con el comienzo de la enfermedad comprendido entre los 60 y los 69 años y controles entre los 60 y 69 años de edad, (3) pacientes con el debut de la EA entre los 70 y 79 años de edad y sus respectivos controles entre los 70 y 79 años, y (4) pacientes que debutaron a los 80 años o después.

Aplicando esta subdivisión se detectó en dos de los subgrupos una acumulación significativa del alelo K. En el grupo de los pacientes con debut antes de los 60 años se determinó una frecuencia alélica de 0,23, significativamente elevada en comparación con 0,13 en los controles correspondientes ($p = 0,003$ por el test χ^2). En el subgrupo con debut de la EA entre los 70 y 79 años se observó una acumulación similar, siendo la frecuencia alélica de BChE-K de 0,19 en los pacientes y de 0,10 en los respectivos controles ($p = 0,003$ por el test χ^2). En el subgrupo de los pacientes y controles de mayor edad no se identificaron diferencias significativas, siendo las frecuencias alélicas de BChE-K de 0,14 y 0,12, respectivamente ($p = 0,538$ por el test χ^2). Por último, en el

subgrupo de 60 a 69 años de edad las frecuencias fueron de 0,13 en pacientes y controles.

3.4.3. El alelo K del gen BChE en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Para detectar a los enfermos en los cuales el alelo BChE-K constituye un factor de riesgo importante, se continuó con la subdivisión de los pacientes y controles, esta vez en subgrupos separados por intervalos de 5 años: (1) menores de 60 años, (2) entre los 60 y 64 años de edad, (3) entre los 65 y 69 años de edad, (4) entre los 70 y 74 años de edad, (5) entre los 75 y 79 años de edad y (6) de 80 años de edad o mayores.

La utilización del análisis de implicación del alelo BChE-K en pequeños subgrupos permitió detectar los subgrupos de pacientes para los cuales el alelo K del BChE es un factor de riesgo real. Así, se detectó una asociación significativa entre el alelo BChE-K y la EA en dos de los subgrupos de pacientes y controles analizados. Aunque esta asociación era más relevante en el subgrupo de pacientes con EA de 75 a 79 años, también se detectó en el grupo de enfermos menores de 60 años (Tabla 10). Después de la aplicación de correcciones para tests múltiples, la asociación detectada disminuía en los subgrupos de individuos menores de 60 años, pero, por el contrario, se hizo más notable aun en el subgrupo de pacientes entre los 75 y 79 años de edad. En el resto de los subgrupos analizados no se detectó una asociación entre el gen estudiado y la EA, pues no se observó la acumulación del alelo en cuestión (Tabla 10).

3.5. El alelo T del gen catD

Mientras que dos estudios de la población alemana han descrito una asociación importante entre el alelo T de catD y la EA, estudios llevados a cabo en otras poblaciones han detectado una falta de acumulación del alelo catD-T en los respectivos grupos de pacientes y, por lo tanto, no han confirmado dicha asociación. En consecuencia, no se conoce todavía con certeza si el alelo T de catD está implicado o no en la aparición de la EA.

TABLA 10

Frecuencias alélicas de BChE en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo		Alelos			Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
	N	W	K				
<60	EA	30	0,77	0,23	0,003	2,1 (0,6 – 7,2)	1,6 (0,5 – 6,5)
	C	28	0,87	0,13			
60-64	EA	16	0,92	0,08	0,512	0,4 (0,09 – 2,8)	0,3 (0,09–2,3)
	C	18	0,93	0,07			
65-69	EA	34	0,80	0,20	0,798	0,2 (0,05 – 1,6)	0,2 (0,05–1,5)
	C	33	0,81	0,19			
70-74	EA	35	0,89	0,11	0,026	1,1 (0,4 – 4,2)	0,8 (0,3–3,7)
	C	32	0,94	0,06			
75-79	EA	32	0,72	0,28	<0,001	4,2 (2,2 – 10,9)	4,7 (2,3–9,6)
	C	27	0,86	0,14			
≥80	EA	16	0,81	0,29	0,008	2,9 (1,1 – 6,7)	3,2 (1,7- 7,5)
	C	17	0,84	0,16			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas de BChE en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo BChE-K sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo BChE-K sobre el riesgo para la EA tras aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

3.5.1. El alelo T del gen catD en la EA precoz y tardía

Para determinar si el alelo T de catD se puede considerar un locus de efecto mayor en la etiopatogenia de la EA, analizamos su presencia primero en los dos grandes subgrupos de EA_p y EA_t, comparando los valores de las frecuencias alélicas obtenidas con los valores de sus respectivos grupos control.

En ninguno de los dos subgrupos se detectó la implicación del alelo catD-T en el desarrollo de la EA, siendo las frecuencias alélicas de 0,09 en los pacientes del

subgrupo con EAp y de 0,10 en los respectivos controles ($p = 0,739$ por el test χ^2), en tanto que para el subgrupo de EA_t fueron de 0,09 en los enfermos y de 0,08 en los controles ($p = 0,712$ por el test χ^2).

3.5.2. El alelo T del gen catD en subgrupos separados por intervalos de 10 años

En el caso de que catD fuese un locus de efecto menor, sería posible detectar algún valor de asociación positivo en grupos que abarcasen menos pacientes. Por lo tanto, dividimos a los pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 10 años: (1) pacientes que debutaron con la EA antes de los 60 años de edad e individuos control menores de 60 años, (2) pacientes con el comienzo de la enfermedad situado entre los 60 y 69 años y controles entre los 60 y 69 años de edad, (3) pacientes con el debut de la EA entre los 70 y 79 años de edad y sus respectivos controles entre los 70 y 79 años, y (4) pacientes que debutaron a los 80 años o después.

El análisis de los resultados obtenidos en estos cuatro subgrupos permitió observar una cierta tendencia a la acumulación del alelo catD-T en el subgrupo de pacientes y controles con edades entre los 70 y 79 años, siendo los valores de las frecuencias alélicas de catD-T de 0,10 en los pacientes y de 0,06 en los controles. La diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,092$ por el test χ^2), pero indicaba la posibilidad de detectar una asociación, aunque ligera, entre el alelo catD-T y la EA en la siguiente división de este subgrupo. En el resto de los subgrupos no se observaron diferencias apreciables entre los pacientes y controles en cuanto a los valores de las frecuencias alélicas obtenidos.

3.5.3. El alelo T del gen catD en subgrupos separados por intervalos de 5 años

Para determinar finalmente si el gen catD puede ser considerado como un locus de implicación menor con respecto a la EA, dividimos a los pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de 5 años: (1) menores de 60 años, (2) entre los 60 y 64 años de edad, (3) entre los 65 y 69 años de edad, (4) entre los 70 y 74 años de edad, (5) entre los 75 y 79 años de edad y (6) de 80 años de edad o mayores.

La utilización de esta táctica de análisis de los resultados permitió la detección del alelo catD-T como factor de riesgo para la EA en uno de los subgrupos (Tabla 11).

TABLA 11

Frecuencias alélicas de catD en pacientes con EA divididos en subgrupos separados por intervalos de 5 años y controles correspondientes

Subgrupo	Alelos			Valor P ^a	OR ^b (95%CI) ^c	OR ^d (95%CI) ^c
	N	C	T			
<60 EA	30	0,90	0,10	1	1	
	C	28	0,90			
60-64 EA	16	0,92	0,08	0,505	0,7 (0,1 – 2,8)	0,5 (0,1 – 2,1)
	C	18	0,90			
65-69 EA	34	0,89	0,11	0,758	0,4 (0,02 – 2,6)	0,4 (0,04 – 1,8)
	C	33	0,88			
70-74 EA	35	0,96	0,04	0,399	0,8 (0,1 – 4,2)	0,6 (0,09 – 3,5)
	C	32	0,94			
75-79 EA	32	0,83	0,17	<0,001	2,4 (1,2 – 7,9)	3,1 (1,8 – 8,7)
	C	27	0,94			
≥80 EA	16	0,95	0,017	<0,001	2,1 (1,1 – 7,6)	2,8 (1,8 – 8,3)
	C	17	0,94			

^a Resultado del test χ^2 analizando las diferencias entre las frecuencias alélicas de catD en pacientes con EA y controles. ^b Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo catD-T sobre el riesgo para la EA. ^c Intervalo de confianza del 95%. ^d Odds-ratios (OR) para estimar el efecto del alelo catD-T sobre el riesgo para la EA tras aplicar la corrección correspondiente para tests múltiples.

La frecuencia alélica de catD-T en el subgrupo de pacientes entre los 75 y 79 años de edad fue significativamente mayor en comparación con la frecuencia alélica de catD-T en el subgrupo control correspondiente (Tabla 11).

Esta acumulación del alelo catD-T traduce la asociación entre el alelo estudiado y la EA en este subgrupo de enfermos y adquiere mayor importancia tras la aplicación

de los tests múltiples para la validación de los resultados obtenidos (Tabla 11). En el resto de los subgrupos no se observó la acumulación del alelo catD-T en los pacientes con EA, por lo cual no se obtuvieron otros resultados positivos en el análisis de este alelo y la EA (Tabla 11).

4. Caracterización de posibles subtipos de la EA

Además del análisis de los resultados teniendo en cuenta los diferentes polimorfismos involucrados en el desarrollo de la EA, también se analizaron por separado los resultados obtenidos para cada subgrupo. De este modo se detectaría la presencia o ausencia de homogeneidad genética entre los diferentes subgrupos analizados. La detección de diferencias significativas en la distribución de los diversos alelos involucrados como factores de riesgo en los diferentes subgrupos permitiría la identificación de subtipos de la EA.

En este análisis solamente se incluyeron los pacientes con EA esporádica, ya que se intentaba definir la influencia de los factores genéticos como factores de riesgo.

4.1. Pacientes con EA menores de 60 años de edad

En los pacientes que debutaron antes de los 60 años de edad, se detectó una acumulación de varios de los factores analizados, pero tan sólo se obtuvieron valores significativos para uno de estos marcadores (Figura 9).

El alelo APOE ϵ 4 juega cierto papel en el desarrollo de la enfermedad en estos pacientes, sin llegar a ser un factor genético de importancia en este subgrupo. También el número de portadores del genotipo APOE4/4 está representado con una frecuencia muy baja (Figura 9, Tablas 1 y 2).

El único marcador con importancia para este subgrupo es el alelo CST3-A del gen de la cistatina C, el cual se asociaba a la EA con una odds-ratio de 3,4 (95% CI 1,2 – 13,9). Además de la asociación del alelo CST3-A a la enfermedad, se detectó una asociación sinérgica entre este alelo, el alelo APOE ϵ 4 y la EA. Aunque hubiese una asociación entre ambos alelos, el alelo CST3-A de por sí confiere riesgo para la EA en este subgrupo, como indican los resultados de los análisis por regresión logística, ya que

la odds-ratio obtenida para medir la asociación entre el alelo CST3-A es mayor que la odds-ratio que define la asociación entre ambos alelos y la enfermedad (3,4 en comparación con 2,4; Tablas 6 y 7).

No se hallaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas o genotípicas del polimorfismo de PS1 entre enfermos y controles (Tabla 8), pero se observó una asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1.1 y el alelo APOE ϵ 4 (Figura 9). Esta asociación al genotipo PS1 1.1 cobraba cierta importancia como factor de riesgo para los enfermos menores de 60 años de edad.

El alelo BChE-K estaba ligeramente acumulado en el presente subgrupo, con frecuencias alélicas más altas en los pacientes que en los controles (Figura 9). No se encontraron diferencias entre pacientes y controles para los otros marcadores analizados.

4.2. Pacientes con EA entre los 60 y 64 años de edad

El subgrupo de pacientes entre los 60 y 64 años de edad se caracteriza por una sobrerrepresentación muy marcada del alelo APOE ϵ 4 y la interacción por sinergia de este alelo con otros factores genéticos.

La acumulación del alelo APOE ϵ 4 en este subgrupo era tan elevada que llegaba a ser cuatro veces la de los individuos normales (Tabla 1), valores que no se detectaron en los otros subgrupos. El 25% de los enfermos eran portadores del genotipo APOE4/4, lo cual tampoco se repitió en otro subgrupo (Figura 10). La asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA encontrada en este subgrupo era muy significativa y mucho mayor que la descrita en estudios previos (Tabla 1).

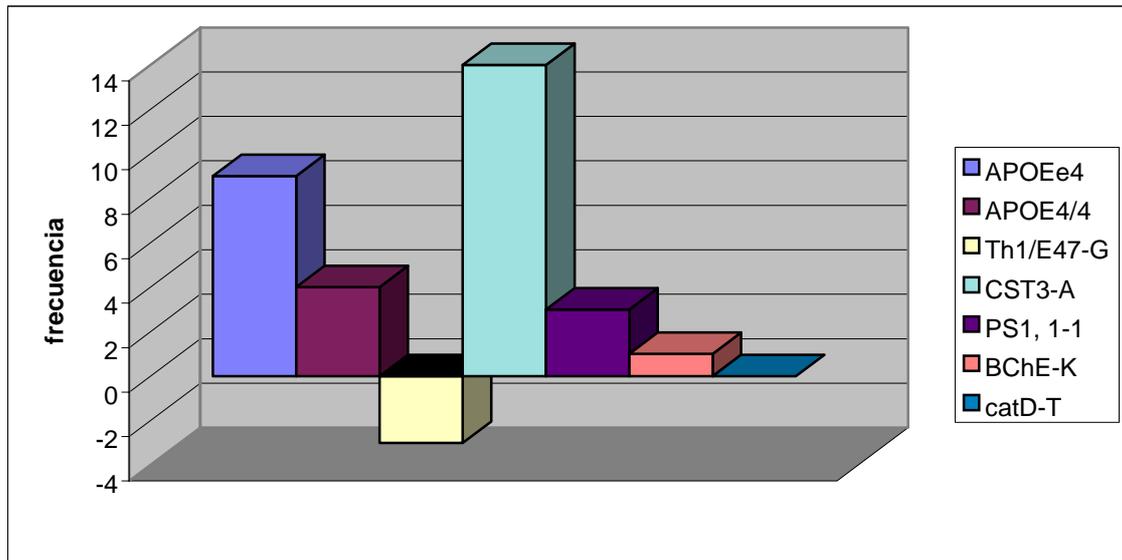


FIGURA 9: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA menores de 60 años de edad. El factor genético más importante en este grupo es el alelo A de CST3.*

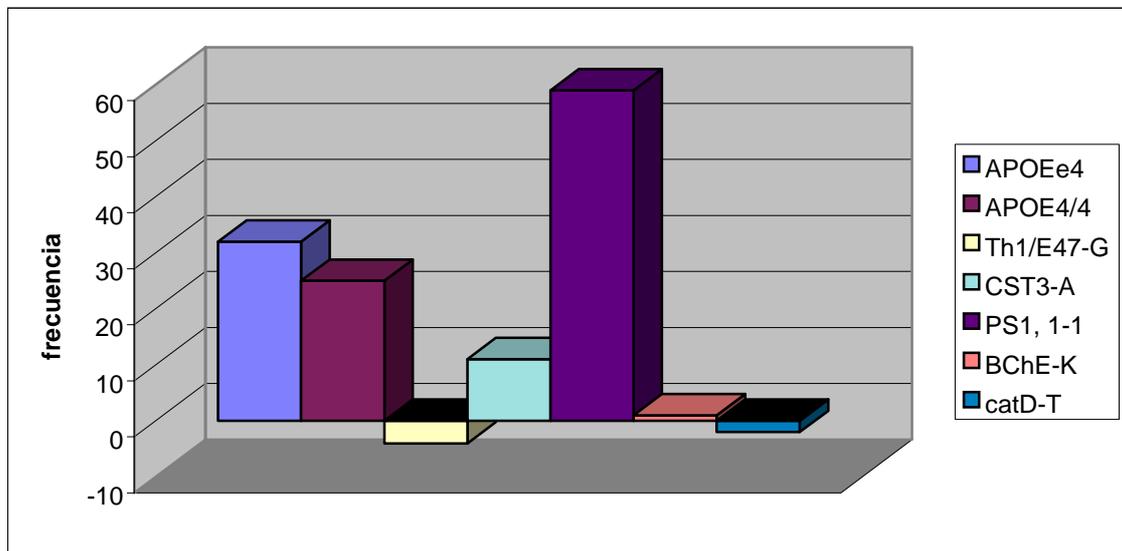


FIGURA 10: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA entre 60 y 64 años de edad. Aparte de la importancia del alelo APOEε4 y su presencia en doble dosis en forma del genotipo APOE4/4, el genotipo 1-1 del PS1 se encuentra marcadamente sobrerrepresentado.*

El alelo CST3-A también se hallaba acumulado en estos pacientes, pero sin presentar valores muy elevados. Su efecto importante se hizo notar junto con el alelo APOE ϵ 4, porque ambos alelos actúan en asociación sinérgica en este subgrupo de pacientes de EA de debut precoz (Figura 10).

El análisis del polimorfismo de PS1 puso de manifiesto que ninguno de los alelos por separado ejercía un efecto sobre el riesgo a padecer la EA. Cuando se analizaron las frecuencias de los diferentes genotipos se detectó una importante acumulación del genotipo PS1 1-1, junto con la asociación sinérgica entre este genotipo y el alelo APOE ϵ 4 (Figura 10, Tablas 7 y 8).

Otros de los posibles marcadores genéticos analizados en este estudio no resultaron ser significativos para el desarrollo de la EA en pacientes entre los 60 y 64 años de edad (Figura 10).

