Servicio
Canario de la Salud
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN
SERVICIO DE INMUNOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO: CIENCIAS CLÍNICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO: MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y ENFERMEDADES
INFECCIOSAS

VARIANTES GÉNICAS ASOCIADAS A NEUROINFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN CANARIAS

Tesis Doctoral presentada por

Mª Cándida Déniz Naranjo

para optar al grado de Doctor

Vº Bº

DIRECTORES DEL TRABAJO

D. Florentino Sánchez García

Dña. Carmen Muñoz Fernández

Las Palmas de Gran Canaria, a Julio de 2009

AGRADECIMIENTOS

En 1998 me hicieron una pregunta un tanto delicada: "¿Tienes novio?", "No", contesté. "Mejor, porque no ibas a tener mucho tiempo para verle". Afortunadamente, no me acobardé, y desafortunadamente, tenía razón quien me hizo esta pregunta.
Así comenzó esta andadura junto a Florentino y Carmen, y junto a otros compañeros, amigos y familiares, que en mayor o menor medida, han estado durante todo este largo período y que he de mencionar.

Empezaré a dar las gracias por el final, es decir, por mis actuales compañeros en Microbiología del Hospital Son Dureta de Mallorca: mis "queridos mallorquines".
Gracias a los chicos de la Unidad de Investigación, Carlos, Tomeu y Laura, que me han aceptado como a una más, prácticamente sin conocerme.
A mis compañeros TEL y auxiliares administrativos del servicio, por enseñarme y guiarme en todo lo que saben.
A los adjuntos, Pedro Alomar, José Gil, Jordi Reina, Xisco Salvá, Antonio Ramírez y Nuria Borrell, por animarme y enseñarme.
A mi tutor, Antonio Oliver, y a mi actual jefe, José Luis Pérez, por animarme y apoyarme en la elaboración de la tesis, aún a costa de sacrificar tiempo para la residencia.
A mis compañeros residentes, Virginia, Carmen, Elena y el mejor co-residente que he tenido nunca jamás, Xavi; ellos han sido mis compañeros de guardias, de sesiones bibliográficas, de sesiones clínicas, de protestas, de alegrías... Con ellos, y, sobre todo, de ellos, he aprendido muchas cosas, además de estar cuando los he necesitado de veras.
Tengo una mención especial para Mariló y Aina, que además de ser mis "adjuntas y superiores favoritas", se han convertido, junto con Laurita, en esas personas que a una se les queda en el corazón para siempre. Gracias chicas.

De vuelta a Canarias, mi primer agradecimiento es para todos los pacientes, familiares y voluntarios sin deterioro cognitivo, que colaboraron con nosotros en los proyectos que se llevaron a cabo. Sin ellos, evidentemente, nada de todo esto hubiera sido posible. Espero que estos trabajos aporten un granito de arena a todo el esfuerzo que se está haciendo en la lucha contra esta terrible enfermedad. Gracias y mucha fuerza.

Gracias al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), del Instituto de Salud Carlos III, y a la Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS), por el apoyo y financiación de todos los proyectos que han dado lugar a esta tesis.

Mi agradecimiento, también, a los neurólogos de los distintos hospitales canarios que han participado en los proyectos de investigación de estos años, puesto que han colaborado desinteresadamente, con gran esfuerzo y dedicación por su parte:
-Hospital De Gran Canaria Dr. Negrín (Gran Canaria): Mª Jesús Alemany, Mª Carmen Pérez Viéitez, Jesús Rodríguez Gallego, Alberto Cubero y Yolanda Aladro.
-Hospital Insular (Gran Canaria): Rafael García
-Hospital Nuestra Señora de Candelaria (Tenerife): Antonio Alayón.
De entre ellos, permítanme que destaque a Carmen Muñoz, codirectora de esta tesis: Gracias, no sólo por codirigir y orientar los trabajos, sino también por enseñarme lo que es ser una gran profesional y, sobre todo, lo que es una persona trabajadora, luchadora, y con mucha fuerza para tirar pa'lante en los peores momentos.
Gracias, Carmen, por ser un modelo a seguir.

Gracias a la Unidades de Investigación y de Ilustración del Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, con José Carlos Rodríguez a la cabeza, y con muy buenos compañeros, con los que también he pasado buenos momentos: Ramón, Juan Verona, Inma, Fran, Rula, Octavio, Yaridé, Antonio, Alejandro, Arantxa, Heriberto y Lidia.
Y a los que estuvieron en algún momento en la Unidad, pero "emigraron a otros lares": Fayna, Sandra y Araceli.

Inmuno:
¿Como se le puede dar las gracias a toda esta gente, con la que tantos momentos buenos (y también algún que otro menos bueno) he pasado?. La verdad es que no lo sé. Nombrarles parece poco, y si fuera a contar todo lo que he vivido con ellos, creo que tendría para escribir más de un libro.
Gracias a los que siempre serán mis compañeros y amigos: Belén, Rita, Isa Molina, Ana, Nereida, Maika, Esther, Mari, Elisa, Ithaisa, Carlos y Carmela (reconoce que he sido tu mejor pesadilla).
A los que llegaron cuando yo casi me iba: Toni, Fausto y Mari Nieves. Y a los que se fueron: Ana Manzanedo, Ione, Ayoze, Jessica, Auri, Alicia, Gina y María.
A los "satélites" del servicio: María y Juncal Irurita (no concibo el servicio sin ellas y sin sus deliciosos "queques" de especias); Antoli, reconocida y deseada fisioterapeuta (creo que casi todos hemos caído en sus manos…); Paqui y Paco, de TB Diagnost, S.A. (no se imaginan lo buena gente que son y todo lo que han hecho por mí); Popo e Inma Alarcón, los amigos de enfrente; Juani Perera, por las buenas risas que nos hemos echado en los congresos.

Y perdonar si he olvidado a alguien, han sido muchas personas en estos años.

En el terreno más personal:

A mis amigos "de fuera de la ciencia", por aguantar las lloreras, los momentos de precariedad, de no poder estar con ellos, por estar siempre conmigo, por animarme, por enfadarse, por reírse… Por todo: Jose Luis, Nory, Alonso, Ana, Paco, Pino, Lidia, Enrique, Raquel, Enrique Armas, Mario, MªCarmen, Cristina, Esther, Eva, Pilar y Paco Navarro.

A las verdaderas chicas de oro, porque valen su peso en el ídem: Isabel, Maite, y María José, por todo este tiempo de ayuda, consejos, llantos, risas y "auto-homenajes". Gracias por estar, chicas, no sé si ésto hubiera salido adelante si ustedes no hubieran estado cerca.

A Florentino

No sabía en que parte ponerte: ¿director?... ¿jefe del servicio?...

He decidido mencionarte en el apartado del terreno personal porque ya que hace mucho que dejaste de ser mi jefe, en el sentido estricto, para convertirte en uno de mis mejores amigos. Y es mucho lo que tengo que agradecerte: Por confiar en mí. Por darme una… no, perdón, más de una oportunidad en esta vida: estoy donde estoy gracias a ti. Por guiarme y enseñarme, no sólo profesionalmente, sino también para intentar ser mejor persona. Por apoyarme y animarme, tanto profesional como personalmente. Gracias.

Y por último, mi mayor agradecimiento es para mis padres, Rafael y Maquita, que son lo mejor que me ha dado la vida.

Gracias por concederme siempre la libertad para elegir y hacer (incluso cuando me equivocaba). Por enseñarme y darme todo sin esperar nada. Por animarme y apoyarme, confiando siempre en mí.

Les quiero mucho.

Candi

Las Palmas de Gran Canaria

Junio de 2009

DEDICADO A LOS QUE, INVOLUNTARIAMENTE,

OLVIDARON Y NOS DEJARON… SIN IRSE.

INDICE

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.....I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN 1

1.- Envejecer 1

1.1.- ¿Qué es el envejecimiento? 1
1.2.- Demencia 2

2.- Enfermedad de Alzheimer..... 3

2.1.- Prevalencia e Incidencia 5
2.2.- Características patológicas..... 6
2.2.1.- Anatómicas 6
2.2.2.- Histopatológicas..... 6
2.2.3.- Neuroquímicas..... 7
2.3.- Tipos de Enfermedad de Alzheimer..... 9
2.4.- Principales factores de riesgo..... 10
2.4.1.- Edad..... 10
2.4.2.- Historia familiar 10
2.4.3.- Género 11
2.4.4.- Susceptibilidad genética 11
2.5.- Fenotipo neuropatológico de la EA..... 12
2.5.1.- Placas amiloideas, neuríticas o seniles 12
2.5.2.- Ovillos o redes neurofibrilares..... 13
2.6.- Bases genética y molecular de la EA 14
2.6.1.- Gen APP y proteína precursora del amiloide..... 15
2.6.2.- Genes PSEN1 y PSEN2. Presenilinas 1 Y 2 19
2.6.3.- Hipótesis del amiloide 21
2.6.4.- Gen APOE y apolipoproteína E..... 23
2.6.5.- Proteína tau hiperfosforilada 27
2.6.6.- ¿Cómo se relacionana el péptido amiloide y la proteína tau? 28
2.6.7.- Otros genes..... 30

3.- Neuroinflamación 33

3.1.- Butirilcolinesterasa..... 34
3.2.- Mieloperoxidasa..... 38

3.3.- Sistema HLA 39
3.4.- Citoquinas 41
3.4.1.- Interleuquina-1 (IL-1) 42
3.4.2.- Interleuquina-6 (IL-6) 43
3.4.3.- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) 45
3.4.4.- Interferón gamma (IFN-gamma) 46
3.4.5.- Interleuquina 10 (IL-10) 46
3.4.6.- Factor de Crecimiento Transformante (TGF-β1) 47
3.4.7.- Influencia de los polimorfismos genéticos de citoquinas en el tratamiento.- 48
4.- Otros factores asociados 49
4.1.- Traumatismo craneoencefálico 49
4.2.- Metales 49
4.3.- Agentes patógenos 50
4.4.- Estrógenos 52
4.5.- Síndrome metabólico 52
4.6.- Micronutrientes 53

OBJETIVOS

OBJETIVOS 54

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS 56
1.- Diseño 56
2.- Pacientes 56
3.- Controles 56
4.- Variables estudiadas 57
5.- Limitaciones del estudio 58
MATERIAL Y MÉTODOS 59
1.- Extracción de ADN 59
2.- Amplificación genómica de los genes a estudio 63
2.1.- Estudio de los genes APOE, BCH, MPO e IL-1 65
2.1.1.- APOE 66
2.1.2.- BUTIRILCOLINESTERASA 67
2.1.3.- MIELOPEROXIDASA 69
2.1.4.- INTERLEUQUINA-1 70
2.2.- Estudio del sistema HLA (HLA-A Y HLA-DR) 74
2.2.1.- HLA-A 74

2.2.2.- HLA-DR 76
2.3- Estudio de los genes de citoquinas: TNF-alfa, TGF-beta, IL-10, IL-6, IFN-gamma 78
3.- Análisis estadístico 80

RESULTADOS

RESULTADOS..... 81
1.- Casuística 81
2.- Edad al diagnóstico 82
3.- Género 82
4.- Variables genéticas 83
4.1.- Apolipoproteína E 84
4.2.- Butirilcolinesterasa 87
4.3.- Mieloperoxidasa 91
4.4.- Citoquinas: TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-10, IL-1alfa, IL-1beta e IL-6 93
4.4.1.-TNF-alfa (-308 G/A) 94
4.4.2.- TGF-beta1 (+10T/C) 95
4.4.3.-TGF-beta1 (+25 G/A) 96
4.4.4.- IFN-gamma (+874 T/A) 97
4.4.5.- IL-10 (-1082 G/A) 98
4.4.6.- IL-10 (-819 C/T) 99
4.4.7.- IL-10 (-592 C/A) 100
4.4.8.- IL-1 alfa (-889 C/T) 101
4.4.9.- IL-1 beta (+3953 T/C) 102
4.4.10.- IL-1 beta (-511 T/C) 103
4.4.11- IL-6 (-174 G/C) 105
4.5.- Sistema HLA 107
4.5.1.- HLA-A2 107
4.5.2.- HLA-DR2 108
5.- Estudio multivariable de los polimorfismos analizados 109

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN..... 111
1.- Edad al diagnóstico 111
2.- Género 112
3.- Marcadores genéticos 113
3.1.- Apolipoproteína E 114
3.2.- Butirilcolinesterasa 116
3.3.- Mieloperoxidasa 118

3.4.- Citoquinas TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-10, IL-1alfa, IL-1beta e IL-6 y sistema HLA..... 120
4.- Estudio multivariable de los marcadores analizados..... 123
5.- ¿Son útiles estos marcadores para el diagnóstico clínico?..... 123

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.....125

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.....128

ANEXO I: CRITERIOS DIAGNOSTICOS

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS.....151
Diagnóstico de Demencia 151
Diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer..... 153

ANEXO II: PUBLICACIONES

- *Gender has a strong modulating effect on the risk of Alzheimer's disease conferred by the apolipoprotein E gene in the population of the Canary Islands, Spain*
- *Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain)*
- *Cytokine IL-1 beta but not IL-1 alpha promoter polymorphism is associated with Alzheimer disease in a population from the Canary Islands, Spain*

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- **A2M** Alfa-2-macroglobulina
- **Ab / Aβ** Péptido amiloide
- **ACh** Acetilcolina
- **AchE** Acetilcolinesterasa
- **Acri/Bis** Acrilamida / Bisacrilamida
- **ACT** Alfa-1-antiquimotripsina
- **ADN** Acido desoxirribonucleico
- **APO-E** Apolipoproteína E
- **APP** Proteína precursora del amiloide
- **APS** Persulfato amónico
- **ARN** Acido ribonucleico
- **ARNm** Acido ribonucleico mensajero
- **BACE** Beta secretasa (del inglés “Beta-site APP Cleaving Enzyme”)
- **BCh** Butirilcolina
- **BChE** Butirilcolinesterasa
- **BPB** Azul de bromofenol
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **CAMDEX** Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly
- **CIE** Clasificación Internacional de Enfermedades
- **cm** Centímetros
- **CPH** Complejo Principal de Histocompatibilidad (inglés “Major Histocompatibility Complex” o MCH)
- **dATP** Desoxiadenosinatrifosfato
- **dCTP** Desoxicitidinatrifosfato
- **DCL** Deterioro Cognitivo Leve
- **dGTP** Desoxiguanosinatrifosfato
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **dNTP** Desoxinucleótido trifosfato
- **DSM-IV** Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 4ª edición
- **dTTP** Desoxitimidinatrifosfato
- **EA** Enfermedad de Alzheimer
- **EAPos** Enfermedad de Alzheimer Posible
- **EAPr** Enfermedad de Alzheimer Probable
- **EDTA** Acido etilendiaminotetraacético
- **EEG** Electroencefalograma

- **EOAD** Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (del inglés “Early Onset Alzhiemer’s Disease”)
- **FID** Fase incipiente de la demencia
- **FMD** Fase intermedia de la demencia
- **GABA** Acido gamma-aminobutírico
- **gr / g** Gramos
- **GSK-3** Kinasa glicógeno sintasa 3
- **H_2O** Agua
- **HDL** Lipoproteína de muy alta densidad (del inglés "High Density Lipoprotein")
- **HLA** Antígeno Leucocitario Humano (del inglés "Human Leukocyte Antigens")
- **HLA-A** Antígeno Leucocitario Humano-A (del inglés "Human Leukocyte Antigens-A")
- **HLA-DR** Antígeno Leucocitario Humano- DR (del inglés "Human Leukocyte Antigens-DR")
- **HSV-1** Herpes Simplex Virus – 1
- **I.C.** Intervalo de Confianza
- **IDL** Lipoproteína de densidad intermedia (del inglés “Intermediate Density Lipoprotein”)
- **IFN** Interferón
- **IL** Interleuquina
- **IL-1** Interleuquina-1
- **IL-6** Interleuquina-6
- **IL-10** Interleuquina-10
- **ISTAC** Instituto de Estadística de Canarias
- **LCR** Líquido cefalorraquídeo
- **LDL** Lipoproteína de baja densidad (del inglés "Low Density Lipoprotein")
- **LOAD** Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (del inglés “Late Onset Alzheimer’s Disease)
- **µ-** Micro-
- **MAEC** Mapa de actividad bioeléctrica del cerebro, cartografía cerebral
- **MgCl** Cloruro magnésico
- **m-** Mili-
- **M** Molar
- **MPO** Mieloperoxidasa
- **NaCl** Cloruro sódico
- **n-** Nano-
- **NINCDS-ADRDA** National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, y Alzheimer’s Disease and Related Disorders Associations
- **NK** Linfocitos “natural killer”

- **NT** Redes neurofibrilares (del inglés “Neurofibrillary Tangles”)
- **O.R.** Odds Ratio
- **OMS** Organización Mundial de la Salud
- **p.ej.** Por ejemplo
- **pb** Pares de bases
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polimerase chain reaction”)
- **PCR-RFLP** PCR por análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (del inglés "Restriction Fragment Length Polymorphism")
- **PCR-SSO** PCR por oligonucleótidos específicos de secuencia (del inglés "Specific Sequence Oligonucleotides")
- **PCR-SSP** PCR por primers específicos de secuencia (del inglés "Specific Sequence Primers")
- **PET** Tomografía por emisión de potrones
- **PHF** Filamentos helicoidales pareados (del inglés “Paired Helical Filaments”)
- **PK** Proteinasa K
- **PMN** Leucocitos polimorfonucleares
- **Primers** Cebadores
- **PS (1 y 2)** Presenilinas (1 y 2)
- **PSEN (1 y 2)** Gen de las presenilinas 1 y 2
- **RM** Resonancia magnética
- **SCN** Sistema nervioso central
- **SDS** Laurilsulfato sódico
- **SEN** Sociedad Española de Neurología
- **SLR** Solución de lisis de células rojas
- **SPECT** Tomografía computarizada por emisión de fotón simple
- **TBE** Tris HCl – ácido bórico – EDTA
- **TC** Tomografía computarizada
- **TE** Tris HCl – EDTA
- **TEMED** N,N,N,N’-tetrametiletilendiamina
- **TGF** Factor de Crecimiento Transformante (del inglés "Transformant Growth Factor")
- **TNF** Factor de Necrosis Tumoral (del inglés "Tumoral Necrosis Factor")
- **TP** Témporo-parietal
- **VLDL** Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés "Very Low Density Lipoprotein")
- **WCLB** Solución de lisis de células blancas (del inglés "White cell lisis buffer")
- **u** Unidades

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- ENVEJECER

El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados o en vías de desarrollo es un hecho bien conocido por todos. España en general, y la Comunidad Canaria en particular, no han quedado atrás: en 1991, el porcentaje de personas mayores de 65 años en Canarias, fue del 9,5%, mientras que en 2007 ya era casi del 12,5% [Instituto de Estadística de Canarias. 2008].

TABLA I1- DATOS DEL ISTAC (2007)

INDICE DE ENVEJECIMIENTO					
	1991	**1996**	**2001**	**2005**	**2007**
CANARIAS	9,51	10,48	12,04	12,09	12,44
Lanzarote	7,3	7,67	7,79	7,56	7,96
Fuerteventura	6,55	6,64	6,35	5,79	6,03
Gran Canaria	8,84	9,85	11,66	11,97	12,28
Tenerife	9,76	10,87	12,65	12,69	13,17
La Gomera	15,65	16,46	18,06	18,05	18,25
La Palma	14,29	15,5	17,37	17,74	18,05
El Hierro	18,6	18,84	20,02	19,17	19,85

1.1.- ¿QUE ES EL ENVEJECIMIENTO?

El envejecimiento es un proceso de carácter irreversible, condicionado tanto genética como ambientalmente, donde las funciones fisiológicas se van perdiendo progresivamente, culminando con la muerte. Sin embargo, este proceso no es una

pérdida patológica, sino biológica, y sus manifestaciones fenotípicas son diferentes de las que originan las enfermedades crónicas. Todos los órganos y sistemas del individuo sufren el envejecimiento, aunque en cada uno de ellos se presenta con algunas características especiales en base a diversas circunstancias propias de las células que los forman [Peinado, 2000].

Dentro de las enfermedades del envejecimiento, la demencia se ha convertido en la gran amenaza para el bienestar y la salud de las personas mayores, de sus familias y de la sociedad en general, e implica una carga sanitaria, social, psicológica y económica significativa [Boada,1999; López-Pousa, 2004].

1.2.- DEMENCIA

El término demencia deriva del latín "demens, dementatus" que significa “sin mente” y se define como una pérdida de las funciones intelectuales, debido a daños o desórdenes cerebrales más allá de los atribuibles al envejecimiento normal, que impide el funcionamiento independiente del sujeto en su medio social habitual. Según Cummings y Benson es "un deterioro intelectual adquirido persistente que afecta al menos tres de los siguientes dominios: lenguaje, memoria, percepción visual-espacial, emociones/personalidad y funciones cognitivas ejecutivas" [Cummings, 1980]. Estas funciones no degeneran todas al mismo tiempo, sino que el proceso es continuo, aumentando el número de funciones afectas con deterioro progresivo, siendo generalmente el déficit de memoria, asociada o no a trastornos de conducta, la primera alteración que percibe el enfermo o sus parientes más cercanos.

Hoy en día y en la mayoría de los países, el diagnóstico de demencia se hace siguiendo las recomendaciones propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la Décima Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10, 1992) y

por la Asociación Americana de Psiquiatría (American Psychiatric Association), recogido en el Manual de Diagnóstico Estadístico (DSM-IV, 1994) (ANEXO I).

Dentro de las demencias, la Enfermedad de Alzheimer representa el 65-70% de todos los casos de demencia, seguida por la demencia vascular o mixta, según algunos autores [Bermejo-Pareja, 2008], o la demencia por cuerpos de Lewy, como se sugiere en otros trabajos [Aarsland, 2008].

2.- ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Alois Alzheimer presentaba por vez primera, en 1906, la descripción de una enfermedad de la corteza cerebral en una mujer de 51 años, la cual presentaba pérdida de memoria, desorientación, alucinaciones y demenciación progresiva que la llevaron a morir con sólo 55 años de edad. Al mismo tiempo, Alzheimer presentó el estudio anatomopatológico de su cerebro, mostrando que la corteza cerebral estaba atrófica y existían, además, dos tipos de anomalías muy llamativas: una especie de esferas o acúmulos extraneuronales, constituidos por un material anómalo (placas seniles); y unas acumulaciones de material aparentemente fibroso en el interior de las neuronas (ovillos neurofibrilares).

Esta enfermedad está caracterizada por un declive gradual e irreversible de las funciones cerebrales superiores o cognoscitivas, con desorientación, daños en memoria y lenguaje, agnosia y apraxia [Rubin, 1987; Starkstein, 1996]. En algunos casos, en las primeras fases de la enfermedad se acompaña de alteraciones mentales de carácter no cognoscitivo (depresión, ansiedad, apatía, alucinaciones, psicosis, etc.) y del comportamiento (irritabilidad, indiferencia, agitación psicomotriz, agresividad, trastornos sexuales, del sueño y el apetito etc). Cuando la enfermedad progresa aparecen otros síntomas: clínica extrapiramidal, mioclonías, crisis, reflejos de liberación frontal, espasticidad, incontinencia, apraxia masticatoria y disfagia. La enfermedad se puede estratificar en tres estadios: el primero dura de 1 a 3 años, los

primeros trastornos de memoria se inician con dificultad para aprender material nuevo, en menor grado se afecta la memoria tardía, hay dificultad para encontrar palabras, desorientación topográfica, irritabilidad y síntomas depresivos. El segundo dura de 2 a 10 años, la memoria reciente y tardía están afectas de forma severa, aparece una afasia afluente, apraxia ideomotora, falla la orientación espacial, el cálculo y tienden a la inquietud psicomotriz. En el último estadio que dura de 8 a 12 años, el deterioro neuropsicológico es severo, aparecen síntomas motores extrapiramidales y termina en tetraplejia espástica en flexión [Cummings, 1992].

La progresión de los síntomas produce una interferencia grave en la realización de las tareas diarias y en los cuidados básicos, originándose una gran discapacidad y una dependencia, que llega a ser total, del cuidador.

Casi 80 años después de la descripción de Alzheimer, en 1984, el Instituto Nacional de Desórdenes y Daños Neurológicos y Comunicativos, y las Asociaciones de Enfermedad de Alzheimer y Desórdenes Relacionados (NINCDS & ADRDA), establecía los criterios clínicos estandarizados para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. Estos criterios no permiten un diagnóstico temprano, en fases precoces en ausencia de demencia, ni un diagnóstico etiológico directo ya que se basan en la exclusión de otros procesos. La figura del deterioro cognitivo leve (DCL) tampoco ha mejorado la rentabilidad diagnóstica. Identifica un estado incipiente de EA en pacientes con DCL tipo amnésico, pero por su definición clínica, incluye una amplia heterogeneidad de pacientes que pueden evolucionar a otros tipos de demencia diferente de EA, permanecer estables o mejorar [Gauthier, 2006]. La combinación de biomarcadores específicos de neuroimagen y de LCR se ha utilizado con la finalidad de aumentar la certeza diagnóstica. Así se recoge en la revisión de 2002 de Robles et al, apoyada por la Sociedad Española de Neurología (SEN) [Robles, 2002], y en los nuevos criterios de investigación para el diagnóstico de EA de Dubois et al en 2007 [Dubois, 2007] (ANEXO I).

Desde el punto de vista macroscópico, la atrofia del hipocampo medida por RM, aunque no es específica de EA, se correlaciona sensiblemente con los cambios patológicos de la EA [Jack, 2002]. La neuroimagen funcional puede demostrar hipometabolismo en estructuras límbicas y corteza de asociación temporo-parietal y frontal mediante tomografía por emisión de positrones (PET) [Nestor, 2003] o hipometabolismo por tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT) [Jagust, 2001]. Los nuevos trazadores de imagen del PET se unen a los depósitos de amiloide y también a los ovillos neurofibrilares suministrando imágenes de su distribución*"in vivo* [Tolboom, 2009]. El descenso de $A\beta_{42}$ y el aumento de los niveles de la proteína tau total y fosforilada en LCR, comentados más adelante, son biomarcadores que se asocian significativamente con las alteraciones neuropatológicas de la EA [Tapiola, 2009]. También se han identificado proteínas sanguíneas relacionadas con la desregularización sistémica y la muerte neuronal en la EA [Ray, 2007].

La búsqueda actual se centra en el desarrollo de biomarcadores que permitan un diagnóstico etiológico e identificar la fase preclínica de la EA en vistas a modificar terapéuticamente su progresión.

2.1.- PREVALENCIA E INCIDENCIA.-

El número de casos de enfermedad de Alzheimer aumenta a medida que aumenta la edad media de la población.

En nuestro país, esta enfermedad tiene una prevalencia global del 4,6%, donde, por grupos de edad, afecta a un 0,6% de la población entre 65-74 años, a un 7,9% de la población entre 75-84 años, y a un 16,2% de la población mayor de 85 años (22,2% mayor de 90 años) [García-García, 2001; Lobo, 2000], y con una media de los ratios de incidencia (per 1.000 personas-año), de 7,4 en población de 65 a 90 años [Bermejo, 2008], pudiendo llegar hasta 20,7 [Fratiglioni, 2000].

2.2.- CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS.-

2.2.1.- ANATÓMICAS

El estudio *post mórtem* de los cerebros de enfermos de Alzheimer refleja, a simple vista, una disminución del peso, del volumen cerebral y del espesor de la corteza, ensanchamiento de ventrículos, aumento de líquido cefalorraquídeo y disminución de sustancia blanca [Peinado, 2000] (fig.I1).

Figura I1.- Comparación de un cerebro sano (izqda) y un cerebro de EA (dcha)

(Imagen tomada y modificada de http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/Alzheimer.htm)

2.2.2.- HISTOPATOLÓGICAS

El estudio microscópico del cerebro de un paciente de Alzheimer, revela una disminución en el número de neuronas en las zonas más relacionadas con las funciones cognoscitivas, en especial en la corteza entorrinal, el hipocampo, la corteza temporo-parietal y la corteza frontal en la zona superficial, así como en diversos núcleos grises internos, como la sustancia innominada o región del núcleo de Meynert y el locus coeruleus. Además, en muchas de las neuronas restantes se observan alteraciones patológicas como signos de atrofia del cuerpo y acortamiento y reducción

del número de dendritas y de las conexiones sinápticas neuronales, engrosamientos y varicosidades a lo largo de las prolongaciones [Brun, 1976; Brun, 1981].

Los depósitos extracelulares descritos por Alois Alzheimer están compuestos por amiloide extracelular, formando las placas neuríticas circundadas de neuritas anómalas y de microglía, la cual, generalmente, se observa dentro y adyacente al núcleo central de la placa y que se encuentra expresando antígenos de superficie relacionados con activación, tales como el CD45 o el HLA-DR. Estos depósitos están, además, rodeados por astrocitos reactivos con abundantes filamentos gliales. Las placas difusas (preamiloides) se encuentran frecuentemente a nivel meningovascular y no se acompañan de neuritas distrófica. El amiloide se deposita también en arteriolas, capilares y vénulas de la meninge y corteza cerebral, raramente en sustancia blanca, constituyendo la angiopatía amiloide que produce una perturbación importante de la barrera hematoencefálica. La zona inicial de acumulación parece ser la parte externa de la membrana basal y puede extenderse al parénquima circundante [Selkoe, 2001].

La degeneración neurofibrilar esta compuesta por agregados intraneuronales de parejas de filamentos plegados helicoidalmente, fundamentalmente formados por proteína tau, proteína asociada a los microtúbulos en estado hiperfosforilado. Las redes neurofibrilares, exhiben un diseño característico de distribución que permite la diferenciación de seis estadios progresivos de la enfermedad [Braak, 1991].

2.2.3.- NEUROQUÍMICAS

2.2.3.1. NEUROTRANSMISORES

La acetilcolina (ACh) es un importante neurotransmisor que transmite las señales, principalmente, entre las neuronas cerebrales, uniéndose a dos tipos de receptores, nicotínicos y muscarínicos, y cuya actividad, en el cerebro, finaliza con la acción hidrolítica de las colinesterasas, principalmente acetilcolinesterasa (AChE).

Una de las anormalidades neuroquímicas más pronunciadas en la EA es la disfunción colinérgica en el sistema nervioso central, de tal manera que las neuronas colinérgicas de los núcleos de la región cerebrobasal, que se proyectan al hipocampo y a extensas áreas corticales, van degenerando. Este defecto colinérgico podría ser responsable de muchas de las alteraciones cognitivas y de algunos de los síntomas psíquicos de los pacientes de Alzheimer [Davies, 1976].

Pero el déficit colinérgico no es el único que se encuentra en estos pacientes: desde principio de los años 80, se ha observado como otros neurotransmisores (noradrenalina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), somastotatina, y dopamina), también tienen sus niveles reducidos [Rossor, 1984; Gottfries, 1985; Beal, 1986; Garcia-Alloza, 2006].

2.2.3.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción elevada de radicales libres (átomos o moléculas que tienen orbitales con un solo electrón impar que son muy inestables) y el descenso en la eliminación de éstos o de los mecanismos necesarios para reparar las macromoléculas oxidadas. Los radicales libres, tales como el ión hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, inducen citotoxicidad a través de la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [Thomas, 2007].

Las neuronas son particularmente vulnerables a los efectos dañinos de los radicales libres, debido a sus niveles bajos de antioxidantes naturales y de la alta demanda de oxígeno necesario para el mantenimiento del metabolismo cerebral, el cual es también un buen sustrato en reacciones cuyos compuestos primarios producen radicales libres [Christen, 2000].

Diversos estudios han confirmado la participación del estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer [Mecocci, 1998; Gabbita ,1998], observándose daño nuclear y mitocondrial en los cerebros de pacientes de Alzheimer [Christen, 2000], así como marcadores oxidativos colocalizados en las lesiones neuropatológicas de la EA [Guimera, 2002].

2.2.3.3. INFLAMACIÓN

Las células gliales regulan la actividad nerviosa ya que intervienen en fenómenos de plasticidad neuronal, supervivencia de las neuronas, nutrición neuronal, regulación del crecimiento, detoxificación y regulación homeostática [Guimera, 2002].

El aumento de la reactividad microglial es otro de los fenómenos que contribuyen a exacerbar la lesión neurodegenerativa en las áreas cerebrales afectadas, produciéndose pérdida sináptica y muerte celular neuronal [Aisen, 1994; Tanzi, 2000; Griffin, 2006].

2.3.- TIPOS DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.-

La enfermedad de Alzheimer puede ser clasificada atendiendo a dos criterios principales: (1) la edad en la que se presenta y (2) los antecendentes familiares:

1) Según la edad de aparición tenemos la EA de inicio temprano o presenil (EOAD), que representa el 1% de los casos, y EA de aparición tardía o esporádica (LOAD) cuando aparece después de los 60/65 años [Bullido, 2002; Manzano, 2009], con un 90% de los casos.

2) Cuando tenemos en cuenta la historia familiar, se divide en forma familiar y forma esporádica, siendo esta última la más abundante (90-95% del total de los casos) [Manzano, 2009].

Con esto, la enfermedad ha sido universalmente dividida en dos grandes grupos: EA familiar-temprana, con un 10% de los casos, y EA esporádica-tardía, que es el tipo mayoritario, representando al, aproximadamente, 90% de los casos [Thinakaran, 1999].

Aunque las características anatomopatológicas son similares en ambos grupos,
las manifestaciones clínicas difieren en algunos aspectos, de tal manera que las formas tempranas son más frecuentes en el género masculino, predominando los trastornos de conducta, mientras que las formas tardías son más frecuentes en mujeres, predominando los trastornos cognitivos [Blennow, 2006; Vilalta-Franch, 2007].

2.4.- PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO.-

2.4.1.- EDAD

Es el principal factor de riesgo de esta enfermedad, de tal modo que la prevalencia se incrementa de forma exponencial con la edad.
Como ya se ha comentado, la EA afecta a un 0,6% de la población entre 65-74 años, a un 7,9% de la población entre 75-84 años, y a un 16,2% de la población mayor de 85 años (22,2% mayor de 90 años) [García-García, 2001; Lobo, 2000], aunque lo que ocurre exactamente por encima de los 90 años, tiene una explicación más compleja, debido a los escasos estudios sobre incidencia en esta franja de edad, y al bajo poder estadístico de los datos por el pequeño número de casos [Manzano, 2009].

2.4.2.- HISTORIA FAMILIAR

Cuando existen antecedentes familiares, el riesgo de padecer la enfermedad se incrementa cuatro veces más; de hecho, se piensa que cerca del 33% de los casos de EA son de origen familiar [Rocca, 1991].

2.4.3.- GÉNERO

Tradicionalmente se admite que la enfermedad de Alzheimer tiene mayor prevalencia en el género femenino que en el masculino. Primero se achacó esta diferencia a que las mujeres suelen vivir más tiempo que los hombres, sin embargo, estudios de incidencia han demostrado la "preferencia" de esta enfermedad por el sexo femenino [Rocca, 1991].

2.4.4.- SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

El estudio de las formas familiares de EA, condujo al descubrimiento e identificación de tres genes (de los que se hablará más adelante) en los cromosomas 21, 14 y 1, como portadores de mutaciones que explican la mayoría de los casos de este tipo de EA. La historia familiar de síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), aumenta de forma significativa el riesgo de EA, lo que podría vincularse con los hallazgos neuropatológicos de EA cuando fallecen de adultos [Masters, 1985].

Aún así, hay familias con una forma hereditaria clara de EA en las que no se detecta mutaciones en ninguno de estos genes, de tal manera que no es descartable la posibilidad de que haya más genes con mutaciones causantes de EA [Bullido, 2002].

Respecto a los casos de EA tardía y esporádica, sin embargo, en la gran mayoría de éstos los factores genéticos no son los causantes de la enfermedad, sino que condicionan una mayor susceptibilidad, es decir, los factores genéticos de predisposición no tienen la fuerza necesaria para la expresión de la enfermedad pero sí producen un aumento del riesgo a los individuos portadores cuando se compara con los no portadores.

En la actualidad, se han analizado un gran número de variaciones o polimorfismos de diferentes genes en pacientes con EA esporádica y tardía [Hoenicka, 2006], sin

embargo, aún sigue existiendo bastante controversia y ningún resultado concluyente, como veremos en otros apartados.

2.5.- FENOTIPO NEUROPATOLÓGICO DE LA EA.-

2.5.1.- PLACAS AMILOIDEAS, NEURÍTICAS O SENILES, EXTRACELULARES

Los depósitos extracelulares descritos por Alois Alzheimer están formados por un gran número de proteínas distintas, siendo la más abundante un péptido de entre 39 y 42 aminoácidos [Glenner, 1984; Masters, 1985], conocido como *péptido amiloide o β-amiloide*; éste tiene una gran capacidad para polimerizar, formando fibras insolubles que se depositan constituyendo una estructura con una gran tendencia a atrapar a otras moléculas que circulan por el espacio extracelular. Además, entre el 80 y el 100% de los pacientes de EA, presentan deposición de péptido amiloide en las paredes vasculares cerebrales (angiopatía cerebral amiloidea), más frecuentes en leptomeninge y córtex.

La deposición del péptido amiloide en el cerebro comienza en el neocórtex y se expande jerárquicamente a otras regiones, como el hipocampo; una expansión similar ocurre con la deposición vascular [Thal, 2008].

Las placas amiloideas se clasifican principalmente en dos tipos: la clásica o neurítica y la difusa (preamiloidea). La primera es una lesión compleja que contiene algunos elementos anormales: un depósito central de fibrillas amiloideas extracelulares (core), rodeado por neuritas distróficas (tanto dendritas como terminales axónicos), microglia activada y astrocitos reactivos. Las placas difusas carecen del core amiloideo, con pocas o ninguna neurita distrófica y contiene péptido amiloide no fibrilar [Chung, 1999].

El péptido amiloide (Ab o Aβ) es el resultado del procesamiento celular de la *proteína precursora del amiloide* (app) [Tanzi, 1987], una proteína transmembrana con funciones de receptor y que interactúa con la matriz intersticial y con células vecinas. Aunque más adelante se hablará de ésta con más detalle, mencionar ahora que la app

puede sufrir distintos cortes proteolíticos por unas determinadas enzimas denominadas *secretasas*; normalmente, el procesamiento de la app sigue la llamada vía no amiloidogénica, dando lugar a un péptido de 39-40 aminoácidos de longitud ($A\beta_{40}$) (fig.I2); sin embargo, en determinadas circunstancias, se favorece la vía amiloidogénica, que conduce a la formación del péptido amiloide en sí, de 42-43 aminoácidos ($A\beta_{42}$) [Selkoe, 2001] (fig.I3).

La mayor parte del péptido amiloide que se encuentra en las placas seniles está formado por la forma $A\beta_{42}$, ligeramente mayor y más hidrofóbica, y con mayor tendencia a la agregación. Sin embargo, la forma $A\beta_{40}$ también se puede localizar en la placa senil, junto con la $A\beta_{42}$ [Selkoe, 2001].

2.5.2.- OVILLOS O REDES NEUROFIBRILARES INTRACELULARES

Son acúmulos intracelulares de filamentos apareados que adoptan una disposición helicoidal, y forman, en conjunto, agregados densos que llenan el citoplasma de la neurona. Están constituidos por una variedad modificada de proteína tau [Kosik, 1986], péptido encargado de proporcionar estabilidad a los microtúbulos neuronales, necesaria ésta para formar el citoesqueleto de los axones neuronales.

En la enfermedad de Alzheimer, esta proteína sufre un proceso anormal de fosforilación, de manera que es hiperfosforilada [(tau-PO_4)n], dejando de cumplir su papel en la estabilidad del citoesqueleto y transformándose, además, en una proteína con capacidad de asociarse consigo misma para formar polímeros intracelulares. Serán éstos los que se organicen en las estructuras helicoidales altamente resistentes conocidas como redes neurofibrilares (NT) o PHFs [Grundke-Iqbal, 1986].

La patología de tau sigue una cinética similar al desarrollo de la enfermedad de EA, como indicó Braak et al: en los primeros cuatro estadios de la enfermedad los ovillos neurofibrilares se extienden desde la corteza entorrinal al hipocampo y estructuras límbicas, y se corresponden con una primera etapa de trastornos mnésicos; en la

segunda etapa se desarrolla la demencia y la patología tau se extiende a la corteza, estadios V y VI [Braak, 1991].

La formación de estos ovillos intraneuronales podría estar asociada con el colapso de la red microtubular, que a su vez generará alteraciones en el transporte axoplásmico, pérdida sináptica, atrofia neurítica y, finalmente, muerte neuronal [Avila, 2004].

Si bien está muy claro que ambos tipos de lesiones, placas extracelulares y ovillos intraneuronales, han de estar presentes para que tenga lugar la enfermedad de Alzheimer, aún queda por dilucidar cuál es el origen exacto de ambas, cuál de las dos aparece primero, y si la aparición de la primera lesión da lugar a la aparición de la segunda.

2.6.- BASES GENÉTICA Y MOLECULAR DE LA EA.-

Hasta el momento sólo se conocen cuatro genes (APP, PSEN1, PSEN2 y APOE), claramente asociados con la enfermedad de Alzheimer, y que, además, se relacionan con ésta dependiendo del tipo de Alzheimer que presente el paciente.

Los tres primeros genes mencionados, están relacionados con la EA de tipo familiar-temprano, encontrándose en cada uno de ellos más de una mutación; estas mutaciones conducen, generalmente, a un aumento de la concentración de $A\beta_{42}$ y, por tanto, de la deposición amiloidea (tabla I2).

Respecto a la EA de tipo esporádico-tardío, sólo las variaciones polimórficas descritas en el gen APOE, han presentado una relevancia significativa en el riesgo de padecer la enfermedad [Selkoe, 2001; Bertram, 2004; San Miguel, 2006].

TABLA I2- FACTORES GENÉTICOS CONFIRMADOS PREDISPONENTES DE EA

TIPO DE EA	CROMOSOMA	PROTEÍNA / GEN	FENOTIPO
FAMILIAR TEMPRANA	21q21.3	APP	↑ producción de Aβ (40 y 42) por procesamiento
	14q24.3	Presenilina-1 (PSEN-1)	↑ producción de $A\beta_{42}$ por procesamiento anormal de
	1q31-q42	Presenilina-2 (PSEN-2)	↑ producción de $A\beta_{42}$ por procesamiento anormal de
ESPORÁDICA TARDÍA	19q13.2	Apolipoproteína E (APOE)	↑ densidad de placas amiloideas y depósitos

2.6.1.- GEN APP Y PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (app)

Como ya se ha mencionado, app es una proteína integral de membrana que presenta varias isoformas, denominadas como app seguido del número de aminoácidos que las constituyen. Las isoformas app571 y app770 se expresan en muchos tipos de tejidos, incluído el sistema nervioso, donde la isoforma mayoritaria es la app695 [Forloni, 1992].

Esta proteína es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, glicosilada en el aparato de Golgi y liberada en la membrana celular como proteína transmembrana, quedando la porción 671-713 que contiene el fragmento beta amiloide parcialmente incluída en la membrana. Aunque su función exacta se desconoce, se ha observado que participa en la modulación de la función y formación sináptica [Priller, 2006]; recientemente se ha visto que participa en el tráfico intracelular de otras proteínas también implicadas en la EA [Liu, 2009].

La app puede experimentar un metabolismo diverso según que genere como producto final Aβ u otros fragmentos. Los péptidos amiloide, en general, son monómeros normalmente solubles que circulan a baja concentración en el líquido cefalorraquídeo y sangre [Shoji, 1992]; pero en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, la app no sigue el catabolismo “normal” [Sisodia, 1990], con lo que estos péptidos amiloides

aumentan en número y se van acumulando dando lugar a las ya conocidas placas amiloideas.

Como ya se ha mencionado, el péptido $A\beta_{42}$ es la forma que inicialmente se agrega en las placas extracelulares, debido a su mayor hidrofobocidad y mayor velocidad de agregación [Iwatsubo, 1994].

La formación de los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ puede tener lugar durante y después del tráfico de la app a través de la vía secretora, pudiendo sufrir ésta distintos tipos de cortes que darán lugar a los péptidos que serán posteriormente secretados al espacio extracelular.

Tres proteasas están implicadas en los procesos de corte que sufre app: alfa-, beta- y gamma-secretasa, y que darán lugar a 2 tipos de vías metabólicas, conocidas como vía no-amiloidogénica y vía amiloidogénica:

a.- En la **vía metabólica no-amiloidogénica**, la denominada alfa-secretasa corta la app dentro de la región del amiloide, entre los aminoácidos 687 y 688, liberando un gran ectodominio denominado α-APPs, y generando también un fragmento COOH-terminal de 83 restos de aminoácidos llamado C83 que queda retenido en la membrana citoplasmática (fig.I2).

El fragmento C83 puede ser escindido, dentro del dominio transmembrana, por el complejo enzimático gamma-secretasa, formándose el péptido p3 [Revisado en Selkoe, 2001].

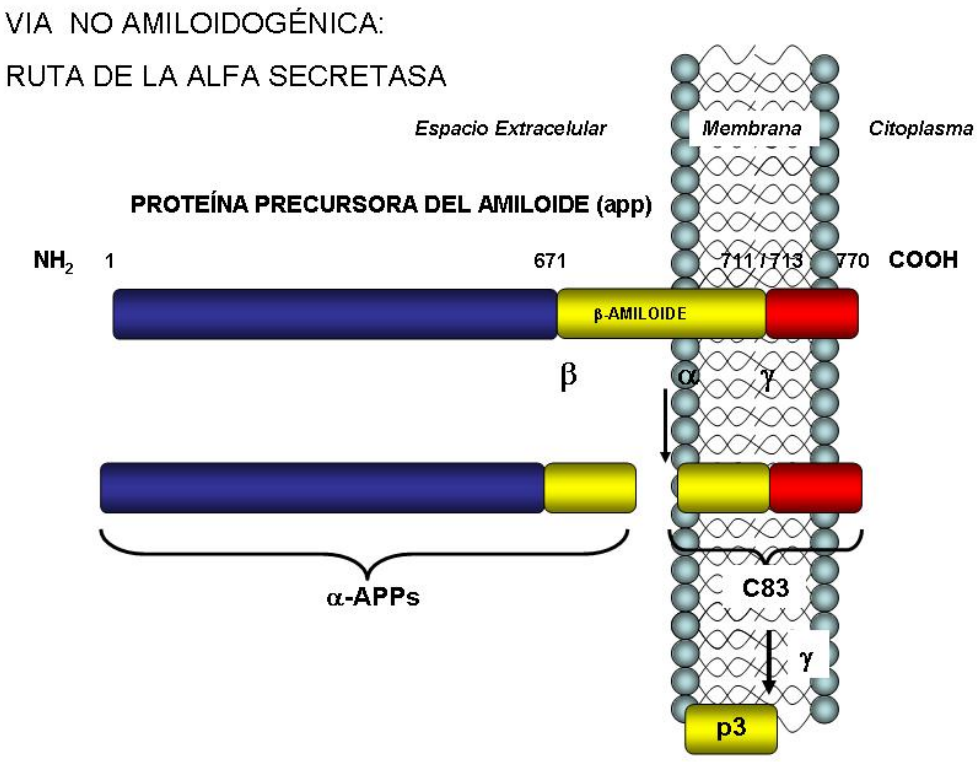

Figura I2.- Ruta no amiloidogénica

El fragmento α-APPs es neuroprotector, neurotrófico y regula la excitabilidad celular y la plasticidad sináptica [Mattson, 1993; Turner, 2003].

b.- Por otro lado, algunas moléculas app no escindidas por la alfa-secretasa, siguen la **vía amiloidogénica**: otra enzima, beta-secretasa (o BACE) y el complejo enzimático gamma-secretasa, escinden a app en otros puntos de corte. Beta secretasa, que tiene una actividad más elevada en los compartimentos de la vía secretora, corta después del aminoácido 671 y crea un fragmento, C99, que queda retenido en la membrana citoplasmática; a continuación, y al igual que en la vía amiloidogénica, el complejo enzimático gamma secretasa realiza un corte en la región transmembrana hidrofóbica (de manera menos específica que la beta secretasa), dando lugar a la formación del

péptido amiloide: si corta en el residuo 711, se generará el $A\beta_{40}$, mientras que si corta en 713 se formará $A\beta_{42}$ [Selkoe, 2001; San Miguel, 2006].

El péptido amiloide resultado del corte proteolítico de estas dos enzimas, puede autoagregarse para formar las placas seniles (fig.I3).

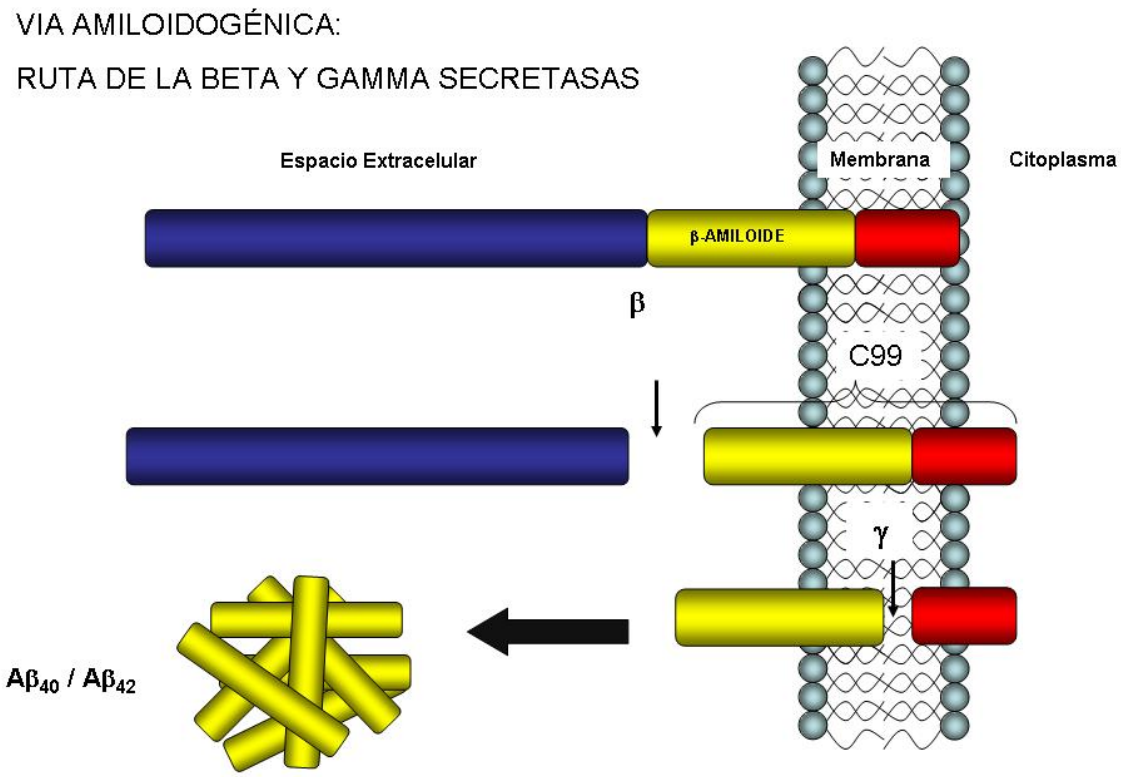

Figura I3.- Ruta amiloidogénica

En 1991 se descubrieron las primeras mutaciones en el gen APP (cromosoma 21q21). Sin embargo, no han sido muchas las mutaciones que se presentan en el mismo, considerándosele responsable de tan sólo el 5-10% de las formas familiares autosómicas dominante de inicio precoz [Selkoe, 2001; Marchesi, 2005].

Estas mutaciones se concentran en las zonas adyacentes a los sitios de corte de app por alfa, beta y gamma secretasa [Theuns, 2000; Selkoe, 2001] [fig.I4]. En el primer caso, las mutaciones resultan en una inhibición del corte de app por la alfa-secretasa; en los otros casos, las mutaciones dan lugar al proceso inverso, es decir, facilitan el corte de app por las secretasas beta y gamma [Herl, 2009].

En cualquier caso, todas estas mutaciones interfieren con el procesamiento normal de la app, conduciendo a un incremento en la secreción de péptido amiloide.

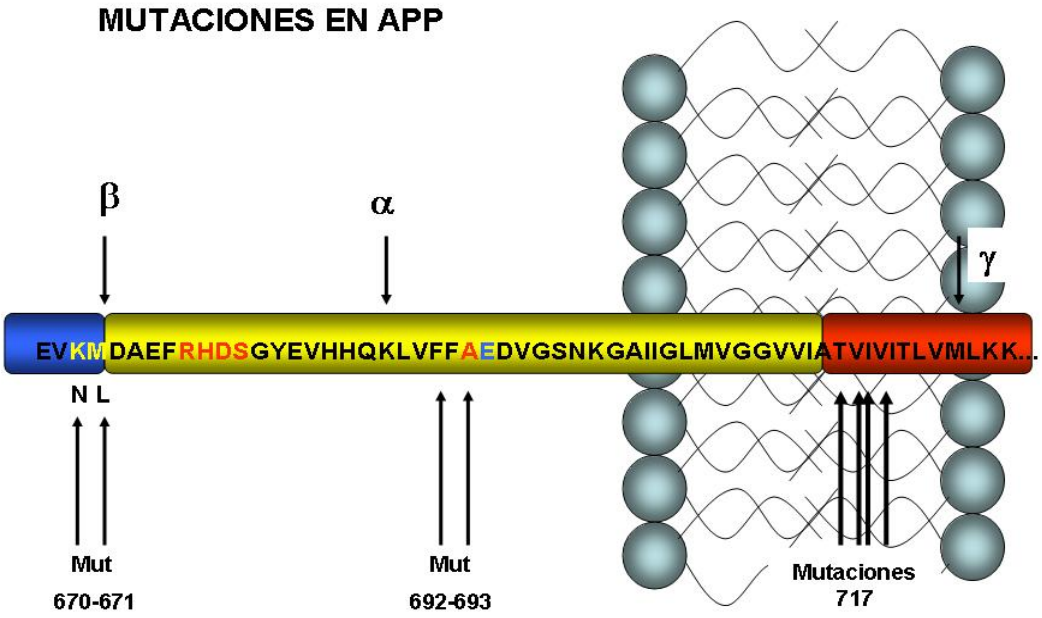

Figura I4.- Algunas de las mutaciones descritas para APP

2.6.2.- GENES PSEN1 y PSEN2. PRESENILINAS 1 Y 2 (ps1, ps2)

El descubrimiento de la forma autosómica dominante de herencia de la enfermedad de Alzheimer, llevó a la búsqueda intensiva de loci en el genoma, además del de app, que pudieran explicar muchos de los casos familiares no unidos al cromosoma 21. Así, en 1992, se describió la existencia de ligamiento genético del cromosoma 14 con algunas de estas familias [Schellenberg, 1992], identificándose un gen en 14q, cuyo producto, presenilina 1 (ps1), contenía múltiples dominios transmembrana [Sherrington, 1995]. Poco tiempo más tarde se descubrió un gen homólogo en el cromosoma 1, que codifica para ps2, cuyas mutaciones también explicaban la aparición temprana de la enfermedad en dos familias [Levy-Lahad, 1995]; muchos e intensos estudios genéticos

han identificado hasta 140 mutaciones en el gen de la presenilina 1 y 10 en la presenilina 2, como causantes moleculares de la EA temprana-familiar [Theuns, 2000; Marchesi, 2005; Vetrivel, 2006].

La presenilina 1 es una proteína integral de membrana, con 8 dominios transmembrana y constituída por 467 aminoácidos. Los análisis de mutación dirigida indican que la edad de inicio de EA en las diferentes familias de ps1 se relaciona con la posición y el tipo de sustitución aminoacídica.

La proteína presenilina 2 es también una proteína transmembrana de 448 aminoácidos, con una homología con la secuencia aminoacídica de la ps1 del 67%. Sin embargo, el número de mutaciones descritas es más reducido.

Ambas proteínas se encuentran localizadas, principalmente, en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi [Cook, 1996; Kovacs, 1996], donde se solapa con los sitios intracelulares de generación del péptido amiloide [Xia, 1997].

Entre las funciones fisiológicas que se atribuyen a ps1 se encuentran la participación en la apoptosis, la homeostasis del calcio, el crecimiento neurítico y la plasticidad sináptica [Revisado en Thinakaran, 2004]. Además, estudios de deleción en ratones (ratones knock-out) reveló una somitogénesis y desarrollo del esqueleto axial anormal, así como hemorragias cerebrales. Además, estos ratones, que morían antes o durante el nacimiento, mostraron un neurodesarrollo embrionario anormal en el cerebro anterior, marcado por una pérdida prematura de precursores neuronales [Shen, 1997; Wong, 1997]. El estudio de estos ratones knock-out también demostró que, mientras que los niveles de los productos de las alfa y beta secretasas se mantenían iguales, la función de la gamma secretasa era anormal, disminuyendo la producción tanto de $A\beta_{40}$ como de $A\beta_{42}$ hasta en un 70%, lo que sugería que la expresión de ps1 era necesaria para la actividad de la gamma-secretasa [De Strooper, 1998; Li; 2000], el complejo enzimático que participa en la formación del péptido amiloide, compuesto también por otras tres proteínas (nicastrina, aph-1 y pen-2) [Revisado en Vetrivel, 2006].

Aunque se han encontrado mutaciones en los genes de ambas presenilinas en más de la mitad de los casos de enfermedad de Alzheimer tipo familiar-temprano, es aún un misterio cómo estas mutaciones diversas dan lugar al mismo fenotipo, es decir, a un aumento en la producción de beta amiloide [Marchesi, 2005].

Sin embargo, no siempre la presencia de mutaciones en éstas, dan lugar a un aumento del péptido beta amiloide, como se ha visto en la enfermedad de Pick, donde PSEN1 puede ser un gen candidato para determinadas taupatías [Dermaut, 2004]. En apoyo de esto último, estarían trabajos como el de Baki et al, donde proponen que mutaciones en ps1 promueven la actividad de la kinasa gsk-3, que a su vez da lugar a una mayor fosforilación de la proteína tau [Baki, 2004].

2.6.3.- HIPÓTESIS DEL AMILOIDE

Esta hipótesis establece que la sobreexpresión de beta amiloide o una deficiente clarificación del mismo es, probablemente, la génesis de la enfermedad de Alzheimer.

El aumento en la síntesis de péptidos Aβ desde la app, en las formas de inicio temprano de la enfermedad, sería debido a mutaciones en los genes APP, PSEN1 y/o PSEN2. Así, la acumulación incrementada de los péptidos amiloidogénicos $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ tendría lugar en los primeros inicios de la enfermedad, debido bien al incremento en la actividad de las beta y gamma secretasa, o bien al descenso en la eliminación de los péptidos Aβ. Tanto por una como por otra causa, estos péptidos Aβ se agregan para formar primero una placa difusa y generar, finalmente, una placa neurítica madura [Revisado en Suh, 2002] (fig. I5).

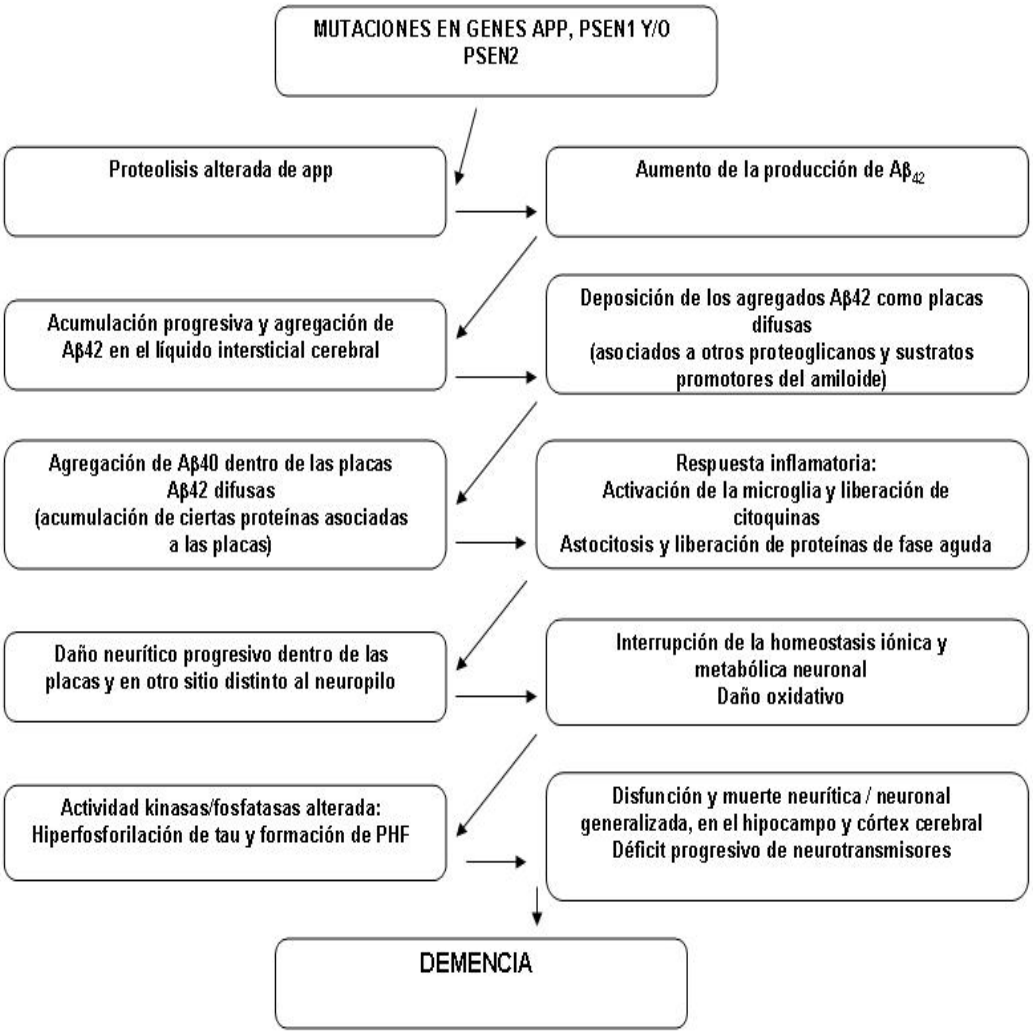

Figura I5.- Secuencia hipotética de los pasos de la EA familiar [Selkoe, 2001]

Se podría pensar que la inmunización de los pacientes con $A\beta_{42}$ eliminaría el depósito de amiloide. En un estudio llevado a cabo entre 2003 y 2006, por Holmes et al, se observó que, aunque había una variación importante en la carga de $A\beta$ y grado de la eliminación de las placas entre los participantes inmunizados, esta clarificación no prevenía la neurodegeneración progresiva [Holmes, 2008].

2.6.4.- GEN APOE Y APOLIPOPROTEÍNA E

La EA de inicio tardío puede aparecer como resultado de la presencia de variabilidad genética en diversos genes, de manera que cada uno de los alelos implicados, de manera aislada, no tenga ningún efecto en cuanto a la presencia de la enfermedad y, únicamente en combinación con otros alelos de genes distintos, llegan a verse comprometidas las vías sobre las que actúan.

Dentro de estos genes, el que ha sido más claramente asociado con estas formas de EA, es el que codifica para la apoliproteína E (apoe) [Saunders, 1993b].

La apoe es una glicoproteína de 299 aminoácidos implicada en el transporte del colesterol y en el metabolismo de las partículas lipídicas, encontrándose presente en las lipoproteínas VLDL, IDL y HDL; su función concreta es la unión, internalización y catabolismo de partículas de lipoproteína, actuando como ligando del receptor de LDL; además está encargada de la movilización y redistribución del colesterol durante el crecimiento neuronal y en caso de daños; también interviene en la regeneración nerviosa, en la promoción de la plasticidad sináptica que sigue al daño neuronal, en inmunorregulación y en la activación de algunas enzimas lipolíticas [Handelmann, 1992 ; Nathan, 1994; Gaynor, 2003].

Se sintetiza principalmente en el hígado y en el cerebro, aunque también en otros tejidos, incluídos astrocitos, macrófagos y monocitos [Basu, 1982].

Existen 3 isoformas de la apoe, conocidas como E2, E3 y E4, productos de 3 formas alélicas (E2, E3 y E4) del gen APOE, que se encuentra en el cromosoma 19q; el más común de estos alelos es el E3, ya que está presente en el 40-90% de la población. Las distintas combinaciones de estos alelos generan 6 genotipos posibles, entre los que destaca el APOE E3/3, por ser el más común. Estas 3 isoformas se diferencian únicamente en cambios aminoacídicos en las posiciones 112 y 158:

TABLA I3- CAMBIOS AMINOACÍDICOS SEGÚN POSICIÓN EN apoe

	POSICIÓN 112	**POSICIÓN 158**
apoe E2	*Cisteína*	*Cisteína*
apoe E3	*Cisteína*	*Arginina*
apoe E4	*Arginina*	*Arginina*

Este ligero cambio tiene efectos a nivel de la función de la proteína, y se refleja en la existencia de asociaciones genéticas entre varias de las isoformas y diversas patologías, como la esclerosis múltiple [Chapman, 2001], la enfermedad de Parkinson [Zareparsi, 2002a], la angiopatía amiloide cerebral [O'Donnell, 2000], pero sobre todo, la enfermedad cardiovascular [Breslow, 1982; van Bockxmeer, 1992; Novaro, 2003].

En 1993 se descubrió que la frecuencia del alelo E4 estaba incrementada en los enfermos de Alzheimer, concretamente en los casos de inicio tardío, tanto en los familiares como en los esporádicos, observándose que los individuos heterozigóticos para este alelo tenían 3 veces más riesgo de padecer EA (oscilaría entre 4 y 20 veces en función de la población en la que se estudie su efecto), mientras que en los homocigóticos, este riesgo se incrementaba en 8 veces más cuando se sobrepasaban los 75 años de edad. Así pues, el riesgo conferido por la posesión de este alelo era dependiente de la dosis génica [Saunders, 1993a; Corder, 1993]. Además, esta asociación era más pronunciada en la mujer que en el hombre [Poirier, 1993; Payami, 1996].

Sin embargo, hemos de resaltar que *la presencia de este alelo E4 no es ni necesaria ni suficiente para desarrollar EA, así como la no presencia de dicha variante garantiza la ausencia de EA*, de tal manera que hay individuos E4/E4 que no han desarrollado la enfermedad e individuos con EA que no presentan este alelo. Por tanto, el gen APOE no es un gen causante de la enfermedad de Alzheimer, pero sí es un factor de

riesgo importante, estimándose que puede tener un efecto considerable en el 50% de la población de pacientes, aproximadamente [Myers, 1996].

¿Cuál es la relación exacta de esta proteína con la EA?. Apoe se encuentra colocalizada en las lesiones del Alzheimer, es decir, en las placas amiloideas y en las redes neurofibrilares intracelulares.