4.3. Pacientes con EA entre los 65 y 69 años de edad

Para los pacientes entre los 65 y 69 años de edad el alelo APOE ϵ 4 sigue siendo un factor genético muy importante que interviene como factor de riesgo en el desarrollo de la EA. La acumulación expresada por su frecuencia alélica y su asociación a la enfermedad expresada por la odds-ratio obtenida (Tabla 1) son indicativas, junto con la presencia elevada del genotipo APOE4/4 (Figura 11), del papel que juega APOE en los pacientes que debutaron entre los 65 y 69 años de edad.

La influencia del alelo APOE ϵ 4, además, se ve reforzada por su interacción sinérgica con el alelo CST3-A y con el genotipo PS1 1.1. Es interesante destacar la existencia de una asociación sinérgica entre los alelos CST3-A y APOE ϵ 4, así como entre el genotipo PS1 1.1 y el alelo APOE ϵ 4. Esta asociación, sin embargo, no se demostró para los tres factores a la vez (Tabla 9). Así, una parte de la acción del alelo APOE ϵ 4 es reforzada por su asociación al alelo CST3-A, en tanto que otra parte es reforzada por su asociación al genotipo PS1 1.1 (Figura 11).

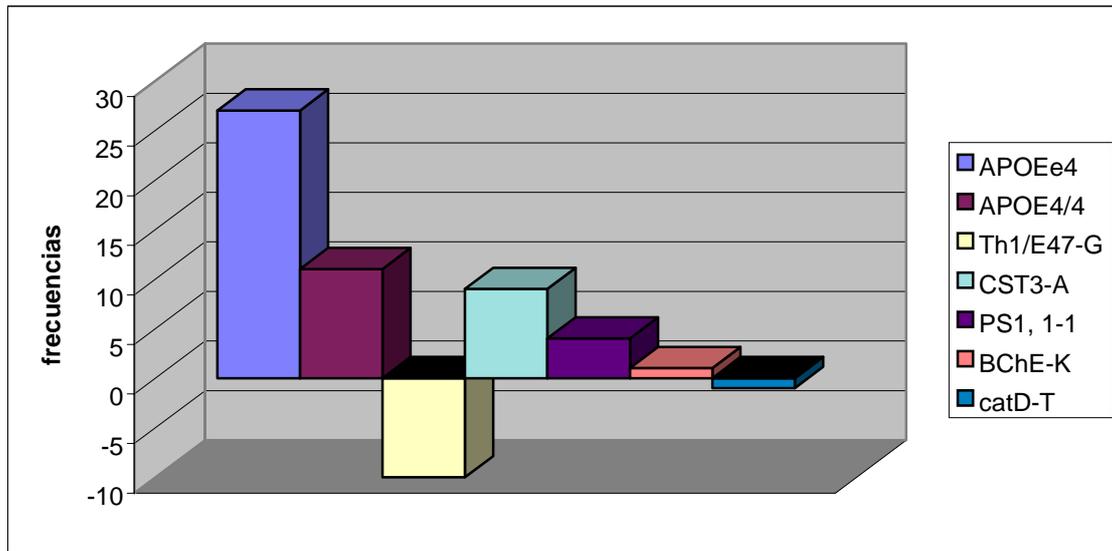


FIGURA 11: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA entre 65 y 69 años de edad. El factor genético más importante para este subgrupo es el alelo APOEε4, ya que disminuye el efecto del genotipo APOE4/4.*

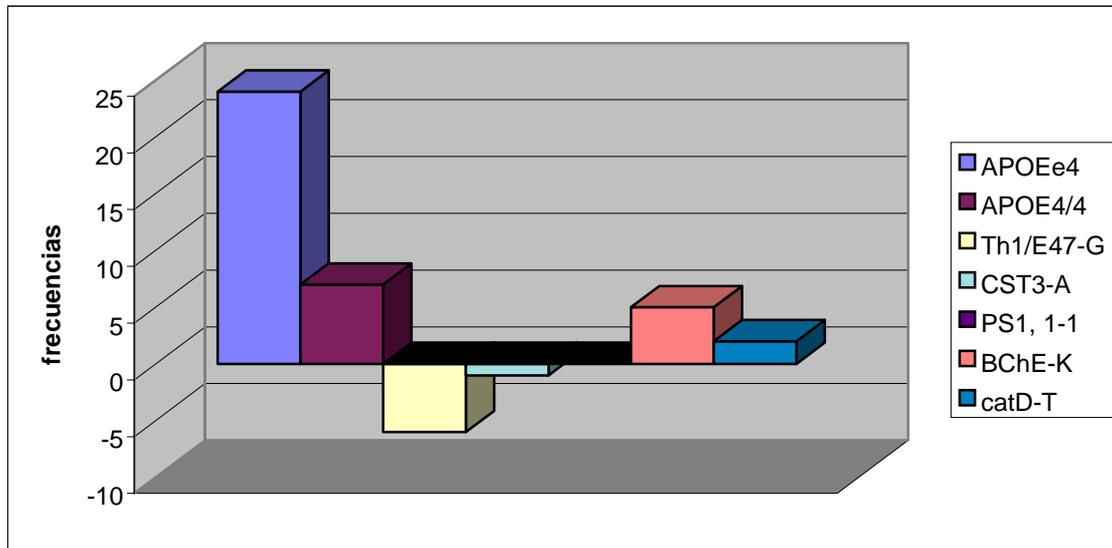


FIGURA 12: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA entre 70 y 74 años de edad. En este subgrupo solo se detectó un factor de riesgo: el alelo APOEε4.*

El alelo CST3-A, el cual está acumulado en este subgrupo, no parece ejercer una influencia adicional sobre el riesgo para la EA, porque la odds-ratio determinada para la asociación entre este alelo y la EA fue inferior a la odds-ratio detectada para la asociación entre los alelos CST3-A y APOE ϵ 4 y la EA (Tablas 5 y 6).

No se demostró la implicación de otros factores en la etiopatogenia de la EA en este subgrupo (Figura 11).

4.4. Pacientes con EA entre los 70 y 74 años de edad

En general, se detectaron pocas influencias genéticas en los pacientes que debutaron entre los 70 y 74 años de edad.

El alelo APOE ϵ 4 es el factor genético más importante en este subgrupo, siendo su influencia marcadamente menor que en el subgrupo de los pacientes entre los 60 y 64 años de edad y menor que en el subgrupo de los pacientes entre los 65 y 69 años de edad (Tabla 1; Figuras 10, 11 y 12). Además de la acumulación del alelo APOE ϵ 4, aún era patente una ligera elevación de la presencia del genotipo APOE4/4 (Figura 12).

La butirilcolinesterasa comenzaba a presentar una implicación leve como factor genético en el desarrollo de la EA, pero en este subgrupo no se puso en evidencia la implicación de ninguno de los otros marcadores investigados (Figura 12).

4.5. Pacientes con EA entre los 75 y 79 años de edad

En este subgrupo comienza a desaparecer el efecto del alelo APOE ϵ 4. Solamente se detectó una frecuencia alélica ligeramente elevada en comparación con el grupo control, mientras los portadores del genotipo APOE4/4 desaparecían ya en este subgrupo. Además, las odds-ratio de 3,4 y 4,3 obtenidas para la asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA y la asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1.1, el alelo APOE ϵ 4 y la EA, respectivamente, reflejan que el alelo APOE ϵ 4 ya no ejerce su efecto independientemente, sino en asociación sinérgica al genotipo PS1 1.1 (Tablas 1 y 8, Figura 13).

Algunos factores genéticos que en los subgrupos anteriores no habían resultado positivos cobraron importancia en el subgrupo de debut entre los 75 y 79 años. Así, los

alelos BChE-K y catD-T presentaron una acumulación en este subgrupo, con odds-ratios respectivas de 5,2 y 3,4, convirtiéndose en factores de riesgo para la EA (Figura 13).

La frecuencia del alelo CST3-A estaba disminuida en comparación con la frecuencia de este alelo en el subgrupo control (Figura 13).

Además de en los pacientes, se observó un cambio significativo en los individuos control entre los 75 y 79 años de edad. La frecuencia del alelo G del polimorfismo Th1/E47 del promotor de APOE se hallaba drásticamente disminuida en comparación con la frecuencia de este mismo alelo en los pacientes, que se mantenía constante en comparación con los subgrupos anteriores y con los subgrupos control de los otros intervalos de edad (Tabla 4.2).

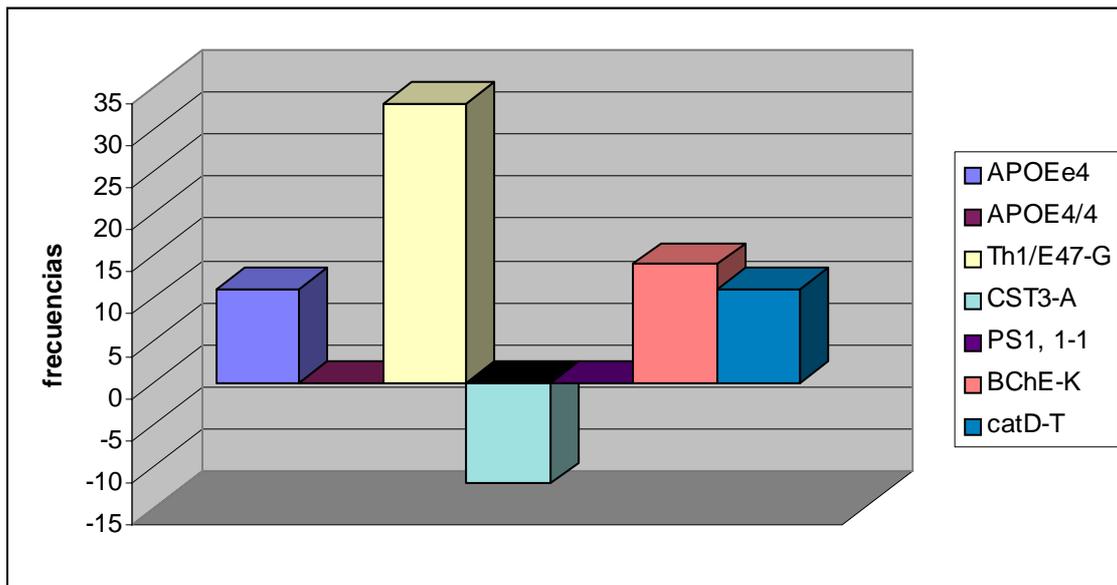


FIGURA 13: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA entre 75 y 79 años de edad. El alelo G del polimorfismo Th1/E47 en el promotor de APOE aparece como factor de riesgo importante. Como factores de riesgo adicionales se detectaron los alelos BChE-K y catD-T.*

4.6. Pacientes con EA de 80 o más años de edad

En este subgrupo se detectó la influencia de tres factores genéticos. De un lado se trataba del alelo G del polimorfismo Th1/E47, la frecuencia del cual se encontraba significativamente aumentada en comparación con los respectivos controles, pero también en comparación con los pacientes de los otros subgrupos (Figura 14, Tabla 4.2).

El alelo APOE ϵ 4 ya no representaba ningún factor de riesgo para los enfermos mayores de 80 años de edad, y, por el contrario, se observaba una frecuencia del alelo APOE ϵ 4 ligeramente mayor en los controles que en los pacientes (Figura 14).

La frecuencia del alelo CST3-A estaba marcadamente disminuida en comparación con los controles, y los otros marcadores analizados en este estudio no presentaban diferencias significativas entre los pacientes y los controles (Figura 14).

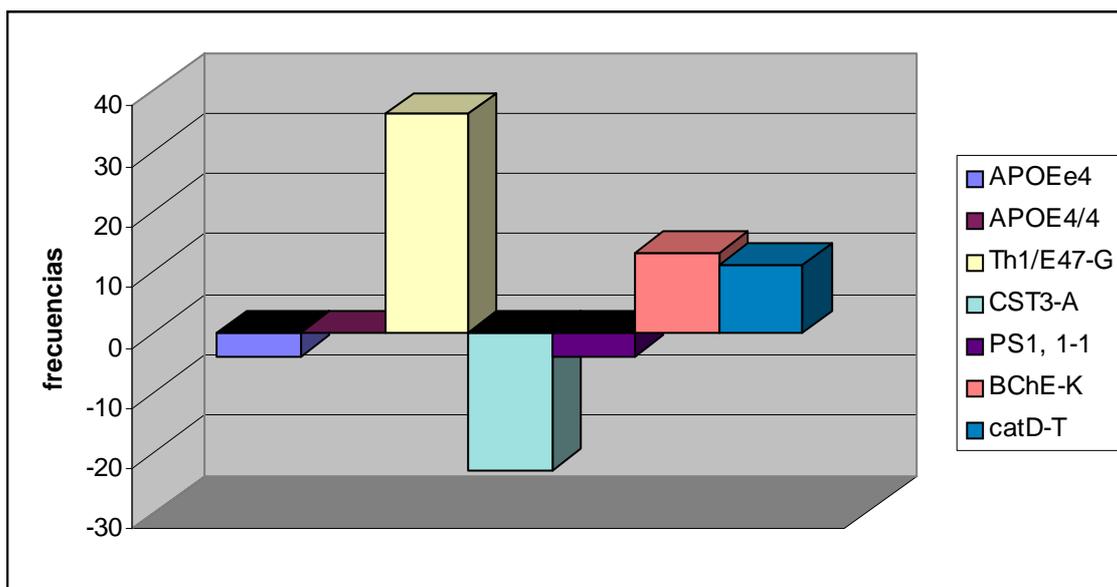


FIGURA 14: *Representación de marcadores genéticos analizados en pacientes con EA de 80 años de edad o mayores. El alelo Th1/E47-G es el factor de riesgo más importante, acompañado por los alelos BChE-K y catD-T.*

V. DISCUSIÓN

En la década de los 90 del siglo XX se produjeron muchos descubrimientos con importantes repercusiones en cuanto a la comprensión de la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer (EA). En el momento actual la información acumulada sobre los aspectos moleculares de la EA es tal que resulta posible afirmar que el desciframiento de la etiopatogenia de la EA y el tratamiento efectivo de la misma se encuentran muy próximos (Cruts, et al, 1998).

El análisis genético de la EA es una tarea difícil donde es imprescindible tener en cuenta la complejidad de la enfermedad, que es consecuencia, sobre todo, de la heterogeneidad genética. Así, hoy en día, se habla de varios tipos de EA (Rosenberg, 2000), dependiendo de la historia familiar del paciente, de la edad de debut de la enfermedad, de los marcadores genéticos o de los factores ambientales a los cuales estuvo expuesto el enfermo.

La mayoría de los casos de EA son esporádicos, pero, no obstante, una mejor información genética y molecular acerca de los genes específicos y otros factores de riesgo implicados en la forma familiar de la EA ayudará a dilucidar la etiología de las mucho más abundantes formas esporádicas.

Aproximadamente el 10% de los casos de EA familiar presentan un patrón de herencia autosómico dominante. Además, estudios epidemiológicos indican que existe un 30% de casos con historia familiar positiva, donde al menos un familiar con parentesco de primer grado está afectado por la enfermedad (Tanzi et al., 1996; Cruts et al., 1998). Se sabe que la EA de comienzo precoz, de transmisión autosómica dominante, representa un grupo heterogéneo de trastornos causados por diferentes mutaciones genéticas en distintas familias. La EA esporádica de comienzo tardío es el resultado de influencias genéticas y ambientales, cuya indentificación no se ha producido aún (Rosenberg, 2000)

Teniendo en cuenta los datos referidos, en la primera parte del presente trabajo se analizaron los genes cuyas mutaciones están involucradas en el desarrollo de la EA familiar. Hasta el momento se conocen tres de estos genes: APP en el cromosoma 21, PS1 en el cromosoma 14 y PS2 en el cromosoma 1.

En el análisis mutacional de los exones 16 y 17 de APP, cuya traducción da lugar al péptido beta-amiloide, se detectaron tres mutaciones en total. La primera fue la mutación V717I en el exón 17, descrita como la primera mutación causante de la EA (Goate et al, 1991). Además, es la más frecuente de todas las mutaciones descritas en APP y se ha detectado en más de una familia (Goate et al, 1991; Hardy y Allsop, 1991; Naruse et al., 1991, Yoshioka et al, 1991), a diferencia de las otras mutaciones de APP, cada una de las cuales se ha detectado en una sola familia.

Se han hallado dos mutaciones intrónicas en tres pacientes diferentes, dos de ellos portadores de una mutación en la posición -65 a 3' del exón 17 y el tercero con una mutación en la posición -75 a 3' del exón 17. Al ser ambas mutaciones intrónicas, es muy poco probable que sean funcionales, ya que no hay alteración directa de la estructura primaria de APP. Para determinar si una de estas mutaciones es patológica, sería necesario encontrar y estudiar otros miembros de estas familias, tanto afectados como sanos. Si en cada familia se repitieran las mutaciones en los miembros afectados pero no en los sanos, sería factible proponer que se trata de mutaciones patológicas que afectarían, por ejemplo, el *splicing* normal de la proteína.

La frecuencia descrita para mutaciones en el gen de APP oscila entre el 2 y 5% (Tanzi et al., 1996; Cruts y Broeckhoven, 1998), y un valor en este rango sería el esperado en la población analizada. El hecho de que tan sólo se haya detectado un portador único con una mutación de APP, lo cual corresponde al 1,7% de frecuencia de las mutaciones de APP en nuestra población con EA familiar, puede significar que (1) la frecuencia de mutaciones en este gen sea más baja en la población española, o mediterránea española, o (2) el número de familias analizadas ha sido demasiado pequeño para alcanzar conclusiones finales. Es posible que, al incrementar la muestra, se detecten más familias en las que la EA esté causada por mutaciones de APP, o que se pueda concluir con más seguridad que la frecuencia de estas mutaciones es más baja en la población estudiada.