Con respecto a las primeras, en estudios iniciales se observó que mostraba gran afinidad por el péptido amiloide, lo que sugería un rol patogénico funcional de esta lipoproteína [Strittmatter, 1993a]. Además, esta afinidad era dependiente de la isoforma apoe, de tal manera que, *in vitro*, E4 se unía más ávidamente al péptido amiloide que la isoforma E3 [Strittmatter, 1993b], aunque estudios en cultivos celulares revelaron lo contrario, es decir, una mayor afinidad de la isoforma E3 [LaDu, 1994]. Esta discrepancia quedó resuelta al observarse que esto ocurría en condiciones de no purificación de apoe, es decir, cuando ésta se deslipidaba y desnaturalizaba, era E4 quien mostraba mayor avidez por el péptido amiloide, lo que sugería que también la conformación de esta apolipoproteína era importante en su relación con las placas amiloideas [LaDu, 1995].

También se observó una relación entre la dosis génica en este locus y la cantidad de depósitos de amiloide del parénquima cerebral de los afectados: aquellos enfermos con una copia del alelo E4 presentan un mayor número de depósitos que aquellos enfermos sin ninguna copia de este alelo, mientras que los individuos E4 homozigotos son los que presentan una mayor densidad de placas seniles [Schmechel, 1993].

En cuanto a su relación con las redes neurofibrilares, estudios *in vitro* demostraron que apoe se unía también a tau, sólo que en esta ocasión era la isoforma E3 la que lo hacía, y no la E4, de modo que E3 se unía a la región de unión de tau al microtúbulo, la misma que se piensa causa su autoensamblaje en PHF, con lo que apoe podría regular el metabolismo intraneuronal de tau y alterar el ratio de formación de PHF y redes neurofibrilares [Strittmatter, 1994].

El estudio posterior de las variantes genéticas dentro de la región reguladora de la transcripción del gen APOE, mostró la presencia de tres polimorfismos en -219 G/T, -427 T/C y -491A/T que generaban diferencias en la actividad transcripcional del mismo, debido, probablemente, a diferencias en la unión de proteínas nucleares. Así, la sustitución del nucleótido A por T en -491 daba lugar a un descenso significativo en la actividad del promotor, al igual que la presencia del alelo C en -427, mientras que la sustitución de T por G en -219 provocaba un incremento en la línea celular humana HepG2 (hepatoma).

Por tanto, incrementos en la concentración de apoe debido a la presencia de los alelos -219T, -427T y -419A, pueden ser los responsables de su asociación con la patogénesis del Alzheimer. Así pues, es posible que polimorfismos en el promotor génico de la apoe contribuyan directamente al riesgo de desarrollo de Alzheimer en individuos que no presentan el alelo E4 [Artiga, 1998a; Artiga, 1998b; Artiga, 1998c].

Basándose en esto, Artiga et al, sugieren que hay dos mecanismos por los que el riesgo de Alzheimer puede ser modificado por el gen APOE: un mecanismo que incluye variantes en la región codificante que altera las propiedades funcionales de la molécula apoe, y un segundo mecanismo que incluye variantes en la región promotora que resulta en diferencias cuantitativas en la expresión de apoe. Estos dos factores están asociados con el riesgo de desarrollo de Alzheimer independientemente; cada uno produce riesgo por sí mismo, pero pueden interactuar entre ellos resultando en un sobrerriesgo para los individuos que portan el alelo E4 y formas del promotor de alta expresión del gen APOE.

2.6.5.- PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA

Las neuronas presentan dos tipos de extensiones citoplasmáticas, axones y dendritas, donde tiene lugar la transmisión neuronal, por lo que cualquier cambio en la morfología neuronal afectaría esta transmisión y podría llevar a eventos patológicos.

Los microtúbulos, componentes del citoesqueleto, son estructuras muy dinámicas, de tal manera que el ensamblaje de sus componentes puede darse al mismo tiempo que la despolimerización de los mismos; este equilibrio genera la morfología típica de las células. Sin embargo, durante la diferenciación de los neuroblastomas en neuronas, los microtúbulos se estabilizan en direcciones específicas, generando las ya mencionadas extensiones citoplasmáticas [Avila, 2004]. Entre las proteínas propuestas para la estabilización de los microtúbulos se encuentra la proteína tau [Kosik, 1986].

Tau es una proteína hidrofílica expresada, principalmente, en las células neuronales, mientras que en el resto de las células no neuronales podrían existir elementos silenciadores de su expresión [Avila, 2004]. Puede sufrir distintas modificaciones: fosforilación, glicosilación, ubiquitinización, oxidación, etc. En muchos casos, la fosforilación controla la unión de tau a los microtúbulos, por lo que parece que esta modificación es la predominante en la regulación de las funciones de tau. La fosforilación es un proceso muy relacionado con el desarrollo, de tal manera que es alta en las neuronas fetales y decrece con la edad. Por tanto, el aumento de la fosforilación de tau conllevaría a situaciones patológicas o taupatías, al igual que el aumento de la cantidad de tau no fosforilada.

En cuanto a las funciones concretas de tau, hay que tener en cuenta que muchos de los estudios que se han llevado a cabo, se han realizado a través de la sobreexpresión de la misma, por lo que es posible que algunos de los resultados obtenidos hayan exagerado el papel de tau en algunos procesos. De cualquier manera, parece claro que tau facilita el ensamblaje de la tubulina, componente de los microtúbulos, además de unirse a otras proteínas con funciones diversas [Avila, 2004]. Sin embargo, la unión

de tau a la tubulina también impide el transporte axonal dependiente de kinesina, con lo que algunos autores especulan que la concentración de tau necesaria para estabilizar los microtúbulos, en presencia de otros factores estabilizadores, es muy pequeña [Stamer, 2002], con lo que el transporte axonal no estaría afectado; pero en presencia de concentraciones mayores, éste sí estaría alterado.

¿Qué ocurre con los enfermos de Alzheimer?. En la EA, tau sufre un proceso anormal de fosforilación, de manera que es hiperfosforilada, [(tau-PO_4)n], y deja de desempeñar su papel en la estabilidad del citoesqueleto, transformándose, además, en una proteína con capacidad de asociarse consigo misma para formar polímeros intracelulares que se organizarán, posteriormente, en las estructuras helicoidales de los PHFs o redes neurofibrilares [Grundke-Iqbal, 1986].

En estos pacientes, algunos grupos de neuronas están preferentemente afectadas por estos ovillos, como por ejemplo ocurre en las áreas del hipocampo, implicado en los procesos de memoria. Esto se correlaciona con los déficits clínicos observados en los estadíos tempranos de la enfermedad respecto al aprendizaje y la creación de nuevas memorias [Munoz, 2000].

2.6.6.- ¿CÓMO SE RELACIONAN EL PÉPTIDO AMILOIDE Y LA PROTEÍNA tau?

Una cuestión importante en la patogénesis de la EA radica en la relación entre la deposición amiloidea y la formación de las redes neurofibrilares, puesto que ambas características han de darse para que se dé esta enfermedad, de modo que la deposición amiloidea es necesaria pero no suficiente para causar la demencia tipo Alzheimer; y lo mismo ocurre con la formación de los ovillos intraneuronales; por tanto, ha de haber una ruta que conecte a ambas lesiones.

Aunque los pasos que conectan el péptido Aβ con la proteína tau aún permanecen desconocidos [Blurton-Jones, 2006], algunos autores han observado que la pérdida de la integridad microtubular dependiente de tau puede estar causada por la exposición

de las neuronas al péptido Aβ pre-fibrilar [Busciglio, 1995; King, 2006], de tal modo que la formación de las fibrillas amiloideas altera el estado de fosforilación de la proteína tau, incrementando, por ejemplo, la actividad enzimática de la kinasa gsk3 a través de una acción antagonista sobre el receptor de la insulina, que promueve la activación de gsk3 [Xie, 2002].

También puede ocurrir que Aβ, al aumentar la respuesta inflamatoria y la liberación de citoquinas proinflamatorias, module indirectamente la fosforilación de tau [Revisado en Blurton-Jones, 2006].

Por el contrario, otros autores consideran que son alteraciones en la proteína tau las que desencadenan la aparición de las placas amiloideas, ya que, a través de la creación de ratones con un bajo nivel de la expresión de tau, se observó que, aunque los niveles de Aβ y la acumulación de placas amiloideas o la formación de neuritas distróficas que rodeaban la placa, no se alteraba, si se previnieron las alteraciones de comportamiento, la pérdida de memoria y la muerte repentina. Estas mejoras tuvieron lugar incluso reduciendo a tau en un 50%. Así, los efectos de Aβ sobre la memoria y la conducta pueden depender de tau [Roberson, 2007].

Otros trabajos sugieren que el aumento de la concentración de tau afecta al transporte axonal, con lo que el transporte secretor de app se vería alterado: app es transportada por vesículas conducidas por kinesina, así, si la concentración de tau aumenta, interacciona con la kinesina y se detiene el transporte de app, de modo que se acumularía intracelularmente facilitándose la formación del péptido amiloide [Stamer, 2002].

2.6.7.- OTROS GENES

2.6.7.1 Alfa-2-macroglobulina (A2M)

A2M es una glicoproteína sérica y el principal inhibidor plasmático de proteinasa con una gran especificidad [Kan, 1985]. Esta proteína ha sido relacionada con la EA en base a su habilidad para mediar en la clarificación y degradación del péptido amiloide.

En 1998 se analizó la deleción A2M-2 dentro del exón 18 del gen de la A2M, observándose que confería un incremento en el riesgo de padecer EA [Blacker, 1998], aunque trabajos posteriores no fueron capaces de replicar estos estudios [Rudrasingham, 1999; Rogaeva, 1999].

En 2003 se identificaron 7 nuevos polimorfismos [Saunders, 2003], y se encontró asociación entre 2 de éstos y una deleción de 5 pares de bases con la EA. El análisis de haplotipos también mostró asociación significativa entre la EA y grupos de polimorfismos de A2M, algunos de los cuales, después de correcciones para múltiples tests, siguen estando relacionados con la EA.

2.6.7.2 Alfa-1-antiquimotripsina (ACT)

Esta proteína pertenece a la clase de los inhibidores de la proteasa, constituída por una única cadena glicopeptídica, y que comparte homología, tanto a nivel de ácido nucleico como de proteína, con la alfa-1-antitripsina [Chandra, 1983]. Su concentración en plasma aumenta en respuesta a traumas, cirugías e infecciones.

En 1995 se presentaba, por primera vez, evidencia de que un polimorfismo de ACT en la posición -15, en combinación con el alelo E4 de la apoe, aumentaba la susceptibilidad a la EA [Kamboh, 1995], aunque otros autores postularon lo contrario, que no había relación [Haines, 1996]. Dos años más tarde se publicaba la asociación

de un microsatélite dinucleótido en la secuencia 5' del gen ACT, denominado como A10, que también en asociación con APOE E4, aumentaba el riesgo de desarrollar EA [Morgan, 1997]. La explicación a estos resultados contradictorios podría estar en la presencia de sitios variables importantes dentro del gen ACT, de tal manera que, la combinación aleatoria de alelos protectores y de riesgo conlleva tanto incremento como disminución en el riesgo de padecer Alzheimer [Wang, 2002].

Sin embargo, el estudio de las enfermedades genéticas complejas, como la EA, acarrea toda una serie de problemas (muestras de estudio insuficientes, existencia de falsos positivos, análisis inapropiados, etc), que dan lugar a una gran controversia y ningún resultado definitivo.

A continuación se resumen algunos de los muchos genes que se han intentado relacionar en la etiología de la EA (tabla I4).

TABLA I4- GENES ASOCIADOS A LA EA EN ESTUDIOS DE CASO-CONTROL

APOLIPOPROTEÍNAS Y PROTEÍNAS RELACIONADAS	APOA-IV, APO-CI, APO J RECEPTORES APOE: LRP, LDL, VLDL OTROS POLIMORFISMOS APOE: MUTACIÓN PITTSBURG
GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO	LIPOPROTEÍNA LIPASA, PARAOXONASA
GENES RELACIONADOS CON LA OXIDACIÓN Y EL METABOLISMO NEURONAL	CITOCROMO P450D, OXIDO NÍTRICO SINTASA 3, DIHIDROLIPOAMIDA S-SUCCINILTRANSFERASA, HEMOOXIGENASA 1,FENIL ETANOLAMINA N-METILTRANSFERASA
GENES MITOCONDRIALES	MUTACIONES EN LOS COMPLEJOS TRANSPORTADORES DE ELECTRONES: COMPLEJO I, SUBUNIDAD ND1, ND2 COMPLEJO IV, CITOCROMO C OXIDASA (SUBUNIDAD 1,2) MUTACIONES PUNTUALES: MT5460, MT4336, ARNR 12S
GENES RELACIONADOS CON Aβ	CISTATINA C, PSEN1 REGIÓN INTRÓNICA, PSEN 2 REGIÓN INTRÓNICA, CATEPSINA, ALFA-QUIMIOTRIPSINA, RECEPTOR AGE, PROTEÍNA LIGADA APP, ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA, DIPEPTIDIL CARBOXIPEPTIDASA, PROTEINA DE MEMBRANA ESPERMATICA, ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA
INFLAMACIÓN	ALFA-1-ANTIQUIMIOTRIPSINA, ALFA-2-MACROGLOBULINA, ALFA-2-MICROGLOBULINA, PROTEÍNA S100
APOPTOSIS	CASPASAS PROTOONCOGENES Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN: BCL2, BAX GEN LIGADO A LA APOPTOSIS-2: NCKAP, RECEPTOR FAS
CITOESQUELETO	MAPT NEUROFILAMENTOS: CORTOS, MEDIANOS, LARGOS KINASAS: ERK, SERK, GSK, MARK FOSFATASAS: FOSFATASAS 3, 3
NEUROTRANSMISORES	MUSCARÍNICOS (1-5), SUBUNIDADES DEL RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA-2,3,4,5,7, Y ALFA-2,3,5, ACETILCOLINESTERASA, TRANSPORTADOR DE LA ACETILCOLINA, CARNITINA ACETILTRANSFERASA, COLINA ACETIL TRANSFERASA, GALANINA, RECEPTOR DE GALANINA, GLUTAMINA SINTASA, CANALES DE POTASIO, RECEPTOR 6 DE SEROTONINA, TRIPTOFANO HIDROXILASA, RECEPTORES 5,6 DE GLUTAMATO, AMPA 1-4, KAINATO 3-5,
FACTORES NEUROTRÓFICOS	BDNF, ENCOGEN TRK, NGF, SUBUNIDADES ALFA,BETA Y GAMMADE NGF, NF-3, RECEPTORES NEUROTRÓFICOS DE TIROSINA KINASA TIPOS 1-4, NEUROTROFINA 3
TRANSDUCTORES DE SEÑAL	CALMODULINA, KINASA DEPENDIENTE DE CMPC, ACTIVADOR DE FE65, V-FOS, FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN LBP 1-C/CP2/LSF, RECEPTOR INTERMEMBRANA G0
OTROS MARCADORES DIAGNÓSTICOS	B-CATENINA, GAP-43, NOTCH3, BLEOMICINA HIDROLASA, LOCUS MN, METALOTIONEINA 3, CRH (CORTICOTROPINE RELEASE HORMONE), FOSFORIBOSIL GLICINAMIDA FORMAL TRANSFERASA, METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

[Revisado y modificado de Manzano, 2009]

(Si se desea una mayor información sobre las mutaciones y variaciones no patogénicas en genes relacionados con la EA, además de estudios de asociación alélica, en las páginas web *http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/default.asp*, y *http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations*, se puede consultar la base de datos en función del gen, la proteína, el polimorfismo o el autor).

3.- NEUROINFLAMACIÓN

La inflamación es fundamentalmente una respuesta protectora cuya meta es eliminar el agente inductor del daño, previniendo así el daño celular/tisular e iniciando los procesos de reparación necesarios. En ausencia del proceso inflamatorio adecuado, el daño celular/tisular podría no ser detectado, lo que daría lugar a la no reparación de éste, pudiendo llegarse a la muerte del organismo.

La activación de la microglia y de los astrocitos fue un hecho que también describió Alois Alzheimer en 1911, el cual observó como éstos se encontraban en abundancia cerca de placas y neuronas.

Este hecho sugería que distintos procesos inflamatorios podían estar implicados en esta enfermedad, ya que las células gliales son responsables de la respuesta inmune innata en el sistema nervioso central, produciendo citoquinas, factores de crecimiento, moléculas del complemento y moléculas de adhesión. Y así se ha visto: en las áreas afectadas, donde hay proliferación de células gliales e inflamación, se produce muerte celular neuronal y pérdida sináptica [Aisen, 1994; Tanzi, 2000; Griffin, 2006], es decir, existe activación de mecanismos inflamatorios que acompañan al proceso degenerativo de esta enfermedad.

Estudios sobre ratones han puesto de manifiesto que la microglia, una vez activada por la degeneración neuronal, participa en una cascada inflamatoria local que facilita el daño tisular y contribuye a la formación de las placas [McRae, 1997], manteniéndose quizás un círculo vicioso en la neurodegeneración relacionada con la EA, es decir, la producción de beta amiloide activa la microglia de los alrededores, que deriva en la producción y liberación de mediadores de la inflamación; los procesos neurotóxicos, llevados a cabo por estas citoquinas, podrían incluír muerte neuronal directa por estimulación de la apoptosis, descenso de la función sináptica e inhibición de la neurogénesis hipocampal, además de un incremento de la producción y acumulación de beta amiloide [Brugg, 1995; Egensperger, 1998; Rosenberg, 2005].

Por otro lado, cabría esperar que la inflamación tuviera un efecto beneficioso y un papel protector en el cerebro, puesto que se induciría la fagocitosis del beta amiloide por parte de la microglia, reduciéndose su deposición en las placas. Bajo determinadas circunstancias se ha visto que esto es así: que la microglía puede degradar el beta amiloide fibrilar [Schenk, 1999] y es responsable de la clarificación de la placa [Bard, 2000].

Sin embargo, aún no está claro de que manera tiene lugar esta degradación por parte de la microglia, aunque sí se ha observado como la acidificación de los lisosomas de ésta, juega un papel importante en la habilidad de la microglía para degradar el beta amiloide [Majumdar, 2007].

Los equipos que han documentado la presencia de un gran número de moléculas inflamatorias en el cerebro de los enfermos de Alzheimer son diversos, compilándose así todo un catálogo de productos de las células inmunes que están presentes en niveles elevados en el cerebro de estos pacientes [Rogers, 1996], e identificándose proteínas inflamatorias asociadas con las placas neuríticas y las células gliales que rodean a éstas, como son los antígenos HLA, proteínas del complemento y citoquinas, que, junto con polimorfismos en sus genes codificadores, aumentan el riesgo o predisponen para un desarrollo más temprano de la enfermedad [Hoozemans, 2001a].

3.1.- BUTIRILCOLINESTERASA

Como ya se ha mencionado, la anormalidad neuroquímica más pronunciada en la enfermedad de Alzheimer es la disfunción colinérgica en el sistema nervioso central.

Un aspecto importante de la función colinesterásica cerebral es que está asociada con diferencias enzimáticas: el cerebro de los mamíferos contiene, principalmente, dos formas de colinesterasas: acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE). Estas dos formas difieren genética, estructural y cinéticamente [Lane, 2006], aunque

ambos compuestos catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina sobrante en el espacio sináptico en colina y ácido acético, reacción necesaria para permitir que la neurona colinérgica vuelva a su estado de reposo después de la activación, evitando así una transmisión excesiva de acetilcolina.

Otra diferencia entre los dos tipos de colinesterasa son sus preferencias por los sustratos sobre los que actúan: la primera hidroliza acetilcolina más rápido, mientras que la segunda hidroliza más rápido la butirilcolina. Sin embargo, aunque la BChE es menos eficiente en la hidrólisis de la acetilcolina a bajas concentraciones, es altamente eficiente a altas concentraciones de este neurotransmisor, donde la AChE se vuelve menos resolutiva [Darvesh, 2003].

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer, mientras que la actividad de la AChE decrece progresivamente en el cerebro de estos pacientes, la actividad de la BChE muestra un incremento [Giacobini, 2004; Lane, 2006].

La BChE humana es una enzima glicoproteica sérica, de la familia de las serin-esterasas, que contiene 4 subunidades idénticas, cada una de las cuales posee un sitio catalítico activo. Se cree que se sintetiza en el hígado y su función fisiológica no está clara, ya que la butirilcolina no es un sustrato fisiológico en el cerebro de los mamíferos, lo que hace difícil la interpretación del papel de la BChE en humanos.

En 1978, a través de la realización de medidas bioquímicas de la actividad de la BChE en tejidos de cerebros sanos, de demencias seniles tipo Alzheimer y de desórdenes mentales sin anormalidades tipo Alzheimer, se observó que la actividad BChE estaba aumentada significativamente en el hipocampo y en el córtex temporal de los casos de Alzheimer comparada con los tejidos sanos, y que existía, además, una correlación positiva significativa entre la actividad BChE con el incremento de la edad (60-90 años) [Perry, 1978]. Años más tarde se demostró que las placas amiloideas y las redes neurofibrilares que se encuentran en los cerebros de los enfermos de Alzheimer presentaban, efectivamente, actividad AChE y BChE [Geula, 1989]. La presencia de las colinesterasas fue confirmada en todas las estructuras con degeneración

neurofibrilar, estando asociadas con la proteína amiloidea desde los estados muy tempranos de la enfermedad, cuando la estructura beta-plegada aún se está formando. De este modo, funciones atribuídas a la AChE y BChE, como sus actividades proteolíticas, pueden jugar un papel en la agregación o proceso de consolidación que tiene lugar en los primeros estadios de la formación de las placas difusas [Moran, 1993; Moran, 1994; Gomez-Ramos, 1997; Guillozet, 1997], es decir, la BChE podría participar en la transformación del beta amiloide de una forma inicialmente benigna a una forma maligna, asociada con la degeneración del tejido nervioso y demencia clínica.

Se sabe que la BChE juega un papel importante en la hidrólisis de algunas drogas, como el mivacurio (bloqueante neuromuscular), la cocaína (alcaloide estimulador del SNC) o la succinilcolina (bloqueador de la placa neuromuscular que se utiliza como miorrelajante); en base a la sensibilidad a esta última se han identificado la mayoría de los fenotipos conocidos de la BChE. La mayoría de éstos son fenotipos raros, siendo la variante K el más común de todos (22% de la población general es heterocigota y un 1,5% es homocigota) [La Du, 1990; Bartels, 1992].

A nivel genómico se han encontrado varias mutaciones que codifican para hasta 65 variantes distintas de BChE [Mikami, 2007; Mikami, 2008]. De todas éstas, se ha observado que en la variante K cambia el aminoácido 539 de alanina a treonina (GCA---ACA; Ala539---Thr) debido a una transición de guanina a adenina en el nucleótido 1615 (exón4) [La Du, 1990; Bartels, 1992]. La mutación que genera esta variante K provoca un 30% de reducción de la actividad BChE sérica [La Du, 1990], y podría estar asociada con una fosforilación reducida de tau en los pacientes con demencia tipo Alzheimer y de Cuerpos de Lewy [Ballard, 2005]. Además, también se ha observado un menor declive cognitivo en los pacientes que portan esta variable [Holmes, 2005].

Sin embargo, los estudios realizados sobre posibles asociaciones entre la EA y las variantes de la BChE son diversos y, en ocasiones, contradictorios:

a) Trabajos donde la variante K era más común en los casos de EA de inicio tardío que en los casos de inicio temprano [Panegyres, 1999]

b) Trabajos donde la variante K por sí sola ya constituye un factor de riesgo, pudiendo actúar sinergísticamente con APOE E4 [Raygani, 2004; Beyer, 2005; Lane, 2008] o no [Ghebremedhin, 2002].

c) Trabajos en los que, cuando se tiene en cuenta el estatus apoe, se ve que la frecuencia alélica aumenta en los individuos que portan el alelo E4, indicando una interacción entre BChE-K y apoe E4 [Lehmann, 1997; Wiebusch, 1999].

d) Trabajos donde la homocigosidad de la variante K está asociada con un aumento del riesgo de formación de redes neurofibrilares, pero no placas amiloideas [Ghebremedhin, 2007].

e) Y trabajos donde no han encontrado asociación alguna con la enfermedad [Cook, 2005; Rakonczay, 2005; Piccardi, 2007].

¿Cuál es la relación de la butirilcolinesterasa con la inflamación? Se sabe que la acetilcolina posee propiedades antiinflamatorias; por tanto, un aumento en la actividad butirilcolinesterásica incide indirectamente sobre la inflamación, puesto que se reducirán los niveles de acetilcolina y aumentarán los eventos inflamatorios debido a la ausencia del control de feed back negativo [Thomas, 2007].

El principal estudio de esta enzima se ha realizado desde el punto de vista del tratamiento, ya que las terapias con más éxito se han centrado, principalmente, en mejorar la transmisión colinérgica usando inhibidores de las colinesterasas [Tasker, 2005]. Muchos de estas drogas inhiben únicamente a la AChE (p.ej, donezepilo), aunque algunas inhiben a ambas enzimas (p.ej, rivastigmina), observándose como la doble inhibición de ambas colinesterasas tiene efectos neuroprotectores [Venneri, 2005].

3.2.- MIELOPEROXIDASA

La mieloperoxidasa (mpo) es una hemoproteína lisosomal localizada en los gránulos azurofílicos de los leucocitos polimorfonucleares (PMN o neutrófilos) y monocitos/macrófagos, formando, por tanto, parte del sistema de defensa de los PMN humanos a través de la generación de ácido hipoclórico y otras especies oxígeno-reactivas.

Se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde se cree que podría ayudar a proteger el ADN contra el daño resultante de los radícales oxígeno producidos durante la maduración y funcionamiento de las células mieloides [Murao, 1988].

A raíz del estudio del promotor del gen de esta proteína y, más concretamente, del polimorfismo -463 G/A, se han producido interesantes asociaciones de éste con la incidencia de enfermedades, tales como el cáncer de pulmón [Le Marchand, 2000; London, 1997], cáncer del tracto aerodigestivo [Cascorbi, 2000], la esclerosis múltiple [Nagra, 1997; Chataway, 1999] o la enfermedad de Alzheimer [Reynolds, 1999; Galeazzi, 1999].

Confirmada su presencia en las neuronas, se ha observado que la expresión de la mpo es mayor en los cerebros de los pacientes de Alzheimer, de tal manera que podría contribuir al estrés oxidativo implicado en la patogénesis de esta enfermedad [Green, 2004; Casado, 2008], condición que precede a la aparición de las placas amiloideas y las redes neurofibrilares [Zafrilla, 2006].

En 1999 se observó que la mpo colocalizaba con el beta amiloide de las placas seniles de las secciones de córtex cerebral de cerebros de enfermos de Alzheimer, con lo que se supuso que los componentes de las placas inducían la expresión de mpo en la microglia; además, el alelo E4 de la apolipoproteína E se correlacionaba con la deposición aumentada de mpo en las placas; por último, se vió también que la mayor expresión del genotipo homocigoto G/G en el promotor de la mpo se encontraba

sobrerrepresentado en la mujeres con enfermedad de Alzheimer y no en los hombres [Reynolds, 1999], donde el genotipo asociado era el A/A [Reynolds, 2000], lo que sugería que el genotipo de la mpo era un factor de riesgo género-específico.

En 2000 se vió que la oxidación de las tres isoformas recombinantes de la apoe es diferencial, de modo que apoe E4 es más susceptible que apoe E3, que a su vez es más susceptible que apoe E2. De esta manera, quizás la oxidación de la apoe pueda contribuir a un ineficiente reciclaje lipídico en el cerebro, particularmente si es apoe E4 o E3 [Jolivalt, 2000].

Aunque el mecanismo exacto de interacción de este polimorfismo con la enfermedad permanece desconocido, recientemente se ha visto que el alelo G está fuertemente expresado en los astrocitos y se ha sugerido que la expresión aberrante de la mpo conduciría a peroxidación fosfolipídica y disfunción neuronal [Maki, 2009].

Sin embargo, al igual que ocurre con los estudios sobre la butirilcolinesterasa, los realizados sobre la mpo y la enfermedad de Alzheimer son controvertidos, donde los resultados publicados en la literatura parecen depender de factores como el género, el polimorfismo APOE o la estructura genética de la población. Así, podemos encontrar trabajos donde se relacionan a esta proteína con la enfermedad en asociación con la apolipoproteína E [Reynolds, 2000], como trabajos donde no hay sinergia entre ambas proteínas, aunque sí de la mpo con la enfermedad [Crawford, 2001; Leininger-Muller, 2003; Zappia, 2004] o trabajos donde ni siquiera hay relación con la EA [Combarros, 2002a; Usui, 2006].

3.3.- COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD O SISTEMA HLA

La tarea de presentar antígenos asociados a células, para que sean reconocidos por los linfocitos T, corre a cargo de proteínas especializadas codificadas por genes presentes en un locus denominado *complejo principal de histocompatibilidad* (CPH o

MHC). En humanos, este complejo recibe el nombre de *sistema HLA*, del inglés "Human Leukocyte Antigen".

Es un locus altamente polimórfico (el más polimórfico del genoma), que regula la expresión de glicoproteínas de la superficie celular que a su vez participan en las interacciones celulares durante la respuesta inmune. De este modo, se puede decir que los genes del sistema HLA son los reguladores de la respuesta inmune por excelencia, puesto que permite al sistema inmune discriminar entre lo que es propio del individuo y lo que es extraño a él.

El MHC se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, donde los genes que lo componen están divididos en tres grandes grupos:

1.- **Clase I**: compuesta por los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C; las moléculas que expresan se encuentran distribuídas por todas las células del organismo, excepto los hematíes.

2.- **Clase II**: compuesta por los genes HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR; las moléculas que expresan se encuentran únicamente en linfocitos B, monocitos/macrófagos, precursores hematopoyéticos inmaduros y células dendríticas.

3.- **Clase III**: compuesta por los genes que codifican diversos componentes del sistema del complemento, tres citoquinas y algunas proteínas del choque térmico.

[Abbas, 2005; Roitt, 2003]

Es característica, en los cerebros de enfermos de Alzheimer, la presencia de proteínas inmuno-asociadas y células, como las de la microglia activada, que expresan altos niveles de estas moléculas.

Ya desde 1984 se observó que determinados alelos HLA parecían estar relacionados con la enfermedad de Alzheimer [Renvoize, 1984]. A partir de aquí, surgen muchos y diversos trabajos que relacionan la enfermedad de Alzheimer con el sistema HLA, sobre todo con el alelo HLA-A2, donde son varios los autores que observan como este alelo se asocia con la edad de aparición de la enfermedad, de tal modo que individuos que poseen este alelo son más jóvenes que los pacientes que no lo poseen [Payami,

1997; Small, 1986; Payami, 1991; Zareparsi, 2002b]; además, se habla de una posible interacción entre este alelo y el alelo E4 del gen de la apoe, de modo que ambos podrían tener efectos aditivos sobre la edad de aparición de la enfermedad [Payami, 1997; Combarros, 1998; Ballerini, 1999].

Pero no es el alelo HLA-A2 el único del sistema HLA vinculado a la enfermedad; en diversos estudios se habla de asociación con el alelo HLA-B5 [Chabrieres, 1998] y del HLA-DR, donde se ha visto que existen diferencias en la frecuencia de distribución de algunos alelos HLA-DR entre pacientes con enfermedad de aparición tardía y de aparición temprana. Además, en individuos que no portan el alelo E4 de la apoe, la influencia combinada de DR1, 2 y 3, genera un riesgo once veces mayor; o por el contrario, la influencia combinada del DR4 y 6 lleva a un descenso once veces más del riesgo [Curran, 1997]. También se habla de los alelos DRB1*03, asociado con un riesgo incrementado, y DRB1*09, asociado con una posible disminución del mismo [Neill, 1999].

3.4.- CITOQUINAS

Son pequeñas proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa, mediando muchas de sus funciones. Se sintetizan en respuesta a microorganismos y otros antígenos, de modo que diferentes citoquinas estimulan distintas respuestas de células que participan en la inmunidad y en la inflamación, generando cambios en la expresión de genes en las células diana y dando lugar a la expresión de nuevas funciones, y a veces, a la proliferación de las células diana o la dirección de un programa coordinado de expresión de genes pro y antiinflamatorios [Abbas, 2005; Roitt, 2003].

Existe una relación cercana entre los sistemas nervioso, inmune y endocrino, de tal modo que algunas citoquinas están presentes en cantidades elevadas en los cerebros de pacientes de Alzheimer, sugiriéndose que el daño celular y la neurodegeneración pueden ser debidos a reacciones neuroinmunes junto con mecanismos inflamatorios

[Bruunsgaard, 1999; Hoozemans, 2001b; Serrano-Sanchez, 2001; Apelt, 2001]. Así, la "ocasión" para que un individuo desarrolle EA podría estar afectada por un *perfil de susceptibilidad,* reflejado en la influencia combinada de heredar múltiples alelos de alto riesgo [McGeer, 2001], de tal manera que las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL -6, TNF-alfa, IFN-gamma), podrían estar sobreexpresadas y/o las antiinflamatorias (IL -10, TGF-beta1) todo lo contrario [Meda, 1999; Remarque, 2001].

3.4.1.- Interleuquina-1 (IL-1)

Existen 2 formas estructuralmente distintas de la IL-1: IL-1alfa, que es la forma acídica, e IL-1beta, que es la forma neutra. Ambas son proteínas de 17 kD codificadas por genes distintos localizados en el brazo largo del cromosoma 2. Estas proteínas, que son sintetizadas por una variedad de tipos celulares, incluyendo macrófagos activados, queratinocitos, linfocitos B estimulados y fibroblastos, son mediadores muy potentes en la inflamación e inmunidad.

En los astrocitos, la IL-1 induce la producción de IL-6, estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible, y promueve la producción del factor estimulante de colonia de macrófagos, productos que pueden, además, aumentar la actividad de la microglia [Bamberger, 2001].

La interleuquina 1 es, junto con la IL-6 y el TNF-alfa, la citoquina más estudiada en relación con la enfermedad de Alzheimer.

Experimentos *in vitro* y en ratas demostraron que la IL-1 puede regular la sobreexpresión y procesamiento de app [Buxbaum, 1992; Forloni, 1992; Sheng, 1996], asociándosele también con la hiperfosforilación de tau [Sheng, 2000], de tal manera que la implantación de IL-1 dentro del cerebro de ratas, aumenta los niveles de ARNm de tau y de tau hiperfosforilada.

Poco tiempo después se comprobó que la IL-1 estaba sobreexpresada en el cerebro de los pacientes de Alzheimer, sobreexpresión directamente relacionada con la formación y progresión de las placas amiloideas [Mrak, 2001], y con un ligero

incremento en plasma del ARNm IL-1 alfa y de la proteína [Dominici, 2002; Zuliani, 2007; Tan, 2007].

Se ha observado que algunos polimorfismos en los promotores y en los genes de estas interleuquinas están asociados con el riesgo de padecer EA [Grimaldi, 2000], así, la homocigosidad TT para la IL-1alfa en la posición -889 de la región promotora del gen, genera un riesgo entre tres y diez veces mayor para el desarrollo de EA, siendo un factor de riesgo de manera dosis-dependiente; mientras que la homocigosidad para el alelo 2 de la IL-1beta está asociada con un riesgo mayor de 10 veces [Combarros, 2002b; Nicoll, 2000; Mrak, 2001]. Además, los individuos homocigotos TT para la posición -889 del gen de la IL-1alfa presentaron un declive cognitivo más rápido [Murphy, 2001].

Sin embargo, y como viene siendo habitual en esta enfermedad, también existen trabajos donde no se encuentra asociación de este polimorfismo con la EA [Tsai, 2003; Wang, 2007; Déniz-Naranjo, 2008; Hu, 2009]

Lo mismo sucede con la IL-1beta, donde son dos los polimorfismos más estudiados con respecto a la enfermedad, concretamente el -511 C/T y el +3953 T/C, e igualmente encontramos trabajos que observan asociación con la enfermedad y trabajos que no [Grimaldi, 2000; Nicoll, 2000; Ehl, 2003; Ma, 2003; Rosenmann, 2004; Licastro, 2004; Seripa, 2005; Déniz-Naranjo, 2008; Wang, 2007].

3.4.2.- Interleuquina-6 (IL-6)

La IL-6 es una proteína de 185 aminoácidos que está producida por muchos tipos celulares diferentes. La principal fuente in vivo son los monocitos/macrófagos estimulados, fibroblastos y células endoteliales. Los monocitos/macrófagos expresan al menos cinco formas moleculares diferentes de la IL-6, que se diferencian por alteraciones postraduccionales, tales como la glicosilación y la fosforilación [Abbas, 2005; Roitt, 2003]. La IL-6 promueve astrogliosis, activa la microglia y estimula la

producción de proteínas de fase aguda, tales como la ACT y la A2M [Bamberger, 2001].

El gen de la IL-6 humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 7, donde presenta el polimorfismo -174 G/C en su región promotora. El alelo C, en esta posición, se ha asociado con una expresión génica reducida y con reducción de los niveles plasmáticos de la interleuquina [Capurso, 2004].

En los casos de EA, además de verse niveles plasmáticos de IL-6 más elevados [Baranowska-Bik, 2008; Bermejo, 2008], también se ha visto que está en las placas amiloideas en un ratio significativamente mayor del que se espera de una distribución al azar de IL-6 entre todo tipo de placas, por lo que se ha sugerido que la expresión de IL-6 puede preceder a cambios neuríticos y que un mecanismo inmunológico, en la enfermedad de Alzheimer, podría estar implicado tanto en la transformación de la placa difusa a placa compacta, como en el desarrollo de demencia [Hull, 1996]. Aunque hay trabajos que no encuentran evidencias de una asociación alélica entre el polimorfismo del promotor -174 G/C y una edad más temprana de inicio de la enfermedad o riesgo para la misma, el análisis de haplotipos mostró un fuerte desequilibrio de ligamiento entre este polimorfismo y otro que se encuentra en la región 3' flanqueante del gen de la IL-6, de tal modo que la interacción entre ambos polimorfismos modifican el riesgo de padecer la enfermedad [Bagli, 2000].

Por otra parte, algunos autores han encontrado que existe una asociación del alelo C del genotipo de la IL-6 con un retraso en la edad de inicio y un riesgo reducido de la enfermedad [Papassotiropoulos, 1999], y otros encuentran que la frecuencia del alelo G del promotor de la IL-6 es significativamente alta en los pacientes de EA [Shibata, 2002; Pola, 2002; Arosio, 2004], aunque hay trabajos donde se observa que el alelo G sólo tiene importancia en los enfermos de Alzheimer de inicio tardío portadores del alelo E4 de la apolipoproteína E [Koivisto, 2005].

También hay autores que no encuentran relación alguna con la enfermedad [van Oijen, 2006].

3.4.3.- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa)

Esta citoquina proinflamatoria es un mediador entre la inmunidad innata y la adaptativa, entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda. La principal fuente de liberación de TNF-alfa son los macrófagos activados, los cuales lo sintetizan en forma de una proteína de membrana que se expresa como un homotrímero. Esta forma de membrana se escinde y tres de estas cadenas polipeptídicas se polimerizan para formar la forma circulante del TNF [Abbas, 2005; Roitt, 2003].

El papel del TNF-alfa en la EA es controvertido [Bamberger, 2001], aunque representa la mayor parte de la actividad neurotóxica secretada por los monocitos/macrófagos y microglia [Combs, 2001].

Se ha observado que la presencia de TNF-alfa en suero es menor en los casos de EA medio/moderado comparado con los casos severos, sugiriéndose que el perfil sérico de citoquinas proinflamatorias parece discriminar entre los casos de EA medio/moderados y las formas vascular y mixta de demencia [Paganelli, 2002; Zuliani, 2007; Tan, 2007].

Uno de los polimorfismos que se encuentra en la región promotora del gen de el TNF-alfa es el -308 G/A. Con respecto a la EA, se ha observado que los portadores del alelo -308 A presentan una media de edad 3 años más joven que los no portadores de este alelo, lo que sugiere un efecto de este polimorfismo sobre la edad de inicio de la enfermedad. Esto representa una evidencia adicional de la importancia de las variaciones genéticas de los componentes proinflamatorios en el origen y la progresión de esta enfermedad [Alvarez, 2002].

Por otro lado, también se ha visto que tener el alelo T en el gen del TNF-alfa aumenta significativamente el riesgo de enfermedad de Alzheimer y de demencia vascular

asociada con la apolipoproteína E. Aunque se necesita hacer más estudios, estos hallazgos sugieren un papel en la terapia antiinflamatoria en estas enfermedades [McCusker, 2001].

3.4.4.- Interferón gamma (IFN-gamma)

El IFN-gamma, también llamado interferón inmunitario, es producido por los linfocitos T y natural killer (NK); su función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las respuestas celulares adaptativas [Abbas, 2005; Roitt, 2003].

Ya en 1994 se observó como la secreción de IFN-gamma era más elevada en los pacientes de EA de carácter severo [Huberman, 1994], además de influir en la deposición beta amiloidea, aumentándola a través de la expresión de BACE y la supresión de la clarificación del péptido beta amiloide [Yamamoto, 2007].

Recientemente se ha visto que cantidades limitadas de esta citoquina en el cerebro, incrementan la neurogénesis, posiblemente representando la función normal del sistema inmune en el control de la inflamación cerebral [Baron, 2008].

En 2003 se llevó a cabo uno de los primeros trabajos de estudio de asociación de polimorfismos del gen del IFN-gamma, en concreto el +874 T/A, no encontrándose asociación de éste con la EA [Scola, 2003], y al que han seguido otros con idénticos resultados [Galimberti, 2004].

3.4.5.- Interleuquina 10 (IL-10)

De manera general, esta citoquina es producida principalmente por los linfocitos Th2 y por los macrófagos, aunque también puede ser sintetizada por otras células, como las células B. La síntesis de IL-10 es estimulada por factores proinflamatorios como el TNF, los lipopolisacáridos y los inmunocomplejos, y provee un mecanismo regulador al tener efectos antiinflamatorios sobre los propios macrófagos [Abbas, 2005; Roitt, 2003].

IL-10 también es sintetizada en el SNC, donde limita los síntomas de diversas enfermedades como la esclerosis múltiple, meningitis y la enfermedad de Alzheimer. Su expresión está elevada durante el curso de la mayoría de las principales enfermedades del SNC, promoviendo la supervivencia de neuronas y células gliales en el cerebro por bloqueo de citoquinas proapoptóticas, y promoviendo la expresión de señales de supervivencia. También limita la inflamación en el cerebro, principalmente por tres rutas: 1) reduciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias, 2) suprimiendo la expresión de receptores de citoquinas, y 3) inhibiendo la activación de los receptores [Strle, 2001].

El gen de la IL-10 se encuentra en el cromosoma 1, donde presenta algunos polimorfismos en la región promotora; de éstos, -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A, se han asociado con la enfermedad de Alzheimer [Lio, 2003; Arosio, 2004; Ma, 2005; Bagnoli, 2007], aunque también encontramos trabajos donde no encuentran relación de éstos con la EA [Depboylu, 2003; Scassellati, 2004; Culpan, 2006; Bagnoli, 2007].

3.4.6.- Factor de Crecimiento Transformante-beta1 (TGF-beta1)

Se trata de una citoquina antiinflamatoria, mediadora de respuestas inmunes e inflamatorias, incluyendo el control de la diferenciación de células T y desactivación de macrófagos. Inhibe la proliferación y disminuye la síntesis de citoquinas de las células T y B, siendo importante en el desarrollo de la tolerancia [Abbas, 2005; Roitt, 2003].

Respecto a la EA, diversos trabajos han concluído que la presencia del TGF-beta conduce a un aumento de la expresión del gen APP en los astrocitos, que a su vez, da lugar a una mayor cantidad de app y posterior secreción de beta amiloide [Amara, 1999; Burton, 2002; Lesné, 2003], además de una clara contribución a los procesos inflamatorios presentes en los cerebros de los pacientes de EA [Grammas, 2002].

El gen del TGF-beta se encuentra en el cromosoma 6, y presenta diversos polimorfismos: +10T/C, +25 G/A, -800 G/A, -509 C/T, etc. Al igual que ha ocurrido con el resto de citoquinas presentadas hasta ahora, la relación de estos polimorfismos con

la EA ha sido confirmada por algunos autores [Arosio, 2007], y rechazada por otros [Luedecking, 2000; Araria-Goumidi, 2002; Hamaguchi, 2005; van Oijen, 2006; Rodríguez-Rodríguez, 2007]

3.4.7.- Influencia de los polimorfismos genéticos de citoquinas en el tratamiento.-

La relevancia de las citoquinas y los eventos inflamatorios en la neurodegeneración de la EA es de particular interés dado el número creciente de trabajos que muestran un efecto beneficioso de los antiinflamatorios en la progresión de la EA [Breitner, 1996].

Se ha llegado a apreciar que los mecanismos antiinflamatorios en el cerebro son tan importantes como la producción de beta amiloide en la ruta patogénica de la enfermedad de Alzheimer, y que estos mecanismos quizás sean prometedores para la obtención de dianas para nuevas drogas. Esta evidencia proviene de hallazgos tanto epidemiológicos como experimentales. Nilsson et al revisan la literatura en el contexto de un modelo para la ruta patogénica del Alzheimer, en el que la expresión de proteínas asociadas al amiloide, dirigidas por citoquinas inflamatorias, juegan un papel esencial en la aceleración del progreso de la enfermedad [Nilsson, 1998].

Otros estudios epidemiológicos indican que el tratamiento antiinflamatorio reduce el riesgo y la incidencia de la enfermedad, además de retrasar el desarrollo de la misma [Hoozemans, 2001a; Bamberger, 2001].

4.- OTROS FACTORES ASOCIADOS.

Como ya se ha mencionado, aproximadamente el 90-95% de los casos de enfermedad de Alzheimer, es del tipo esporádico-tardío, donde el único gen relacionado es el que codifica para la apolipoproteína E. Sin embargo, la falta de una causa genética clara en este tipo de EA, ha dado lugar a la búsqueda de otros posibles factores no genéticos que también se asocien a la enfermedad.

4.1.- TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO

El traumatismo craneoencefálico se ha encontrado con frecuencia en las historias de los pacientes de EA, más que en los controles, en muchos estudios [Gedye, 1989; Graves, 1990; Mortimer, 1991; O'Meara, 1997; Guo, 2000], aunque otros no han sido capaces de encontrar esta asociación [Chandra, 1989]

4.2.- METALES

Aunque no ha sido definitivamente demostrado el papel causal en la EA de algunos metales como el aluminio, cobre, zinc o hierro, las evidencias epidemiológicas sugieren que niveles elevados de éstos, en el cerebro, podrían estar relacionadas con el desarrollo o la progresión de la enfermedad de Alzheimer [González, 1999; White, 2001; Matsuzaki, 2004; Lehmann, 2006; Squitti, 2009].

Estos metales juegan un papel catalítico en la generación de radicales libres, conocidos por su toxicidad e inducción del daño celular, tanto a nivel de ADN como a nivel proteico. Se han observado en altas concentraciones de cobre, hierro y zinc dentro de las placas amiloideas y se cree que puedan iniciar la agregación del péptido amiloide bajo condiciones acídicas. El papel del aluminio, sin embargo, es más

controvertido: algunos estudios muestran relación de éste con la EA, mientras que otros no encuentran asociación alguna [Revisado en Thomas, 2007].

4.3.- AGENTES PATÓGENOS

Debido a su naturaleza ubicua y neurótropa, y al hecho de estar presente en las mismas áreas cerebrales afectadas en la enfermedad de Alzheimer [Jamieson, 1992], el virus Herpes Simplex-1 (HSV-1) se ha convertido en el principal patógeno investigado [Pyles, 2001], aunque también se ha estudiado el papel de otros posibles patógenos como predisponentes para la EA, pero con escasos resultados [Taylor, 1986; Lin, 1997].

Ya en 1982 se sugería el posible papel del HSV-1 en la enfermedad de Alzheimer [Ball, 1982], y desde entonces, son numerosos los trabajos que se han llevado a cabo para evidenciar la influencia de este virus en la EA. Los primeros estudios realizados fallaron en demostrar la presencia del HSV-1 en los cerebros de los pacientes de Alzheimer [Taylor, 1984], posiblemente debido a la falta de las técnicas suficientemente sensibles y adecuadas para este cometido; sin embargo, el desarrollo de técnicas más sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dieron lugar a otros estudios donde sí se observaba una fuerte correlación de este virus con la EA, incluído el tipo familiar [Cheon, 2001; Mori, 2004].

En 1988 se observó que la glicoproteína B del HSV-1 poseía una región entre los residuos 22-44 (gB22-44), que se unía a los complejos apoe/LDL [Huemer, 1988] y, posteriormente, que los individuos con recurrencias frecuentes del herpes labial eran mayoritariamente portadores del alelo E4 de la apolipoproteína E [Lin, 1995]. Esto dio lugar al estudio de la relación entre las isoformas de esta apolipoproteína, el HSV-1 y la EA, con trabajos donde se observa una clara relación entre estas dos variables

entre sí y/o con la enfermedad [Lin, 1996; Itzhaki, 1997; Burgos, 2007; Letenneur, 2008].

Así, se ha teorizado que la frecuente reactivación en el SNC del HSV-1 podría conducir a un mayor daño y pérdida neuronal, predisponiendo de esta manera al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Si además está presente el alelo E4 de la apolipoproteína E, éste podría favorecer la reactivación del virus [Itzhaki, 1997]. También puede ocurrir que la actividad de la apoe E4, comparada con la de E2 o la de E3, conlleve a una menor capacidad de ésta para reparar el daño neuronal, lo que favorecería la reactivación del herpes virus. Sí se ha observado, en modelos murinos, que el perfil de apoe afecta a los niveles de virus latente, donde la isoforma E4 está asociada con cantidades de hasta 10 veces más ADN viral con respecto a la isoforma E3 [Burgos, 2006].

Junto con la relación entre el HSV-1 y la apolipoproteína E, se observó que existía una región de homología entre el beta amiloide y la glicoproteína B del HSV-1; además, la región comprendida entre los residuos 22-44 de esta proteína, forma fibrillas similares a las que forma el beta amiloide, sugieriéndose así que este péptido podría estar iniciando la formación fibrilar que aparece en las placas seniles [Cribbs, 2000].

Estudios en cultivos celulares neuronales y gliales han revelado que la infección con HSV-1, además de intervenir en la síntesis y procesamiento de app [Shipley, 2005], conduce a un incremento en los niveles intracelulares de beta amiloide, tanto $A\beta_{40}$ como $A\beta_{42}$, y a una mayor deposición amiloidea $A\beta_{42}$ en modelos murinos [Wozniak, 2007]. Es más, recientes trabajos demuestran la localización de ADN viral dentro de un 90% de las placas amiloideas con un 72% de éste asociado con las placas, mientras que en los individuos mayores sin demencia tipo Alzheimer, aunque hay un 80% de placas con ADN del HSV-1, sólo un 24% de este ADN está asociado a las mismas [Wozniak, 2009].

4.4.- ESTRÓGENOS

Se ha observado que las mujeres postmenopausicas tienen un mayor riesgo de desarrollar EA que los hombres, sugiriéndose que quizás esto sea debido a la disminución de los niveles estrogénicos que siguen a la menopausa. Los efectos protectores de los estrógenos podrían incluír la promoción de la actividad colinérgica, la reducción de la pérdida neuronal y la estimulación del crecimiento axonal. Así pues, el tratamiento estrogénico, con estradiol, en mujeres postmenopausicas con EA podría conducir a una mejora de éstas, tal y como se ha observado [Asthana, 2001].

Sin embargo, este papel protector de los estrógenos y, por tanto, la terapia estrogénica, queda en entredicho con trabajos donde ocurre lo contrario, es decir, determinadas terapias, como la del uso de estrógeno más progestina, parece que incrementan el riesgo de probable demencia en las mujeres postmenopausicas mayores de 65 años, y que además, no previenen del daño cognitivo medio en éstas [Shumaker, 2003; Rapp, 2003].

4.5.- SÍNDROME METABÓLICO

También relacionado con la EA, este síndrome constituye un conjunto de factores de riesgo cardiovascular, identificados además como factores de riesgo para la EA. Se caracteriza por anormalidades en el metabolismo de la insulina, la glucosa y las lipoproteínas, asociado a hipertensión arterial y obesidad, siendo esta última una condición que se vuelve muy común en los países occidentalizados.

De este modo, se ha visto que la restricción calórica y el ejercicio, y dietas con bajo contenido en grasas y alta en antioxidantes y trazas minerales, se han asociado con un descenso en el riesgo de padecer EA [Martins, 2006; Vilalta-Franch, 2008].

4.6.- MICRONUTRIENTES

Muchos estudios de caso-control han demostrado que los pacientes de EA eran deficientes en ciertos micronutrientes, como el ácido fólico o la vitamina B12, mientras que tenían niveles elevados de homocisteína [Revisado en Mattson, 2002]; el desequilibrio de estos factores está asociado con la formación incrementada de micronúcleos y la alteración de la metilación, lo cual podría modificar la expresión génica, por ejemplo, a través de aneuploidía y rotura del cromosoma 1, que porta el gen PSEN2, y aumento de la expresión de los genes PSEN1 y BACE.

Además, en el caso concreto del ácido fólico, se ha visto que su deficiencia incrementa la trisomía de los cromosomas 17 y 21, portadores de los genes TAU y APP, respectivamente; respecto a la homocisteína, se ha observado una fuerte correlación entre niveles altos de ésta y reducción del volumen hipocampal y cortical [Revisado en Thomas, 2007].

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer representa entre el 50% y el 80% de las demencias que se dan en las personas mayores de 60 años. El impacto de esta enfermedad sobre los pacientes, cuidadores y personal sanitario, es inmenso, dando lugar a una tremenda carga económica y física de los recursos sanitarios. En España, esta enfermedad afecta a un 0,6% de la población entre 65-74 años, a un 7,9% de la población entre 75-84 años y a un 16,2% de la población mayor de 85 años, e implica un coste anual de unos 259 millones de euros [García-García, 2001].

Como ya se ha explicado en la Introducción, la EA es una enfermedad con un marcado componente genético y una expresión heterogénea, donde hasta ahora, sólo cuatro genes han sido claramente relacionados: APP, PSEN1, PSEN2 (forma familiar y temprana) y APOE (forma esporádica y tardía). Sin embargo, estos cuatro genes no explican todos los casos de Alzheimer, por lo que otros factores han de estar interactuando con éstos para que la enfermedad tenga lugar.

Han sido muchos los genes propuestos y estudiados, sobre todo, aquellos que codifican para proteínas halladas en las placas amiloideas extraneuronales. Y toda la información surgida a raíz de la gran cantidad de trabajos que se han llevado a cabo, ha dado lugar a controversia y discrepancia en los resultados, posiblemente debida a diferencias poblacionales, metodologías y elección de los grupos a estudio.

El objetivo del presente trabajo consiste en caracterizar, a través del estudio de los genes APOE, BChE, MPO, HLA, IL-1alfa, IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, IL-10, IFN-gamma y TGF-beta, entre pacientes y controles, un perfil genético que nos permita ayudar en el diagnóstico de esta enfermedad, o caracterizar aquellos individuos que presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de la misma.

Pretendemos alcanzar este objetivo a través del estudio de las frecuencias de genotipos, de alelos o de caracteres génicos, en relación al diagnóstico, a la edad de diagnóstico de la enfermedad y al género, de nuestra serie de pacientes y controles.

SUJETOS Y MÉTODOS

SUJETOS

1.- DISEÑO

Para el estudio de factor de susceptibilidad, el diseño que se ha utilizado es el del tipo caso-control.

2.- PACIENTES

Se han estudiado 282 pacientes consecutivos diagnosticados de Probable Enfermedad de Alzheimer por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr.Negrín, basándose en los criterios NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association workgroup) (ANEXO I).

Nuestro estudio se ha centrado en la EA de tipo esporádico-tardío, es decir, pacientes sin herencia de EA y mayores de 60 años, puesto que éste es el tipo de EA que presenta una mayor incidencia.

3.- CONTROLES

Han participado 312 individuos, también mayores de 60 años, y sin déficit cognitivo, medido por el test de CAMGOG [sección del test CAMDEX (Cambridge Mental Disorders of the Elderly Examination)].

A todos los individuos se les ha solicitado su consentimiento informado para la participación en el estudio. En el caso de los pacientes sin capacidad para decidir, se solicitó a los familiares que cuidaban de ellos.

Además, los distintos proyectos de investigación que han dado lugar a este trabajo, fueron aprobados por el Comité Etico del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

4.- VARIABLES ESTUDIADAS

4.1.- Edad al diagnóstico

4.2.- Género de los sujetos a estudio

4.3.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes:

- Apolipoproteína E (APOE E: exón 4)
- Butirilcolinesterasa (BChE: variantes W-K; exón 4: +1615 G/A)
- Mieloperoxidasa (MPO: -463 G/G)
- Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa: -308 G/A)
- Factor Transformador del Crecimiento-beta1 (TGF-beta1: +10 T/C y +25 G/A)
- Interferon-gamma (IFN-gamma: +874 T/A)
- Interleuquina-10 (IL-10: -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A)
- Interleuquina-1alfa (IL-1alfa: -889 C/T)
- Interleuquina-1beta (IL-1beta: +3953 T/C y -511 T/C)
- Interleuquina-6 (IL-6: -174 G/C)
- Antígeno Leucocitario Humano A (HLA-A2)
- Antígeno Leucocitario Humano DR (HLA-DR2)

5.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación que presentó la realización de este estudio fue el reclutamiento de los controles adecuados, debido a que, en nuestra experiencia, el grado de participación de personas sin deterioro cognitivo en las edades requeridas, es escaso. Y así ocurrió en el caso especial de las mujeres, puesto que la mayoría de nuestras pacientes eran mayores de 75 años (120 de éstas), mientras que mujeres control de esta edad o mayor sólo hubieron 27, bien porque no deseaban participar en el estudio o bien porque no superaban el test de medición de grado cognitivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- EXTRACCIÓN DE ADN: MÉTODO DEL FENOL-CLOROFORMO

Para poder analizar los genes ya mencionados, el primer paso consistió en la extracción del ADN del núcleo de las células blancas que circulan por el torrente sanguíneo. Para esto, a cada sujeto del estudio se le extrajeron unos 10 ml de sangre; a partir de aquí, se realizó primero el aislamiento de las células blancas y luego la extracción del ADN de las mismas, siguiendo el protocolo publicado por Blin et al [Blin, 1976], con algunas modificaciones.

1.1.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS BLANCAS

La sangre se recolectó en un tubo de EDTA de 10ml y se pasó a un tubo Falcon de 50 ml, completando con solución de lisis de células rojas (SLR) hasta 50ml. Durante 10 minutos se centrifugó a 600 g, eliminándose posteriormente el sobrenadante y dejando un volumen de unos 10ml; este procedimiento se repitió dos veces más y finalmente se desechó todo el sobrenadante, quedando un pellet en el fondo del tubo, formado por las células blancas, el cual se congeló hasta el momento de la extracción del ADN.

1.2.- EXTRACCIÓN DE ADN

Los pellets se descongelaron y resuspendieron en 4 ml de solución compuesta por buffer de lisis de células blancas (WCLB) más proteinasa K (40μl) y laurilsulfato-sódico (SDS) (80μl), dejándose en agitación a 42ºC toda la noche.

Al día siguiente se añadían 4ml de fenol-cloroformo-isoamílico (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A) y agitaban durante 10 minutos, centrifugándose posteriormente 10 minutos a 1700 g. Se extrajo el sobrenadante, que se añadió a un nuevo tubo de 15ml de polipropileno, repitiéndose el mismo proceso de agitación y centrifugado.

De nuevo se extrajo el sobrenadante, pasándose a otro tubo de polipropileno de 15ml, y se le añadieron 4ml de cloroformo-isoamílico, dejándose en agitación 7 minutos con una centrifugación posterior de 5 minutos a 1700 g. Este proceso se repitió una vez más con el sobrenadante.

De esta manera, conseguimos eliminar la mayor parte de la fracción proteica de las células.

Al sobrenadante final se le añadieron 200μl de NaCl 3M autoclavado, precipitándose posteriormente el ADN con 4ml de isopropanol hasta que se formó una "medusa". Esta medusa se pasó a criotubos de 4ml para ser lavada, durante 30 minutos, con etanol al 70% frío.

Por último se eliminaron los restos de etanol, dejándose secar durante toda la noche y resuspendiéndose luego en 200μl ó 500μl de Tris-HCl / EDTA (TE) 1/0,1, según el tamaño de la medusa de ADN.

Una vez que la medusa quedaba bien resuspendida, se medía la concentración haciendo diluciones 1/100 (p.ej.: 198 μl de agua bidestilada + 2 μl de muestra), y se ajustaba a concentración de 100 μg/ml; para esto se añadía TE 1/0,1, cuyo volumen calculamos de la siguiente manera:

CÁLCULO DEL VOLUMEN TOTAL: [Concentración x Volumen Inicial] / 100

CÁLCULO DEL VOLUMEN A AÑADIR: Vol. total – Vol. Inicial

Finalmente, se comprobaba el estado del ADN en un gel de agarosa al 2% y se sacaba una foto para documentar la integridad del ADN.

REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN POR FENOL-CLOROFORMO

- **Solución de Lisis de Células Rojas (SLR)**

	Concentración Final	**2 litros**	**1 litro**
Tris base *(SIGMA. Ref 93362-250G)*	10 mM	24,2 gr.	12,1 gr.
MgCl *(SIGMA. Ref M8266-100G)*	50 mM	20,33 gr.	10,16 gr.
NaCl *(FLUKA. Ref 71376-1KG)*	100 mM	11,69 gr.	5,84 gr.

- **Solución Proteinasa K (PK)**

Disolver 20 mg/ml en 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)

	Stock	**Vol. a coger**
Proteinasa K *(SIGMA Ref. P2308-100MG)*	100 mg	Todo
Tris HCl pH 7.6 10 mM *(SIGMA Ref. 93363-500G)*	2 M	25 μl

Completar con agua destilada *(BRAUN Ref.387875)* hasta 5 ml

- **Solución de Lisis de Células Blancas (WCLB)**

	Stock	**Vol. a coger**
Tris HCl pH 7.6 10 mM	1 M pH 7.6	5 ml
EDTA pH 8.0 10 mM *(SIGMA Ref. 5513-100G)*	0,5 M pH 8.0	10 ml
NaCl 50 mM	3 M	8,3 ml

Completar con agua destilada hasta un volumen de 500 ml

- **Fenol** *(SIGMA Ref. P-1037)*

- **Solución de cloroformo-isoamílico**

	Vf = 500 ml	**Vf = 1 litro**
CLOROFORMO *(Merck Ref. 102445-1000)*	480 ml	960 ml
ISOAMÍLICO *(FLUKA Ref. 59304)*	20 ml	40 ml

- **Tris-HCl /EDTA (TE) 1 / 0.1**

	Concentración Final	**Stock**	**Volumen**
Tris-HCl pH 7.6	1 mM	2 M	50 µl
EDTA	1 mM	0,5 M	20 µl

Completar con agua destilada hasta un volumen de 100 ml

- **Laurilsulfato-sódico (SDS) 10%** *(SIGMA Ref L4390-100G)*

Pesar 50 gramos de laurilsulfato sódico y añadir agua destilada hasta 500 ml.

(Preparar con mascarilla y guantes)

- **NaCl 3 M**

Pesar 175,3 gramos de NaCl y añadir agua destilada hasta 1000 ml. Autoclavar.

- **Tris-HCl 2M pH 7.6**

Pesar 24,22g de Tris-HCl y disolver en agua destilada; ajustar pH y completar hasta un volumen final de 100 ml. Autoclavar.

- **Tris-HCl 1M pH 7.6**

Disolver 15,67 gramos de Tris-HCl en 100 ml de agua; ajustar a pH 7.6.

- **Tris-base 1M pH 7.0**

Disolver 12,1 gramos de Trizma Base (2-amino-2(hidroximetil)-propano-1,3-diol) en 100 ml de agua y ajustar a pH 7.0

2.- AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES A ESTUDIO: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para poder estudiar los genes propuestos y sus polimorfismos, era necesario amplificar la señal de éstos, es decir, obtener una gran número de copias que nos permitiera dicho estudio. El método por excelencia es el de la reacción en cadena de la polimerasa.

Conocida por sus siglas en inglés como PCR (*Polimerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Mullis et al [Mullis, 1986], cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo, en teoría, de una única copia de ese fragmento.

Se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, usando ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de ADN recién formadas tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

La técnica de la PCR necesita: nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y dos *cebadores o primers*, (secuencias cortas de nucleótidos que inician la reacción). En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (95ºC) de la muestra la más habitual. A continuación, el primer se unirá a su complementario en el ADN (anillamiento o hibridación), siendo necesario que la temperatura descienda (por ejemplo, 55ºC). Por último, se aumenta la temperatura hasta 72ºC, temperatura a la cual la polimerasa puede actuar (extensión), produciéndose una copia del fragmento que deseábamos amplificar. Este ciclo (desnaturalización-anillamiento-extensión) se repetirá un número de veces dependiendo de la cantidad de fragmentos amplificados que deseemos.

Algunos de los tipos de PCR utilizadas en el presente trabajo son:

PCR-RFLP. En algunos casos, los productos amplificados poseen secuencias que son reconocidas y cortadas por ciertas enzimas, denominadas endonucleasas de restricción; de esta manera, si dos regiones amplificadas por PCR presentan variaciones en la secuencia nucleotídica en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, se generarán distintos patrones de fragmentos.

Nested-PCR (*PCR anidada*). Consiste en realizar dos reacciones de PCR consecutivas. Al finalizar la primera, una alícuota de la misma es sometida nuevamente al proceso de multiplicación tras haber colocado dos primers internos, que amplificaran una región contenida dentro de la región amplificada en primer lugar.

PCR-SSO. El fundamento de esta técnica es una hibridación reversa post-PCR. El soporte de la hibridación consiste en tiras de nitrocelulosa con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas en líneas paralelas. Estas sondas son complementarias a la secuencia de mutaciones conocidas. La amplificación de la muestra se realiza con primers biotinilados que permitirán el revelado de la reacción. Tras la hibridación se añade un conjugado compuesto por estreptavidina-fosfatasa alcalina, que se unirá a cualquier híbrido formado sobre la tira. Al añadir el sustrato de la enzima se producirá un precipitado marrón-púrpura en las posiciones correspondientes.

PCR-SSP. Bajo condiciones de PCR estrictamente controladas, los primers que emparejan perfectamente dan lugar a amplificación de la secuencia que interesa (resultado positivo), mientras que si existe algún emparejamiento erróneo, o mismatch, no habrá amplificación (resultado negativo).

La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de fragmentos específicos de ADN amplificados. También se incluye una pareja de primers que sirven de control interno para controlar que la PCR ha tenido lugar y no se ha visto afectada por cualquier otro factor (fig. SM1).

2.1.- ESTUDIO DE LOS GENES *APOE*, *BCH*, *MPO* E *IL-1* (PCR-RFLP Y NESTED-PCR)

El estudio de los polimorfismos de los genes de la apolipoproteína E, butirilcolinesterasa, mieloperoxidasa, e interleuquinas-1alfa y -1beta, siguieron todos el mismo procedimiento, esto es, una PCR-RFLP en la que primero se amplificó la zona génica a estudiar por medio de PCR, seguida de un corte enzimático con la enzima de restricción correspondiente.

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 50μl, con ADN a una concentración de 100ng/μl, $MgCl_2$, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), primers y enzima polimerasa en su propio tampón.