En los 35 pacientes con EA precoz familiar no se encontró ninguna mutación funcional en el gen de PS1. Este dato parece indicar que la incidencia de mutaciones de

PS1 descrita en la literatura (60-70%) o bien está sobreestimada o bien es específica de poblaciones de origen étnico diferentes a la española mediterránea.

Parece probable que las mutaciones de PS1 sean, en efecto, menos frecuentes en la población española o mediterránea española, ya que hasta el momento sólo se han descrito cuatro mutaciones en España (Aldudo et al., 1998; Ezquerro et al., 1999; Ezquerro et al., 2000). Tres de ellas se han identificado en Cataluña, donde en estos momentos se desarrolla un programa para detectar a las familias de riesgo. Los cálculos llevados a cabo para la población catalana proporcionan una cifra de 300 000 personas con riesgo de padecer la EA. Asumiendo que el 1% de tales casos sean familiares, habría 3000 familias afectadas y, si el 10% de estas familias presenta un patrón de herencia autosómico dominante (Tanzi et al., 1996), serían 300 las familias cuya enfermedad estaría causada por una mutación única en uno de los genes involucrados en la EA familiar. Se ha descrito que en el 60 al 70 % de estos casos la EA es consecuencia de una mutación en el gen de PS1 (Cruts y Broeckhoven, 1998), lo que significaría que tan sólo en Cataluña habría 180 familias con mutaciones en el gen de PS1. El hecho de que hasta el momento se hayan descrito nada más que tres mutaciones y de que se esté trabajando en un programa para la detección de estas mutaciones invita a pensar que su frecuencia es inferior al 60% descrito en la población española afectada.

Se ha caracterizado la nueva mutación V148I en el TM2 del gen de PS2 en un paciente con EA familiar de debut tardío (Lao et al., 1998) y se ha comprobado que las mutaciones de PS2 son mucho menos frecuentes que las de PS1 (Murgolo et al., 1996; Tanzi et al., 1996). Específicamente, sólo el 7,9% de todas las mutaciones de los genes de las presenilinas identificadas hasta ahora son mutaciones de PS2.

La mutación V148I es la segunda encontrada en enfermos con EA tardía, lo cual indica que el análisis de los casos de EA familiar precoz no es suficiente. Es probable que la baja frecuencia de mutaciones de PS2 encontrada sea debida al análisis de tan sólo familias con EA precoz, sin tener en cuenta que las mutaciones en este gen también podrían darse en familias con debut tardío de la enfermedad. Hasta el momento no se conocen todas las funciones de las presenilinas, pero se ha descubierto que una de ellas

es intervenir en el procesamiento de APP mediante la facilitación de la actividad de la gamma-secretasa (De Strooper et al., 1998). PS1 es responsable del 60% de la actividad enzimática (Wolfe et al., 1999a), mientras la PS2 cubre el 40% restante (Kimberly et al., 2000). Aunque ambas presenilinas estén implicadas en la generación de A β , PS2 lo está en menor medida. Por ello, bien podrían existir familias con EA familiar tardía en las que la enfermedad esté causada por mutaciones del gen de PS2.

En tanto que sólo el 5,7% de todas las mutaciones descritas en el gen de PS1 afectaban a familias españolas, el 16,7% de las mutaciones de PS2 se han identificado en España. Estos porcentajes podrían indicar que en la población española las mutaciones de PS2 son más frecuentes que las mutaciones de PS1 o, lo que es más probable, que por falta de estudio de familias con EA tardía, la frecuencia de las mutaciones de PS2 esté subestimada en estos momentos.

Las variaciones polimórficas en el locus de apoE actúan como factores de riesgo heredados, influyendo la susceptibilidad genética para la EA (Strittmatter et al., 1993a; Saunders et al., 1993). Mientras el alelo APOE ϵ 4 es el factor de riesgo más importante descrito hasta ahora, encontrándose asociado a una edad de comienzo de la EA más temprana (Corder et al., 1993), el alelo APOE ϵ 2 puede considerarse como un factor protector contra la EA (Corder et al., 1994).

El primer bloque de datos analizado en el presente trabajo ha puesto de manifiesto una diferencia poco apreciable entre las frecuencias del alelo APOE ϵ 4 en la EA precoz y la EA tardía. En ambos casos estas frecuencias fueron significativamente más altas que en los respectivos grupos control. De este modo se confirmó la importancia del alelo APOE ϵ 4 como factor de riesgo para la EA en la población de enfermos analizada en este estudio. Además, la detección de la acumulación del alelo APOE ϵ 4 en la totalidad de la muestra analizada, sin necesidad de limitaciones de edad de comienzo de la enfermedad, corrobora su papel como locus mayor de susceptibilidad (Strittmatter et al., 1993a).

En el segundo bloque del análisis de los datos se introdujo una división según la edad de comienzo de la enfermedad, de modo que los pacientes con EA y los controles correspondientes se dividieron en subgrupos separados por intervalos de 10 años. Como resultado pudo observarse que la importancia del alelo APOE ϵ 4 como factor de riesgo para la EA disminuye drásticamente en pacientes que debutaron antes de los 60 años y desaparece por completo en los pacientes de 80 o más años de edad. Estos datos coinciden con los resultados de otros grupos, que han descrito que el riesgo conferido por el alelo APOE ϵ 4 depende de la edad de comienzo de la EA (Farrer et al., 1997; Frisoni et al., 1998). Además, observamos una inversión de las frecuencias del alelo APOE ϵ 4 en el subgrupo de pacientes con 80 o más años, donde los individuos control presentaban una frecuencia del alelo APOE ϵ 4 mayor que los enfermos. Estos datos confirman la importancia del alelo APOE ϵ 4 como factor de riesgo para el desarrollo de la EA en individuos de hasta 80 años de edad, porque la presencia de los portadores de este alelo se halla disminuida muy llamativamente en pacientes mayores, probablemente debido a su muerte a edades más tempranas.

El análisis de los resultados en el último bloque, donde los pacientes y controles se dividieron en subgrupos separados por intervalos de 5 años, permitió la identificación de los pacientes entre los 60 y 64 años de edad como el subgrupo en que el alelo APOE ϵ 4 tiene mayor influencia e importancia como factor de riesgo. El subgrupo de pacientes con el debut de la EA entre los 60 y 64 años presentaba una asociación muy elevada entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA, con una odds-ratio de 14,9. Este valor es el doble o más del descrito en otros trabajos (Saunders et al., 1996; Farrer et al., 1997; Finckh et al., 2000), donde la población de pacientes se analizó independiente de la edad de comienzo de la enfermedad. Además de corroborar la importancia del alelo APOE ϵ 4 como factor de riesgo en el subgrupo de edad entre los 60 y 80 años, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que, aun dentro de este subgrupo, la influencia del alelo APOE ϵ 4 depende de la edad de los pacientes. De este modo, la asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA disminuye lentamente a través de los cuatro subgrupos que incluyen los pacientes entre los 60 y 80 años de edad, hasta llegar a un valor mínimo en el subgrupo entre los 75 y 79 años.

Se ha incriminado al genotipo APOE4/4 como responsable de la precipitación del comienzo de la EA (Saunders et al., 1993). Los resultados de nuestro estudio confirman los hallazgos previos y, además, ponen de manifiesto que la presencia del genotipo APOE4/4 es dependiente de la edad de comienzo en los subgrupos entre los 60 y 74 años. En los pacientes con debut de la enfermedad antes de los 60 años de edad, el genotipo APOE4/4 está presente con una frecuencia muy baja y no se detectó ninguna asociación entre este genotipo y la EA. Este resultado concuerda perfectamente con la identificación de frecuencias de APOE ϵ 4 más bajas en pacientes menores de 60 años y con el hecho de que el alelo APOE ϵ 4 comienza a ejercer su influencia como factor de riesgo para la EA a partir de los 60 años de edad.

La presencia del genotipo APOE4/4 fue significativa en tres de los subgrupos analizados en el último paso: en el subgrupo de pacientes entre los 60 y 64 años de edad, en el subgrupo de pacientes y controles entre los 65 y 69 años y en el subgrupo de enfermos y controles entre los 70 y 74 años. Se detectó un valor muy elevado de asociación entre el genotipo analizado y la EA en el subgrupo entre los 60 y 64 años de edad, donde el 25% de los pacientes eran portadores del genotipo APOE4/4. Este alto porcentaje de portadores del genotipo APOE4/4 en este subgrupo explicaría, a su vez, la frecuencia elevada del alelo APOE ϵ 4 y el valor de asociación tan significativo entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA. En los dos subgrupos siguientes la asociación entre el genotipo APOE4/4 y la EA fue disminuyendo poco a poco en los sucesivos subgrupos, hasta la desaparición total de este genotipo en los pacientes con 75 o más años de edad.

Con estos resultados se demuestra, que, aparte de ser un factor de riesgo de elevada importancia en pacientes entre los 60 y 64 años de edad, el alelo APOE ϵ 4 actúa de forma dependiente de la dosis y precipita el comienzo de la enfermedad. Por ello se observó su acumulación y su presencia en doble dosis en el subgrupo de enfermos menores de 65 años y, además, la desaparición lenta de ambos efectos a través de los subgrupos hasta llegar a los 80 o más años de edad, donde el alelo APOE ϵ 4 pierde su importancia como factor de riesgo para la EA.

Se han propuesto diferentes mecanismos biológicos para la explicación de la asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA: la isoforma apoE4 facilitaría (o al menos no limitaría) la deposición amiloidea (Strittmatter et al., 1993b; Evans et al., 1995) y no protegería contra el estrés oxidativo, en contraste con la isoforma apoE2 (Miyata y Smith, 1996). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis explica porqué los individuos homocigotos para el alelo APOE ϵ 4 sobreviven hasta los 80 años sin haber desarrollado la EA. Existen resultados de estudios recientes que sugieren que factores genéticos dentro del mismo locus de APOE también pueden modular el riesgo a padecer la enfermedad. Así, se ha descrito la asociación estrecha entre el alelo APOE ϵ 4 y un polimorfismo consistente en un cambio C/G en el *enhancer* del intrón 1 (IE1) (Mui et al., 1996). Además se han descrito varios polimorfismos en la región promotora de APOE, dos de los cuales modulan la expresión del gen (Lambert et al., 1998a; Artiga et al., 1998).

El primero de estos polimorfismos descritos se localizaba en la posición -491 hacia el inicio de la transcripción (Bullido et al., 1998), donde una adenina representa el alelo más frecuente, mientras el alelo que contiene una timina presenta una frecuencia mucho más reducida. En el primer trabajo se observó una asociación entre el genotipo AA y la EA, según la cual la presencia de este genotipo aumentaba en más de tres veces el riesgo a padecer la EA (Bullido et al., 1998).

En el mismo año de 1998 se descubrió un segundo polimorfismo en la posición -219 hacia el inicio de la transcripción (Lambert et al., 1998a). Este polimorfismo está localizado dentro de la secuencia de unión del factor transcripcional heterodimérico TH1/E47 y se le denominó polimorfismo E47/Th1cs. El alelo representado por una guanina en esta posición es el más común en la población normal, con una frecuencia de 0,53, mientras que el alelo representado por una timina es el menos frecuente. En su estudio, Lambert y cols (Lambert et al., 1998a) analizaron además un grupo de 279 enfermos con EA y hallaron una frecuencia del alelo G disminuida en comparación con el grupo control. En la conclusión de este trabajo se discutió la posibilidad de que esta mutación resultase en una modulación de la expresión del gen, lo que tendría tres

repercusiones principales: (1) la mutación en el promotor modularía el riesgo conferido por el alelo APOE ϵ 4, o el efecto protector del alelo APOE ϵ 2, (2) esta mutación tendría efectos diferentes en portadores heterocigotos o homocigotos del alelo APOE ϵ 4, y (3) el riesgo a padecer la EA sería diferente en portadores del genotipo APOE3/4 y el genotipo GG, del genotipo APOE3/4 y el genotipo TG, del genotipo APOE3/4 y el genotipo TT (Lambert et al., 1998a).

Un tercer estudio sobre las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos descritos en la región promotora del APOE confirmó los resultados antes obtenidos, siendo adscritos los efectos perjudiciales al alelo Th1/E ϵ 7-T y los efectos protectores al alelo -491AT-T (Bullido et al., 1998; Lambert et al., 1998a), pero sólo para los individuos portadores del genotipo APOE3/4 (Lambert et al., 1998b).

En un estudio posterior se analizó la totalidad de la región promotora de APOE a la búsqueda de nuevos polimorfismos. Se encontraron un total de cinco, pero sólo dos de ellos estaban implicados en la expresión del gen (Artiga et al., 1998). La presencia del alelo G en el polimorfismo Th1/E47 aumentaba significativamente la expresión del gen, mientras el alelo T del polimorfismo -491AT disminuía dicha expresión.

Los primeros estudios analizaron las frecuencias alélicas en poblaciones de enfermos y controles, desconociendo los efectos de los diferentes alelos sobre la expresión del gen (Bullido et al., 1998; Lambert et al., 1998a; Lambert et al., 1998b). Para la obtención de datos con la menor distorsión posible, en el presente estudio se han aplicado correcciones teniendo en cuenta los efectos contrarios de los alelos G del polimorfismo Th1/E47 y T del polimorfismo -491AT en individuos homocigotos.

El intento de reproducir los resultados obtenidos en los estudios anteriores resultó infructuoso, probablemente por dos razones principales: (1) en los estudios anteriores no se aplicaron las correcciones a tener en cuenta para portadores del genotipo APOE3/3, el alelo -491AT-T y el alelo Th1/E47-G por falta de conocimiento de su influencia sobre los niveles de expresión, y (2) en los estudios previos se analizó la población en su conjunto, sin introducir separaciones de edad algunas (Bullido et al., 1998; Lambert et al., 1998a; Lambert et al., 1998b).

El análisis de las frecuencias alélicas del polimorfismo -491AT puso de manifiesto, en los pacientes y controles, frecuencias del alelo T mucho más bajas que para el alelo A. En cuanto a los pacientes, estas frecuencias fueron homogéneas en los seis subgrupos analizados y oscilaban entre 0,12 y 0,19. Por lo que se refiere a los individuos control, se detectaron dos subgrupos en los que estas frecuencias se hallaban aumentadas en comparación con los pacientes. Después de la aplicación de las correcciones, que tenían en cuenta la presencia de portadores del genotipo APOE3/3 y además de los alelos T del polimorfismo -491AT, y G del polimorfismo Th1/E47, las frecuencias del alelo T bajaron hasta la mitad en todos los subgrupos de pacientes, oscilando ahora entre 0,04 y 0,07. En los subgrupos control con individuos de hasta 64 años de edad se observó una acumulación significativa del alelo T, la cual había sido menos pronunciada antes de aplicar la corrección.

El estudio del polimorfismo Th1/E47 también reveló la implicación de uno de los dos alelos en los dos subgrupos control con individuos de más de 75 años de edad. En tanto que las frecuencias del alelo Th1/E47-G no eran significativamente diferentes entre los pacientes y controles y se mantenían constantes para ambos grupos hasta los 74 años de edad (0,39-0,52 en los pacientes y 0,43-0,58 en los controles), las frecuencias de dicho alelo disminuían bruscamente en los grupos control a partir de los 75 años de edad. Este efecto no se vio alterado por la aplicación de las correcciones utilizadas para el análisis de estos polimorfismos.

Al contrario de la disminución de la frecuencia del alelo Th1/E47-G identificada en los controles de mayor edad, al comparar con los controles se observó un aumento significativo de la frecuencia de este mismo alelo en los pacientes de 80 o más años de edad. Este aumento también se detectó al comparar con las frecuencias de este alelo en los otros subgrupos de pacientes, hallazgo que tampoco se vio afectado por las correcciones aplicadas.

Estos datos permiten proponer los alelos -491AT-T y Th1/E47-G como factores de protección contra la EA, con la diferencia de que el primero es importante en personas jóvenes, menores de 60 años de edad, y el segundo ejerce su influencia en personas a partir de los 75 años de edad. Diversos investigadores han propuesto la

existencia de genes protectores para la EA (Hendrie et al., 1993; Rosenberg et al., 1996). Uno de ellos es el alelo APOE ϵ 2, la frecuencia del cual está aumentada en controles sanos mayores de 90 años, sobre todo en los ya centenarios (Schachter et al., 1994; Louhija et al., 1994; Kervinen et al., 1994), y en las poblaciones menos susceptibles a padecer la enfermedad (Mak et al., 1996). El riesgo conferido por APOE a padecer la EA está disminuido en portadores de un alelo APOE ϵ 2 y se han constatado edades más avanzadas de comienzo de la enfermedad en portadores de dicho alelo (Corder et al., 1994). En estudios de progresión del curso de la enfermedad se ha demostrado que el alelo APOE ϵ 2 enlentece la progresión de la EA (Craft et al., 1998).

Los cambios neuropatológicos característicos de la EA (placas seniles, degeneración neurofibrilar) aparecen mucho antes del inicio de los primeros síntomas y son ya irreversibles cuando se diagnostica la enfermedad (Mann y Esiri, 1988; Braak y Braak, 1991). En la formación de las placas seniles intervienen moléculas muy variadas, pero datos recientes indican que apoE, junto con A β , juega un papel crucial en la formación de fibrillas insolubles (Bales et al., 1997).