Las distintas PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600 siguiendo cada una su propio protocolo de amplificación.

Una vez terminada la reacción de amplificación, en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X y con bromuro de etidio, se comprobó si la misma había tenido lugar con éxito, sometiendo las muestras a electroforesis de 200 V durante unos 40-60 minutos; para ésto, se tomaron 3μl de cada muestra y se mezclaron con 7μl de tampón de carga, en un volumen final de 10μl.

Una vez comprobado que existía producto de amplificación, se tomó una cantidad de éste y se sometió a la acción de una enzima de restricción, generándose un determinado patrón de bandas que nos daba el tipaje deseado. Las electroforesis posteriores tuvieron lugar en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje según las bandas a identificar.

2.1.1.- APOE

El genotipaje de los polimorfismos exónicos del gen APOE se realizó de acuerdo al método descrito por Hixson et al [Hixson, 1990], con ligeras modificaciones: Se amplificó el ADN con los cebadores 5'-ACA GAA TCC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' y 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3', generándose una banda de 244 pares de bases. Además del buffer descrito por el fabricante de la taq polimerasa (Perkin Elmer), cada reacción de amplificación contenía 1μM de cada primer, 200 μM dNTP, 1,5mM $MgCl_2$, 10% DMSO, 1,25 u taq polimerasa, y 200-400ng ADN en un volumen final de 50μl.

Cada mezcla de reacción se calentó a 95ºC durante 5 minutos, siendo sometida a 30 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (95ºC, 30 segundos), anillamiento, (60ºC, 20 segundos), y extensión, (72ºC, 20 segundos), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 10 minutos.

CORTE CON ENDONUCLEASA

Una vez comprobado la presencia de producto amplificado, se añadieron 5 unidades de la enzima de restricción HhaI (*New England Biolabs, Ref. R0139L*) directamente a cada uno de éstos. Esta enzima reconoce la secuencia:

5' G C G ↓C 3'

3' C↑ G C G 5'

La nueva reacción se incubó a 37ºC durante 3 horas y, por último, se realizó una electroforesis del producto de corte en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 20%.

Los distintos patrones de bandas del genotipo resultante podían ser:

E4/4: 72 pb + 48 pb + 35 pb

E4/2: 91 pb + 83 pb + 72 pb + 48 pb + 35 pb

E3/4: 91 pb + 72 pb + 48 pb + 35 pb

E3/3: 91 pb + 48 pb + 35 pb

E3/2: 91 pb + 83 pb + 48 pb + 35 pb.

E2/2: 91 pb + 83 pb

2.1.2.- BUTIRILCOLINESTERASA

Aunque las variantes "salvaje" (W) y K del gen de la butirilcolinesterasa son las más comunes, existen otras variantes; así pues, para comprobar que las variantes que encontrabamos eran éstas (W y/o K) , a cada individuo de este estudio se le realizó un doble tipaje, es decir dos PCR-RFLP: una para el tipaje de la variante K y otro para el tipaje de la variante W, de acuerdo al método descrito por Altamirano et al, con ligeras modificaciones [Altamirano, 2000]. Los primers utilizados fueron los siguientes:

- Variante K : 5' TTA ATA CAA CTT ATT CCA TAT TTT ACA GGA AAT ATT GAT GTA 3' y 5' AAG CTC CTG ATA TTT TTG CCT TGA TCT AAA GGA AAA 3, que generan una banda de 217 pb.
- Variante salvaje (W): 5' TGT ACT GTG TAG TTA GAG AAA ATG GCT TTT GT 3' y 5' ATG TTA TTG TTC CAG CGA TGG AAT CCT GCT TTC CAC GCC CAT TCG G 3', que generan una banda de 169 pb.

Además del buffer descrito por el fabricante de la taq polimerasa (Ecogen), cada reacción de amplificación contenía 0,5μM de cada primer, 200μM dNTP, 3mM $MgCl_2$, 2,5u taq polimerasa y 300-500ng ADN en un volumen final de 50μl.

Cada mezcla de reacción se calentó a 95ºC durante 5 minutos, siendo sometida a 30 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (95ºC, 1minuto), anillamiento,

(60ºC, 1 minuto), y extensión, (72ºC, 1 minuto), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 5 minutos.

Los genotipos BChE-K y BChE-W se identificaron tras digestión con Mae III y Bgl I, respectivamente, y resolución por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 13%; los fragmentos individuales de ADN se visualizaron y fotografiaron tras su tinción con bromuro de etidio.

CORTES CON ENDONUCLEASAS

A) Variante K

Utilizamos la enzima Mae III (*Roche Ref. 822248*), que reconoce la secuencia:

5' ↓G T N A C 3'

3' C A N T G↑ 5'

Incubamos a 55º durante 3 horas, con las siguientes condiciones de corte de restricción: 12,5μl del buffer descrito para Mae III, 0,08u de Mae III y 10μl de producto amplificado en un volumen final de 25μl. Los productos generados eran:

Corte con MaeIII (alelo A = variante K): 178 pb + 39 pb

No corte con MaeIII: 217 pb

B) Variante salvaje (W)

Utilizamos la enzima Bgl I (*New England Biolabs Ref. R0143L*), que reconoce la secuencia:

5´ G C C N N N N↓N G G C 3´

3´ C G G N↑N N N N C C G 5´

Incubamos a 37ºC durante 3 horas, con las siguientes condiciones: 2μl del buffer descrito para Bgl I, 10u de Bgl I y 10μl de producto amplificado en un volumen final de 25μl. Los productos generados eran:

Corte con Bgl I (alelo A = variante W): 119 pb + 50 pb

No corte con Bgl I: 169 pb

2.1.3.- MIELOPEROXIDASA

El genotipaje del polimorfismo -463 G/A del promotor del gen MPO se realizó de acuerdo al método descrito por Reynolds et al [Reynolds,1999; Reynolds, 2000], con ligeras modificaciones: Se amplificó el ADN con los cebadores 5'- CGG TAT AGG CAC ACA ATG GTG AG 3' y 5' GCA ATG GTT CAA GCG ATT CTT C -3', generándose una banda de 350 pb. Además del buffer descrito por el fabricante de la taq polimerasa (Ecogen), cada reacción de amplificación contenía 0,25μM de cada primer, 200μM dNTP, 0,75mM MgCl2, 10% DMSO, 2,5u taq polimerasa y 500ng ADN en un volumen final de 50μl.

Cada mezcla de reacción se calentó a 95ºC durante 5 minutos, siendo sometida a 30 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (95ºC, 1 min), anillamiento (60ºC, 1 min), y extensión (72ºC, 2 min).

CORTE CON ENDONUCLEASA

El polimorfismo de G a A en la posición –463 en la región promotora del gen de la mpo destruye (alelo A) o crea (alelo G) un sitio de restricción Aci I dentro de un fragmento de amplificación de 350 pb. Existen tres posibles genotipos definidos por tres diseños de bandeados distintos cuando realizamos una PCR-RFLP: A/A, G/A, G/G.

Una vez comprobado la presencia de producto amplificado, se añadió 1 unidad de la enzima de restricción Aci I (*New England Biolabs, Ref. R0551L*) directamente a 10 μl de producto amplificado e incubamos a 37ºC durante 3 horas. Esta enzima que reconoce la secuencia:

5' C↓C G C 3'

3' G G C↑G 5'

El distinto patrón de bandas que se puede generar es:

Genotipo A/A (menor actividad promotora): 289 pb + 61 pb

Genotipo A/G : 289 pb + 169 pb + 120 pb + 61 pb

Genotipo G/G (mayor actividad promotora) : 169 pb + 120 pb + 61 pb

2.1.4.- INTERLEUQUINA-1

El genotipaje de los polimorfismos de los genes de estas interleuquinas se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Kanemoto et al [Kanemoto, 2000] y Foster et al [Foster, 2000], con ligeras modificaciones; la amplificación del ADN con los primers para IL-1beta (- 511C/T) 5'-TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC-3' y 5'-GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT-3', generan una banda de 299 pb; para IL-1beta (+3953C/T): 5' GTT GTC ATC AGA CTT TGA CC 3' y 5' TTC AGT TCA TAT GGA CCA GA 3', generaron una banda de 249 pb; y para IL-1alfa (-889 C/T), los primers fueron 5'-GGG GGC TTC ACT ATG TTG CCC ACA CTG GAC TAA-3' y 5'-GAA GGC ATG GAT TTT TAC ATA TGA CCT TCC ATG-3', que generan una banda de 304 pb.

Además del buffer descrito por el fabricante de la Taq polimerasa (Perkin Elmer), cada reacción de amplificación contenía 0,5μM de cada primer, 100μM dNTP, 1,5mM $MgCl_2$, 1,25u taq polimerasa, y 200ng ADN en un volumen final de 50μl.

Cada mezcla de reacción se calentó a 95ºC durante 5 minutos, siendo sometida a 35 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (94ºC, 45 segundos), anillamiento, (54ºC, 50 segundos), y extensión, (72ºC, 1minuto), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 5 minutos.

CORTES CON ENDONUCLEASAS

Los genotipos IL-1beta (- 511C/T) e IL-1beta (C+3953T) se identificaron tras digestión con las enzimas Ava I y Taq I, respectivamente, resolviéndose por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20%; mientras que los genotipos IL-1alfa (-889 C/T) se identificaron tras digestión con Nco I y resolución por electroforesis también en un gel de poliacrilamida al 20%; los fragmentos individuales de ADN se visualizaron y fotografiaron tras su tinción con bromuro de etidio.

CORTE CON ENDONUCLEASA PARA ESTUDIO IL-1beta: PROMOTOR (C- 511T)

Utilizamos la enzima de restricción Ava I (*New England Biolabs Ref. R0152L*), que reconoce la secuencia:

5' C ↓Y C G R G 3'

3' G R G C Y ↑C 5'

Las condiciones de corte son las siguientes, durante 3 horas a 37ºC: 2 μl del buffer descrito para Ava I, 10u de Ava I y 8μl de producto amplificado en un volumen final de 25μl. Los productos generados fueron:

Corte con Ava I (alelo C):190 pb + 114 pb

No corte con Ava I (alelo T): 304 pb

CORTE CON ENDONUCLEASA PARA ESTUDIO IL-1beta: EXON V (C+3953T)

Utilizamos la enzima de restricción Taq I (*New England Biolabs Ref.149L*), que corta la diana

5' T ↓C G A 3'

3' A G C↑ T 5'

Las condiciones de corte son las siguientes, durante 3 horas a 65ºC: 2μl del buffer descrito para Taq I, 2μl de BSA (albúmina de suero bovino), 10u de Taq I y 10μl de producto amplificado en un volumen final de 25μl.

Los productos generados fueron:

Corte con Taq I (alelo C): 135 pb + 114 pb

No corte con Taq I (alelo T): 249 pb

CORTE CON ENDONUCLEASA PARA ESTUDIO IL-1alfa: PROMOTOR (C-889T);

Utilizamos la enzima de restricción Nco I (*New England Biolabs Ref. R0193L*), que reconoce la secuencia:

5' C↓ C A T G G 3'

3' G G T A C ↑C 5'

Las condiciones de corte son las siguientes, durante 3 horas a 37ºC: 2μl del buffer descrito para Nco I, 10u de Nco I y 8μl de producto amplificado en un volumen final de 25μl. Los productos generados fueron:

Corte con Nco I (alelo C): 267 pb + 32 pb

No corte con Nco I (alelo T): 299 pb

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: REACTIVOS, TAMPONES Y GELES

- **dNTP mix: dATP** *(ROCHE Ref.1051440)*, **dCTP***(ROCHE Ref.1051458)*, **dGTP***(ROCHE Ref.1051466)*, **dTTP***(ROCHE Ref.1051482)*

Cada uno de los 4 desoxinucleótidos está a una concentración de 100mM en un volumen de 250μl. Se mezclan los cuatro y se les añade agua bidestilada (9ml) hasta quedar a una concentración de 2,5mM cada uno. Esta mezcla se alicuota en tubos eppendorf de 0,5ml y se congelan.

- **Tampón de carga 6X** (para geles de electroforesis de bandas con bajos pesos moleculares)

	Stock	Concentración Final	Volumen (50 ml)
H_2O bidestilada *(BRAUN Ref.387875)*			8,75 ml
Azul de bromofenol (BPB)	10 %	0,25 %	1,25 ml
Sacarosa *(SIGMA Ref. S0389-500G)*	50 %	40 %	40 ml

- Azul de bromofenol: Pesar 5 g y disolver en agua destilada hasta un volumen final de 50 ml.

- Sacarosa 50% (p/v): Pesar 50 g y disolver en agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

- **Tampón TBE 1X**

Se toman 500 ml de tampón TBE 10X *(BIO-RAD Ref.161-0770)*, y se diluyen en agua destilada hasta un volumen final de 5 litros.

- **Bromuro de Etidio 10 mg/ml** *(SIGMA Ref. E7637-25G)*

Pesar 0,5g y disolver en agua destilada hasta un volumen final de 50 ml.

- **Gel de agarosa 2%**

Pesar 4,8g de agarosa *(ECOGEN Medium EEO agarose 250 gr. Ref AG0220)* y disolver en TBE 1X. Calentar en microondas y añadir 11,5μl de bromuro de etidio cuando enfríe. Dejar gelificar en una bandeja de electroforesis con sus correspondientes peines para hacer los pocillos. Una vez gelificado, poner en una cubeta de electroforesis y cubrir con TBE 1X.

- **Gel de poliacrilamida**

En un vaso de precipitado se mezclan los siguientes reactivos, para un gel de 18 x 16 cm:

	8 %	10 %	13 %	20 %
H_2O (ml)	21	19	17	11
Acril/Bis (ml)	6	7'5	9,75	15
TBE 10X (ml)	3	3	3	3
APS 10% (µl)	150	150	150	150
TEMED (µl)	15	15	15	15

- **Persulfato amónico (APS) 10%** *(BIO-RAD Ref. 161-0700)*

Pesar 0,5g y disolver en agua destilada hasta un volumen final de 5 ml.

- **40% Acrilamida *(BIO-RAD Ref. 161-0140)* / 2% Bisacrilamida (***BIO-RAD Ref. 161-0141***)**
- **N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (***BIO-RAD Ref. 161-0801***)**

2.2.- ESTUDIO DEL SISTEMA HLA (HLA-A Y HLA-DR) (PCR-SSO)

El estudio del locus A de la clase I del sistema HLA y del locus DR de la clase II, se realizó a través de una PCR-SSO. En ambos casos, se utilizaron los kits comerciales de 2 laboratorios.

2.2.1.- HLA-A

2.2.1.1.- Amplificación

(Instrucciones según fabricante (Dynal RELI SSO HLA-A. Dynal Biotech, Oslo, Noruega)

1. Se pipetean 30µl de la Master Mix (suministrada por el fabricante) dentro de cada tubo de PCR.

2. Se añaden 15µl de la solución $MgCl_2$ 6,0mM en todos los tubos que contengan la Master Mix.

3. Por último se añaden 15µl del ADN control, del control negativo (agua destilada estéril), y del ADN de cada individuo en los tubos de PCR apropiados. Es necesario un ADN purificado en suficiente cantidad para poder dispensar 200ng en un volumen de 15µl.

Cada mezcla de reacción fue sometida a 35 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin-Elmer, mediante desnaturalización (95ºC, 15 segundos), anillamiento (45ºC, 60 segundos), y extensión (72ºC, 15 segundos), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 5 minutos.

Cuando el programa termina, se añaden 60µl de la solución de desnaturalización, suministrada por el kit, a cada una de las muestras y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir una completa desnaturalización.

2.2.1.2.-Hibridación

Una vez pasado el tiempo de desnaturalización, se lleva a cabo la hibridación automatizada con el aparato Auto RELI-48 y los reactivos, tal y como recomienda el fabricante (Dynal Biotech, Oslo, Noruega)

.• Concentrado SSPE: Calentar en un baño a 50ºC. Todos los sólidos precipitados deben quedar disueltos

• Concentrado SDS: Calentar en un baño a 50ºC. Todos los sólidos precipitados deben quedar disueltos

• Buffer de Hibridación: Mezclar juntos en el orden siguiente: 55ml del concentrado SSPE, 213ml de agua destilada o desionizada y 6,9ml del concentrado SDS. Para ayudar a la disolución, la solución puede calentarse a 50ºC.

• Buffer de Lavado: Mezclar juntos en el orden indicado: 65ml de concentrado SSPE, 1228,5ml de agua destilada y 6,5ml de concentrado SDS. Dividir el buffer de lavado

en 2 botes dispensadores de volumen ajustable, ajustado a 5ml. Usar 275ml como Buffer de Lavado Astringente y 1025ml como Buffer de Lavado Ambiente.

- Buffer de Citrato: Diluir 30ml del concentrado de Citrato con 570ml de agua destilada.
- Conjugado: Se prepara según el número de hibridaciones a realizar, esto es:

16 μl del conjugado x nº de tiras + 5,3 ml del tampón de lavado x nº de tiras

- Sustrato: Se prepara según el número de hibridaciones a realizar, esto es:

4,4 ml de sustrato A x nº tiras + 1,1 ml de sustrato B x nº tiras.

2.2.2.- HLA - DR

2.2.2.1.-Amplificación

(Instrucciones según fabricante: Innogenetics Diagnostica Iberia, S.L., Barcelona, España)

En un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml, se pipetean las cantidades correspondientes al número de muestras que tenemos (N), en el siguiente orden:

1º.- Agua destilada	N x 24μl
2º.- Tampón de amplificación (AB)	N x 10μl
3º.- Solución de primers (DRB1)	N x 10μl
4º.- Taq polimerasa	N x 0,5μl

Una vez preparada la mezcla para la PCR, pipeteamos 45μl de esta mix en cada tubo eppendorf de 0,2ml estéril, y añadimos 5μl de ADN a amplificar.

En un termociclador PTC-100 HB, cada mezcla de reacción se calentó a 95ºC durante 5 minutos, siendo sometida a continuación a 35 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (95ºC, 30 segundos), anillamiento, (55ºC, 20 segundos), y extensión, (72ºC, 30 segundos), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 10 minutos.

Una vez terminada la amplificación, sacamos los tubos y preparamos una electroforesis de control de calidad, tomando una alícuota de 4μl de amplificado a la que añadimos 1μl de tampón de carga 5x, por muestra, y lo sometemos a electroforesis en un gel al 2% de agarosa en TBE, a 200V durante 25 minutos. Terminada la electroforesis realizaremos una foto y comprobamos que las muestras han amplificado correctamente antes de pasar a la hibridación con las tiras.

2.2.2.2.-Hibridación

Con el aparato de hibridación Auto-LiPA y los reactivos suministrados por el fabricante y distribuidor (Innogenetics Diagnostica Iberia, S.L., Barcelona, España), se lleva a cabo la hibridación tal y como recomienda el fabricante, añadiendo previamente 15 μl de solución desnaturalizante y 15μl de muestra de PCR de cada uno de los individuos.

- Buffer de Hibridación
- Lavado Astringente (SW)
- Solución de Lavado o Rinse: Se prepara según el número de muestras a hibridar (N), esto es:

(6,8 ml solución rinse concentrada x N) + (27,2 ml agua bidestilada x N)

- Conjugado: Se prepara según el número de muestras a hibridar (N), esto es:

(120 μl conjugado concentrado x N) + (12 ml diluyente de conjugado x N)

- Substrato: Se prepara según el número de muestras a hibridar (N), esto es:

(120 μl substrato x N) + (12 ml buffer de substrato x N)

- Buffer de Substrato (SB)

2.3- ESTUDIO CITOQUINAS: TNF-ALFA, TGF-BETA, IL-10, IL-6, IFN-GAMMA (PCR-SSP)

El estudio de estos polimorfismos se realizó por medio de una PCR-SSP: La pareja de primers están diseñados para tener emparejamientos perfectos sólo con un único alelo o grupo de alelos. Bajo condiciones de PCR estríctamente controladas, los primers que emparejan perfectamente dan lugar a amplificación de la secuencia que interesa (resultado positivo), mientras que si existe algún mismatch, no habrá amplificación (resultado negativo).

La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de fragmentos específicos de ADN amplificados. También se incluye una pareja de primers que sirven de control interno para controlar que la PCR ha tenido lugar y no se ha visto afectada por cualquier factor:

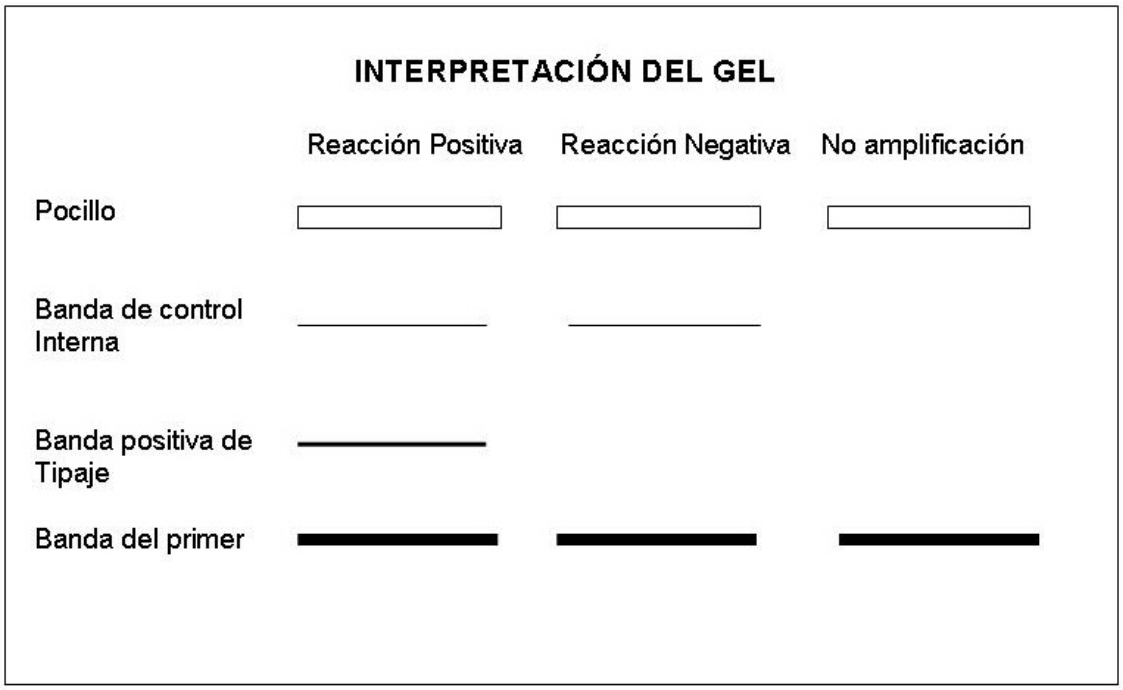

Figura SM1.- Interpretación del gel de una PCR-SSP

Protocolo de amplificación (según fabricante para el kit CYTGEN fabricado por One Lambda, Inc., California, U.S.A):

1. Se descongelan los tubos de mix y las placas que ya vienen en el kit de tipaje de citoquinas, y se llevan a temperatura ambiente.
2. Se añade 1μl de agua al pocillo del control negativo de la placa.
3. Se añaden 5u/μl al tubo de mix. Se cierra el tubo y se agita con un vórtex durante unos 5 segundos; luego se centrifuga para que no queden restos en las paredes y tapa del tubo de mix.
4. Se pipetean 9μl de mix al pocillo del control negativo de la placa.
5. Se añaden 10μl de ADN al tubo de mix. Se cierra el tubo y se agita otra vez durante unos 5 segundos y luego se vuelve a centrifugar.
6. Se alicuotan 10μl de la mezcla de mix-ADN a cada uno de los pocillos de la placa, excepto al pocillo del control negativo.
7. Se cubre la placa con la tira de sellar que acompaña a las placas y se pone en el termociclador Perkin -Elmer.

En un termociclador Perkin-Elmer 96, cada mezcla de reacción se sometió a 1 ciclo de desnaturalización (96ºC durante 2 minutos y 10 segundos) más anillamiento (63ºC durante 1 minuto); le siguieron nueve ciclos de amplificación (96ºC, 10 segundos) y anillamiento (63ºC, 1minuto); finalmente se realizaron 20 ciclos de amplificación mediante desnaturalización (96ºC, 20 segundos), anillamiento (59ºC, 50 segundos), y extensión (72ºC, 32 segundos), y un ciclo final de extensión de 72ºC durante 10 minutos.

Los 10 μl de la reacción se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, a 140-150 voltios, durante unos 3-5 minutos.

3.- ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS versión 10.0 para Windows (Chicago, IL, USA).

Las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto del grupo de pacientes como del grupo de controles, se obtuvieron por recuento directo de los genotipos y alelos, y cálculo de proporciones simples. Así mismo, hemos realizado el estudio de la presencia o ausencia de un determinado alelo, en cada sujeto, como un carácter cuantificable.

Las comparaciones de alelos, genotipos y presencia/ausencia de un carácter, se realizaron con el test de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2), o el test exacto de Fisher, cuando fue necesario, en el módulo "crosstab" del paquete estadístico SPSS. Se utilizó el método de Wolf-Haldane para el cálculo de los odds ratio (O.R.) y los intervalos de confianza (I.C.) del 95%.

La comparación de edad al diagnóstico se realizó por medio del test no paramétrico de Mann-Whitney.

Respecto a los estudios de Regresión Logística, se han realizado con el módulo apropiado del paquete estadístico SPSS versión 10.0, lo mismo que la Regresión de Cox para variables de tiempo.

Como es habitual en estos estudios, en este trabajo, todas las p superiores a 0,05, se han considerado no significativas.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- CASUÍSTICA

De los 282 pacientes mayores de 60 años, 88 fueron hombres y 194 mujeres. El rango de edad de los enfermos fue de 60 a 97 años, con una edad media de 76,05 años.

Por género, la edad media de los hombres fue de 75,22, mientras que la de las mujeres fue de 76,43.

De los 312 controles, 192 fueron hombres y 120 mujeres. El rango de edad de los controles fue de 60 a 90 años, con una edad media de 70,10 años.

Por género, la edad media de los hombres fue de 70,36, mientras que la de las mujeres fue de 69,68.

TABLA R1- DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS

DIAGNÓSTICO	GÉNERO	N	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pacientes	Hombre	88	75,22	60	88
	Mujer	194	76,43	60	97
	TOTAL	282	76,05	60	97
Controles	Hombre	192	70,36	60	90
	Mujer	120	69,68	60	88
	TOTAL	312	70,10	60	90
TOTAL	Hombre	280	71,89	60	90
	Mujer	314	73,85	60	97
	TOTAL	594	72,93	60	97

2.- EDAD AL DIAGNÓSTICO

Cuando estudiamos la edad al diagnóstico, evidentemente sólo podemos hacerlo en el grupo de pacientes. Estos fueron divididos por grupos de 5 años, tal y como se muestra en la tabla R2, donde podemos ver que el porcentaje de pacientes va aumentando a medida que aumenta la edad hasta los 80 años, donde empieza a descender el número de pacientes.

TABLA R2- GRUPOS DE EDAD EN PACIENTES

GRUPOS DE EDAD						TOTAL
60-64	**65-69**	**70-74**	**75-79**	**80-84**	**≥ 85**	
18 (*6,4%*)	28 (*9,9%*)	66 (*23,4%*)	74 (*26,2%*)	67 (*23,8%*)	29 (*10,3%*)	282 (*100%*)

3.- GÉNERO

Cuando estudiamos la posible relación del género con la enfermedad observamos que existen diferencias significativas entre hombres y mujeres, de tal manera que el género femenino es un factor de susceptibilidad para la enfermedad (tablas R3 y R40):

TABLA R3- RELACIÓN GÉNERO x DIAGNÓSTICO

			GENERO		TOTAL
			Hombre	**Mujer**	
DIAGNOSTICO	**Pacientes**	N (%)	88 *(31,2)*	194 *(68,8)*	282 *(100,0)*
	Controles	N (%)	192 *(61,5)*	120 *(38,5)*	312 *(100,0)*
TOTAL		N (%)	280 *(47,1)*	314 *(52,9)*	594 *(100,0)*

p = 0,000; O.R. = 3,527; I.C. (2,511 – 4,955)

Decidimos comprobar también si existía alguna relación entre el género y la edad al diagnóstico de la enfermedad, para lo cual realizamos este estudio en el grupo de los pacientes.

Así, aplicando el test de Mann-Whitney, que nos sirve para comparar medias de dos grupos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, aunque estas últimas son más longevas.

TABLA R4- RELACIÓN GÉNERO x EDAD AL DIAGNÓSTICO

	GÉNERO	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	Hombre	88	75,22	7,08
	Mujer	194	76,43	6,72

p = 0,167

4.- VARIABLES GENÉTICAS

Como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos, las distintas variables genéticas estudiadas fueron:

- Apolipoproteína E (APOE E: exón 4)
- Butirilcolinesterasa (BChE: variantes W-K; exón 4: +1615 G/A)
- Mieloperoxidasa (MPO: -463 G/G)
- Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa: -308 G/A)
- Factor Transformador del Crecimiento-beta1 (TGF-beta1: +10 T/C y +25 G/A)
- Interferon-gamma (IFN-gamma: +874 T/A)
- Interleuquina-10 (IL-10: -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A)
- Interleuquina-1alfa (IL-1alfa: -889 C/T)
- Interleuquina-1beta (IL-1beta: +3953 T/C y -511 T/C)
- Interleuquina-6 (IL-6: -174 G/C)
- Antígeno Leucocitario Humano A (HLA-A2)
- Antígeno Leucocitario Humano DR (HLA-DR2)

La distribución de los genotipos de todos los genes propuestos en este estudio, en ambos grupos de sujetos (pacientes y controles), mostró que todos éstos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weimberg, esto es, los genotipos observados no presentaron desviaciones de los genotipos esperados, asumiéndose, por tanto, el equilibrio genético en la población.

4.1.- APOLIPOPROTEÍNA E

Ya mencionado en el apartado Introducción, es el alelo E4 del gen de la apolipoproteína E el que se ha encontrado asociado con la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico y tardío.

4.1.1. GENOTIPOS Y ALELOS

La distribución de los genotipos y alelos de este gen, en nuestro grupo de estudio, se muestran a continuación en las siguientes tablas (Tablas R5 y R6):

TABLA R5- DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS APO-E x DIAGNÓSTICO

			GENOTIPO APOE						TOTAL
			E4/4	**E4/3**	**E4/2**	**E3/3**	**E3/2**	**E2/2**	
DIAGNÓSTICO	**Paciente**	N (%)	22 *(7,8)*	108 *(38,3)*	8 *(2,8)*	129 *(45,7)*	15 *(5,3)*	0	282 *(100,0)*
	Control	N (%)	1 *(0,3)*	64 *(20,5)*	4 *(1,3)*	220 *(70,5)*	22 *(7,1)*	1 *(0,3)*	312 *(100,0)*
TOTAL		N (%)	23 *(3,9)*	172 *(29,0)*	12 *(2,0)*	349 *(58,8)*	37 *(6,2)*	1 *(0,2)*	594 *(100,0)*

p = 0,000

TABLA R6- DISTRIBUCIÓN DE ALELOS APO-E x DIAGNÓSTICO

			ALELOS APOE			TOTAL
			E2	E3	E4	
DIAGNOSTICO	Paciente	N (%)	23 *(4,1)*	381 *(67,6)*	160 *(28,4)*	564 *(100,0)*
	Control	N (%)	28 *(4,5)*	526 *(84,3)*	70 *(11,2)*	624 *(100,0)*
TOTAL		N (%)	51 *(4,3)*	907 *(76,3)*	230 *(19,4)*	1188 *(100,0)*

p = 0,000

Podemos ver que existe algún tipo de relación de estos alelos con la EA, de manera que es el alelo E4 el que aparece en mayor número en el grupo de nuestros pacientes, mientras que el E3 lo hace en el grupo control (el E2 aparece por igual en ambos grupos).

Si estratificamos nuestro grupo de estudio por presencia / ausencia de este alelo E4, podemos ver que el casi el 50% de los pacientes lo presentan, mientras que el otro 50% no lo tiene. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los controles, donde casi un 78% de los individuos no portan este alelo:

TABLA R7- PRESENCIA DEL ALELO E4 x DIAGNÓSTICO

			PRESENCIA DE E4		TOTAL
			E4 pres	No E4	
DIAGNÓSTICO	Pacientes	N *(%)*	138 *(48,9)*	144 *(51,1)*	282 *(100,0)*
	Controles	N *(%)*	69 *(22,1)*	243 *(77,9)*	312 *(100,0)*
TOTAL		N *(%)*	207 *(34,8)*	387 *(65,2)*	594 *(100,0)*

p = 0,00; O.R. = 3,37; I.C. (2,36 – 4,81)

Vemos que existe una fuerte asociación de la presencia del alelo E4 con la enfermedad, incluso cuando hacemos este mismo estudio separando por género, donde la asociación se mantiene igual de fuerte en ambos sexos (Tabla R8):

TABLA R8- PRESENCIA DEL ALELO E4 x DIAGNÓSTICO x GÉNERO

HOMBRES			PRESENCIA DE E4		TOTAL
			E4 pres	No E4	
DIAGNÓSTICO	Pacientes	N *(%)*	39 *(44,3)*	49 *(55,7)*	88 *(100,0)*
	Controles	N *(%)*	39 *(20,3)*	153 *(79,7)*	192 *(100,0)*
MUJERES			**PRESENCIA DE E4**		**TOTAL**
			E4 pres	**No E4**	
DIAGNÓSTICO	Pacientes	N *(%)*	99 *(51,0)*	95 *(49,0)*	194 *(100,0)*
	Controles	N *(%)*	30 *(25,0)*	90 *(75,0)*	120 *(100,0)*

Hombres: p = 0,000; OR = 3,122; I.C.(1,80–5,40)

Mujeres: p = 0,000; OR = 3,126; I.C.(1,89–5,15)

4.1.2. EFECTO DOSIS

Quisimos estudiar también si existía un "efecto dosis" respecto a este alelo, es decir, si existían diferencias en cuanto a tener un alelo E4 (heterocigoto E x/4) o dos (homocigoto E 4/4) frente a no tener ninguno. Para esto, realizamos una regresión logística y pudimos observar que tener un alelo E4 conlleva un riesgo casi 3 veces mayor que no tener ningún alelo E4, mientras que tener dos alelos E4 (ser homocigoto E 4/4) conlleva un riesgo 37 veces mayor que cuando no se tiene ninguno (Tabla R9):

TABLA R9- ESTUDIO DE DOSIS DE ALELO E4 x DIAGNÓSTICO

Nº DE ALELOS E4	N	p	O.R.	I.C.
0	144			
1	116	0,000	**2,879**	**2,001 – 4,140**
2	22	0,000	**37,008**	**4,950 – 276,64**

En este tabla, donde la categoría de referencia es no tener ningún alelo E4, podemos ver que el I.C. para el caso de tener 2 alelos E4 es muy amplio; esto es debido a que en alguna de las casillas tenemos muy poco número de individuos, concretamente en

la casilla "control-4/4" de la tabla R5 sólo hay 1 individuo (si este número hubiera sido mayor, el I.C. sería más corto).