El efecto final de los dos alelos propuestos como factores protectores contra la EA es similar. El alelo -491A/T disminuye la expresión del gen, lo cual significa que hay menos cantidad de apoE presente en los individuos en los que está sobrerrepresentado. De igual manera, en los individuos sanos mayores de 75 años, la disminución de la frecuencia del alelo Th1/E47-G se traduce en una menor cantidad de apoE, puesto que Th1/E47-G aumenta la expresión del gen APOE. La disminución de apoE en el cerebro redundaría en una menor interacción entre apoE y A β , con la consiguiente dificultad en la formación de fibrillas y el enlentecimiento del proceso de generación de placas seniles. Todo ello, obviamente, protegería contra el inicio de la EA.

Además, el alelo Th1/E47-G está acumulado en pacientes de 80 o más años de edad y parece actuar en este subgrupo como factor de riesgo de la EA. Ya que el efecto del alelo APOE ϵ 4 desaparece en individuos mayores de 80 años (Frisoni et al., 1998; Finck et al., 2000; Beyer et al., 2001), deben existir otros factores genéticos implicados en la etiopatogenia de la EA (Crawford et al., 2000). A la vista de los resultados del

presente trabajo, se propone el alelo Th1/E47-G como factor de riesgo para la aparición de la EA en individuos de 80 o más años de edad.

Recientemente, con el nombre de mutación E4P, se ha descrito otro polimorfismo en el exón 3 del gen de APOE en que el alelo "P" está presente conjuntamente con un alelo APOE ϵ 4. Esta conjunción incrementa en cuatro veces el riesgo para la EA conferido por APOE ϵ 4 en ausencia del referido polimorfismo del exón 3 (Kamboh et al., 1999).

Los resultados de nuestro estudio, en el que se identificó un único portador de la mutación E4P, sugieren que la frecuencia de esta mutación es más baja en la población española que en la población caucásica norteamericana, donde se describió por primera vez. Por otra parte, el hecho de que la mutación E4P detectada en este estudio esté situada en un alelo APOE ϵ 4, confirma la relación entre ambos alelos. Además, la colocalización de ambos apoya la hipótesis de que esta asociación entre la mutación E4P, el alelo APOE ϵ 4 y la EA sea una coincidencia en la que concurren, de una parte, una mutación funcional (aún no descubierta) causante de la EA y, de otra, y el alelo APOE ϵ 4 (Kamboh et al., 1999).

En el estudio de las frecuencias alélicas de APOE IE1 G y APOE ϵ 4 se propuso que el riesgo a padecer la EA conferido por el alelo APOE IE1 G pudiera estar condicionado por la asociación de ϵ 4 con el alelo IE1 G (Mui et al., 1996). Esta propuesta se basaba en la observación de que todos los pacientes portadores del genotipo APOE4/4 en aquella muestra también eran homocigotos para G/G en el polimorfismo IE1.

Por el contrario, el efecto causado por la mutación E4P es independiente del alelo APOE ϵ 4, ya que los valores de asociación (odds-ratios) para APOE4P/APOE ϵ 4 en comparación con no-APOE4P/APOE ϵ 4 (29,06) eran considerablemente más elevados que los valores de asociación encontrados para APOE ϵ 4 en comparación con no-APOE ϵ 4, así como para APOE4P en comparación con no-APOE4P (4,49 y 5,35, respectivamente).

El único paciente portador de la mutación E4P en nuestra muestra sólo tenía 57 años cuando la EA hizo su debut. La reducida edad de comienzo de la EA en este paciente parece ilustrar que la mutación E4P y el genotipo APOE4/4, actuando de forma conjunta, tienen la capacidad de precipitar el debut de la enfermedad.

La mutación E4P consiste en la sustitución de una prolina por una leucina en el codón 28 de la isoforma apoE4. Parece lógico pensar que esta mutación provoca alteraciones adicionales en el funcionamiento de la proteína, con el consiguiente incremento o aceleración de la deposición de amiloide en el cerebro. La existencia de individuos sanos portadores de la mutación pudiera explicarse de dos formas: por un lado, podría tratarse de una mutación funcional de penetrancia incompleta (Kamboh et al., 1999) y, por otro, de la existencia de un gen protector contra las influencias de APOE ϵ 4 y E4P (Rosenberg et al., 1996).

Aunque la genética de APOE como locus mayor de susceptibilidad esté bien documentada, queda por dilucidar la función normal de la proteína en el cerebro y cómo altera el metabolismo la isoforma apoE4 para incrementar el riesgo a padecer la EA. Los resultados de múltiples estudios sugieren que la apoE cerebral ejerce varias funciones. La interacción de apoE con los marcadores microscópicos más relevantes (placas amiloides y ovillos neurofibrilares) invitó la hipótesis de que el apoE extracelular está involucrado en la amiloidogénesis (Schmechel et al., 1993; Berr et al., 1994). Los resultados de otros estudios indican que apoE participa en la redistribución del colesterol y es un agente antioxidante, mediador de la respuesta inmune, modulador de la deposición de amiloide y estabilizador de los microtúbulos (Mahley y Huang, 1999).

En la investigación de muchos loci que confieren riesgo a padecer la EA se han obtenido resultados controvertidos. Estas discrepancias podrían explicarse por diferencias a la hora de escoger la muestra, sobre todo referidas a la edad de los pacientes e individuos control en las diversas poblaciones estudiadas. Sin recurrir a la diferenciación de la muestra de pacientes según la edad de comienzo de la enfermedad, tan solo sería posible detectar en cualquier población analizada un locus que confiriera

un riesgo mayor a padecer la EA. Para la detección de marcadores genéticos con una influencia limitada en el desarrollo de la EA es prácticamente obligatoria la introducción de limitaciones de diferentes subgrupos según la edad de comienzo de la enfermedad y de los respectivos subgrupos control con el mismo rango de edad (Crawford et al., 2000; Beyer et al., 2001). Varios investigadores han hecho ya uso de esta división de la muestra mediante la agrupación de enfermos y controles en subgrupos separados por intervalos de 10 ó 15 años (Hiltunen et al., 1998; Wiebusch et al., 1999; Grubber et al., 1999; Crawford et al., 2000). Recientemente se ha propuesto el análisis de los resultados en subgrupos separados por intervalos de 5 años para determinar una implicación lo más exacta posible de loci menores en la etiopatogenia de la EA (Beyer et al., 2001).

Si bien hemos detectado el efecto del alelo APOE ϵ 4 como factor de riesgo en los subgrupos de pacientes con edades comprendidas entre los 60 y 79 años, la influencia de los loci menores se hallaba restringida a uno o a pocos de los subgrupos analizados en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos en el estudio del polimorfismo de la cistatina C no apoyan lo descrito en un estudio previo (Crawford et al., 2000), donde se identificó el genotipo CST3 G/G como un factor de riesgo a desarrollar la EA en pacientes de 80 o más años. Por el contrario, los datos del presente estudio indican que el alelo CST3-A representa un factor de riesgo en pacientes con EA esporádica de comienzo precoz. El alelo APOE ϵ 4 no juega un papel importante en pacientes que debutaron antes de los 60 años, lo cual sugiere la existencia de otros factores genéticos cruciales para el desarrollo de la enfermedad en este grupo de edad. Basándose en los resultados de este trabajo, parece razonable proponer el alelo CST3-A como uno de tales factores.

Además, la asociación sinérgica entre el alelo APOE ϵ 4, el alelo CST3-A y la EA fue muy pronunciada para el subgrupo entre los 60 y 64 años y seguía siendo evidente en los subgrupos entre los 65 y 69 años y entre los 70 y 74 años. Esta asociación subraya la importancia del alelo CST3-A como factor de riesgo para la EA. Las

frecuencias elevadas del alelo CST3-G en pacientes de 75 o más años de edad parecen confirmar que el alelo CST3-A actúa como factor de riesgo en pacientes menores de 75 años, entre los que la presencia de portadores del alelo CST3-A se halla muy disminuida debido, probablemente, a una muerte más temprana.

Los resultados respecto a la acumulación del alelo CST3-A en los pacientes con EA hasta los 65 años de edad y su asociación sinérgica al alelo APOE ϵ 4, además, hacen posible postular que el alelo CST3-A actuaría como cofactor de otro agente directamente implicado en la etiopatogenia de la EA. La presencia del alelo CST3-A podría aumentar el efecto de este agente en la producción de la EA. Por sí solo el alelo CST3-A no sería capaz de dar lugar a ningún efecto patológico, y ello explicaría su acumulación en individuos sanos de 75 o más años de edad.

Aunque no se han descrito efectos funcionales del polimorfismo de la cistatina C, su localización en el penúltimo aminoácido del péptido señal sugiere que podría alterar la vía secretora de la cistatina C. Normalmente, la cistatina C está presente en el medio intracelular como monómero o dímero inactivo, convirtiéndose en monómero activo antes de su secreción. En este contexto, el polimorfismo en el péptido señal ejercería sus efectos probablemente sobre las propiedades de agregación de la cistatina C, dando lugar a dímeros o complejos con moléculas tales como beta-amiloide (McCarron et al., 1999). De hecho, esta hipótesis recuerda el mecanismo de la HCHWA-I, donde la mutación L68Q lleva a la reducción de la secreción y actividad de cistatina C y a su acumulación en agregados intracelulares (Bjarnadottir et al., 1998; Benedikz et al., 1999).

En conclusión, nuestros resultados identifican al alelo CST3-A como factor de riesgo para desarrollar la EA y apuntan la posibilidad de que el polimorfismo Ala/Thr de la cistatina C cause cambios funcionales en la proteína. Serán necesarios estudios adicionales para aclarar la posición del alelo CST3-A entre los factores de riesgo para la EA y los efectos de este polimorfismo en el metabolismo y el funcionamiento de la cistatina C.

El polimorfismo intrónico de PS1 se encuentra en la posición 17 del intrón 8 del gen y está representado por los alelos 1 y 2. Si bien las frecuencias de ambos alelos son similares en los pacientes con EA y los controles, se ha comprobado que el genotipo PS1 1.1 está acumulado en los enfermos en ausencia de una asociación sinérgica al alelo APOE ϵ 4 (Wragg et al., 1996). Otro grupo (Kehoe et al., 1996) ha reproducido estos resultados, que también se han corroborado entre la población japonesa (Matsushita et al., 1997). Sin embargo, en un estudio de un grupo muy numeroso de pacientes norteamericanos no se obtuvieron resultados similares, sin que por tanto se pueda confirmar que el genotipo PS1 1.1 representa un factor de riesgo adicional al del alelo APOE ϵ 4 a padecer la EA (Scott et al., 1996).

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden solo parcialmente con los obtenidos en estudios anteriores. Mientras que la frecuencia de ambos alelos no presentaba diferencias significativas entre los pacientes y los controles en ninguno de los subgrupos estudiados, el genotipo PS1 1.1 estaba representado con una frecuencia significativamente aumentada en el grupo de pacientes entre los 60 y 64 años de edad en comparación con sus respectivos controles (Tabla 7). El riesgo conferido por la acumulación de este genotipo en el subgrupo entre los 60 y 64 años era independiente de la asociación sinérgica detectada entre el genotipo PS1 1/1 y el alelo APOE ϵ 4, siendo la odds-ratio de 24,8 obtenida para la asociación entre el genotipo PS1 1/1 y la EA bastante más elevada que la odds-ratio de 12,7 obtenida para la asociación entre el genotipo PS1 1/1, el alelo APOE ϵ 4 y la EA (Tablas 7 y 8).

En los pacientes de hasta 69 años se detectó una asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1/1 y el alelo APOE ϵ 4. Esta asociación fue muy marcada en el subgrupo de pacientes comprendidos entre los 60 y 64 años, con valores dos veces más elevados que en los subgrupos de enfermos menores de 60 años y con edades entre los 65 y 69 años (Tabla 8). No se pudo detectar la asociación entre el genotipo PS1 1/1, el alelo APOE ϵ 4 y la EA entre los pacientes de 70 a 74 años de edad, pero reapareció entre los pacientes de 75 a 79 años.

Estos resultados indican que el genotipo PS1 1.1 puede considerarse como un factor de riesgo independiente y adicional para el desarrollo de la EA entre los 60 y 64

años. Además, hasta los 69 años de edad refuerza los efectos del alelo APOE ϵ 4 actuando en asociación sinérgica con el mismo y confiriendo riesgo para la aparición de la EA.

El polimorfismo intrónico de la PS1 está localizado dentro del intrón 8, a 17 nucleótidos de distancia del exón 8. Esta localización podría sugerir la existencia de una vía de *splicing* alternativo que afectaría a los exones 8 ó 9 (Wragg et al., 1996). Con la presencia del genotipo PS1 1/1 estaría presente una única isoforma de la PS1. Se sabe que las presenilinas presentan actividad gamma-secretasa (De Strooper et al., 1998) y que PS1 es responsable del 60% de esta actividad enzimática (Wolfe et al., 1999a). Por lo tanto, la presencia de la isoforma generada a partir del genotipo PS1 1/1 aumentaría la actividad gamma-secretasa, acelerando la formación de A β , e incrementaría la deposición de amiloide al actuar en conjunto con la isoforma apoE4 (Berr et al., 1994; Gearing et al., 1995; McNamara et al., 1998). Ello explicaría la implicación conjunta del genotipo PS1 1/1 y la isoforma apoE4 en la etiopatogenia de la EA.

La detección de la asociación sinérgica entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4, así como entre el genotipo PS1 1/1 y el alelo APOE ϵ 4, sería indicativa de la necesidad de investigar la posible existencia de una asociación sinérgica entre estos tres factores genéticos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio de los tres marcadores indicaban que no existe una asociación entre el alelo CST3-A, el genotipo PS1 1/1 y el alelo APOE ϵ 4. La falta de esta asociación podría explicarse teniendo en cuenta los diferentes sitios de intervención de los tres factores. Mientras que cistatina C es una proteína amiloidógena e interviene, junto a A β , en la formación de los depósitos amiloides (McCarron et al., 1999) y PS1 es una de las moléculas responsables de la producción de A β por su actividad gamma-secretasa (De Strooper et al., 1998), la implicación de apoE no está aclarada del todo, aunque se postula su participación en la formación de las placas seniles (McNamara et al., 1998).

De acuerdo con un modelo poligénico (Galton y Ferns, 1999), en la EA el alelo APOE ϵ 4 pudiera ejercer una influencia mayor sobre la expresión de otros polimorfismos genéticos que no son suficientes para causar la enfermedad si actúan individualmente.

Varios estudios sobre la asociación entre el alelo BChE-K y la EA han arrojado resultados controvertidos. Así, mientras que algunos autores han descrito una asociación sinérgica entre los alelos BChE-K y APOE ϵ 4 (Wiebusch et al., 1999; McIlroy et al., 2000), otros han encontrado una asociación entre el alelo BChE-K y la EA independiente del genotipo APOE (Crawford et al., 1998). Otros investigadores, en cambio, no han logrado reproducir ninguno de estos resultados (Hiltunen et al., 1998; Grubber et al., 1999).

La butirilcolinesterasa participa en la hidrólisis de acetilcolina, y los pacientes portadores de un alelo APOE ϵ 4 presentan un déficit colinérgico severo. Por esta razón se ha propuesto que la actividad reducida de la variante K de la butirilcolinesterasa ejerce efectos protectores sobre la neurotransmisión colinérgica en los sujetos portadores del alelo APOE ϵ 4 (Soinen et al., 1995).

Los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan esta hipótesis, ya que hemos detectado la asociación entre el alelo BChE-K y la EA, sin que existiera sinergia entre los alelos BChE-K y APOE ϵ 4 en tres de los seis subgrupos estudiados. Se encontró una ligera acumulación del alelo BChE-K en los pacientes que debutaron con la enfermedad antes de los 60 años. Esta acumulación se repetía en los pacientes con edades de debut de la EA entre los 70 y 74 años y se hacía muy significativa en el subgrupo de pacientes entre los 75 y 79 años de edad.

Mientras que el efecto del alelo APOE ϵ 4 empezaba a disminuir notablemente en los subgrupos de pacientes y controles entre los 70 y 74 años de edad, en estos subgrupos hacía su aparición el alelo BChE-K como factor de riesgo adicional, aunque todavía revestido de poca importancia (Figura 4.13). En el siguiente subgrupo, integrado por los pacientes y controles con edades entre los 75 y 79 años, el alelo APOE ϵ 4 ya no confería riesgo a padecer la EA por sí solo, sino únicamente en

asociación al genotipo PS1 1.1, en tanto que aparecía el alelo BChE-K como un factor de riesgo importante (Figura 4.14).

Se ha observado la acumulación de grandes cantidades de BChE en los cerebros de enfermos con EA en comparación con los cerebros de individuos sanos. La BChE en los cerebros de los pacientes se localiza en las placas seniles y losovillos neurofibrilares (Mesulam y Geula, 1990). Aunque la variante K de la BChE, caracterizada por un cambio aminoacídico en el codón 539, presente una actividad reducida al 70% (Rubinstein et al., 1978), sería posible que este cambio en la estructura primaria cause modificaciones de la estructura secundaria que alteren la afinidad por A β . Si, en este caso, aumentara la afinidad de BChE por A β , su unión se produciría con más facilidad. Y, si se piensa que BChE participa en la transformación de A β desde una forma inicialmente benigna a una forma neurotóxica (Guillozet et al., 1997), la variante K podría enlentecer este proceso, lo cual explicaría su importancia como factor de riesgo en los pacientes de más de 70 años.