4.1.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

En cuanto a si este alelo presentaba alguna relación con la edad al diagnóstico, no encontramos ninguna relación entre ambos:

TABLA R10- PRESENCIA DEL ALELO E4 x EDAD AL DIAGNÓSTICO

	PRESENCIA DE E4	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	E4 presente	138	75,78	6,48
	E4 ausente	144	76,31	7,19

p = 0,517

4.2.- BUTIRILCOLINESTERASA

4.2.1. ALELOS Y GENOTIPOS

En cuanto al estudio de los genotipos de la BChE realizados en este trabajo, el porcentaje de pacientes que portaban el alelo K de la BChE fue muy similar al de los controles, al igual que el porcentaje de individuos que portaban el alelo salvaje, por lo que ninguno de éstos presentó asociación alguna con la susceptibilidad a la enfermedad:

TABLA R11- RELACIÓN DE GENOTIPOS BChE x DIAGNÓSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		KK	KW	WW	K	W
DIAGNOSTICO	Pacientes *(%)*	14 *(5,0)*	82 *(29,1)*	186 *(66,0)*	192 *(34,0)*	372 *(66,0)*
	Controles *(%)*	16 *(5,1)*	89 *(28,5)*	207 *(66,3)*	210 *(33,7)*	414 *(66,3)*
TOTAL (%)		30 *(5,1)*	171 *(28,8)*	393 *(66,2)*	402 *(33,8)*	786 *(66,2)*
		p = 0,987			**p = 0,902**	

TABLA R12- PRESENCIA DEL ALELO K BChE x DIAGNÓSTICO

			PRESENCIA DE K		TOTAL
			K pres	No K	
DIAGNÓSTICO	Pacientes	N *(%)*	96 *(34,0)*	186 *(66,0)*	282 *(100,0)*
	Controles	N *(%)*	105 *(33,7)*	207 *(66,3)*	312 *(100,0)*
TOTAL		N *(%)*	201 *(33,8)*	393 *(66,2)*	594 *(100,0)*

p = 0,931

4.2.2. INTERACCIÓN CON APOE4

Tampoco hubo asociación con la enfermedad cuando estratificamos por presencia / ausencia de BChE-K, ni siquiera estratificando por género o por presencia / ausencia de APOE E4 (Tabla R13):

TABLA R13- PRESENCIA ALELO K x DIAGNÓSTICO x PRESENCIA DE APOE E4

ALELO E4 PRESENTE		PRESENCIA DE K		TOTAL
		K pres	No K	
DIAGNÓSTICO	Pacientes *(%)*	44 *(31,9)*	94 *(68,1)*	138 *(100,0)*
	Controles *(%)*	24 *(34,8)*	45 *(65,2)*	69 *(100,0)*
ALELO E4 AUSENTE		**PRESENCIA DE K**		**TOTAL**
		K pres	**No K**	
DIAGNÓSTICO	Pacientes *(%)*	52 *(36,1)*	92 *(63,9)*	144 *(100,0)*
	Controles *(%)*	81 *(33,3)*	162 *(66,70)*	243 *(100,0)*

Presencia APOE E4 → p = 0,754

Ausencia APOE E4 → p = 0,582

4.2.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

Sin embargo, cuando hacemos el estudio de asociación con la edad al diagnóstico, encontramos que la presencia / ausencia del alelo K sí que tiene relación con la

misma, de tal manera que este alelo está asociado a los sujetos de más edad (Tabla R14):

TABLA R14- PRESENCIA ALELO K x EDAD AL DIAGNÓSTICO

	PRESENCIA DE K	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	K presente	96	77,30	6,34
	K ausente	186	75,41	7,02

p = 0,028

Así pues, en nuestro estudio tenemos que no existe ningún tipo de asociación entre los genotipos del gen de la butirilcolinesterasa y el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, ni siquiera cuando hacemos el mismo estudio separando por género. Tampoco aparece ningún tipo de asociación cuando estudiamos la presencia / ausencia del alelo K con todos los individuos, separando por género o separando por presencia / ausencia de E4.

Sin embargo, la presencia / ausencia del alelo K sí tiene relación con la edad al diagnóstico de la enfermedad, de tal manera que los individuos que no poseen este alelo son los de menos edad.

¿Que ocurre cuando separamos por presencia / ausencia de E4? (Tabla R15):

TABLA R15- PRESENCIA ALELO K x EDAD AL DIAGNÓSTICO x PRESENCIA APOE4

	PRESENCIA APOE E4	PRESENCIA K	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	E4 presente	K presente	44	76,57	6,11
		K ausente	94	75,41	6,65
	E4 ausente	K presente	52	77,92	6,53
		K ausente	92	75,40	7,42

Presencia E4 → p = 0,33

Ausencia E4 → p = 0,043

Cuando separamos por presencia / ausencia de APOE E4, vemos que en ambos casos los individuos que presentan el alelo K son mayores que los que no lo presentan, lo cual sigue en concordancia con el resultado general; sin embargo, esto sólo es estadísticamente significativo en los individuos que no portan el alelo E4 (p=0'043), donde los pacientes que tienen el alelo K son los de más edad cuando se diagnostican.

4.2.4. EFECTO DOSIS

Cuando estudiamos la posibilidad de que existiera distinta relación con la edad según el número de alelos K presente, observamos que sólo existía diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el tener 1 alelo K (heterocigoto K) frente a no tener ninguno (tabla R16); posiblemente, el no encontrar relación con la edad en el grupo de los homocigotos para el alelo K, se explique por el bajo número de éstos que hay en todo el grupo.

TABLA R16- EFECTO DOSIS x EDAD

Nº DE ALELOS K	N	MEDIA DE EDAD	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
0	186	75,41	7,02
1	82	77,66	6,46
2	14	75,21	5,29

0 vs 1 $\Rightarrow$ p = 0,014 // 0 vs 2 $\Rightarrow$ p = 0,919 // 1 vs 2 $\Rightarrow$ p = 0,184

4.3.- MIELOPEROXIDASA

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, el genotipo -463 G/G del promotor del gen de la mieloperoxidasa ha sido relacionado con la enfermedad de Alzheimer.

4.3.1. GENOTIPOS Y ALELOS

No hemos encontrado asociación de ningún genotipo del promotor de este gen con el diagnóstico de la enfermedad en estudio, tal y como podemos ver en la tabla R17:

TABLA R17- RELACIÓN DE GENOTIPOS MPO x DIAGNÓSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		GG	**GA**	**AA**	**G**	**A**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	151 *(53,5)*	114 *(40,4)*	17 *(6,0)*	530 *(94,0)*	34 *(6,0)*
	Controles *(%)*	149 *(47,8)*	134 *(42,9)*	29 *(9,3)*	566 *(90,7)*	58 *(9,3)*
TOTAL (%)		300 *(50,5)*	248 *(41,8)*	46 *(7,7)*	1096 *(92,3)*	92 *(7,7)*
		p = 0,197			**p = 0,039**	

Aunque observamos que existe una significación entre el alelo G y la EA, este resultado es bastante débil, ya que el número de alelos A es muy bajo y consideramos que podría estar falseando la significación de esta asociación. De hecho, cuando estudiamos la presencia de estos alelos en los individuos, comprobamos que, efectivamente, no hay relación de ninguno de ellos con la enfermedad (Tabla R18):

TABLA R18- PRESENCIA DE ALELOS MPO x DIAGNÓSTICO

		PRESENCIA DE MPO-G		PRESENCIA DE MPO-A	
		Sí G	**No G**	**Sí A**	**No A**
DIAGNOSTICO	**Paciente *(%)***	265 *(94,0)*	17 *(6,0)*	131*(46,5)*	151 *(53,5)*
	Controles *(%)*	283 *(90,7)*	29 *(9,3)*	163 *(52,2)*	149 *(47,8)*
		p = 0,167		**p = 0,163**	

4.3.2. INTERACCIÓN CON APOE4

Al estratificar por la presencia / ausencia del alelo E4 de la apolipoproteína E, sí que encontramos asociación del alelo G del promotor de la MPO con el diagnóstico de la enfermedad, pero únicamente en aquellos individuos que no portaban el alelo E4:

TABLA R19- ***RELACIÓN DE MPO -463G x DIAGNÓSTICO x PRESENCIA DE APOE E4***

APOE E4	DIAGNÓSTICO	PRESENCIA DE MPO G		TOTAL
		Sí G	**No G**	
PRESENTE	**Paciente (%)**	126 *(91,3)*	12 *(8,7)*	138 *(100,0)*
	Control (%)	62 *(89,9)*	7 *(10,1)*	69 *(100,0)*
AUSENTE	**Paciente (%)**	139 *(96,5)*	5 *(3,5)*	144 *(100,0)*
	Control (%)	221 *(90,9)*	22 *(9,1)*	243 *(100,0)*

Presencia APOE E4 → p = 0,8

Ausencia APOE E4 → p = 0,04; O.R. = 2,767; I.C.(1,024-7,477)

Este resultado hay que tomarlo con cautela, puesto que en una de las casillas de la tabla de contingencia existe un número bajo de individuos (sólo 5).

4.3.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

Respecto a la edad al diagnóstico, no encontramos relación de ningún tipo con la misma cuando estudiamos al total de los pacientes (p=0,663); sin embargo, cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, pudimos observar que los

individuos homocigotos para el alelo G y con E4 presente, adelantaban su edad al diagnóstico:

TABLA R20- EDAD AL DIAGNÓSTICO x MPO-GG x APOE4

	APOE E4	GENOTIPO GG	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	PRESENTE	No GG	61	77,56	6,39
		Sí GG	77	74,38	6,24
	AUSENTE	Sí GG	74	77,46	7,04
		No GG	70	75,10	7,21

Presencia APOE E4 → p = 0,004

Ausencia APOE E4 → p = 0,049

También encontramos una asociación, aunque bastante más lábil, en aquellos pacientes que no son homocigotos para el alelo G (GA o AA) y tampoco portan el alelo E4, de tal modo que en estos individuos también se adelantaría la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.3.4. EFECTO DOSIS

Aunque hemos observado asociación entre el genotipo GG, la presencia del alelo APOE E4 y la edad al diagnóstico, no realizamos el estudio dosis, puesto que el número de individuos disminuiría bastante y la casuística no sería la adecuada para un estudio de este tipo.

4.4.- CITOQUINAS: TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-10, IL-1alfa, IL-1beta e IL-6

Como ya se ha reseñado al principio de este apartado de Resultados, cuando estudiamos todas estas variables, por separado, sólo algunas de las interleuquinas

ofrecieron algún tipo de asociación con la enfermedad de Alzheimer, concretamente IL-1beta (-511 C/T) e IL-6, siendo negativas el resto.

4.4.1.-TNF-ALFA (-308 G/A)

4.4.1.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo de promotor -308 G/A del gen TNF-alfa con la EA.

TABLA R21- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS TNF-ALFA (-308 G/A) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		GG	**GA**	**AA**	**G**	**A**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	206 *(73,0)*	70 *(24,8)*	6 *(2,1)*	482 *(85,5)*	82 *(14,5)*
	Controles *(%)*	236 *(75,6)*	69 *(22,1)*	7 *(2,2)*	541 *(86,7)*	83 *(13,3)*
		p = 0,738			**p = 0,557**	

4.4.1.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -308 G/A del gen TNF-alfa con el diagnóstico de la EA.

4.4.1.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -308 G/A del gen TNF-alfa con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.1.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina

4.4.2.- TGF-BETA1 (+10T/C)

4.4.2.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo +10T/C del gen TGF-beta1 con la EA.

TABLA R22- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS TGF-BETA 1 (+10 T/C) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		TT	**TC**	**CC**	**T**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	94 *(33,3)*	139 *(49,3)*	49 *(17,4)*	327 *(58,0)*	237 *(42,0)*
	Controles *(%)*	102 *(32,7)*	143 *(45,8)*	67 *(21,5)*	347 *(55,6)*	277 *(44,4)*
		p = 0,435			**p = 0,412**	

4.4.2.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +10T/C del gen TGF-beta1 con el diagnóstico de la EA.

4.4.2.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +10T/C del gen TGF-beta1 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.2.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.3.-TGF-BETA1 (+25 G/A)

4.4.3.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo +25 G/A del gen TGF-beta1 con la EA.

TABLA R23- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS TGF-BETA 1 (+25 G/C) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		GG	**GC**	**CC**	**G**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	254 *(90,1)*	26 *(9,2)*	2 *(0,7)*	533 *(94,5)*	31 *(5,5)*
	Controles *(%)*	267 *(85,6)*	44 *(14,1)*	1 *(0,3)*	578 *(92,6)*	46 *(7,4)*
		p = 0,151			**p = 0,197**	

4.4.3.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +25 G/A del gen TGF-beta1 con el diagnóstico de la EA.

4.4.3.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +25 G/A del gen TGF-beta1 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.3.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.4.- IFN-GAMMA (+874 T/A)

4.4.4.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo +874 T/A del gen IFN-gamma con la EA.

TABLA R24- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IFN-GAMMA (+874 T/A) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		TT	**TA**	**AA**	**T**	**A**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	62 *(22,0)*	143 *(50,7)*	77 *(27,3)*	297 *(52,7)*	267 *(47,3)*
	Controles *(%)*	65 *(20,8)*	163 *(52,2)*	84 *(26,9)*	331 *(53,0)*	293 *(47,0)*
		p = 0,920			**p = 0,907**	

4.4.4.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +874 T/A del gen IFN-gamma con el diagnóstico de la EA.

4.4.4.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +874 T/A del gen IFN-gamma con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.4.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.5.- IL-10 (-1082 G/A)

4.4.5.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo de promotor -1082 G/A del gen IL-10 con la EA.

TABLA R25- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-10 (-1082 G/A) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		GG	**GA**	**AA**	**A**	**G**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	49 *(17,4)*	128 *(45,4)*	105 *(37,2)*	338 *(59,9)*	226 *(40,1)*
	Controles *(%)*	51 *(16,3)*	152 *(48,7)*	109 *(34,9)*	370 *(59,3)*	254 *(40,7)*
		p = 0,719			**p = 0,859**	

4.4.5.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -1082 G/A del gen IL-10 con el diagnóstico de la EA.

4.4.5.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -1082 G/A del gen IL-10 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.5.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.6.- IL-10 (-819 C/T)

4.4.6.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo de promotor -819 C/T del gen IL-10, con la EA.

TABLA R26- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-10 (-819 C/T) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		CC	**CT**	**TT**	**C**	**T**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	144 *(51,1)*	113 *(40,1)*	25 *(8,9)*	163 *(28,9)*	401 *(71,1)*
	Controles *(%)*	162 *(51,9)*	123 *(39,4)*	27 *(8,7)*	177 *(28,4)*	447 *(71,6)*
		p = 0,978			**p = 0,847**	

4.4.6.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -819 C/T del gen IL-10 con el diagnóstico de la EA.

4.4.6.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -819 C/T del gen IL-10 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.6.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.7.- IL-10 (-592 C/A)

4.4.7.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo de promotor -592 C/A del gen IL-10 con la EA.

TABLA R27- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-10 (-592 C/A) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		CC	**CA**	**AA**	**C**	**A**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	143 *(50,7)*	114 *(40,4)*	25 *(8,9)*	164 *(29,1)*	400 *(70,9)*
	Controles *(%)*	162 *(51,9)*	123 *(39,4)*	27 *(8,7)*	177 *(28,4)*	447 *(71,6)*
		p = 0,957			**p = 0,798**	

4.4.7.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -592 C/A del gen IL-10 con el diagnóstico de la EA.

4.4.7.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo de promotor -592 C/A del gen IL-10 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.7.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.8.- IL-1 ALFA (-889 C/T)

4.4.8.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo de promotor -889 C/T del gen IL-1alfa con la EA.

TABLA R28- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-1 ALFA (-889 C/T) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		CC	**CT**	**TT**	**T**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	138 *(48,9)*	118 *(41,8)*	26 *(9,2)*	170 *(30,1)*	394 *(69,9)*
	Controles *(%)*	168 *(53,8)*	121 *(38,8)*	23 *(7,4)*	167 *(26,8)*	457 *(73,2)*
		p = 0,438			**p = 0,198**	

4.4.8.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo -889 C/T del gen IL-1alfa con el diagnóstico de la EA.

4.4.8.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo -889 C/T del gen IL-1alfa con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.8.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.9.- IL-1 BETA (+3953 T/C)

4.4.9.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo +3953 T/C del gen IL-1beta con la EA.

TABLA R29- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-1BETA (+3953 T/C) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		CC	**CT**	**TT**	**T**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	151 *(53,5)*	114 *(40,4)*	17 *(6,0)*	148 *(26,2)*	416 *(73,8)*
	Controles *(%)*	182 *(58,3)*	118 *(37,8)*	12 *(3,8)*	142 *(22,8)*	482 *(77,2)*
		p = 0,315			**p = 0,176**	

4.4.9.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +3953 C/T del gen IL-1beta con el diagnóstico de la EA.

4.4.9.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo +3953 C/T del gen IL-1beta con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.4.9.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos de esta citoquina.

4.4.10.- IL-1 BETA (-511 T/C)

4.4.10.1. GENOTIPOS Y ALELOS

Al realizar el estudio genotípico y alélico de este polimorfismo, pudimos observar que existía algún tipo de relación de éste con la enfermedad y, a priori, diríamos que es el alelo T el que está más relacionado con el grupo de los pacientes (58,5% de los pacientes lo presentan frente a 49,3% controles), mientras que el alelo C está relacionado con los controles (91,9% de los controles lo presentan frente a 86,5%).

TABLA R30- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-1BETA (-511 C/T) x DIAGNÓSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		CC	**CT**	**TT**	**T**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	117 *(41,5)*	127 *(45,0)*	38 *(13,5)*	203 *(36,0)*	361 *(64,0)*
	Controles *(%)*	158 *(50,6)*	129 *(41,3)*	25 *(8,0)*	179 *(28,7)*	445 *(71,3)*
		p = 0,026			**p = 0,008**	

Al separar por presencia / ausencia de los alelos C o T, tenemos que, efectivamente, el alelo -511T es el que se relaciona con ser paciente, mientras que el alelo -511C se relaciona más con los controles, sugiriendo una cierta protección (Tabla R31):

TABLA R31- PRESENCIA DE LOS ALELOS -511T Y -511C x DIAGNOSTICO

		PRESENCIA DE-511 T		PRESENCIA DE -511 C	
		Sí T	**No T**	**Sí C**	**No C**
DIAGNOSTICO	**Paciente *(%)***	165 *(58,5)*	117 *(41,5)*	244 *(86,5)*	38 *(13,5)*
	Controles *(%)*	154 *(49,4)*	158 *(50,6)*	287 *(92,0)*	25 *(8,0)*

Presencia de -511 T $\rightarrow$ p = 0,026; OR = 1,44; I.C.(1,04 – 2,00)

Presencia de -511 C $\rightarrow$ p = 0,033; OR = 0,55; I.C.(0,32 – 0,95)

4.4.10.2. INTERACCIÓN APOE E4

Al estudiar la relación del alelo -511T con el diagnóstico, separando por la presencia / ausencia del alelo APOE E4 (Tabla R30), tenemos que:

TABLA R32- PRESENCIA DEL ALELO -511T x DIAGNÓSTICO x APOE E4

APOE E4	DIAGNÓSTICO	PRESENCIA DE -511 T		TOTAL
		Sí T	No T	
PRESENTE	**Paciente (%)**	76 *(55,1)*	62 *(44,9)*	138 *(100,0)*
	Control (%)	30 *(43,5)*	39 *(56,5)*	69 *(100,0)*
AUSENTE	**Paciente (%)**	89 *(61,8)*	55 *(38,2)*	144 *(100,0)*
	Control (%)	124 *(51,0)*	119 *(49,0)*	243 *(100,0)*

Presencia de APOE E4 → p = 0,140; OR = 1,59; I.C.(0,89 – 2,85)

Ausencia de APOE E4 → p = 0,045; OR = 1,55; I.C.(1,02 – 2,36)

La relación de este polimorfismo con la enfermedad únicamente es significativa en los individuos que no presentan el alelo E4 del gen APOE.

En cuanto al alelo -511C, no encontramos ningún tipo de asociación con el diagnóstico de la EA cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4.

4.4.10.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo -511 C/T del gen IL-1beta con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

TABLA R33- PRESENCIA IL-1 BETA (-511T) x EDAD AL DIAGNÓSTICO

	PRESENCIA DE -511 T	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	**-511 T presente**	165	75,87	6,90
	-511 T ausente	117	76,31	6,80

p = 0,600

4.4.10.4. EFECTO DOSIS

Puesto que el alelo T del polimorfismo IL-1beta (-511) presentó relación con la susceptibilidad a la enfermedad, estudiamos el posible efecto dosis de éste:

TABLA R34- ESTUDIO DOSIS IL-1BETA (-511 T) x DIAGNOSTICO

Nº DE ALELOS T	N	p	O.R.	I.C.
0	117			
1	127	0,103	1,329	0,944 – 1,872
2	38	0,012	2,053	1,174 – 3,588

Al estudiar la tabla anterior observamos que es el hecho de ser homocigoto para el alelo -511T el que muestra un resultado altamente significativo, por lo que la presencia de 2 alelos -511T, confiere una destacada susceptibilidad a la enfermedad.

4.4.11- IL-6 (-174 G/C)

4.4.11.1. GENOTIPOS Y ALELOS

Cuando realizamos el estudio del polimorfismo del gen de la IL-6 (-174G/C), no encontramos ninguna relación de los genotipos de promotor -174G/C del gen IL-6 con la enfermedad de Alzheimer:

TABLA R35- RELACIÓN DE IL-6(-174G/C) x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			ALELOS	
		GG	**GC**	**CC**	**G**	**C**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	163 *(57,8)*	99 *(35,1)*	20 *(7,1)*	425 *(75,4)*	139 *(24,6)*
	Controles *(%)*	152 *(48,7)*	127 *(40,7)*	33 *(10,6)*	431 *(69,1)*	193 *(30,9)*
		p = 0,063			**p = 0,017**	

Sin embargo, al hacer el estudio alélico, sí pudimos comprobar como el alelo G de la IL-6 se asocia con el diagnóstico de la enfermedad

4.4.11.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, sí que aparece relación del genotipo GG con el diagnóstico de la enfermedad en aquellos individuos no E4, perdiéndose la relación alélica en ambos grupos (E4 y no E4):

TABLA R36- RELACIÓN DE GENOTIPOS Y ALELOS IL-6 x DIAGNÓSTICO x APOE E4

APOE E4	DIAGNÓSTICO	GENOTIPOS IL-6 (-174G/C)			ALELOS	
		GG	GC	CC	G	C
PRESENTE	Paciente (%)	72 *(52,2)*	56 *(40,6)*	10 *(7,2)*	128 *(68,4)*	10 *(50,0)*
	Control (%)	33 *(47,8)*	26 *(37,7)*	10 *(14,5)*	59 *(31,6)*	10 *(50,0)*
AUSENTE	Paciente (%)	91 *(63,2)*	43 *(29,9)*	10 *(6,9)*	134 *(37,9)*	10 *(30,3)*
	Control (%)	119 *(49,0)*	101 *(41,6)*	23 *(9,5)*	220 *(62,1)*	23 *(69,7)*
Presencia de APOE4 →		**p = 0,250**			**p = 0,081**	
Ausencia de APOE4 →		**p = 0,025**			**p = 0'254**	

4.4.11.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

Respecto a la edad al diagnóstico de la enfermedad, no encontramos ningún tipo de relación con los genotipos o alelos de esta citoquina:

TABLA R37- RELACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ALELO IL-6(-174G) x EDAD AL DIAGNOSTICO

	IL-6 (-174 G)	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EDAD	G presente	262	75,98	6,75
	G ausente	20	76,9 5	8,13

p = 0,544

4.4.11.4. EFECTO DOSIS

Al no existir relación del alelo G con la edad al diagnóstico en el total de los individuos, únicamente en aquellos no E4, no estudiamos el efecto dosis de los alelos de esta citoquina, puesto que el número de individuos disminuye considerablemente.

4.5.- HLA

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, el sistema HLA ha sido relacionado en la literatura con la susceptibilidad a la EA, tanto los loci de clase I (A y B), como los de clase II (DR). De todos los loci incluidos en estas clases, los más relacionados han sido el HLA-A y el HLA-DR; así pues, en el presente trabajo han sido éstos los estudiados, centrándonos sobre todo en los alelos A2 y DR2.

4.5.1.- HLA-A2

4.5.1.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo HLA-A2 con la EA:

TABLA R38- RELACIÓN DE HLA-A2 x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			PRESENCIA A2	
		A2 A2	**A2 X**	**X X**	**A2**	**NO A2**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	22 *(7,8)*	113 *(40,1)*	147 *(52,1)*	157 *(27,8)*	407 *(72,2)*
	Controles *(%)*	18 *(5,8)*	115 *(36,9)*	179 *(57,4)*	151 *(24,2)*	743 *(75,8)*
X = Otro alelo no A2		**p = 0,359**			**p = 0,153**	

4.5.1.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo HLA-A2 con el diagnóstico de la EA.

4.5.1.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo HLA-A2 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.5.1.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos HLA-A2.

4.5.2.- HLA-DR2

4.5.2.1. GENOTIPOS Y ALELOS

En nuestro estudio no encontramos ninguna relación de los genotipos y alelos del polimorfismo HLA-DR2 con la EA:

TABLA R39- RELACIÓN DE HLA-DR2 x DIAGNOSTICO

		GENOTIPOS			PRESENCIA DR2	
		DR2 DR2	**DR2 X**	**X X**	**DR2**	**NO DR2**
DIAGNOSTICO	**Pacientes *(%)***	2 *(0,7)*	66 *(23,4)*	214 *(75,9)*	70 *(12,4)*	494 *(87,6)*
	Controles *(%)*	6 *(1,9)*	65 *(20,8)*	241 *(77,2)*	77 *(12,3)*	547 *(87,7)*
X = Otro alelo no DR2		**p = 0,350**			**p = 0,970**	

4.5.2.2. INTERACCIÓN APOE E4

Cuando estratificamos por presencia / ausencia de APOE E4, tampoco encontramos ningún tipo de asociación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo HLA-DR2 con el diagnóstico de la EA.

4.5.2.3. EDAD AL DIAGNÓSTICO

No encontramos relación de los genotipos y/o alelos del polimorfismo HLA-DR2 con la edad al diagnóstico de la enfermedad.

4.5.2.4. EFECTO DOSIS

Al no existir ningún tipo de relación con la enfermedad, no fue necesario estudiar el efecto dosis de los alelos que conforman los genotipos HLA-DR2.

5.- ESTUDIO MULTIVARIABLE DE LOS POLIMORFISMOS ANALIZADOS.-

Por medio de un estudio de regresión logística, y teniendo en cuenta el género y los polimorfismos en estudio, como podemos observar en la tabla R40, el alelo -511T del gen de la IL-1beta, es un factor independiente para el desarrollo de la enfermedad, lo mismo que el alelo E4 del gen APOE y el género del paciente:

TABLA R40- ESTUDIO MULTIVARIABLE x DIAGNOSTICO

VARIABLE	p	O.R.	I.C.
APOE E4	0,000	3,257	2,239 – 4,738
Género	0,000	3,290	2,307 – 4,690
IL 1beta (-511T)	0,037	1,460	1,024 – 2,083
IL-6 (-174 G)	0,061	1,817	0,973 – 3,392

Con respecto al alelo G del polimorfismo -174 del gen de la IL-6, podemos observar en la misma tabla, que no presenta significación como factor de susceptibilidad independiente, pero por medio de las interacciones entre las variables consideradas, vemos que actúa incrementando el riesgo conferido por la presencia del alelo APOE E4, así como del alelo -511T de la IL-1beta, comportándose por ello, como factor modificador del riesgo conferido por estos dos alelos de susceptibilidad (tabla R41):

TABLA R41-MODIFICACION DEL RIESGO APOE E4 E* IL-1BETA (-511 T) x *PRESENCIA DE IL-6(-174G)

	No IL-6(-174G)	**Sí IL-6(-174G)**
PRESENCIA APOE E4	O.R.= 3'218	O.R.= 3'533
PRESENCIA IL-1β (-511 T)	O.R.= 1'478	O.R.= 1'504

Respecto al estudio de la edad, cuando hacemos el estudio de manera monovariable, sólo aparece relacionado con la misma la presencia de BCH-K y MPO (-463G); sin embargo, cuando hacemos el estudio multivariable a través de la regresión de Cox, ninguno de los genes estudiados tiene relación con la edad al diagnóstico. Esto podría ser debido a que en la regresión, el estudio se va haciendo por "tramos" de edad, que puede que eliminen la posible relación de BCH-K y MPO (-463G) con la misma.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados, o en vías de desarrollo, ha dado lugar a la aparición de enfermedades propias de la edad, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer, la principal dentro de éstas. Esta enfermedad, que afecta a unos 13,5 millones de personas en todo el planeta - unos 2 millones en España -, no sólo afecta al paciente en sí, sino también a sus familiares, con costes psicológicos imposibles de calcular, y a la sociedad en general, con una carga económica que puede estar entre 13.000 y 28.000 euros por paciente y año [López-Pousa, 2004; Lopez-Bastida, 2009].

Nuestro trabajo se ha centrado exclusivamente en la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico y tardío, debido a que es la que mayor porcentaje presenta en el total de los pacientes de EA, tanto a nivel global [Manzano, 2009] como en nuestra casuística.

1.- EDAD AL DIAGNÓSTICO

El principal factor de riesgo de esta enfermedad es la edad. Comienza a ser frecuente en individuos mayores de 65 años, incrementándose de forma exponencial [Manzano, 2009]. En nuestra casuística, cuando agrupamos a los pacientes en subgrupos de 5 años, hemos podido constatar que el porcentaje de enfermos aumenta a medida que aumenta la edad, hasta los 80 años, donde se produce un ligero descenso, que aumenta a partir de los 85 años (Tabla R2); posiblemente, la disminución del porcentaje de pacientes en el grupo de mayores de 85 años, sea debido al fallecimiento de las personas por encima de estas edades, tal y como vemos en la tabla D1:

TABLA D1.- PORCENTAJE DE POBLACIÓN CANARIA MAYOR DE 60 AÑOS AGRUPADA POR EDAD

		GRUPOS DE EDAD						
		60-64	**65-69**	**70-74**	**75-79**	**80-84**	**≥ 85**	**TOTAL**
Población Canarias 2008	**Hombre**	48.359	38.085	33.969	23.630	13.015	8.330	165.388
	(%)	*29,2*	*23*	*20,5*	*14,3*	*7,9*	*5*	*100*
	Mujer	49.415	40.096	39.032	30.784	19.443	16.641	195.411
	(%)	*25,3*	*20,5*	*20*	*15,7*	*10*	*8,5*	*100*
	Total	97.774	78.181	73.001	54.414	32.458	24.971	360.799
	(%)	*27*	*21,6*	*20,2*	*15*	*9*	*6,9*	*100*

Datos tomados del ISTAC (Instituto de Estadística de Canarias) a 01.01.2008

2.- GÉNERO

Cuando estudiamos la relación entre la EA y el género, vemos que la literatura se decanta por una mayor presencia del género femenino entre los pacientes de EA [Rocca, 1991].

En el caso concreto de nuestro trabajo, encontramos más del doble de mujeres que de hombres en el grupo de los pacientes, por lo que pensamos que esta mayor abundancia de mujeres en el grupo de los pacientes pueda estar asociada efectivamente con la enfermedad, tal y como ya ha sido sugerido. Así, teniendo en cuenta el género en el estudio multivariable, hemos podido apreciar que el género femenino es, definitivamente, un factor de riesgo muy importante y estadísticamente significativo (Tabla de Resultados R40), confiriendo una susceptibilidad a la EA 3,2 veces mayor frente al genero masculino.

Estudios recientes en ratones han demostrado que la actividad gamma secretasa que genera la formación del péptido $A\beta_{42}$ es mayor en las hembras que en los machos, lo que lleva a sugerir que pueda ocurrir lo mismo en la especie humana, pudiéndose

explicar así la mayor relación de esta enfermedad con el género femenino que con el masculino [Placanica, 2009].

Sin embargo, también es posible que los hombres fallezcan antes por otras causas, de tal manera que el número de mujeres, a determinadas edades, sea mayor que el de hombres (tabla D1) y, así, la EA aparezca más relacionada con este género y que, como además se ha especulado, exista algún tipo de protección en este género que lleve a un retraso de la aparición de la enfermedad, tal como se ha sugerido para los estrógenos [Kawas,1997; Asthana, 2001; Carroll, 2007]. También se han observado diferencias en el metabolismo antioxidante en los cerebros de hombres y mujeres, de tal manera que hay una sobrerregulación género-específica en la defensa antioxidante, mayor en el género femenino [Schuessel, 2004].

3.- MARCADORES GENÉTICOS

La búsqueda de marcadores - estructurales, bioquímicos, genéticos, ambientales, etc - que ayuden a los profesionales clínicos en un diagnóstico más certero de la enfermedad, se ha convertido en el objetivo de algunos investigadores [Clark, 2003] y en el nuestro propio.

Muchas han sido las proteínas relacionadas con la placas seniles y las redes neurofibrilares, reflejándose el estudio de éstas en sus genes, tal y como se ha visto en la tabla I4 de la Introducción. A cada proteína y gen propuesto como posible implicado en algún aspecto de la EA, le ha seguido un gran número de trabajos y publicaciones que, generalmente, sólo han contribuído a una amplia controversia respecto a su implicación en esta enfermedad, encontrándose siempre trabajos a favor y en contra de cada uno de los candidatos. ¿Las causas?: Diferentes métodos de trabajo, diferentes casuísticas, diferentes poblaciones con diferencias genotípicas y alélicas, etc.

Con los proyectos financiados y realizados a lo largo de estos años, y que han dado lugar a esta tesis, hemos intentado ayudar a esclarecer la participación de determinados genes que participan ampliamente en el proceso patogénico de esta enfermedad, y podrían ser de utilidad a los neurólogos en un diagnóstico más preciso de la misma.

3.1.- APOLIPOPROTEÍNA E

El marcador "por excelencia" dentro de la EA esporádica-tardía, es el alelo E4 del gen de la apolipoproteína E [Clark, 2003], ampliamente asociado con esta enfermedad desde 1993, cuando se observó por primera vez esta relación [Saunders, 1993a; Corder, 1993].

La apolipoproteína E, implicada en el catabolismo de lipoproteínas y redistribución del colesterol, entre otras funciones, presenta 3 isoformas: E2, E3 y E4, tal y como ya se ha comentado. De estas 3 isoformas, la apoe E4 ha mostrado mayor avidez por el péptido amiloide que las otras dos [Strittmatter, 1993b], relacionándosele, por ello, con una mayor deposición amiloidea [Strittmatter, 1993a]; pero también se le ha relacionado con la proteína tau, de modo que apoe podría regular el metabolismo intraneuronal de tau y alterar el ratio de formación de PHF y redes neurofibrilares [Strittmatter, 1994].

Al igual que se ha visto en trabajos recientes [Raygani, 2005; Styczyńska, 2008; Sando, 2008], en nuestro grupo de estudio hemos podido comprobar que también esta variante E4 de la apoe, está asociada con la EA, donde 48,9% de los pacientes la presentan, frente a un 22,1% de los controles [p = 0,00; O.R.= 3,37; IC (2,36 – 4,81)]; esta asociación persiste incluso cuando estratificamos por género, donde la asociación se mantiene igual de fuerte en ambos sexos [Hombres: p= 0,000; OR=3,122; I.C.(1,80 – 5,40) // Mujeres: p= 0,000; OR=3,126; I.C.(1,89 – 5,15)], al contrario de lo publicado

en algunos trabajos, donde parece que la asociación del alelo E4 con la EA es mayor en mujeres [Ghebremedhin, 2001].

Cuando estudiamos la importancia de tener uno o dos alelos E4 con respecto al riesgo de padecer la enfermedad, pudimos observar la existencia de un intenso efecto dosis, como ya se ha publicado en trabajos anteriores [Corder,1993], es decir, tener un alelo E4 conlleva un riesgo de padecer la enfermedad casi 3 veces mayor que cuando no se posee ningún alelo E4, mientras ser homocigoto E4/4 conlleva un riesgo 37 veces mayor que cuando no se tiene ninguno [1 alelo E4: p= 0,000; OR=2,87; I.C.(2,00 – 4,14) // 2 alelos E4: p= 0,000; OR=37,00; I.C.(4,95 – 276,64)].

Por lo tanto, el riesgo asociado con el alelo E4 es dosis dependiente, reflejándose esto en el incremento del riesgo según el número de alelos E4 presentes.

Por otro lado, y al contrario que lo observado por otros autores, no pudimos constatar la relación de la presencia del alelo E4 con la edad al diagnóstico, o lo que es lo mismo, una presentación más temprana de la enfermedad [Raygani, 2005; Styczyńska, 2008; Sando, 2008].

Con estos resultados, ¿sería lícito utilizar el genotipado de apoe para predecir si una persona padecerá, o no, EA?: El gen APOE no es un gen causante de la enfermedad de Alzheimer, aunque sí un factor de riesgo notable, estimándose que puede tener un efecto importante en el 50% de la población de pacientes, aproximadamente [Myers,1996], pero sin los criterios clínicos adecuados, realizar el genotipado de apoe no ofrece resultados diagnósticos concluyentes, ya que, la presencia del alelo E4 no es ni necesaria ni suficiente para desarrollar EA, así como la no presencia de dicha variante garantiza la ausencia de la enfermedad [Mayeux, 1998; Devanand, 2005].

3.2.- BUTIRILCOLINESTERASA

La butirilcolinesterasa humana es una enzima cuyo papel está asociado con la hidrólisis de la acetilcolina, aunque de manera más lenta que la llevada a cabo por la acetilcolinesterasa. Esta proteína presenta distintas variantes que le hacen ser más o menos activa, como se ha visto con la variante K, la más común de éstas, y cuya actividad está reducida hasta en un 33% con respecto a la variante salvaje [La Du,1990]. Por tanto, sería lógico suponer que una menor actividad de esta proteína, llevaría a una menor hidrólisis de la acetilcolina, mejorando la trasmisión colinérgica y retrasando la aparición de los signos clínicos de la EA, que sería lo esperable con esta variante.

También se ha especulado con la participación de la BChE dentro de la neuroinflamación: aunque no sea una de las proteínas directamente implicadas, la inactivación de la acetilcolina por esta enzima impediría la acción antiinflamatoria que se le supone a la acetilcolina [Thomas, 2007].

Creímos interesante comprobar si la BChE, y concretamente su variante K, se daba en nuestra casuística y si tenía relación alguna con la EA. Para esto, cada genotipo de BChE fue doblemente confirmado, tipándose tanto la variante K como la variante salvaje (W), tal y como describen Altamirano et al [Altamirano, 2000].

Al contrario que en los trabajos de Wiebusch, Raygani y Beyer [Wiebusch, 1999; Raygani, 2004; Beyer, 2005], respecto a la susceptibilidad a la enfermedad, no encontramos ningún tipo de asociación, al igual que Cook et al y Rakoncazy et al [Cook, 2005; Rakonczay, 2005], ni genotípica (p=0,987) ni alélica (p=0,902), ya que el porcentaje de pacientes que portaban el alelo K de la BChE fue muy similar al de los controles, al igual que el porcentaje de individuos que tenían el alelo salvaje; aunque la frecuencia alélica de BCHE-K es de las mayores descritas (Tabla D2):

TABLA D2.- FRECUENCIAS ALÉLICAS DESCRITAS EN DISTINTAS POBLACIONES

	CASOS		CONTROLES	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia
Oxford (Lehmann,1997)	LOAD=74	0,17	104	0,09
	EOAD=14	0,07		
USA (Crawford,1998)	Community = 62	0,097	201	0,144
	Clinic = 329	0,17		
Bristol (Kehoe,1998)	181	0,21	71	0,20
Finland (Hiltunen,1998)	78	0,14	97	0,15
USA (Grubber,1999)	245	0,19	241	0,23
Montreal (Wiebusch,1999)	135	0,23	70	0,13
Northern Ireland (McIlroy, 2000)	175	0,27	187	0,14
Tehran, Iran (Raygani, 2004)	105	0,24	129	0,12
España [Norte] (Combarros, 2005)	187	0,10	172	0,15
Gran Canaria (Déniz-Naranjo, 2007)	**282**	**0,34**	**312**	**0,33**

Tampoco observamos relación con la susceptibilidad a la EA cuando estratificamos por género o por presencia / ausencia de apoe E4.

Pero cuando realizamos el estudio de asociación con la edad al diagnóstico, pudimos comprobar que la presencia / ausencia del alelo K sí estaba relacionado con la misma, del tal manera que este alelo se asociaba a los sujetos de más edad, o lo que es lo mismo, los individuos que no portan el alelo K enferman significativamente antes (p=0,028), lo cual es coherente con lo que se esperaba de esta variante.

Si estudiamos esta relación separando por presencia / ausencia de APOE4, en ambos casos observamos que los individuos que presentan el alelo K son mayores que los que no lo presentan, lo cual sigue la tónica del resultado general, aunque esto sólo tiene significación estadística en los individuos que no presentan el alelo E4 de la apoe

(p=0'043), donde los pacientes que tienen el alelo K son los de más edad cuando se diagnostican.

Estudiamos, además, la posibilidad de que existiera distinta relación con la edad según el número de alelos K presente, pero sólo existían diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el tener 1 alelo K (heterocigoto K) frente a no tener ninguno.

Pensamos que el haber establecido un efecto dosis con sólo la presencia de 1 alelo frente a 0 alelos es debido, sin lugar a dudas, al pequeño tamaño de nuestra casuística con respecto a los homocigotos para el alelo K, ya que, como podemos observar en la Tabla R16, el número de sujetos homocigotos para el alelo K es muy pequeño, y creemos que esto esté condicionando la significación del estadístico de 2 alelos frente a 0 alelos y edad al diagnóstico.

3.3.- MIELOPEROXIDASA

La mieloperoxidasa es una proteína que forma parte del sistema de defensa de los PMN humanos a través de la generación de ácido hipoclórico y otras especies oxígeno-reactivas. Localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo, se cree que podría ayudar a proteger el ADN contra el daño resultante de los radícales oxígeno producidos durante la maduración y funcionamiento de las células mieloides [Murao, 1988].

Respecto a la EA, la expresión de la mpo es mayor en los cerebros de los pacientes de Alzheimer, de tal manera que podría contribuir al estrés oxidativo implicado en la patogénesis de esta enfermedad [Green, 2004; Casado, 2008], que precede a la aparición de las placas amiloideas y las redes neurofibrilares [Zafrilla, 2006]. Desde 1999 se pudo observar que colocalizaba con las placas amiloideas y que presentaba un polimorfismo de promotor en su gen, -463 G/A, relacionado con la EA [Reynolds,

1999], concretamente, este genotipo contribuía con 1,57 veces más riesgo de padecer la enfermedad [Crawford, 2001].

Sin embargo, los estudios iniciales que relacionaron el polimorfismo -463 G/A del promotor del gen de la mieloperoxidasa con la enfermedad de Alzheimer [Reynolds, 2000; Crawford, 2001], al ser replicados en otras poblaciones, no han mostrado asociación significativa [Combarros, 2002; Styczynska, 2003; Usui, 2006].

En el caso concreto de nuestro trabajo, aunque pudimos comprobar una significación entre el alelo -463G y la EA, pensamos que este resultado es bastante débil, ya que el número de alelos -463A es muy bajo en comparación con el G, y consideramos que podría estar alterando la significación de esta asociación. Así, cuando estudiamos la presencia de estos alelos en los individuos, comprobamos que no existe relación de éstos con la EA.

Lo mismo ocurrió cuando estratificamos por la presencia / ausencia de la variante E4 de la apolipoproteína E, encontrando asociación del alelo -463G del promotor de la MPO con el diagnóstico de la enfermedad, pero únicamente en aquellos individuos que no portaban el alelo E4. Creemos que esto podría estar condicionado por el pequeño número de sujetos sobre los que se basaba, sobre todo, en aquellos que no presentaban el alelo -463G, donde el número de individuos nunca superó los 22. El presente resultado es algo similar a lo publicado por Leininger-Muller et al, que, aunque encuentran asociación del polimorfismo -463 G/A con esta enfermedad, dado el bajo nivel significativo del p valor, no sugieren un efecto causal de éste con la EA, hipotetizando sobre un posible desequilibrio de ligamiento de este polimorfismo con otra variante funcional implicada en la EA [Leininger-Muller, 2003].

En cuanto a la edad al diagnóstico, aunque no pudimos encontrar relación alguna con ésta cuando estudiamos al total de los pacientes (p=0,663), al estratificar por presencia / ausencia de APOE E4, pudimos observar que los individuos homocigotos para el alelo -463G y con E4 presente, adelantaban su edad al diagnóstico (p=0,004),

como ocurre con la población masculina en el trabajo de Reynolds et al [Reynolds, 2000].

En esta ocasión no realizamos el estudio del posible efecto dosis del alelo -463G sobre la edad al diagnóstico y la presencia / ausencia de E4, puesto que el número de individuos se reducía considerablemente.

Por tanto, el análisis de los datos generados durante este estudio, pone de manifiesto que el polimorfismo -463 G/A del promotor de la MPO, no condiciona la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer, tanto en el total de individuos, como separando por géneros, aunque sí parece estar influyendo en la edad de diagnóstico de la misma.

3.4.- CITOQUINAS (TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-10, IL-1alfa, IL-1beta e IL-6) Y SISTEMA HLA

La idea de una relación alterada entre el sistema inmune y el sistema nervioso, en la EA, es innegable [Martínez, 1993].

Entre los muchos componentes presentes en las lesiones de la EA, mayoritariamente asociados con estados inflamatorios e inmunológicos, la presencia de linfocitos B o de anticuerpos no se ha constatado hasta ahora, siendo escasa la presencia de linfocitos T. Por tanto, la reacción no es una reacción autoinmune, a pesar del ataque dirigido contra las placas, ni una respuesta no específica al daño, tal y como clásicamente se han implicado en las reacciones inflamatorias. El hecho que tal reacción tenga lugar en el cerebro, un órgano frecuentemente descrito como “inmunológicamente privilegiado”, sugiere que es necesario una reevaluación de las dimensiones del sistema inmune innato, incluyendo como opera a nivel tisular [McGeer, 2000].

Aunque aún permanecen desconocidas las causas moleculares y celulares precisas, la evidencia de la relación entre la deposición de beta-amiloide y la respuesta

inflamatoria en la EA es cada vez mayor [Rosenberg, 2005; Sastre, 2006], y los trabajos realizados por diferentes equipos en diferentes poblaciones, han revelado la asociación de esta enfermedad con diversos polimorfismos que regulan la respuesta inmuno-inflamatoria, como por ejemplo el sistema HLA o algunas citoquinas [Koivisto, 2005; Lio, 2006; Ramos, 2006].

Así, la inflamación ya iniciada por la presencia de beta amiloide podría estar siendo reforzada por un desequilibrio entre interleuquinas pro y antiinflamatorias, de tal modo que la existencia de un "perfil genético de susceptibilidad" regulara la transcripción de las mismas, dando lugar a un exceso de citoquinas proinflamatorias y defecto de las antiinflamatorias.

Del total de polimorfismos de citoquinas y HLA estudiados en nuestro trabajo, sólo hemos observado relación con la enfermedad de Alzheimer en dos de ellos: IL-1beta (-511 C/T) e IL-6 (-174 G/C). En cuanto al resto de polimorfismos, no observamos ningún tipo de relación con la enfermedad, ni como posibles factores de susceptibilidad ni en relación con la edad al diagnóstico, tanto en el total de individuos como separando por género o presencia / ausencia del alelo E4 de la apolipoproteína E.

3.4.1.-INTERLEUQUINA 1

La interleuquina 1 es, junto con la IL-6 y el TNF-alfa, la citoquina más estudiada en la enfermedad de Alzheimer. De los tres polimorfismos estudiados para esta interleuquina, IL-1alfa (-889 C/T), IL-1beta (-511 C/T) e IL-1beta (+3953 T/C), sólo el polimorfismo de promotor -511 C/T de la IL-1 beta ha mostrado en nuestro estudio una clara asociación con la EA.

Por otra parte, el alelo -511T ha sido asociado con una mayor concentración plasmática de IL-1beta [Licastro, 2000], lo que nos sugiere que puede conducir a una mayor transcripción de esta citoquina y por tanto, favorecer la inflamación en la enfermedad de Alzheimer.

En este estudio hemos observado una mayor presencia del alelo -511T en el grupo de los pacientes; de hecho, cuando estudiamos el posible efecto dosis con respecto a la susceptibilidad a la enfermedad, vemos que el ser homocigoto para este alelo muestra un resultado altamente significativo (p=0,012). Hemos de tener en cuenta que, al estudiar este efecto dosis, hemos comparado el tener 2 alelos T frente a no tener ninguno, y cuando estudiamos tener 1 alelo T frente a no tener ninguno hemos de recordar que esto es también tener un alelo C, el cual sugería cierta protección frente a la enfermedad (Tabla R31); por tanto, es posible que en el caso de los heterocigotos, la susceptibilidad de T se anule con la protección de C, y por ello no observamos significación estadística en el caso de los heterocigotos.

La susceptibilidad a la EA, con respecto al alelo -511T, se mantiene en presencia como en ausencia de APOE E4, lo que nos indica que actúa como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad.

3.4.2.- INTERLEUQUINA 6

Como ya se ha comentado, en los casos de EA se ha observado la presencia de IL-6 en las placas amiloideas y niveles plasmáticos de esta interleuquina más elevados [Baranowska-Bik, 2008; Bermejo, 2008]. Asimismo, el gen de la IL-6 humana, presenta el polimorfismo -174 G/C en su región promotora, donde el alelo C se ha asociado con una expresión génica reducida y también disminución de los niveles plasmáticos de esta interleuquina [Capurso, 2004], además de relacionársele con un retraso en la edad de inicio y un riesgo reducido de la enfermedad [Papassotiropoulos, 1999]

Cuando llevamos a cabo el estudio genotípico de este polimorfismo, no encontramos relación alguna de la IL-6 con la EA en el total de los individuos, coincidiendo con lo publicado por otros autores [van Oijen, 2006]; pero cuando estratificamos el genotipo por presencia / ausencia del alelo APOE E4, sí que aparecía una asociación claramente significativa en el grupo que no tenían este alelo APOE E4 (p=0,025). Del mismo modo, al realizar el estudio alélico observamos asociación estadísticamente significativa del alelo -174G con la EA (p=0,017).

No encontramos asociación alguna de este polimorfismo con la edad al diagnóstico.

Así pues, y aparentemente, el alelo -174G de la interleuquina 6 estaría relacionado con la enfermedad en aquellos pacientes que no tienen la isoforma apoe E4.

A la vista de estos resultados, por lo tanto, parece que los pacientes de Alzheimer analizados presentan un genotipo alto productor de IL-1 (IL-1 beta -511T) junto con el alelo G de la IL-6, que también conlleva a una mayor producción de la misma [Capurso, 2004], con lo que tendríamos una configuración proinflamatoria en los individuos de los genotipos IL-1beta -511T e IL-6 -174G, que favorecería, en gran medida, la inflamación descrita en los cerebros de estos pacientes.

4.- ESTUDIO MULTIVARIABLE DE LOS MARCADORES ANALIZADOS

Por medio de un estudio de regresión logística, y teniendo en cuenta el género, los polimorfismos en estudio y el genotipo APOE, observamos que, efectivamente, el alelo -511T del promotor de la IL-1beta se comporta como un factor independiente para el desarrollo de la enfermedad, mientras que el alelo -174G del promotor de la IL-6 no actúa como factor de riesgo *per sé* en la aparición de la enfermedad de Alzheimer, aunque sí aumenta el riesgo conferido por la presencia del alelo APOE E4, así como del alelo -511T de la IL-1beta (Tabla R40), comportándose por ello como modificador del riesgo.

5.- ¿SON ÚTILES ESTOS MARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO?

Hasta ahora, la presencia del alelo E4 del gen de la apoe está claramente asociada con la enfermedad de tipo esporádica-tardía. En nuestra casuística, éste se manifiesta en el 48,9% de nuestros pacientes, o lo que es lo mismo, casi un 50% de los pacientes

no lo tienen, por lo que sería interesante encontrar otros posibles marcadores que pudieran ayudar en el diagnóstico de estos individuos negativos para apoe E4 [Hampel, 2004].

Así, hemos podido comprobar que en el resto de los pacientes no E4 encontramos que el alelo -511T de la IL-1beta está presente en el 61,8% de éstos (Tabla R32), con lo que, prácticamente en el 80,5 % de nuestros pacientes clínicamente diagnosticados de EA, tenemos un marcador asociado a la misma (APOE E4, IL-1beta -511T, o ambos a la vez), mientras que en el 19,5 % de los pacientes no existe ningún marcador que pueda ayudar al clínico en el diagnóstico del cuadro de EA.

Por tanto, creemos que estos marcadores son útiles siempre y cuando se usen en un entorno exclusivamente clínico, es decir, ante la presencia de una sospecha clínica de demencia tipo Alzheimer, de tal manera que pueden ayudar al clínico a afianzar el diagnóstico precoz (como es el caso de la apoe, que ya se utiliza como apoyo al diagnóstico clínico según los criterios diagnósticos de Robles et al [Robles, 2002] [ANEXO I]), mientras que como predictores de EA en ausencia de cuadro de demencia no tienen validez alguna.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En nuestra casuística, el porcentaje de enfermos aumenta a medida que aumenta la edad.

2. En nuestra casuística, encontramos más del doble de mujeres que de hombres en el grupo de los pacientes.

3. En nuestro grupo de estudio hemos podido comprobar que el alelo E4 de la lipoproteína apoe, está asociado con la EA, incluso cuando hacemos este mismo estudio estratificando por género.

4. El riesgo asociado con el alelo E4 de la apoe es dosis dependiente, es decir, tener un alelo E4 conlleva un riesgo de padecer la enfermedad casi 3 veces mayor que cuando no se posee ningún alelo E4, mientras que ser homocigoto E 4/4 conlleva un riesgo 37 veces mayor que cuando no se tiene ninguno.

5. No encontramos relación de la presencia del alelo E4 de la apoe con la edad al diagnóstico, o lo que es lo mismo, una presentación más temprana de la enfermedad.

6. Respecto a la variante K de la butirilcolinesterasa, no encontramos ningún tipo de asociación con la susceptibilidad a la EA, ni genotípica ni alélica.

7. La presencia del alelo K de la BChE sí está relacionado con la edad al diagnóstico, de tal manera que retrasa la aparición de la enfermedad.

8. En el estudio del polimorfismo -463 G/A del gen de la MPO, éste no condiciona la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer, tanto en el total de individuos, como separando por géneros, aunque sí que parece estar influyendo en la edad de diagnóstico de la misma, adelantando su aparición en los individuos APOE4 positivos.

9. Del total de polimorfismos estudiados para las citoquinas (TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-10, IL-1alfa, IL-1beta e IL-6) y HLA (HLA-A2 y HLA-DR2), en nuestra casuística, sólo hemos observado relación con la enfermedad de Alzheimer en dos de ellos: IL-1beta (-511 C/T) e IL-6 (-174 G/C). En cuanto al resto de polimorfismos, no observamos ningún tipo de relación con la EA, ni como posibles factores de susceptibilidad, ni en relación con la edad al diagnóstico, tanto en el total de individuos como separando por género o presencia / ausencia del alelo E4 de la apolipoproteína E.

10. En este estudio, el alelo IL-1beta (-511T) actúa como factor de riesgo independiente para el desarrollo de EA.

11. Existe, además, un marcado efecto dosis del alelo IL-1beta (-511T) con respecto a la susceptibilidad a la enfermedad, aumentando el riesgo a la misma con el número de alelos.

12. No encontramos relación alguna del genotipo IL-6 (-174GG) con la EA en el total de los individuos, aunque sí hay asociación en los pacientes que no portan el alelo APOE E4.

13. El alelo -174G de la IL-6 no actúa como factor de riesgo *per se* en la aparición de la enfermedad de Alzheimer, sino como factor modificador de otros riesgos presentes, incrementando el riesgo conferido por la presencia del alelo APOE E4, así como del alelo -511T de la IL-1beta.

14. No hay asociación del polimorfismo -174 G/C de la IL-6 con la edad al diagnóstico.

15. Estos marcadores pueden ser de utilidad a los neurólogos siempre y cuando se usen en un entorno estrictamente clínico, es decir, ante la presencia de una sospecha clínica de demencia tipo Alzheimer, de tal manera que pueden ayudar al clínico a afianzar el diagnóstico precoz, mientras que como predictores de EA, en ausencia de cuadro de demencia, no tienen validez alguna.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarsland D, Rongve A, Nore SP, Skogseth R, Skulstad S, Ehrt U, Hoprekstad D, Ballard C. Frequency and Case Identification of Dementia with Lewy Bodies Using the Revised Consensus Criteria. Dement Geriatr Cogn Disord 2008;26:445-452

2. Abbas, AK. Inmunología Celular y Molecular, 5ª Edición. Elsevier. 2005

3. Aisen PS, Davis KL. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implications for therapy. Am J Psychiatry. 1994 Aug;151(8):1105-13

4. Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. J. Neurochem. 2000. 74, 869-877

5. Alvarez V, Mata IF, Gonzalez P, Lahoz CH, Martinez C, Pena J, Guisasola LM, Coto E. Association between the TNF alpha-308 A/G polymorphism and the onset-age of Alzheimer disease. Am J Med Genet. 2002 Jul 8;114(5):574-7

6. Amara FM, Junaid A, Clough RR, Liang B. TGF-beta(1), regulation of alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. Brain Res Mol Brain Res. 1999 Jul 23;71(1):42-9

7. Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. Brain Res. 2001 Mar 9; 894(1):21-30

8. Araria-Goumidi L, Lambert JC, Mann DM, Lendon C, Frigard B, Iwatsubo T, Cottel D, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. Association study of three polymorphisms of TGF-beta1 gene with Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002 Jul;73(1):62-4

9. Arosio B, Bergamaschini L, Galimberti L, La Porta C, Zanetti M, Calabresi C, Scarpini E, Annoni G, Vergani C. +10 T/C polymorphisms in the gene of transforming growth factor-beta1 are associated with neurodegeneration and its clinical evolution. Mech Ageing Dev. 2007 Oct;128(10):553-7

10. Arosio B, Trabattoni D, Galimberti L, Bucciarelli P, Fasano F, Calabresi C, Cazzullo CL, Vergani C, Annoni G, Clerici M. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2004 Sep;25(8):1009-15

11. Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, Lendon C, Han SW, Morris JC, Vázquez J, Goate A, Valdivieso F. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. Hum Mol Genet. 1998a Nov; 7(12):1887-1892

12. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vázquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. FEBS Letters 1998b 421:105-108

13. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vázquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's disease. Nat Genet. 1998c Jan; 18(1):69-71

14. Asthana S, Baker LD, Craft S, Stanczyk FZ, Veith RC, Raskind MA, Plymate SR. High-dose estradiol improves cognition for women with AD: results of a randomized study. Neurology. 2001 Aug 28;57(4):605-12

15. Avila J, Lucas JJ, Pérez M, Hernández F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiol Rev. 2004. 84: 361-384

16. Bagli M, Papassotiropoulos A, Knapp M, Jessen F, Luise Rao M, Maier W, Heun R. Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in a German population. Neurosci Lett. 2000 Apr 7;283(2):109-12

17. Bagnoli S, Cellini E, Tedde A, Nacmias B, Piacentini S, Bessi V, Bracco L, Sorbi S. Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2007 May 18;418(3):262-5

18. Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. EMBO J. 2004 Jul 7;23(13):2586-96

19. Ball MJ. Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpes virus involved?. Can J Neurol Sci. 1982 Aug;9(3):303-6

20. Ballard C, Morris C, Kalaria R, McKeith I, Perry R, Perry E. The k variant of the butyrylcholinesterase gene is associated with reduced phosphorylation of tau in dementia patients. Dement Geriatr Cogn Disord. 2005;19(5-6):357-60

21. Ballerini C, Nacmias B, Rombolà G, Marcon G, Massacesi L, Sorbi S. HLA A2 allele is associated with age at onset of Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1999 Mar;45(3):397-400

22. Bamberger ME, Landreth GE. Microglial interaction with beta-amyloid: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Microsc Res Tech. 2001 Jul 15;54(2):59-70

23. Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Barcikowska M, Baranowska B. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. Neuro Endocrinol Lett. 2008 Feb;29(1):75-9

24. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. Nat Med. 2000 Aug;6(8):916-9

25. Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonego A. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J. 2008 Aug;22(8):2843-52

26. 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(5):1086-1103

27. 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 Aug 25;257(16):9788-95

28. Beal MF, Growdon JH. CSF neurotransmitter markers in Alzheimer's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1986;10(3-5):259-70

29. Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Immunol Lett. 2008 May 15;117(2):198-202

30. Bermejo-Pareja F, Benito-León J, Vega S, Medrano MJ, Román GC; Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. J Neurol Sci 2008. 15, 264 (1-2)63-72

31. Bertram L, Tanzi R. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?. Hum Mol Genet. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R135-41

32. Beyer K, Lao JI, Latorre P, Ariza A. Age at onset: an essential variable for the definition of genetic risk factors for sporadic Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1057:260-78

33. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. Nat Genet. 1998 Aug;19(4):357-60

34. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006 Jul 29;368(9533):387-403

35. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res. 1976 Sep;3(9):2303-8

36. Blurton-Jones M, Laferla FM. Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. Curr Alzheimer Res. 2006 Dec;3(5):437-48

37. Boada M, Peña-Casanova J, Bermejo F, Guillén F, Hart WM, Espinosa C, Rovira J. Costs of health care resources of ambulatory-care patients diagnosed with Alzheimer's disease in Spain. Med Clin (Barc). 1999 Nov 27;113(18):690-5

38. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-59

39. Breitner JC. Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal. Neurobiol Aging. 1996 Sep-Oct;17(5):789-94

40. Breslow JL, Zannis VI, SanGiacomo TR, Third JL, Tracy T, Glueck CJ. Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2. J Lipid Res. 1982 Nov;23(8):1224-35

41. Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 28;92(7):3032-5

42. Brun A, Englund E. Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. Histopathology. 1981 Sep;5(5):549-64

43. Brun A, Gustafson L. Distribution of cerebral degeneration in Alzheimer's disease. A clinico-pathological study. Arch Psychiatr Nervenkr. 1976 Dec 31;223(1):15-33

44. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1999 Jul;54(7):M357-64

45. Bullido MJ, Valdivieso F. Fronteras en la enfermedad de Alzheimer. Cap 4. Disección genética de la enfermedad de Alzheimer. Farmaindustria en colaboración con el Instituto y Fundación Teófilo Hernando. Universidad Autónoma de Madrid. 2002

46. Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Valdivieso F. Apolipoprotein E genotype influences vertical transmission of herpes simplex virus type 1 in a gender specific manner. Aging Cell. 2007 Dec;6(6):841-2

47. Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Valdivieso F. Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simples virus type 1 in DNA. J Virol. 2006 Jun;80(11):5383-7

48. Burton T, Liang B, Dibrov A, Amara F. Transcriptional activation and increase in expression of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene is mediated by TGF-beta in normal human astrocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jul 19;295(3):702-12

49. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. Neuron. 1995 Apr; 14(4):879-88

50. Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10075-8

51. Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Capurso A, Panza F. Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. Exp Gerontol. 2004 Oct;39(10):1567-73

52. Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. J Neurosci. 2007 Nov 28;27(48):13357-65

53. Casado A, López-Fernández M, Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. Neurochem Res. 2008 Mar;33(3):450-8

54. Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, Gephart J, Meisel C, Muller JM, Loddenkemper R, Roots I. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. Cancer Res. 2000. 1;60(3):644-9

55. Chabrieres et al. Involvement of HLA-B5 in the early onset of sporadic Alzheimer's disease. Research and practice in Alzheimer's Disease. 1998; 71-76

56. Chandra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Robson KJ, Woo SL. Sequence homology between human alpha 1-antichymotrypsin, alpha 1-antitrypsin, and antithrombin III. Biochemistry. 1983 Oct 25;22(22):5055-61

57. Chandra V, Kokmen E, Schoenberg BS, Beard CM. Head trauma with loss of consciousness as a risk factor for Alzheimer's disease. Neurology.1989 Dec;39(12):1576-8

58. Chapman J, Vinokurov S, Achiron A, Karussis DM, Mitosek-Szewczyk K, Birnbaum M, Michaelson DM, Korczyn AD. APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. Neurology 2001; 56: 312-316

59. Chataway J, Sawcer S, Feakes R, Coraddu F, Broadley S, Jones HB, Clayton D, Gray J, Goodfellow PN, Compston A. A screen of candidates from peaks of linkage: evidence for the involvement of myeloperoxidase in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1999. 3;98(2):208-13

60. Cheon MS, Bajo M, Gulesserian T, Cairns N, Lubec G. Evidence for the relation of herpes simplex virus type 1 to Down syndrome and Alzheimer's disease. Electrophoresis. 2001 Feb;22(3):445-8

61. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr. 2000 Feb;71(2):621S-629S

62. Chung H, Brazil MI, Soe TT, Maxfield FR. Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells. J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):32301-8

63. Clark CM, Karlawish JH. Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies.Ann Intern Med. 2003 Mar 4;138(5):400-10

64. Combarros O, Escribano J, Sánchez-Velasco P, Leyva-Cobián F, Oterino A, Leno C, Berciano J. Association of the HLA-A2 allele with an earlier age of onset of Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand. 1998 Aug;98(2):140-1

65. Combarros O, Infante J, Llorca J, Peña N, Fernández-Viadero C, Berciano J. The myeloperoxidase gene in Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis. Neurosci Lett. 2002a Jun 21;326(1):33-6