También resulta plausible que ocurriera todo lo contrario, y que la variante K de BChE acelerara el proceso de formación de las placas amiloideas, estando menos implicada que la isoforma apoE4 en la formación de A β neurotóxico. Como la frecuencia de esta isoforma baja notablemente en los pacientes de más de 70 años, recobraría importancia en este proceso la variante K de BChE, y actuaría como factor de riesgo mayor en los subgrupos con edades comprendidas entre los 70 y 79 años.

En un estudio reciente sobre la relación entre el polimorfismo de catD y la EA se describió una estrecha asociación entre el alelo catD-T y la enfermedad. El estudio incluía 102 pacientes con una edad media de debut de la EA de 73,1 años (rango, 51-101 años; Papassotiropoulos et al., 1999). Otros autores que han estudiado un grupo de enfermos con EA y controles de una población de Irlanda del Norte no pudieron confirmar la asociación entre la enfermedad y la catepsina D (McIlroy et al., 1999).

Los datos obtenidos en nuestro estudio indican que existe una asociación entre el alelo catD-T y la EA, pero que no se trata de una asociación estrecha que esté presente

en la totalidad de la muestra y sea detectable sin recurrir a la división en subgrupos según la edad de comienzo de la EA.

La catepsina D *in vitro* es capaz de generar fragmentos de A β a partir de APP, debido a su actividad similar a la de beta-secretasa (Cataldo et al., 1997; Chevallier et al., 1997). El alelo catD-T del polimorfismo implicado como factor de riesgo de la EA es responsable de un aumento de la secreción de pro-catD (Touitou et al., 1994). Es muy posible que la secreción incrementada de la forma inmadura de la proteína tenga como consecuencia una actividad enzimática mayor de la normal, lo cual elevaría la producción de A β y, por lo tanto, el riesgo a desarrollar la EA.

No existen estudios que hayan determinado la actividad enzimática de ambas formas de la proteína (la normal y la mutada). Los resultados del presente estudio, que permitieron determinar el papel de la variante T de la catepsina D como factor de riesgo para la EA en pacientes que debutaron entre los 75 y 79 años, indican que el aumento de la actividad enzimática no es muy significativo. Un ligero aumento de la actividad beta-secretasa incrementaría la producción de A β poco más de lo habitual y, como el proceso de formación de las placas amiloideas es prolongado y acumulativo, sólo a avanzada edad se detectarían los efectos causados por la presente variante alélica.

Nuestros resultados se obtuvieron utilizando una metodología efectiva para la detección de loci menores involucrados en la aparición de la EA. Los grupos de pacientes y controles se dividieron en subgrupos separados por intervalos de cinco años, lo cual permitía determinar con bastante exactitud la influencia de los factores genéticos analizados en el desarrollo de la EA.

Para lograr llegar a esta conclusión se analizaron los resultados obtenidos para todos los marcadores en tres grandes bloques.

En primer lugar, los grupos de los enfermos y controles se dividieron en los dos subgrupos más habituales: los pacientes con EA precoz (debutaron antes de los 65 años) y los pacientes con EA tardía (presentaron los primeros síntomas a partir de los 65 años), ambos con sus respectivos subgrupos control.

En segundo término, los enfermos y controles se dividieron en subgrupos separados por intervalos de diez años de edad, obteniéndose de este modo cuatro subgrupos a analizar: los pacientes que debutaron antes de los 60 años, entre los 60 y 69 años, entre los 70 y 79 años, y a partir de los 80 años. Para los cuatro subgrupos se escogieron subgrupos control integrados por individuos que coincidían con los intervalos de edad de los pacientes.

En tercer lugar, los pacientes y controles se dividieron en subgrupos separados por intervalos de cinco años de edad, de modo que en este bloque de análisis de los resultados se incluyeron seis subgrupos diferentes: pacientes y controles menores de 60 años de edad, entre los 60 y 64 años de edad, entre los 65 y 69 años de edad, entre los 70 y 74 años de edad, entre los 75 y 79 años de edad y de 80 o más años.

En el caso de APOE se trataba de un locus de efecto mayor y la importancia como factor de riesgo del alelo APOE ϵ 4 se detectaba en todos los subgrupos hasta los 80 años de edad. Sin embargo, el análisis de los resultados en seis subgrupos permitió definir el subgrupo entre los 60 y 64 años como el más afectado por el riesgo referido por el alelo APOE ϵ 4. Además, se demostró que la influencia del alelo APOE ϵ 4 va remitiendo poco a poco en los tres subgrupos siguientes, hasta desaparecer por completo en los pacientes de 80 o más años (Tabla 1).

La implicación del alelo CST3-A en el desarrollo de la EA se detectó ya en el primer bloque de análisis, donde se obtuvieron valores de asociación significativos para la EAp. Pero sólo después del análisis de los resultados en los seis subgrupos propuestos en el tercer bloque se delimitó que la acumulación del alelo CST3-A detectada en los pacientes era muy pronunciada antes de los 60 años de edad y disminuía gradualmente en los subgrupos de pacientes entre los 60 y 64 años de edad y entre los 65 y 69 años de edad (Tabla 5). Para los enfermos entre los 70 y 74 años no se detectaba ya ninguna asociación entre el alelo CST3-A y la EA, siendo las frecuencias alélicas similares en los pacientes y controles. En los controles a partir de los 75 años de edad se empazaba a acumular este mismo alelo, llegando a representar valores muy altos en los individuos control de 80 años de edad y mayores (Tabla 5). Esta tendencia

tan clara a la disminución gradual en los pacientes y al efecto contrario en los controles no se habría detectado sin la utilización del tercer bloque de análisis de los resultados.

La acumulación del genotipo PS1 1/1 era evidente en el subgrupo de EAp (según el primer bloque de análisis) y en el segundo subgrupo, que incluía los pacientes entre 60 y 69 años de edad (según el segundo bloque de análisis). Ambos tipos de análisis hubieran distorsionado los resultados, ya que se detectó que el genotipo PS1 1/1 está acumulado (con un porcentaje muy elevado) en tan sólo uno de los seis subgrupos analizados en el tercer bloque, representando una asociación importante entre este genotipo y la EA (Tabla 7). También se produjo una distorsión similar en los resultados obtenidos para la asociación entre el genotipo PS1 1/1, el alelo APOE ϵ 4 y la EA, que ponían de manifiesto que el subgrupo de mayor asociación era el de los pacientes entre los 60 y 64 años de edad (Tabla 8).

Mediante el análisis de BChE se objetivó, en el tercer bloque, que en sólo uno de los seis subgrupos se hallaba sobrerrepresentado el alelo BChE-K y llegaba a convertirse en un factor de riesgo para desarrollar la EA, lo cual se expresaba por su asociación significativa a la enfermedad (Tabla 10). Los individuos para los cuales este locus representa un factor de riesgo debutaron entre los 75 y 79 años de edad, pareciendo necesitarse para la producción de la enfermedad el concurso de varios genes de menor impacto.

Otro de estos factores genéticos parece ser la catepsina D, para la que se detectó una asociación entre el alelo catD-T y la EA en el mismo subgrupo de pacientes (entre los 75 y 79 años) tras el análisis de los resultados en el tercer bloque, dividiendo pacientes y controles en seis subgrupos respectivos (Tabla 11). En este caso ocurría lo mismo que con el alelo BChE-K: su asociación a la enfermedad no se habría detectado si no se hubiese recurrido al análisis de los resultados en un número más elevado de subgrupos.

Para concluir, cabe destacar que la influencia de loci menores es apreciable cuando, como se hizo en este estudio, los pacientes con EA se dividen en subgrupos según la edad de comienzo de la enfermedad. Los presentes resultados abundan en la

heterogeneidad genética de la enfermedad de Alzheimer, cuya patogenia molecular parece estar influenciada, de forma diferencial, por diversos factores genéticos que guardan una relación con la edad del paciente al inicio de la enfermedad.

En el subgrupo de pacientes que debutaron antes de los 60 años se detectó la acumulación de cuatro factores genéticos: alelo APOE ϵ 4, alelo CST3-A, genotipo PS1 1/1 y alelo BChE-K. En tanto que el alelo CST3-A presentaba una asociación a la EA muy importante, en el caso de los otros tres la acumulación era poco relevante. En este subgrupo de los pacientes más jóvenes con EA cabe esperar la influencia transcendental de al menos un factor genético de impacto mayor o, alternativamente, la influencia conjunta de varios factores genéticos de impacto menor. Ninguno de ellos ha sido identificado hasta el momento (Roses, 1998; Rosenberg, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el alelo CST3-A podría ser uno de los factores que ejercen una influencia menor en este subgrupo de pacientes jóvenes con EA, puesto que era detectable en al menos el 30% de los enfermos y en casi el 15% de los controles (Figura 10). En este subgrupo también pudimos registrar una leve acumulación del alelo APOE ϵ 4, pero éste ejercía su influencia como factor de riesgo en asociación sinérgica al alelo CST3-A o al genotipo PS1 1/1. En cambio, el alelo APOE ϵ 4 sí que hacía notar su influencia como factor de riesgo independiente e importante en los pacientes que debutaron entre los 60 y 79 años de edad.

En el subgrupo de pacientes con debut de la enfermedad antes de los 60 años está todavía por descubrir el factor genético de impacto mayor responsable de la aparición de la enfermedad a edades tan tempranas. También es posible que se trate de varios factores genéticos de impacto menor que, junto a factores ambientales específicos, sean los responsables del desarrollo de la enfermedad.

En el subgrupo de pacientes que debutaron entre los 60 y 64 años de edad, el alelo APOE ϵ 4 parece ser el factor genético que confiere el mayor riesgo a padecer la

EA. La concentración del alelo APOE ϵ 4 fue muy elevada en este subgrupo, muchos de cuyos enfermos eran portadores de una doble dosis de este alelo (homocigosis; Figura 13). Estos resultados confirman que el alelo APOE ϵ 4 es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la EA esporádica (Saunders et al., 1993; Meyer et al., 1998) y actúa precipitando el debut de la enfermedad (Corder et al., 1993). Los valores de asociación entre el alelo APOE ϵ 4 y la EA para el efecto de doble dosis (14,9 y 17,8) fueron hasta tres veces mayores que otros valores descritos hasta ahora. Es importante destacar que en este trabajo se utilizó la división de los pacientes y controles en subgrupos separados por intervalos de cinco años con la finalidad de delimitar con la mayor exactitud posible la influencia de los diferentes factores genéticos y de poder detectar la presencia de loci menores. De este modo fue factible la identificación de los pacientes con debut entre los 60 y 64 años como el subgrupo en el que tiene más importancia el alelo APOE ϵ 4 de cara al desarrollo de la EA.

Además, se detectó una asociación sinérgica pronunciada entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4, así como una asociación sinérgica igualmente importante entre el genotipo PS1 1/1 y el alelo APOE ϵ 4 (Figura 11). Estas asociaciones, junto a una sobrerrepresentación muy elevada del genotipo PS1 1/1, indican que la EA en este subgrupo estaría causada por los efectos combinados de los productos de estos tres genes (APOE, PS1 y CST3), que probablemente intervienen en la formación de las placas amiloides (McNamara et al., 1998; McCarron et al., 1999), y el producto del gen PS1, que interviene directamente en la producción de A β a partir de APP (De Strooper et al., 1998).

El subgrupo de los pacientes que debutaron entre los 65 y 69 años pertenece a la EA de comienzo tardío. En este subgrupo se detectaba la presencia de los mismos factores genéticos implicados en el desarrollo de la EA en el subgrupo anterior, con la diferencia de que aquí los valores de asociación obtenidos eran más bajos. Además, el genotipo PS1 1/1 sólo ejercía su efecto en asociación sinérgica con el alelo APOE ϵ 4, sin que estuviese elevada la frecuencia de este genotipo en comparación con el grupo control (Figura 12).

Ya que el alelo APOE ϵ 4 es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de la EA y participa en la precipitación de los síntomas de la EA esporádica, la frecuencia disminuida de este alelo en los pacientes que debutaron entre los 65 y 69 años es congruente con el inicio más tardío de la EA que tiene lugar en estos pacientes. Los polimorfismos de PS1 y cistatina C pusieron de manifiesto la misma tendencia que el alelo APOE ϵ 4 a disminuir su influencia sobre el comienzo de la EA en este subgrupo. Esto parece indicar que ambos polimorfismos, junto a APOE, juegan un papel importante como factores de riesgo de la EA.

El subgrupo constituido por pacientes que debutaron entre los 70 y 74 años presentaba una acumulación de factores genéticos menos importante. Sobre todo se observaba una acumulación del alelo APOE ϵ 4, aunque la misma era mucho más baja que en los dos subgrupos anteriores. Prácticamente, el efecto de la doble dosis del alelo APOE ϵ 4 como factor de precipitación de la enfermedad había desaparecido. Continuaba detectándose la asociación sinérgica entre el alelo CST3-A y el alelo APOE ϵ 4, mientras que la asociación sinérgica entre el genotipo PS1 1/1 había desaparecido, aunque la frecuencia de este genotipo no había cambiado con respecto a los subgrupos anteriores.

La frecuencia del alelo BChE-K estaba ligeramente incrementada, lo que indicaba la existencia de una asociación entre el alelo BChE-K y la EA. Los resultados del presente trabajo no pudieron confirmar la estrecha asociación descrita por otros autores entre la EA y el alelo BChE-K o el alelo catD-T (Lehmann et al., 1997; Wiebusch et al., 1999; Papassotiropoulos et al., 2000).

Los resultados obtenidos para este subgrupo sugieren la existencia de marcadores genéticos aún por descubrir los cuales tendrían más importancia en el debut de la EA más tardía. Por otra parte, este subgrupo se caracteriza por una acumulación muy baja de factores genéticos, con lo que cabe achacar la mayor responsabilidad a los factores ambientales.

De hecho, la existencia de otros factores, probablemente ambientales, de mucha importancia y capaces de modificar la influencia de los factores genéticos, se comprobó

en un estudio que puso de manifiesto que sólo una tercera parte de los gemelos idénticos son concordantes para el desarrollo de la EA (Rosenberg, 2000).

En el subgrupo de pacientes que debutaron con la enfermedad entre los 75 y 79 años se detectó la presencia de diferentes factores genéticos con una influencia específica para este subgrupo. El alelo APOE ϵ 4 había perdido su importancia como factor de riesgo casi por completo y presentaba frecuencias muy poco diferentes entre los pacientes y los controles.

Por el contrario, en este subgrupo se detectaron dos factores genéticos que habían carecido de influencia en los grupos anteriores. Específicamente, los alelos BChE-K y catD se convirtieron en factores de riesgo a padecer la EA en estos pacientes. Ambas proteínas, la butirilcolinesterasa y la catepsina D, se han involucrado directamente en la etiopatogenia de la EA: la catepsina D por su actividad similar a la beta-secretasa, que le confiere la propiedad de formar A β *in vitro* a partir de APP (Cataldo et al., 1997; Chevallier et al., 1997) y la BChE por su localización en las placas seniles y ovillos neurofibrilares en los cerebros de los pacientes con EA (Mesulam y Geula, 1990).

En el subgrupo que incluía los pacientes que debutaron a partir de los 80 años no se detectó la influencia de ninguno de los factores genéticos presentes en uno o más de los otros subgrupos. El alelo APOE ϵ 4 se halla algo más representado en el grupo control que en los pacientes y podía observarse el mismo hecho con el alelo CST3-A, la frecuencia del cual estaba triplicada en los controles en comparación con los enfermos (Figura 15).

En los pacientes de 80 o más años apareció un marcador cuya influencia no se había detectado en los subgrupos anteriores. En concreto, el alelo Th1/E47-G se hallaba significativamente acumulado en este subgrupo en comparación con los controles y con los subgrupos previos de pacientes (Tabla 4.2).

Hasta el momento no se ha descrito la existencia de factores de riesgo para la EA en pacientes mayores de 80 años. La desaparición del valor como locus mayor de

susceptibilidad del alelo APOE ϵ 4 en este subgrupo invita a postular la existencia de al menos un marcador genético responsable de la aparición de la enfermedad en estos enfermos (Crawford et al., 2000). La EA es el resultado de un proceso acumulativo en el que la deposición lenta de A β lleva a la interrupción irreversible (hasta ahora) de circuitos principales, con el consiguiente deterioro cognitivo. El alelo G del polimorfismo Th1/E47 del promotor de APOE aumenta la expresión del gen, de modo que los individuos portadores de este polimorfismo acumulan a lo largo de la vida una gran cantidad de la proteína apoE. Si, como parece, apoE interviene en la formación de las placas seniles (McNamara et al., 1998), una mayor cantidad de esta proteína facilitaría la formación de las placas y, al tratarse de un proceso acumulativo, los resultados se harían notar a edades más avanzadas.

Para concluir, los resultados del presente trabajo sugieren la existencia de subtipos de la EA que son dependientes de la edad de comienzo de la enfermedad, hallándose diferentes factores involucrados en el desarrollo de los diversos subtipos. Tal como se ha evidenciado en este proyecto, algunos factores genéticos limitan su influencia a cierto subtipo de la EA, en tanto que otros (APOE ϵ 4) tienen repercusiones en varios subtipos, aunque con valores muy variables de asociación a la EA en cada uno de ellos. La influencia de estos factores genéticos sufriría modificaciones y quedaría complementada por diversos factores ambientales, de los cuales no se ha identificado hasta el momento.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones, agrupables en cuatro apartados de acuerdo con las cuestiones abordadas en el desarrollo del proyecto.

1. Genes causantes de la enfermedad de Alzheimer (EA)

1.1. Las mutaciones del gen de la proteína precursora de la amiloide (APP) son muy poco comunes, siendo la frecuencia encontrada en la población objeto de nuestro estudio incluso ligeramente inferior a las descritas en la literatura.

1.2. Las características de la población analizada explican la ausencia de mutaciones funcionales del gen de presenilina 1 (PS1) en nuestros resultados en discrepancia con las frecuencias descritas en la literatura.

1.3. Nuestros hallazgos en un paciente con EA tardía identifican la asociación de una nueva mutación (V148I) del gen de la presenilina 2 (PS2) a la forma tardía de la EA.

2. APOE: un gen de efecto mayor para el desarrollo de la EA

2.1. El alelo APOE ϵ 4 es un factor de riesgo mayor en todos los pacientes con EA hasta los 80 años. Constituye el factor de riesgo más importante entre los enfermos que debutaron entre los 60 y 64 años de edad.

2.2. El efecto del alelo APOE ϵ 4 es dependiente de la dosis y precipita el comienzo de la EA cuando está presente en doble dosis (APOE4/4).

2.3. El alelo APOE ϵ 4 es el factor de riesgo más importante para los pacientes que pertenecen al subgrupo con una edad de comienzo de la EA entre los 60 y 64 años.

3. Loci de efecto menor para el desarrollo de la EA

3.1. La detección de la presencia de loci menores es posible únicamente dividiendo la población estudiada en subgrupos separados por intervalos de cinco años de edad.

3.2. Los genes de la cistatina C, PS 1, butirilcolinesterasa (BChE) y catepsina D (catD) son loci de efecto menor. Específicamente, el alelo CST3-A es un factor de riesgo para personas menores de 65 años, el genotipo PS1 1/1 actúa en sinergia con el alelo APOE ϵ 4 en los pacientes que debutaron antes de los 69 años y los alelos BChE-K y catD-T son marcadores que confieren riesgo en los enfermos que debutaron entre los 75 y 79 años.

3.3. Uno de los dos polimorfismos del promotor del gen de APOE analizados en este estudio (el polimorfismo Th1/E47) también puede considerarse como un locus de efecto menor. El alelo Th1/E47-G representa un factor de riesgo para los pacientes con EA que debutaron después de los 80 años.

4. Factores protectores

4.1. El alelo -491AT-T se encuentra acumulado en los individuos control menores de 65 años en comparación con los enfermos y con los controles de los otros grupos de edad. Por tanto, puede considerarse que el alelo -491-T es un factor de protección en individuos menores de 65 años.

4.2. El alelo Th1/E47-T se encuentra acumulado en los individuos control de 75 años y mayores en comparación con los enfermos y con los controles de los otros grupos de

edad. Por tanto, puede considerarse que el alelo Th1/E47-T es un factor de protección en individuos de 75 años y mayores.

5. Caracterización de posibles subtipos de EA

5.1. Los resultados del presente estudio indican la existencia de diferentes subtipos de EA esporádica dependiendo de la edad de comienzo de la enfermedad. Estos subtipos presentan diferencias en cuanto a la carga genética y la influencia de los factores ambientales.

5.2. En la población estudiada se comprobó que, el alelo CST3-A ejerce una influencia notable en los pacientes que debutaron antes de los 60 años, mientras que el alelo APOE ϵ 4 es el factor genético más importante en los pacientes que debutaron entre los 60 y 64 años. En los pacientes que debutaron entre los 70 y 74 años no se detectó una carga genética significativa y en los enfermos con inicio de la EA entre los 75 y 79 años se identificaron varios factores genéticos con una influencia menor. Finalmente, el alelo Th1/E47-G es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EA en pacientes que debutaron a los 80 años o más tarde.

5.3. La acumulación de las diferentes proteínas, productos de los genes que se han visto involucrados como factores de riesgo en la etiopatogenia de la EA, podría explicar el desarrollo de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AIZAWA Y, FUKATSU R, TAKAMARU Y, TSUZUKI K, CHIBA H, KOBAYASHI K, FUJII N, TAKAHATA N. Amino-terminus truncated apolipoprotein E is the major species in amyloid deposits in Alzheimer's disease-affected brains: a possible role for apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Brain Res* (1997) 768: 208-14.
- ALDUDO J, BULLIDO MJ, ARBIZU T, OLIVA R, VALDIVIESO F. Identification of a novel mutation (Leu282Arg) of the human presenilin 1 gene in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1998) 240: 174-6.
- ALLDERDICE PW, GARDNER HA, GALUTIRA D, LOCKRIDGE O, LADU BN, MCALPINE PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* (1991) 11: 452-4.
- ALZHEIMER A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med* (1907) 64: 146-148.
- ALZHEIMER A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zbl ges Neurol Psych* (1911) 4: 356-385.
- ALZHEIMER'S DISEASE COLLABORATIVE GROUP. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* (1995) 11: 219-22.
- ANNAERT WG, LEVESQUE L, CRAESSAERTS K, DIERINCK I, SNELLINGS G, WESTAWAY D, GEORGE-HYSLOP PS, CORDELL B, FRASER P, DE STROOPER B. Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* (1999) 147: 277-94.
- ARTIGA MJ, BULLIDO MJ, SASTRE I, RECUERO M, GARCIA MA, ALDUDO J, VAZQUEZ J, VALDIVIESO F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* (1998) 421: 105-8.
- BALBÍN M, GRUBB A, ABRAHAMSON M. An Ala/Thr variation in the coding region of the human cystatin C gene (CST3) detected as a SstII polymorphism. *Hum Genet* (1993) 92: 206-7.
- BALES KR, VERINA T, DODEL RC, DU Y, ALTSTIEL L, BENDER M, HYSLOP P, JOHNSTONE EM, LITTLE SP, CUMMINS DJ, PICCARDO P, GHETTI B, PAUL SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* (1997) 17: 263-4.
- BARTELS CF, JENSEN FS, LOCKRIDGE O, VAN DER SPEK AF, RUBINSTEIN HM, LUBRANO T, LA DU BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am J Hum Genet* (1992) 50: 1086-103.
- BASU SK, HO YK, BROWN MS, BILHEIMER DW, ANDERSON RG, GOLDSTEIN JL. Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* (1982) 257: 9788-95.
- BENEDIKZ E, MERZ GS, SCHWENK V, JOHANSEN TE, WISNIEWSKI HM, RUSHBROOK JI. Cellular processing of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *Amyloid* (1999) 6: 172-82.

BERR C, HAUW JJ, DELAERE P, DUYCKAERTS C, AMOUYEL P. Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1994) 178: 221-4.

BEYER K, LAO JI, GÓMEZ M, RIUTORT N, LATORRE P, MATE JL, ARIZA A. Alzheimer disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neurosci Lett* (2001)

BEYREUTHER K, MASTERS CL. Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathol* (1991) 1: 241-51.

BIERER LM, HOF PR, PUROHIT DP, CARLIN L, SCHMEIDLER J, DAVIS KL, PERL DP. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* (1995) 52: 81-8.

BJARNADOTTIR M, WULFF BS, SAMENI M, SLOANE BF, KEPPLER D, GRUBB A, ABRAHAMSON M. Intracellular accumulation of the amyloidogenic L68Q variant of human cystatin C in NIH/3T3 cells. *Mol Pathol* (1998) 51: 317-26.

BOBEK LA, LEVINE MJ. Cystatins--inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* (1992) 3: 307-32.

BOERWINKLE E, VISVIKIS S, WELSH D, STEINMETZ J, HANASH SM, SING CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Genet* (1987) 27: 567-82.

BORCHELT DR, RATOVITSKI T, VAN LARE J, LEE MK, GONZALES V, JENKINS NA, COPELAND NG, PRICE DL, SISODIA SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* (1997) 19: 939-45.

BORCHELT DR, THINAKARAN G, ECKMAN CB, LEE MK, DAVENPORT F, RATOVITSKY T, PRADA CM, KIM G, SEEKINS S, YAGER D, SLUNT HH, WANG R, SEEGER M, LEVEY AI, GANDY SE, COPELAND NG, JENKINS NA, PRICE DL, YOUNKIN SG, SISODIA SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* (1996) 17: 1005-13.

BOTEVA K, VITEK M, MITSUDA H, DE SILVA H, XU PT, SMALL G, GILBERT JR. Mutation analysis of presenillin 1 gene in Alzheimer's disease. *Lancet* (1996) 347: 130-1.

BRAAK H, BRAAK E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* (1991) 82: 239-59.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* (1986) 232: 34-47.

- BULLIDO MJ, ARTIGA MJ, RECUERO M, SASTRE I, GARCIA MA, ALDUDO J, LENDON C, HAN SW, MORRIS JC, FRANK A, VAZQUEZ J, GOATE A, VALDIVIESO F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* (1998) 18: 69-71.
- BUXBAUM JD, GANDY SE, CICCETTI P, EHRLICH ME, CZERNIK AJ, FRACASSO RP, RAMABHADHAN TV, UNTERBECK AJ, GREENGARD P. Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87: 6003-6.
- CALLAHAN LM, CHOW N, CHEETHAM JE, COX C, COLEMAN PD. Analysis of message expression in single neurons of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* (1998) 19: S99-105.
- CAMPION D, FLAMAN JM, BRICE A, HANNEQUIN D, DUBOIS B, MARTIN C, MOREAU V, CHARBONNIER F, DIDIERJEAN O, TARDIEU S. Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (1995) 4: 2373-7.
- CARDIN AD, BOWLIN TL, KRSTENANSKY JL. Inhibition of lymphocyte proliferation by synthetic peptides homologous to human plasma apolipoproteins B and E. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 154: 741-5.
- CATALDO AM, BARNETT JL, PIERONI C, NIXON RA. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci* (1997) 17: 6142-51.
- CATALDO AM, HAMILTON DJ, BARNETT JL, PASKEVICH PA, NIXON RA. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci* (1996) 16: 186-99.
- CHAN W, FORNWALD J, BRAUNER M, WETZEL R. Native complex formation between apolipoprotein E isoforms and the Alzheimer's disease peptide A beta. *Biochemistry* (1996) 35: 7123-30.
- CHARTIER-HARLIN MC, CRAWFORD F, HAMANDI K, MULLAN M, GOATE A, HARDY J, BACKHOVENS H, MARTIN JJ, BROECKHOVEN CV. Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val----Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1991a) 129: 134-5.
- CHARTIER-HARLIN MC, CRAWFORD F, HOULDEN H, WARREN A, HUGHES D, FIDANI L, GOATE A, ROSSOR M, ROQUES P, HARDY J. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* (1991b) 353: 844-6.
- CHARTIER-HARLIN MC, PARFITT M, LEGRAIN S, PEREZ-TUR J, BROUSSEAU T, EVANS A, BERR C, VIDAL O, ROQUES P, GOURLET V, FRUCHART JC, DELACOURTE A, ROSSOR M, MAMUOYEL P. Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* (1994) 3: 569-74.

CHEVALLIER N, VIZZAVONA J, MARAMBAUD P, BAUR CP, SPILLANTINI M, FULCRAND P, MARTINEZ J, GOEDERT M, VINCENT JP, CHECLER F. Cathepsin D displays In vitro beta-secretase-like specificity. *Brain Res* (1997) 750: 11-9.

CITRON M, WESTAWAY D, XIA W, CARLSON G, DIEHL T, LEVESQUE G, JOHNSON-WOOD K, LEE M, SEUBERT P, DAVIS A, KHOLODENKO D, MOTTER R, SHERRINGTON R, PERRY B, YAO H, STROME R, LIEBERBURG I, ROMMENS J, KIM S, SCHENK D, FRASER P, ST GEORGE HYSLOP P, SELKOE DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* (1997) 3: 67-72.

COHEN DH, FEINER H, JENSSON O, FRANGIONE B. Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein, gamma trace. *J Exp Med* (1983) 158: 623-8.

COOPER B. Health care policy and planning for dementia: an international perspective. In: Huppeit FA, Brayne C, O'Connor DW, eds. *Dementia and normal aging*. Cambridge: Cambridge University, Press, 1994: 519-551.

CORDER EH, SAUNDERS AM, RISCH NJ, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, RIMMLER JB, LOCKE PA, CONNEALLY PM, SCHMADER KE. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* (1994) 7: 180-4.

CORDER EH, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, RIMMLER JB, LOCKE PA, CONNEALLY PM, SCHMADER KE, TANZI RE. Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease. *Neurology* (1995) 45: 1323-8.

CORDER EH, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GASKELL PC, SMALL GW, ROSES AD, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (1993) 261: 921-3.

COYLE JT, PRICE DL, DELONG MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* (1983) 219: 1184-90.

CRAFT S, TERI L, EDLAND SD, KUKULL WA, SCHELLENBERG G, MC CORMICK WC, BOWEN JD, LARSON EB. Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes with Alzheimer's disease. *Neurology* (1998) 51: 149-53.

CRAWFORD F, FALLIN D, SUO Z, ABDULLAH L, GOLD M, GAUNTLETT A, DUARA R, MULLAN M. The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and community-based populations. *Neurosci Lett* (1998) 249: 115-8.

CRAWFORD FC, FREEMAN MJ, SCHINKA JA, ABDULLAH LI, GOLD M, HARTMAN R, KRIVIAN K, MORRIS MD, RICHARDS D, DUARA R, ANAND R, MULLAN MJ. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* (2000) 55: 763-8.

CRAWFORD F, HARDY J, MULLAN M, GOATE A, HUGHES D, FIDANI L, ROQUES P, ROSSOR M, CHARTIER-HARLIN MC. Sequencing of exons 16 and 17 of the beta-amyloid precursor

- protein gene in 14 families with early onset Alzheimer's disease fails to reveal mutations in the beta-amyloid sequence. *Neurosci Lett* (1991) 133: 1-2.
- CROOK R, ELLIS R, SHANKS M, THAL LJ, PEREZ-TUR J, BAKER M, HUTTON M, HALTIA T, HARDY J, GALASKO D. Early-onset Alzheimer's disease with a presenilin-1 mutation at the site corresponding to the Volga German presenilin-2 mutation. *Ann Neurol* (1997) 42:124-8.
- CRUTS M, VAN BROECKHOVEN C. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann Med* (1998) 30: 560-5.
- CRUTS M, VAN DUIJN CM, BACKHOVENS H, VAN DEN BROECK M, WEHNERT A, SERNEELS S, SHERRINGTON R, HUTTON M, HARDY J, ST GEORGE-HYSLOP PH, HOFMAN A, VAN BROECKHOVEN C. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* (1998) 7: 43-51.
- DARVESH S, GRANTHAM DL, HOPKINS DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol* (1998) 393: 374-90.
- DE LACOSTE MC, WHITE CL. The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging* (1993) 14: 1-16.
- DE STROOPER B, BEULLENS M, CONTRERAS B, LEVESQUE L, CRAESSAERTS K, CORDELL B, MOECHARS D, BOLLEN M, FRASER P, GEORGE-HYSLOP PS, VAN LEUVEN F. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* (1997) 272: 3590-8.
- DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, VANDERSTICHELE H, GUHDE G, ANNAERT W, VON FIGURA K, VAN LEUVEN F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* (1998) 391: 387-90.
- DSM-IV. (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th edition. Washington: American Psychiatric Association.
- DUFF K, ECKMAN C, ZEHR C, YU X, PRADA CM, PEREZ-TUR J, HUTTON M, BUEE L, HARIGAYA Y, YAGER D, MORGAN D, GORDON MN, HOLCOMB L, REFOLO L, ZENK B, HARDY J, YOUNKIN S. Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* (1996) 383: 710-3.
- ELLIS RJ, OLICHNEY JM, THAL LJ, MIRRA SS, MORRIS JC, BEEKLY D, HEYMAN A. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* (1996) 46: 1592-6.
- ESCH FS, KEIM PS, BEATTIE EC, BLACHER RW, CULWELL AR, OLTERSDORF T, MCCLURE D, WARD PJ. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* (1990) 248: 1122-4.
- EVANS KC, BERGER EP, CHO CG, WEISGRABER KH, LANSBURY PT. Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92: 763-7.

EVANS DA, FUNKENSTEIN HH, ALBERT MS, SCHERR PA, COOK NR, CHOWN MJ, HEBERT LE, HENNEKENS CH, TAYLOR JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* (1989) 262: 2551-6.

EZQUERRA M, CARNERO C, BLESAS R, GELPI JL, BALLESTA F, OLIVA R. A presenilin 1 mutation (Ser169Pro) associated with early-onset AD and myoclonic seizures. *Neurology* (1999) 52: 566-70.

EZQUERRA M, CARNERO C, BLESAS R, OLIVA R. A novel presenilin 1 mutation (Leu166Arg) associated with early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* (2000) 57: 485-8.

FARRER LA, CUPPLES LA, HAINES JL, HYMAN B, KUKULL WA, MAYEUX R, MYERS RH, PERICAK-VANCE MA, RISCH N, VAN DUIJN CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* (1997) 278: 1349-56.

FINCKH U, MULLER-THOMSEN T, MANN U, EGGERS C, MARKSTEINER J, MEINS W, BINETTI G, ALBERICI A, HOCK C, NITSCH RM, GAL A. High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. *Am J Hum Genet* (2000) 67: 1033-5.

FRISONI GB, MANFREDI M, GEROLDI C, BINETTI G, ZANETTI O, BIANCHETTI A, TRABUCCHI M. The prevalence of apoE-epsilon4 in Alzheimer's disease is age dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1998) 65: 103-6.

GAFFNEY D, CAMPBELL RA. A PCR based method to determine the Kalow allele of the cholinesterase gene: the E1k allele frequency and its significance in the normal population. *J Med Genet* (1994) 31: 248-50.

GALTON DJ, FERNS GA. Genetic markers to predict polygenic disease: a new problem for social genetics. *QJM* (1999) 92: 223-32.

GAUGHAN G, PARK H, PRIDDLE J, CRAIG I, CRAIG S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics* (1991) 11: 455-8.

GEARING M, SCHNEIDER JA, ROBBINS RS, HOLLISTER RD, MORI H, GAMES D, HYMAN BT, MIRRA SS. Regional variation in the distribution of apolipoprotein E and Abeta in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* (1995) 54: 833-41.

GEULA C, WU CK, SAROFF D, LORENZO A, YUAN M, YANKNER BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* (1998) 4: 827-31.

GHISO J, PONS-ESTEL B, FRANGIONE B. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* (1986) 136: 548-54.

GIANNAKOPOULOS P, HOF PR, MOTTIER S, MICHEL JP, BOURAS C. Neuropathological changes in the cerebral cortex of 1258 cases from a geriatric hospital: retrospective clinicopathological evaluation of a 10-year autopsy population. *Acta Neuropathol (Berl)* (1994) 87: 456-68.

- GLENNER GG, MURPHY MA. Amyloidosis of the nervous system. *J Neurol Sci* (1989) 94: 1-28.
- GLENNER GG, WONG CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) 122: 1131-5.
- GOATE A, CHARTIER-HARLIN MC, MULLAN M, BROWN J, CRAWFORD F, FIDANI L, GIUFFRA L, HAYNES A, IRVING N, JAMES L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* (1991) 349: 704-6.
- GOATE AM, HAYNES AR, OWEN MJ, FARRALL M, JAMES LA, LAI LY, MULLAN MJ, ROQUES P, ROSSOR MN, WILLIAMSON R. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* (1989) 1: 352-5.
- GOLABEK AA, SOTO C, VOGEL T, WISNIEWSKI T. The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* (1996) 271: 10602-6.
- GOLDGABER D, LERMAN MI, MCBRIDE OW, SAFFIOTTI U, GAJDUSEK DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* (1987) 235: 877-80.
- GRABOWSKI TJ, DAMASIO AR. Definition, clinical features and neuroanatomical basis of dementia. (1996) In: Esiri MM, Morris JH eds. *The neuropathology of dementia*. Cambridge: Cambridge University Press.
- GRUBBER JM, SAUNDERS AM, CRANE-GATHERUM AR, SCOTT WK, MARTIN ER, HAYNES CS, CONNEALLY PM, SMALL GW, ROSES AD, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA. Analysis of association between Alzheimer disease and the K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K). *Neurosci Lett* (1999) 269: 115-9.
- GUILLOZET AL, SMILEY JF, MASH DC, MESULAM MM. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol* (1997) 42: 909-18.
- GUSSEKLOO J, HEEREN TJ, IZAKS GJ, LIGTHART GJ, ROOIJMANS HG. A community based study of the incidence of dementia in subjects aged 85 years and over. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1995) 59: 507-10.
- HAASS C, CAZORLA P, MIGUEL CD, VALDIVIESO F, VAZQUEZ J. Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein. *Biochem J* (1997) 325: 169-75.
- HAASS C, SCHLOSSMACHER MG, HUNG AY, VIGO-PELFREY C, MELLON A, OSTASZEWSKI BL, LIEBERBURG I, KOO EH, SCHENK D, TEPLow DB. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* (1992) 359: 322-5.
- HALTIA M, VIITANEN M, SULKAVA R, ALA-HURULA V, POYHONEN M, GOLDFARB L, BROWN P, LEVY E, HOULDEN H, CROOK R. Chromosome 14-encoded Alzheimer's disease: genetic and clinicopathological description. *Ann Neurol* (1994) 36: 362-7.

HANDELMANN GE, BOYLES JK, WEISGRABER KH, MAHLEY RW, PITAS RE. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neuritis by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* (1992) 33: 1677-88.

HARDY J, ALLSOP D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* (1991) 12: 383-8.

HARDY J, HIGGINS GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (1992) 256: 184-5.

HENDRIE HC, HALL KS, PILLAY N, RODGERS D, PRINCE C, NORTON J, BRITAIN H, NATH A, BLUE A, KAUFERT J. Alzheimer's disease is rare in Cree. *Int Psychogeriatr* (1993) 5: 5-14.

HENRY I, GRANDJOUAN S, BARICHARD F, HUERRE-JEANPIERRE C, JUNIEN C. Mitotic deletions of 11p15.5 in two different tumors indicate that the CALCA locus is distal to the PTH locus. *Cytogenet Cell Genet* (1989) 50: 155-7.

HILTUNEN M, MANNERMAA A, HELISALMI S, KOIVISTO A, LEHTOVIRTA M, RYYNANEN M, RIEKKINEN P, SOININEN H. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* (1998) 250: 69-71.

HOF PR, CHARPIOT A, DELACOURTE A, BUEE L, PUROHIT D, PERL DP, BOURAS C. Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett* (1992) 139: 10-4.

HOF PR, COX K, MORRISON JH. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* (1990) 301: 44-54.

HOF PR, MORRISON JH. Hippocampal and neocortical involvement in normal brain aging and dementia: morphological and neurochemical profile of the vulnerable circuits. *J Am Geriatr Soc* (1996) 44: 857-64.

HOF PR, NIMCHINSKY EA, CELIO MR, BOURAS C, MORRISON JH. Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1993) 152: 145-8.

HOFMAN A, ROCCA WA, BRAYNE C, BRETILER MM, CLARKE M, COOPER B, COPELAND JR, DARTIGUES JF, DA SILVA DROUX A, HAGNEL LO. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int J Epidemiol* (1991) 20: 736-48.

HOLTZMAN DM, BALES KR, WU S, BHAT P, PARSADANIAN M, FAGAN AM, CHANG LK, SUN Y, PAUL SM. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* (1999) 103: R15-R21.

HOULDEN H, CROOK R, BACKHOVENS H, PRIHAR G, BAKER M, HUTTON M, ROSSOR M, MARTIN JJ, VAN BROECKHOVEN C, HARDY J. ApoE genotype is a risk factor in non presenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet* (1998) 81: 117-21.

- HUA X, NOHTURFFT A, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* (1996) 87: 415-26.
- ICD-10 (1992) *Manual of the international statistical classification of diseases, injuries and causes of death*. 10th edition. Geneva: WHO.
- JORM AF, KORTEN AE, HENDERSON AS. The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand* (1987) 76: 465-79.
- KAKULAS BA, WILTON SD, FABIAN VA, JONES TM. Apolipoprotein-E genotyping in diagnosis of Alzheimer's disease. *Lancet* (1996) 348: 483.
- KAMBOH MI, ASTON CE, PEREZ-TUR J, KOKMEN E, FERRELL RE, HARDY J, DEKOSKY ST. A novel mutation in the apolipoprotein E gene (APOE*4 Pittsburgh) is associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1999) 263: 129-32.
- KANG J, LEMAIRE HG, UNTERBECK A, SALBAUM JM, MASTERS CL, GRZESCHIK KH, MULTHAUP G, BEYREUTHER K, MULLER-HILL B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* (1987) 325: 733-6.
- KARLINSKY H, VAULA G, HAINES JL, RIDGLEY J, BERGERON C, MORTILLA M, TUPLER RG, PERCY ME, ROBITAILLE Y, NOLDY NE. Molecular and prospective phenotypic characterization of a pedigree with familial Alzheimer's disease and a missense mutation in codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Neurology* (1992) 42: 1445-53.
- KATZMAN R, TERRY R, DETERESA R, BROWN T, DAVIES P, FULD P, RENBING X, PECK A. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* (1988) 23: 138-44.
- KEHOE P, WILLIAMS J, HOLMANS P, LIDDELL M, LOVESTONE S, HOLMES C, POWELL J, NEAL J, WILCOCK G, OWEN MJ. Association between a PS-1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* (1996) 7: 2155-8.
- KENESSEY A, NACHARAJU P, KO LW, YEN SH. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem* (1997) 69: 2026-38.
- KERVINEN K, SAVOLAINEN MJ, SALOKANNEL J, HYNNINEN A, HEIKKINEN J, EHNHOLM C, KOISTINEN MJ, KESANIEMI YA. Apolipoprotein E and B polymorphisms—longevity factors assessed in nonagenarians. *Atherosclerosis* (1994) 105: 89-95.
- KIMBERLY WT, XIA W, RAHMATI T, WOLFE MS, SELKOE DJ. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* (2000) 275: 3173-8.
- KONIG G, MONNING U, CZECH C, PRIOR R, BANATI R, SCHREITER-GASSER U, BAUER J, MASTERS CL, BEYREUTHER K. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem* (1992) 267: 10804-9.
- KRAEPELIN E. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. II Band, *Klinische Psychiatrie*. (1910) Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig.

LAMBERT JC, BERR C, PASQUIER F, DELACOURTE A, FRIGARD B, COTTEL D, PEREZ-TUR J, MOUROUX V, MOHR M, CECYRE D, GALASKO D, LENDON C, POIRIER J, HARDY J, MANN D, AMOUYEL P, CHARTIER-HARLIN MC. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (1998a) 7: 1511-6.

LAMBERT JC, PASQUIER F, COTTEL D, FRIGARD B, AMOUYEL P, CHARTIER-HARLIN MC. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (1998b) 7: 533-40.

LAO JI, BEYER K, FERNANDEZ-NOVOA L, CACABELOS R. A novel mutation in the predicted TM2 domain of the presenilin 2 gene in a Spanish patient with late-onset Alzheimer's disease. *Neurogenetics* (1998) 1: 293-6.

LAYER PG, WEIKERT T, ALBER R. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by mean of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res* (1993) 273: 219-26.

LEHMANN DJ, JOHNSTON C, SMITH AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (1997) 6: 1933-6.

LEMERE CA, LOPERA F, KOSIK KS, LENDON CL, OSSA J, SAIDO TC, YAMAGUCHI H, RUIZ A, MARTINEZ A, MADRIGAL L, HINCAPIE L, ARANGO JC, ANTHONY DC, KOO EH, GOATE AM, SELKOE DJ, ARANGO JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* (1996) 2: 1146-50.

LEVY E, SASTRE M, KUMAR A, GALLO G, PICCARDO P, GHETTI B, TAGLIAVINI F. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J Neuropathol Exp Neurol* (2001) 60: 94-104.

LEVY-LAHAD E, WASCO W, POORKAJ P, ROMANO DM, OSHIMA J, PETTINGELL WH, YU CE, JONDRO PD, SCHMIDT SD, WANG K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* (1995) 269: 973-7.

LEVY-LAHAD E, POORKAJ P, WANG K, FU YH, OSHIMA J, MULLIGAN J, SCHELLENBERG GD. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* (1996) 34: 198-204.

LEWIS DA, CAMPBELL MJ, TERRY RD, MORRISON JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci* (1987) 7: 1799-808.

LI X, GREENWALD I. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95: 7109-14.

LIDDELL MB, BAYER AJ, OWEN MJ. No evidence that common allelic variation in the Amyloid Precursor Protein (APP) gene confers susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (1995) 4: 853-8.

- LOUHIJA J, MIETTINEN HE, KONTULA K, TIKKANEN MJ, MIETTINEN TA, TILVIS RS. Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins. Relative loss of the apolipoprotein E4 phenotype in centenarians. *Arterioscler Thromb* (1994) 14: 1084-9.
- LUCOTTE G, BERRICHE S, DAVID F. Alzheimer's mutation. *Nature* (1991) 351: 530.
- LUYENDIJK W, BOTS GT, VEGTER-VAN DER VLIS M, WENT LN. Familial cerebral hemorrhage is a result of cerebral amyloid angiopathy. *Ned Tijdschr Geneesk* (1986) 130: 1935-40.
- MC CARRON MO, NICOLL JA, STEWART J, IRONSIDE JW, MANN DM, LOVE S, GRAHAM DI, DEWAR D. The apolipoprotein E epsilon2 allele and the pathological features in cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol* (1999) 58: 711-8.
- MC ILROY SP, DYNAN KB, MCGLEENON BM, LAWSON JT, PASSMORE AP. Cathepsin D gene exon 2 polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1999) 273: 140-1.
- MC ILROY SP, CRAWFORD VL, DYNAN KB, MCGLEENON BM, VAHIDASSR MD, LAWSON JT, PASSMORE AP. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J Med Genet* (2000) 37: 182-5.
- MC KHANN G, DRACHMAN G, FOLSTEIN M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* (1984) 34: 939-944.
- MC NAMARA MJ, GOMEZ-ISLA T, HYMAN BT. Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta40 and Abeta42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* (1998) 55: 1001-4.
- MAEKAWA M, SUDO K, DEY DC, ISHIKAWA J, IZUMI M, KOTANI K, KANNO T. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin Chem* (1997) 43: 924-9.
- MAHLEY RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* (1988) 240: 622-30.
- MAHLEY RW, HUANG Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* (1999) 10: 207-17.
- MAK YT, CHIU H, WOO J, KAY R, CHAN YS, HUI E, SZE KH, LUM C, KWOK T, PANG CP. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese. *Neurology* (1996) 46: 146-9.
- MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROOK J. Molecular cloning. A laboratory manual. (1982) Cold Spring Harbor Laboratory.
- MANN DM, ESIRI MM. The site of the earliest lesions of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* (1988) 318: 789-90.

MASTERS CL, SIMMS G, WEINMAN NA, MULTHAUP G, MCDONALD BL, BEYREUTHER K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82: 4245-9.

MATSUSHITA S, ARAI H, MURAMATSU T, MAKIMOTO K, NAKAGAWA T, SASAKI H, HIGUCHI S. Presenilin-1 polymorphism in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Exp Neurol* (1997) 146: 567-9.

MAYEUX R, SAUNDERS AM, SHEA S, MIRRA S, EVANS D, ROSES AD, HYMAN BT, CRAIN B, TANG MX, PHELPS CH. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* (1998) 338: 506-11.

MESULAM MM, GEULA C. Shifting patterns of cortical cholinesterases in Alzheimer's disease: implications for treatment, diagnosis, and pathogenesis. *Adv Neurol* (1990) 51: 235-40.

MEYER MR, TSCHANZ JT, NORTON MC, WELSH-BOHMER KA, STEFFENS DC, WYSE BW, BREITNER JC. APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* (1998) 19: 321-2.

MIRRA SS, HART MN, TERRY RD. Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. *Arch Pathol Lab Med* (1993) 117: 132-44.

MIRRA SS, HEYMAN A, MCKEEL D, SUMI SM, CRAIN BJ, BROWNLEE LM, VOGEL FS, HUGHES JP, VAN BELLE G, BERG L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* (1991) 41: 479-86.

MIYATA M, SMITH JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* (1996) 14: 55-61.

MOLSA PK, MARTTILA RJ, RINNE UK. Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol Scand* (1982) 65: 541-52.

MORRISON JH, HOF PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* (1997) 278: 412-9.

MUI S, BRIGGS M, CHUNG H, WALLACE RB, GOMEZ-ISLA T, REBECK GW, HYMAN BT. A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with Alzheimer's disease and strongly with the epsilon 4 allele. *Neurology* (1996) 47: 196-201.

MULLAN M, HOULDEN H, WINDELSPECHT M, FIDANI L, LOMBARDI C, DIAZ P, ROSSOR M, CROOK R, HARDY J, DUFF K. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet* (1992) 2: 340-2.

MURGOLO NJ, BROWN JE, BAYNE ML, STRADER CD. Presenilin mutations in Alzheimer's disease: molecular models suggest a potential functional locus. *Trends Pharmacol Sci* (1996) 17: 389-93.

- MURRELL J, FARLOW M, GHETTI B, BENSON MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* (1991) 254: 97-9.
- NARUSE S, IGARASHI S, KOBAYASHI H, AOKI K, INUZUKA T, KANEKO K, SHIMIZU T, IIHARA K, KOJIMA T, MIYATAKE T. Mis-sense mutation Val----Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet* (1991) 337: 978-9.
- NARUSE S, THINAKARAN G, LUO JJ, KUSIAK JW, TOMITA T, IWATSUBO T, QIAN X, GINTY DD, PRICE DL, BORCHELT DR, WONG PC, SISODIA SS. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* (1998) 21: 1213-21.
- NITSCH RM, SLACK BE, WURTMAN RJ, GROWDON JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* (1992) 258: 304-7.
- NOCHLIN D, BIRD TD, NEMENS EJ, BALL MJ, SUMI SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer's disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol* (1998) 43: 131-5.
- OLTERS DORF T, FRITZ LC, SCHENK DB, LIEBERBURG I, JOHNSON-WOOD KL, BEATTIE EC, WARD PJ, BLACHER RW, DOVEY HF, SINHA S. The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* (1989) 341: 144-7.
- OTT A, BRETELER MM, VAN HARKAMP F, CLAUS JJ, VAN DER CAMMEN TJ, GROBBEE DE, HOFMAN A. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* (1995) 310: 970-3.
- OWEN MJ, KEHOE P, WILLIAMS J. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* (1996) 348: 414.
- PAPASSOTIROPOULOS A, BAGLI M, FEDER O, JESSEN F, MAIER W, RAO ML, LUDWIG M, SCHWAB SG, HEUN R. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1999) 262: 171-4.
- PAPASSOTIROPOULOS A, BAGLI M, KURZ A, KORNHUBER J, FORSTL H, MAIER W, PAULS J, LAUTENSCHLAGER N, HEUN R. A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* (2000) 47: 399-403.
- PERAUS GC, MASTERS CL, BEYREUTHER K. Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion. *J Neurosci* (1997) 17: 7714-24.
- PEREZ-TUR J, FROELICH S, PRIHAR G, CROOK R, BAKER M, DUFF K, WRAGG M, BUSFIELD F, LENDON C, CLARK RF. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* (1995) 7: 297-301.
- PERICAK-VANCE MA, YAMAOKA LH, HAYNES CS, SPEER MC, HAINES JL, GASKELL PC, HUNG WY, CLARK CM, HEYMAN AL, TROFATTER JA. Genetic linkage studies in Alzheimer's disease families. *Exp Neurol* (1988) 102: 271-9.
- PERRY EK, PERRY RH, BLESSE DG, TOMLINSON BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1978) 4: 273-7.

PONTE P, GONZALEZ-DEWHITT P, SCHILLING J, MILLER J, HSU D, GREENBERG B, DAVIS K, WALLACE W, LIEBERBURG I, FULLER F. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* (1988) 331: 525-7.

PRELLI F, CASTANO E, GLENNER GG, FRANGIONE B. Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J Neurochem* (1988) 51: 648-51.

RALL SC, MAHLEY RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* (1992) 231: 653-9.

ROCCA WA, BONAIUTO S, LIPPI A, LUCIANI P, TURTU F, CAVARZERAN F, AMADUCCI L. Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: a door-to-door survey in Appignano, Macerata Province, Italy. *Neurology* (1990) 40: 626-31.

ROGAEV EI, LUKIW WJ, VAULA G, HAINES JL, ROGAEVA EA, TSUDA T, ALEXANDROVA N, LIANG Y, MORTILLA M, AMADUCCI L. Analysis of the c-FOS gene on chromosome 14 and the promoter of the amyloid precursor protein gene in familial Alzheimer's disease. *Neurology* (1993) 43: 2275-9.

ROGAEV EI, SHERRINGTON R, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, LIANG Y, CHI H, LIN C, HOLMAN K, TSUDA T, MAR L, SORBI S, NACMIAS B, PLACENTINI S, AMADUCCI L, CHUMAKOV I, COHEN D, LANNFELT L, FRASER PE, ROMMENS JM, ST GEORGE-HYSLOP PH. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* (1995) 376: 775-8.

ROGAEV EI, SHERRINGTON R, WU C, LEVESQUE G, LIANG Y, ROGAEVA EA, IKEDA M, HOLMAN K, LIN C, LUKIW WJ, DE JONG PJ, FRASER PE, ROMMENS JM, ST GEORGE-HYSLOP P. Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics* (1997) 40: 415-24.

ROSENBERG RN. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* (2000) 54: 2045-54.

ROSENBERG RN, RICHTER RW, RISSER RC, TAUBMAN K, PRADO-FARMER I, EBALO E, POSEY J, KINGFISHER D, DEAN D, WEINER MF, SVETLIK D, ADAMS P, HONIG LS, CULLUM CM, SCHAEFER FV, SCHELLENBERG GD. Genetic factors for the development of Alzheimer disease in the Cherokee Indian. *Arch Neurol* (1996) 53: 997-1000.

ROSES AD. Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction, of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* (1995) 38: 6-14.

ROSES AD. Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphisms for complex psychiatric diseases. *Am J Med Genet* (1998) 81: 49-57.

RUBINSTEIN HM, DIETZ AA, LUBRANO T. E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* (1978) 15: 27-9.

RUSS C, POWELL J, LOVESTONE S, HOLMES C. K variant of butyrylcholinesterase and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* (1998) 351: 881.

- SAFTIG P, PETERS C, VON FIGURA K, CRAESSAERTS K, VAN LEUVEN F, DE STROOPER B. Amyloidogenic processing of human amyloid precursor protein in hippocampal neurons devoid of cathepsin D. *J Biol Chem* (1996) 271: 27241-4.
- SAMPSON VL, MORRISON JH, VICKERS JC. The cellular basis for the relative resistance of parvalbumin and calretinin immunoreactive neocortical neurons to the pathology of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* (1997) 145: 295-302.
- ST GEORGE-HYSLOP PH, TANZI RE, POLINSKY RJ, NEVE RL, POLLEN D, DRACHMAN D, GROWDON J, CUPPLES LA, NEE L, MYERS RH. Absence of duplication of chromosome 21 genes in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Science* (1987) 238: 664-6.
- SAUNDERS AM, HULETTE O, WELSH-BOHMER KA, SCHMECHEL DE, CRAIN B, BURKE JR, ALBERTS MJ, STRITTMATTER WJ, BREITNER JC, ROSENBERG C. Specificity, sensitivity, and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* (1996) 348: 90-3.
- SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, SCHMECHEL DE, GEORGE-HYSLOP PH, PERICAK-VANCE MA, JOO SH, ROSI BL, GUSELLA JF, CRAPPER-MACLACHLAN DR, ALBERTS MJ. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* (1993) 43: 1467-1472.
- SAURA CA, TOMITA T, DAVENPORT F, HARRIS CL, IWATSUBO T, THINAKARAN G. Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem* (1999) 274: 13818-23.
- SCHACHTER F, FAURE-DELANEF L, GUENOT F, ROUGER H, FROGUEL P, LESUEUR-GINOT L, COHEN D. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* (1994) 6: 29-32.
- SHELLENBERG GD, ANDERSON L, O-DAHL S, WIJSMAN EM, SADOVNICK AD, BALL MJ, LARSON EB, KUKULL WA, MARTIN GM, ROSES AD. APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* (1991a) 49: 511-7.
- SHELLENBERG GD, BIRD TD, WIJSMAN EM, MOORE DK, BOEHNKE M, BRYANT EM, LAMPE TH, NOCHLIN D, SUMI SM, DEEB SS. Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science* (1988) 241: 1507-10.
- SHELLENBERG GD, BIRD TD, WIJSMAN EM, ORR HT, ANDERSON L, NEMENS E, WHITE JA, BONNYCASTLE L, WEBER JL, ALONSO ME. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* (1992) 258: 668-71.
- SHELLENBERG GD, PERICAK-VANCE MA, WIJSMAN EM, MOORE DK, GASKELL PC, YAMAOKA LA, BEBOUT JL, ANDERSON L, WELSH KA, CLARK CM. Linkage analysis of familial Alzheimer disease, using chromosome 21 markers. *Am J Hum Genet* (1991a) 48: 563-83.
- SCHUENER D, ECKMAN C, JENSEN M, SONG X, CITRON M, SUZUKI N, BIRD TD, HARDY J, HUTTON M, KUKULL W, LARSON E, LEVY-LAHAD E, VIITANEN M, PESKIND E, POORKAJ P, SHELLENBERG G, TANZI R, WASCO W, LANNFELT L, SELKOE D, YOUNKIN S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in

vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* (1996) 2: 864-70.

SCHMECHEL DE, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, CRAIN BJ, HULETTE CM, JOO SH, PERICAK-VANCE MA, GOLDGABER D, ROSES AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90: 9649-53.

SCOTT WK, ROSES AD, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996 Jun 1 347:9014 1560

SELKOE DJ. Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* (1993) 16: 403-9.

SELKOE DJ. Alzheimer's disease: Genotypes, Phenotype, and treatments. *Science* (1997) 275: 630-631.

SELKOE DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* (1998) 8: 447-53.

SEUBERT P, OLTERS DORF T, LEE MG, BARBOUR R, BLOMQUIST C, DAVIS DL, BRYANT K, FRITZ LC, GALASKO D, THAL LJ. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* (1993) 361: 260-3.

SEUBERT P, VIGO-PELFREY C, ESCH F, LEE M, DOVEY H, DAVIS D, SINHA S, SCHLOSSMACHER M, WHALEY J, SWINDLEHURST C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* (1992) 359: 325-7.

SHEN Y, LI R, MC GEER EG, MC GEER PL. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res* (1997) 769: 391-5.

SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, CHI H, LIN C, LI G, HOLMAN K, PERICAK-VANCE M., TANZI RE, ROSES AD, FRASER PE, ROMMEN JM, ST GEORGE-HYSLOP PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* (1995) 375: 754-60.

SIEST G, PILLOT T, REGIS-BAILLY A, LEININGER-MULLER B, STEINMETZ J, GALTEAU MM, VISVIKIS S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* (1995) 41: 1068-86.

SINHA S, DOVEY HF, SEUBERT P, WARD PJ, BLACHER RW, BLABER M, BRADSHAW RA, ARICI M, MOBLEY WC, LIEBERBURG I. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* (1990) 265: 8983-5.

SINHA S, LIEBERBURG I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96: 11049-53.

SISODIA SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89: 6075-9.

- SISODIA SS, KIM SH, THINAKARAN G. Function and dysfunction of the presenilins. *Am J Hum Genet* (1999) 65: 7-12.
- SOININEN H, KOSUNEN O, HELISALMI S, MANNERMAA A, PALJARVI L, TALASNIEMI S, RYYNANEN M, RIEKKINEN P. A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett* (1995) 187: 79-82.
- SPARROW JT, SPARROW DA, FERNANDO G, CULWELL AR, KOVAR M, GOTTO AM. Apolipoprotein E: phospholipid binding studies with synthetic peptides from the carboxyl terminus. *Biochemistry* (1992) 31: 1065-8.
- STEINER H, CAPELL A, PESOLD B, CITRON M, KLOETZEL PM, SELKOE DJ, ROMIG H, MENDLA K, HAASS C. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem* (1998) 273: 32322-31.
- STEINER H, ROMIG H, GRIM MG, PHILIPP U, PESOLD B, CITRON M, BAUMEISTER R, HAASS C. The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* (1999a) Mar 19 274:12 7615-8
- STEINER H, ROMIG H, GRIM MG, PHILIPP U, PESOLD B, CITRON M, BAUMEISTER R, HAASS C. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* (1999b) 38: 14600-5.
- STRITTMATTER WJ, SAUNDERS AM, SCHMECHEL D, PERICAK-VANCE M, ENGHILD J, SALVESEN GS, ROSES AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993a) 90: 1977-81.
- STRITTMATTER WJ, WEISGRABER KH, HUANG DY, DONG LM, SALVESEN GS, PERICAK-VANCE M, SCHMECHEL D, SAUNDERS AM, GOLDBABER D, ROSES AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993b) 90: 8098-102.
- TANZI RE, KOVACS DM, KIM TW, MOIR RD, GUENETTE SY, WASCO W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* (1996) 3: 159-68.
- TANZI RE, MCCLATCHEY AI, LAMPERTI ED, VILLA-KOMAROFF L, GUSELLA JF, NEVE RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* (1988) 331: 528-30.
- THINAKARAN G, BORCHELT DR, LEE MK, SLUNT HH, SPITZER L, KIM G, RATOVITSKY T, DAVENPORT F, NORDSTEDT C, SEEGER M, HARDY J, LEVEY AI, GANDY SE, JENKINS NA, COPELAND NG, PRICE DL, SISODIA SS. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* (1996) 17: 181-90.
- THINAKARAN G, HARRIS CL, RATOVITSKI T, DAVENPORT F, SLUNT HH, PRICE DL, BORCHELT DR, SISODIA SS. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem* (1997) 272: 28415-22.

THORSTEINSSON L, GEORGSSON G, ASGEIRSSON B, BJARNADOTTIR M, OLAFSSON I, JENSSON O, GUDMUNDSSON G. On the role of monocytes/macrophages in the pathogenesis of central nervous system lesions in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *J Neurol Sci* (1992) 108: 121-8.

THUREN T, SISSON P, WAITE M. Activation of hepatic lipase catalyzed phosphatidylcholine hydrolysis by apolipoprotein E. *Biochim Biophys Acta* (1991) 1083: 217-20.

THUREN T, WEISGRABER KH, SISSON P, WAITE M. Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* (1992) 31: 2332-8.

TOMITA T, MARUYAMA K, SAIDO TC, KUME H, SHINOZAKI K, TOKUHIRO S, CAPELL A, WALTER J, GRUNBERG J, HAASS C, IWATSUBO T, OBATA K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94: 2025-30.

TOUITOU I, CAPONY F, BROUILLET JP, ROCHEFORT H. Missense polymorphism (C/T224) in the human cathepsin D pro-fragment determined by polymerase chain reaction--single strand conformational polymorphism analysis and possible consequences in cancer cells. *Eur J Cancer* (1994) 30: 390-4.

VAN DUIJN CM, DE KNIJFF P, CRUTS M, WEHNERT A, HAVEKES LM, HOFMAN A, VAN BROECKHOVEN C. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* (1994) 7: 74-8.

VAN DUIJN CM, HENDRIKS L, CRUTS M, HARDY JA, HOFMAN A, VAN BROECKHOVEN C. Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet* (1991) 337: 978.

VASSAR R, BENNETT BD, BABU-KHAN S, KAHN S, MENDIAZ EA, DENIS P, TELOW DB, ROSS S, AMARANTE P, LOELOFF R, LUO Y, FISHER S, FULLER J, EDENSON S, LILE J, JAROSINSKI MA, BIERE AL, CURRAN E, BURGESS T, LOUIS JC, COLLINS F, TREANOR J, ROGERS G, CITRON M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* (1999) 286: 735-41.

VICKERS JC, DELACOURTE A, MORRISON JH. Progressive transformation of the cytoskeleton associated with normal aging and Alzheimer's disease. *Brain Res* (1992) 594: 273-8.

WALTER J, CAPELL A, GRUNBERG J, PESOLD B, SCHINDZIELORZ A, PRIOR R, PODLISNY MB, FRASER P, HYSLOP PS, SELKOE DJ, HAASS C. The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med* (1996) 2: 673-91.

WANG ZZ, JENSSON O, THORSTEINSSON L, VINTERS HV. Microvascular degeneration in hereditary cystatin C amyloid angiopathy of the brain. *APMIS* (1997) 105: 41-7.

WAVRANT-DE VRIEZE F, PEREZ-TUR J, LAMBERT JC, FRIGARD B, PASQUIER F, DELACOURTE A, AMOUYEL P, HARDY J, CHARTIER-HARLIN MC. Association between the

low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1997) 227: 68-70.

WEIDEMANN A, KONIG G, BUNKE D, FISCHER P, SALBAUM JM, MASTERS CL, BEYREUTHER K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* (1989) 57: 115-26.

WEISGRABER KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* (1994) 45: 249-302.

WEISGRABER KH, RALL SC, MAHLEY RW, MILNE RW, MARCEL YL, SPARROW JT. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem* (1986) 261: 2068-76.

WELSH-BOHMER KA, GEARING M, SAUNDERS AM, ROSES AD, MIRRA S. Apolipoprotein E genotypes in a neuropathological series from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* (1997) 42: 319-25.

WIEBUSCH H, POIRIER J, SEVIGNY P, SCHAPPERT K. Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum Genet* (1999) 104: 158-63.

WOLFE MS, XIA W, OSTASZEWSKI BL, DIEHL TS, KIMBERLY WT, SELKOE DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* (1999a) 398: 513-7.

WOLFE MS, XIA W, MOORE CL, LEATHERWOOD DD, OSTASZEWSKI B, RAHMATI T, DONKOR IO, SELKOE DJ. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* (1999b) 38: 4720-7.

WONG PC, ZHENG H, CHEN H, BECHER MW, SIRINATHSINGHI DJ, TRUMBAUER ME, CHEN HY, PRICE DL, VAN DER PLOEG LH, SISODIA SS. Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* (1997) 387: 288-92.

WRAGG M, HUTTON M, TALBOT C. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group. *Lancet* (1996) 347: 509-12.

XIA W, ZHANG J, KHOLODENKO D, CITRON M, PODLISNY MB, TEPLow DB, HAASS C, SEUBERT P, KOO EH, SELKOE DJ. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* (1997) 272: 7977-82.

XIA W, ZHANG J, OSTASZEWSKI BL, KIMBERLY WT, SEUBERT P, KOO EH, SHEN J, SELKOE DJ. Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* (1998) 37: 16465-71.

YAMADA T, WAKABAYASHI K, KAKIHARA T, GEJYO F, TAKAHASHI H, ITOH Y. Further characterization of a monoclonal antibody recognizing apolipoprotein E peptides in amyloid deposits. *Ann Clin Lab Sci* (1997) 27: 276-81.

YAMAZAKI T, KOO EH, SELKOE DJ. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* (1996) 109: 999-1008.

YAMAZAKI T, SELKOE DJ, KOO EH. Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* (1995) 129: 431-42.

YASUDA M, MAEDA K, HASHIMOTO M, YAMASHITA H, IKEJIRI Y, BIRD TD, TANAKA C, SCHELLENBERG GD. A pedigree with a novel presenilin 1 mutation at a residue that is not conserved in presenilin 2. *Arch Neurol* (1999) 56: 65-9.

YOSHIOKA K, MIKI T, KATSUYA T, OGIHARA T, SAKAKI Y. The 717Val---Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) 178: 1141-6.

ZHANG MY, KATZMAN R, SALMON D, JIN H, CAI GJ, WANG ZY, QU GY, GRANT I, YU E, LEVY P. The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: impact of age, gender, and education. *Ann Neurol* (1990) 27: 428-37.

ZHAO J, PAGANINI L, MUCKE L, GORDON M, REFOLO L, CARMAN M, SINHA S, OLTERS DORF T, LIEBERBURG I, MCCONLOGUE L. Beta-secretase processing of the beta-amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J Biol Chem* (1996) 271: 31407-11.