66. Combarros O, Riancho JA, Infante J, Sañudo C, Llorca J, Zarrabeitia MT, Berciano J. Interaction between CYP19 aromatase and butyrylcholinesterase genes increases Alzheimer's disease risk. Dement Geriatr Cogn Disord. 2005;20(2-3):153-7

67. Combarros O, Sanchez-Guerra M, Infante J, Llorca J, Berciano J. Gene dose-dependent association of interleukin-1 A[-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. J Neurol. 2002b 249(9):1242-5

68. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. J Neurosci. 2001 Feb 15;21(4):1179-88

69. Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM, Wojczyk BS, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Lee VM, Doms RW. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):9223-8

70. Cook LJ, Ho LW, Wang L, Terrenoire E, Brayne C, Evans JG, Xuereb J, Cairns NJ, Turic D, Hollingworth P, Moore PJ, Jehu L, Archer N, Walter S, Foy C, Edmondson A, Powell J, Lovestone S, Williams J, Rubinsztein DC. Candidate gene association studies of genes involved in neuronal cholinergic transmission in Alzheimer's disease suggests choline acetyltransferase as a candidate deserving further study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Jan 5;132(1):5-8

71. Corder EH, Saunder AM, Risch NJ, 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 261:921-923

72. Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Morris MD, Abdullah LI, Richards D, Sevush S, Duara R, Mullan MJ. Association between Alzheimer's disease and a functional polymorphism in the Myeloperoxidase gene. Exp Neurol. 2001 Feb;167(2):456-9

73. Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. Biochemistry. 2000 May 23;39(20):5988-94

74. Culpan D, Prince JA, Matthews S, Palmer L, Hughes A, Love S, Kehoe PG, Wilcock GK. Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2006 Nov 13;408(2):141-5

75. Cummings J, Benson DF, LoVerme SJr. Reversible dementia. Illustrative cases, definition, and review. JAMA. 1980 Jun 20; 243(23):2434-9

76. Cummings JL and Benson DF. Dementia, a clinical approach. Stonehamm, MA. Butterwort-Heinemann 1992, 45-94

77. Curran M, Middleton D, Edwardson J, Perry R, McKeith I, Morris C, Neill D. HLA-DR antigens associated with major genetic risk for late-onset Alzheimer's disease. Neuroreport. 1997 Apr 14;8(6):1467-9

78. Darvesh S, Hopkins D, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat Rev Neurosci. 2003; 4:131-38

79. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.Lancet. 1976 Dec 25;2(8000):1403 1405

80. 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 Jan 22;391(6665):387-90

81. Déniz-Naranjo MC, Muñoz-Fernandez C, Alemany-Rodríguez MJ, Pérez-Vieitez MC, Aladro-Benito Y, Irurita-Latasa J, Sánchez-García F. Cytokine IL-1 beta but not IL-1 alpha promoter polymorphism is associated with Alzheimer disease in a population from the Canary Islands, Spain. Eur J Neurol. 2008 Oct;15(10):1080-4

82. Depboylu C, Du Y, Müller U, Kurz A, Zimmer R, Riemenschneider M, Gasser T, Oertel WH, Klockgether T, Dodel RC. Lack of association of interleukin-10 promoter region polymorphisms with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2003 May 15;342(1-2):132-4

83. Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, Pickut BA, Peeters K, van den Broeck M, Vennekens K, Claes S, Cruts M, Cras P, Martin JJ, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. Ann Neurol. 2004 May;55(5):617-26

84. Devanand DP, Pelton GH, Zamora D, Liu X, Tabert MH, Goodkind M, Scarmeas N, Braun I, Stern Y, Mayeux R. Predictive utility of apolipoprotein E genotype for Alzheimer disease in outpatients with mild cognitive impairment. Arch Neurol. 2005 Jun;62(6):975-80

85. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM, Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. Immunogenetics. 2002 May; 54(2):82-6

86. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. Lancet Neurol. 2007 Aug;6(8):734-46

87. Egensperger R, Kosel S, von Eitzen U, Graeber MB. Microglial activation in Alzheimer disease: Association with APOE genotype. Brain Pathol. 1998 Jul;8(3):439-47

88. Ehl C, Kölsch H, Ptok U, Jessen F, Schmitz S, Frahnert C, Schlösser R, Rao ML, Maier W, Heun R. Association of an interleukin-1beta gene polymorphism at position -511 with Alzheimer's disease. Int J Mol Med. 2003 Feb;11(2):235-8

89. Forloni G, Demicheli F, Giorgi S, Bendotti C, Angeretti N. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. Brain Res Mol Brain Res. 1992 Nov;16(1-2):128-34

90. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, Wyvill K, Steinberg SM, Kovacs J, Blauvelt A, Yarchoan R, Chanock SJ. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. Blood. 2000 Oct 1;96(7):2562-7

91. Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology. 2000;54(11 Suppl 5):S10-5

92. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. J Neurochem. 1998 Nov;71(5):2034-40

93. Galeazzi L, Ronchi P, Franceschi C, Giunta S. *In vitro* peroxidase oxidation induces stable dimers of beta-amyloid (1-42) through dityrosine bridge formation. Amyloid. 1999. 6(1):7-13

94. Galimberti L, Arosio B, Calabresi C, Scurati S, Hamilton S, Carpini SD, Vergani C, Annoni G. +874(T-->A) single nucleotide gene polymorphism does not represent a risk factor for Alzheimer's disease. Immun Ageing. 2004 Nov 12;1(1):6

95. Garcia-Alloza M, Tsang SW, Gil-Bea FJ, Francis PT, Lai MK, Marcos B, Chen CP, Ramirez MJ. Involvement of the GABAergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2006 Aug;27(8):1110-7

96. García-García FJ, Sánchez Ayala MI, Pérez-Martín A, et al. Prevalencia de demencia y de sus subtipos en sujetos mayors de 65 años: efectos de la educación y ocupación. Estudio Toledo. Med Clin 2001; 116: 401-407

97. Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B. International Psychogeriatric Association Expert Conference on mild cognitive impairment. Mild cognitive impairment. Lancet. 2006 Apr 15; 367(9518):1262-70

98. Gaynor JW, Gerdes M, Zackai EH, Bernbaum J, Wernovsky G, Clancy RR, Newman MF, Saunders AM, Heagerty PJ, D'Agostino JA, McDonald-McGinn D, Nicolson SC, Spray TL, Jarvik GP. Apolipoprotein E genotype and neurodevelopmental sequelae of infant cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Dec;126(6):1736-45

99. Gedye A, Beattie BL, Tuokko H, Horton A, Korsarek E. Severe head injury hastens age of onset of Alzheimer's disease. J Am Geriatr Soc. 1989 Oct;37(10):970-3

100. Geula C, Mesulam M. Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. Brain Res. 1989. 498 (1):185-189

101. Ghebremedhin E, Schultz C, Thal DR, Rüb U, Ohm TG, Braak E, Braak H. Gender and age modify the association between APOE and AD-related neuropathology. Neurology. 2001 Jun 26;56(12):1696-701

102. Ghebremedhin E, Thal DR, Schultz C, Braak H, Deller T. Homozygosity for the K variant of BCHE gene increases the risk for development of neurofibrillary pathology but not amyloid deposits at young ages. Acta Neuropathol. 2007 Oct;114(4):359-63

103. Ghebremedhin E, Thal DR, Schultz C, Braak H. Age-dependent association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease-related neuropathology in human brains. Neurosci Lett. 2002 Mar 1;320(1-2):25-8

104. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. Pharmacol Res. 2004 Oct;50(4):433-40

105. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun. 1984 May 16;120(3):885-90

106. Gomez-Ramos P, Moran MA. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase en senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. Mol Chem Neuropathol. 1997. 30(3):161-173

107. González C, Martín T, Cacho J, Breñas MT, Arroyo T, García-Berrocal B, Navajo JA, González-Buitrago JM. Serum zinc, copper, insulin and lipids in Alzheimer's disease epsilon 4 apolipoprotein E allele carriers. Eur J Clin Invest. 1999 Jul;29(7):637-42

108. Gottfries CG. Alzheimer's disease and senile dementia: biochemical characteristics and aspects of treatment. Psychopharmacology (Berl). 1985;86(3):245-52

109. Grammas P, Ovase R. Cerebrovascular transforming growth factor-beta contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain. Am J Pathol. 2002 May;160(5):1583-7

110. Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB, Raskind M. The association between head trauma and Alzheimer's disease. Am J Epidemiol. 1990 Mar;131(3):491-501

111. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2004 Aug;90(3):724-33

112. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. Am J Clin Nutr. 2006 Feb;83(2):470S-474S

113. Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. Ann Neurol. 2000 Mar;47(3):361-5

114. 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 Jul 9;269(2):115-9

115. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986 (83):4913-4917

116. Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC, Mesulam MM. Butyrylcholinesterase in the life of amyloid plaques. Ann Neurol. 1997. 42(6):909-918

117. Guimera A, Girones X, Cruz-Sánchez FF. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. Rev Esp Patol 2002; 35 (1):21-48

118. Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC, Sadovnick AD, Duara R, DeCarli C, Johnson K, Go RC, Growdon JH, Haines JL, Kukull WA, Farrer LA. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. Neurology. 2000 Mar 28;54(6):1316-23

119. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PC, Farrer LA, Auerbach SA, Gusella JF, Locke PA, Rosi BL, Yamaoka L, Small GW, Conneally PM, Roses AD, Pericak-Vance MA. No genetic effect of alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. Genomics. 1996 Apr 1;33(1):53-6

120. Hamaguchi T, Okino S, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H, Yamada M. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with cerebral amyloid angiopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005 May;76(5):696-9

121. Hampel H, Mitchell A, Blennow K, Frank RA, Brettschneider S, Weller L, Möller HJ. Core biological marker candidates of Alzheimer's disease - perspectives for diagnosis, prediction of outcome and reflection of biological activity. J Neural Transm. 2004 Mar;111(3):247-72

122. 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 neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons *in vitro*. J Lipid Res. 1992 Nov;33(11):1677-88

123. Herl L, Thomas AV, Lill C, Banks M, Deng A, Jones PB, Spoelgen R, Hyman BT, Berezovska O. Mutations in amyloid precursor protein affect its interactions with presenilin/gamma-secretase. Mol Cell Neurosci. 2009 Jun;41(2):166-74.

124. Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Koivisto A, Lehtovirta M, Ryynänen M, Riekkinen P Sr, 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 Jun 26;250(1):69-71

125. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res. 1990 Mar;31(3):545-8

126. Hoenicka J. Genes in Alzheimer's disease. Rev Neurol. 2006 Mar 1-15;42(5):302-5

127. Holmes C, Ballard C, Lehmann D, David Smith A, Beaumont H, Day IN, Nadeem Khan M, Lovestone S, McCulley M, Morris CM, Munoz DG, O'Brien K, Russ C, Del Ser T, Warden D. Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: effect of butyrylcholinesterase K gene variation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005 May;76(5):640-3

128. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. Lancet. 2008 Jul 19;372(9634):216-23

129. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. Immunological aspectos of Alzheimer's disease: therapeutic implications. BioDrugs 2001a; 15(5):325-37

130. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, Rozemuller AJ, Eikelenboom P. Interleukin-1beta induced cyclooxygenasa 2 expression and prostaglandin E2 secretion by human neuroblastoma cells: implications for Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 2001b 36(3):559-70

131. Hu JL, Li G, Zhou DX, Zou YX, Zhu ZS, Xu RX, Jiang XD, Zeng YJ. Genetic analysis of Interleukin-1A C(-889)T polymorphism with Alzheimer disease. Cell Mol Neurobiol. 2009 Feb;29(1):81-5

132. Huberman M, Shalit F, Roth-Deri I, Gutman B, Brodie C, Kott E, Sredni B. Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage. J Neuroimmunol. 1994 Jul;52(2):147-52

133. Huemer HP, Menzel HJ, Potratz D, Brake B, Falke D, Utermann G, Dierich MP. Herpes simplex virus binds to human serum lipoprotein. Intervirology. 1988;29(2):68-76

134. Hull M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J.The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Behav Brain Res. 1996 Jun;78(1):37-41

135. Instituto de Estadística de Canarias (ISTAC). Gobierno de Canarias. 2008

136. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. Lancet. 1997 Jan 25;349(9047):241-4

137. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). Neuron. 1994 Jul;13(1):45-53

138. Jack CR Jr, Dickson DW, Parisi JE, Xu YC, Cha RH, O'Brien PC, Edland SD, Smith GE, Boeve BF, Tangalos EG, Kokmen E, Petersen RC. Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia. Neurology. 2002 Mar 12;58(5):750-7

139. Jagust W, Thisted R, Devous MD Sr, Van Heertum R, Mayberg H, Jobst K, Smith AD, Borys N. SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical-pathologic study. Neurology. 2001 Apr 10;56(7):950-6

140. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Yates CM, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. J Pathol. 1992 Aug;167(4):365-8

141. Jolivalt C, Leininger-Muller B, Bertrand P, Herber R, Christen Y, Siest G.: Differential oxidation of apolipoprotein E isoforms and interaction with phospholipids. Free Radic Biol Med. 2000. 1;28(1):129-40

142. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. Nat Genet. 1995 Aug;10(4):486-8

143. Kan CC, Solomon E, Belt KT, Chain AC, Hiorns LR, Fey G. Nucleotide sequence of cDNA encoding human alpha 2-macroglobulin and assignment of the chromosomal locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Apr;82(8):2282-6

144. Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M (Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. Ann Neurol. 2000 May;47(5):571-4

145. Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. Neurology. 1997 Jun;48(6):1517-21

146. Kehoe PG, Williams H, Holmans P, Wilcock G, Cairns NJ, Neal J, Owen MJ. The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease. J Med Genet. 1998 Dec;35(12):1034-5

147. King ME, Kan HM, Baas PW, Erisir A, Glabe CG, Bloom GS. Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. J Cell Bio. 2006 Nov 20; 175(4):541-6

148. Koivisto AM, Helisalmi S, Pihlajamaki J, Moilanen L, Kuusisto J, Laakso M, Hiltunen M, Keijo K, Hanninen T, Helkala EL, Kervinen K, Kesaniemi YA, Soininen H. Interleukin-6 promoter polymorphism and late-onset Alzheimer's disease in the Finnish population. Journal of neurogenetics. 2005; 19(3-4):155-61

149. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986 (83):4044-4048

150. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. Nat Med. 1996 Feb;2(2):224-9

151. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lightstone H, Van der Spek A, Lockridge O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. Clin Biochem. 1990 Oct;23(5):423-31

152. LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. J Biol Chem. 1994 Sep 23;269(38):23403-6

153. LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT. Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. J Biol Chem. 1995 Apr 21;270(16):9039-42

154. Lane R, Feldman HH, Meyer J, He Y, Ferris SH, Nordberg A, Darreh-Shori T, Soininen H, Pirttilä T, Farlow MR, Sfikas N, Ballard C, Greig NH. Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. Pharmacogenet Genomics. 2008 Apr;18(4):289-98

155. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. Int J Neuropsychopharmacol. 2006 Feb;9(1):101-24

156. Le Marchand L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR. Association of the myeloperoxidase -463G-->a polymorphism with lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000. 9(2):181-4

157. Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes por butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. Human Molecular Genetics. 1997. 6(11):1933-1936

158. Lehmann DJ, Worwood M, Ellis R, Wimhurst VL, Merryweather-Clarke AT, Warden DR, Smith AD, Robson KJ. Iron genes, iron load and risk of Alzheimer's disease. J Med Genet. 2006 Oct;43(10):e52

159. Leininger-Muller B, Hoy A, Herbeth B, Pfister M, Serot JM, Stavljenic-Rukavina M, Massana L, Passmore P, Siest G, Visvikis S. Myeloperoxidase G-463A polymorphism and Alzheimer's disease in the ApoEurope study. Neurosci Lett. 2003 Oct 2;349(2):95-8

160. Lesné S, Docagne F, Gabriel C, Liot G, Lahiri DK, Buée L, Plawinski L, Delacourte A, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Transforming growth factor-beta 1 potentiates amyloid-beta generation in astrocytes and in transgenic mice. J Biol Chem. 2003 May 16;278(20):18408-18

161. Letenneur L, Pérès K, Fleury H, Garrigue I, Barberger-Gateau P, Helmer C, Orgogozo JM, Gauthier S, Dartigues JF. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. PLoS ONE. 2008;3(11):e3637

162. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science. 1995 Aug 18;269(5226):973-7

163. Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Presenilin 1 is linked with γ-secretase activity in detergent solubilized state. PNAS 2000; 97;6138-6143

164. Licastro F, Pedrini S, Ferri C, Casadei V, Govoni M, Pession A, Sciacca FL, Veglia F, Annoni G, Bonafe M, Olivieri F, Franceschi C, Grimaldi LM. Gene polymorphism affecting alpha1-antichymotrypsin and interleukin-1 plasma levels increases Alzheimer's disease risk. Annals of neurology. 2000. 48(3):388-91

165. Licastro F, Veglia F, Chiappelli M, Grimaldi LM, Masliah E. A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2004 Sep;25(8):1017-22

166. Lin WR, Casas I, Wilcock GK, Itzhaki RF. Neurotropic viruses and Alzheimer's disease: a search for varicella zoster virus DNA by the polymerase chain reaction. Neurotropic viruses and Alzheimer's disease: a search for varicella zoster virus DNA by the polymerase chain reaction. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1997 Jun;62(6):586-9

167. Lin WR, Shang D, Itzhaki RF. Neurotropic viruses and Alzheimer disease. Interaction of herpes simplex type 1 virus and apolipoprotein E in the etiology of the disease. Mol Chem Neuropathol. 1996 May-Aug;28(1-3):135-41

168. Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Itzhaki RF. Alzheimer's disease, herpes simplex virus type 1, cold sores and apolipoprotein E4. Biochem Soc Trans. 1995 Nov;23(4):594S

169. Lio D, Annoni G, Licastro F, Crivello A, Forte GI, Scola L, Colonna-Romano G, Candore G, Arosio B, Galimberti L, Vergani C, Caruso C. Tumor necrosis factor-alpha -308A/G polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. Mechanisms of ageing and development. 2006;127(6): 567-71

170. Lio D, Licastro F, Scola L, Chiappelli M, Grimaldi LM, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Franceschi C, Caruso C. Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. Genes Immun. 2003 Apr;4(3):234-8

171. Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H. Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta -amyloid precursor protein and phospholipase D1. J Biol Chem. 2009 1;284(18):12145-52

172. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology. 2000;54(11 Suppl 5):S4-9

173. London SJ, Lehman TA, Taylor JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. Cancer Res. 1997. 15;57(22):5001-3

174. Lopez-Bastida J, Oliva-Moreno J, Perestelo-Perez L, Serrano-Aguilar P. The economic costs and health-related quality of life of people with HIV/AIDS in the Canary Islands, Spain. BMC Health Serv Res. 2009 Mar 30;9:55

175. López-Pousa S, Garre-Olmo J, Turon-Estrada A, Hernández F, Expósito I, Lozano-Gallego M, Hernández-Ferrándiz M, Gelada-Batlle E, Pericot-Nierga I, Vilalta-Franch J. Análisis de los costes de la enfermedad de Alzheimer en función del deterioro cognitivo y funcional. Med Clin 2004 may 29;122(20) 767-772

176. Luedecking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. Hum Genet. 2000 May; 106(5):565-9

177. Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2005 Jul;26(7):1005-10

178. Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield F. Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. Molecular Biology of the Cell 2007; 18:1490-1496

179. Maki RA, Tyurin VA, Lyon RC, Hamilton RL, Dekosky ST, Kagan VE, Reynolds WF. Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. J Biol Chem. 2009 Jan 30;284(5):3158-69

180. Manzano S, González J, Marcos A, Matías-Guiu J. Genetics and Alzheimer's disease. Neurología. 2009 Mar; 24(2):83-9

181. Marchesi VT. An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease.Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 28;102(26):9093-8

182. Martinez M, Frank A, Hernanz A. Relationship of interleukin-1 beta and beta 2-microglobulin with neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. J Neuroimmunol. 1993 Nov-Dec;48(2):235-40

183. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Nolan D, Gandy SE, Martins RN. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease.Mol Psychiatry. 2006 Aug;11(8):721-36

184. 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. 1985. 82:4245-4249

185. Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Okuda H, Yasuda Y, Miyata S, Meshitsuka S, Tohyama M. Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2. J Neurochem. 2004 Mar;88(6):1345-51

186. Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. Physiol Rev. 2002 Jul;82(3):637-72

187. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. Neuron 1993 Feb;10(2):243-54

188. 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 Feb 19;338(8):506-11

189. McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, McCullagh CD, Urquhart DD, Middleton D, Patterson CC, McIlroy Sp, Passmore AP. Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumour necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study. Lancet. 2001 Feb 10; 357(9254):436-9

190. McGeer PL, McGeer EG. Autotoxicity and Alzheimer disease.Arch Neurol. 2000 Jun;57(6):789-9

191. McGeer PL, McGeer EG. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. Arch Neurol. 2001 Nov; 58(11):1790-2

192. McIlroy 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 Mar;37(3):182-5

193. McRae A, Dahlstrom A, Ling EA. Microglial in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease. Gerontology. 1997;43(1-2):95-108

194. Mecocci P, Polidori MC, Ingegni T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. Neurology. 1998 Oct;51(4):1014-7

195. Meda L, Baron P, Prat E, Scarpini E, Scarlato G, Cassatella MA, Rossi F. Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]. J Neuroimmunol. 1999 Jan 1; 93(1-2):45-52

196. Mikami LR, Wieseler S, Souza RL, Schopfer LM, Lockridge O, Chautard-Freire-Maia EA. Expression of three naturally occurring genetic variants (G75R, E90D, I99M) of the BCHE gene of human butyrylcholinesterase. Pharmacogenet Genomics. 2007 Sep;17(9):681-5

197. Mikami LR, Wieseler S, Souza RL, Schopfer LM, Nachon F, Lockridge O, Chautard-Freire-Maia EA. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. Pharmacogenet Genomics. 2008 Mar;18(3):213-8

198. Moran MA, Mufson Ej, Gomez-Ramos P. Cholinesterases colocalize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brains. Acta Neuropathol (Berl). 1994. 87 (3):284-292

199. Moran MA, Mufson EJ, Gomez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Azlheimer’s brain. Acta Neuropathol (Berl). 1993. 85(4):362-369

200. Morgan K, Morgan L, Carpenter K, Lowe J, Lam L, Cave S, Xuereb J, Wischik C, Harrington C, Kalsheker NA. Microsatellite polymorphism of the alpha 1-antichymotrypsin gene locus associated with sporadic Alzheimer's disease. Hum Genet. 1997 Jan;99(1):27-31

201. Mori I, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Yokochi T, Nishiyama Y. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. J Med Virol. 2004 Aug;73(4):605-11

202. Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Rocca WA, et al. Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. Int J Epidemiol. 1991;20 Suppl 2:S28-35

203. Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer’s disease. Neurobiol Aging. 2001 Nov-Dec; 22(6):903-8

204. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73

205. Munoz DG, Feldman H. Causes of Alzheimer's disease.CMAJ. 2000 Jan 11;162(1):65-72

206. Murao SI, Stevens FJ, Ito A, Huberman E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. Proc. Nat. Acad. Sci. 1988. 85:1232-1236

207. Murphy GM Jr, Claassen JD, DeVoss JJ, Pascoe N, Taylor J, Tinklenberg JR, Yesavage JA. Rate of cognitive decline in AD is accelerated by the interleukin-1 alpha –889*1 allele. Neurology. 2001 Jun 12; 56(11): 1595-7

208. Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PWF, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A, Au R, White RF, Knoefel JE, Cobb JL, Mc Nulty KA, Beiser A, Wolf PA. Apolipoprotein E epsilon-4 association with dementia in a population-based study: the Framingham study. Neurology 1996 46:673-677

209. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1997. ;78(1-2):97-107

210. Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth *in vitro*. Science 1994 May 6;264(5160):850-2

211. Neill D, Curran MD, Middleton D, Mawhinney H, Edwardson JA, McKeith I, Ballard C, Morris C, Ince P, Jaros E, Perry R. Risk for Alzheimer's disease in older late-onset cases is associated with HLA-DRB1*03. Neurosci Lett. 1999 Nov 12;275(2):137-40

212. Nestor PJ, Fryer TD, Smielewski P, Hodges JR. Limbic hypometabolism in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Ann Neurol. 2003 Sep;54(3):343-51

213. Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. Ann Neurol. 2000 Mar;47(3):365-8

214. Nilsson et al. The essential role of inflammation and induced gene expression in the pathogenic pathway of Alzheimer's disease. Frontiers in Bioscience. 1998;3,d436-446

215. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. Circulation. 2003 Oct 14;108(15):1804-8

216. O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, Furie KL, Segal AZ, Chiu RI, Ikeda D, Greenberg SM. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage. N Engl J Med. 2000 Jan 27;342(4):240-5

217. O'Meara ES, Kukull WA, Sheppard L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Pfanschmidt M, Thompson JD, Schellenberg GD, Larson EB. Head injury and risk of Alzheimer's disease by apolipoprotein E genotype. Am J Epidemiol. 1997 Sep 1;146(5):373-84

218. Paganelli R, Di Iorio A, Patricelli L, Ripani F, Sparvieri E, Faricelli R, Iarlori C, Porreca C, Di Gioacchino M, Abate G. Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. Exp Gerontol. 2002. 37(2-3):257-63

219. Panegyres PK, Mamotte CD, Vasikaran SD, Wilton S, Fabian V, Kakulas BA. Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease. 1999. J Neurol 246(5):369-370

220. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1999 May; 45(5):666-8

221. Payami H, Kaye J, Becker W, Norman D, Wetzsteon P. HLA-A2, or a closely linked gene, confers susceptibility to early-onset sporadic Alzheimer's disease in men. Neurology. 1991 Oct;41(10):1544-8

222. Payami H, Schellenberg GD, Zareparsi S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA, Matsuyama SS, Jarvik LF, Miller B, McManus DQ, Bird TD, Katzman R, Heston L, Norman D, Small GW. Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. Neurology. 1997 Aug;49(2):512-8

223. Payami H, Zareparsi S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bird TD, Yu CE, Wijsman EM, Heston LL, Litt M, Schellenberg GD. Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for familial Alzheimer disease: a possible clue to the higher incidence of Alzheimer disease in women. Am. J. Hum. Genet. 1996 58:803-811

224. Peinado MA, Del Moral ML, Esteban FJ, Martínez Lara, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. Rev Neurol 2000; 31:1054-1065

225. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Azlheimer type. Neuropathol Appl Neurobiol. 1978. 4(4):273-277

226. Piccardi M, Congiu D, Squassina A, Manconi F, Putzu PF, Mereu RM, Chillotti C, Del Zompo M. Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in ACHE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Oct 5;144B(7):895-9

227. Placanica L, Zhu L, Li YM. Gender- and age-dependent gamma-secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease.PLoS ONE. 2009;4(4):e5088

228. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S,Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. Lancet 1993. 342:697-699

229. Pola R, Flex A, Gaetani E, Lago AD, Gerardino L, Pola P, Bernabei R. The –74 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promotor is associated with Alzheimer's disease in a Italian population. Neuroreport. 2002 16;13(13):1645-7

230. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. J Neurosci. 2006 Jul 5;26(27):7212-21

231. Pyles RB. The association of herpes simplex virus and Alzheimer's disease: a potential synthesis of genetic and environmental factors. Herpes. 2001 Nov;8(3):64-8

232. Rakonczay Z, Horvath Z, Juhasz A, Kalman J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. Chem Biol Interact. 2005 Dec 15;157-158:233-8

233. Ramos EM, Lin MT, Larson EB, Maezawa I, Tseng LH, Edwards KL, Schellenberg GD, Hansen JA, Kukull WA, Jin LW. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. Archives of neurology. 2006. 63(8):1165-9

234. Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, Gass MG, Stefanick ML, Lane DS, Hays J, Jonson KC, Coker LH, Dailey M, Bowen D. Effect of Estrogen Plus Progestin on Global Cognitive Function in Postmenopausal Women: The Women's Health Initiative Memory Study: A Randomized Controlled Trial. JAMA. 2003;289:2663-2672

235. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. Nat Med. 2007 Nov;13(11):1359-62

236. Raygani AV, Zahrai M, Raygani AV, Doosti M, Javadi E, Rezaei M, Pourmotabbed T. Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. Neurosci Lett. 2005 Feb 25;375(1):1-6

237. Raygani AV, Zahrai M, Soltanzadeh A, Doosti M, Javadi E, Pourmotabbed T. Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2004 Nov 23;371(2-3):142-6

238. Remarque EJ, Bollen EL, Weverling-Rijnsburger AW, Laterveer JC, Blauw GJ, Westendorp RG. Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. Exp Gerontol. 2001 Jan;36(1):171-6

239. Renvoize EB. An HLA and family study of Alzheimer’s disease. Psychol Med. 1984; 14(3):515-20

240. Reynolds WF, Hiltunen M, Pirskanen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Soininen H. MPO and APOEepsilon4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. Neurology. 2000 Nov 14;55(9):1284-90

241. Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. Exp Neurol. 1999.155(1):31-41

242. Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. Science. 2007 May 4;316(5825):750-4

243. Robles A, Del Ser T, Alom J, Peña-Casanova J; Grupo Asesor del Grupo de Neurologia de la Conducta y Demencias de la Sociedad Española de Neurología. Propuesta de criterios para el diagnóstico clínico del deterioro cognitivo ligero, la demencia y la enfermedad de Alzheimer. Neurologia. 2002 Jan;17(1):17-32

244. Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, et al. Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. Ann Neurol. 1991 Sep;30(3):381-90

245. Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Juan P, Mateo I, Llorca J, Infante J, García-Gorostiaga I, Berciano J, Combarros O. Serum levels and genetic variation of TGF-beta1 are not associated with Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand. 2007 Dec;116(6):409-12

246. Rogaeva EA, Premkumar S, Grubber J, Serneels L, Scott WK, Kawarai T, Song Y, Hill DL, Abou-Donia SM, Martin ER, Vance JJ, Yu G, Orlacchio A, Pei Y, Nishimura M, Supala A, Roberge B, Saunders AM, Roses AD, Schmechel D, Crane-Gatherum A, Sorbi S, Bruni A, Small GW, Conneally PM, Haines JL, Van Leuven F, St George-Hyslop PH, Farrer LA, Pericak-Vance MA. An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease. Nat Genet. 1999 May;22(1):19-22

247. Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Walker D, McGeer P. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. Neurobiol Aging. 1996 Sep-Oct;17(5):681-6

248. Roitt. Inmunología. Fundamentos. 10ª Edición. Panamericana. 2003

249. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. Int Rev Psychiatry. 2005 Dec;17(6):503-14

250. Rosenmann H, Meiner Z, Dresner-Pollak R, Kahana E, Aladjem Z, Grenader T, Wertman E, Abramsky O. Lack of association of interleukin-1beta polymorphism with Alzheimer's disease in the Jewish population. Neurosci Lett. 2004 Jun 10;363(2):131-3

251. Rossor MN, Iversen LL, Reynolds GP, Mountjoy CQ, Roth M. Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease.Br Med J (Clin Res Ed). 1984 Mar 31;288(6422):961-4

252. Rubin EH, Morris JC, Berg L.The progression of personality changes in senile dementia of the Alzheimer's type.J Am Geriatr Soc. 1987 Aug;35(8):721-5

253. Rudrasingham V, Wavrant-De Vrièze F, Lambert JC, Chakraverty S, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Rice F, Pérez-Tur J, Frigard B, Morris JC, Carty S, Petersen R, Cottel D, Tunstall N, Holmans P, Lovestone S, Chartier-Harlin MC, Goate A, Hardy J, Owen MJ, Williams J. Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer disease. Nat Genet. 1999 May;22(1):17-9

254. San Miguel A, Rodríguez-Barbero MJ, San Miguel R, Alonso N, Calvo B, Martín-Gil, FJ. Estudio de marcardores biológicos en la enfermedad de Alzheimer. Rev Electrón Biomed 2006; 1:88-99

255. Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton ML, Sletvold O, Saltvedt I, White LR, Lydersen S, Aasly JO. APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway. BMC Neurol. 2008 Apr 16;8:9

256. Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. International journal of developmental neuroscience. 2006 Apr-May;24(2-3):167-76

257. Saunders AJ, Bertram L, Mullin K, Sampson AJ, Latifzai K, Basu S, Jones J, Kinney D, MacKenzie-Ingano L, Yu S, Albert MS, Moscarillo TJ, Go RC, Bassett SS, Daly MJ, Laird NM, Wang X, Velicelebi G, Wagner SL, Becker DK, Tanzi RE, Blacker D. Genetic association of Alzheimer's disease with multiple polymorphisms in alpha-2-macroglobulin. Hum Mol Genet. 2003 Nov 1;12(21):2765-76

258. Saunders AM, Schmader K, Breitner JCS, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymnaski MH, McCown N, Dole KC, Schmechel DE, Strittmatter WJ, Pericak-Vance MA, Roses AD. Apolipoprotein E epsilon-4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. Lancet. 1993a Sep 18;342(8873):710-1

259. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology. 1993b Aug;43(8):1467-72

260. Scassellati C, Zanardini R, Squitti R, Bocchio-Chiavetto L, Bonvicini C, Binetti G, Zanetti O, Cassetta E, Gennarelli M. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2004 Feb 12;356(2):119-22

261. Scola L, Licastro F, Chiappelli M, Franceschi C, Grimaldi LM, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C. Allele frequencies of +874T --> A single nucleotide polymorphism at the first intron of IFN-gamma gene in Alzheimer's disease patients. Aging Clin Exp Res. 2003 Aug;15(4):292-5

262. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Science, 1992 Oct 23;258(5082):668-71

263. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandevert C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature. 1999 Jul 8;400(6740):173-7

264. 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 Oct 15;90(20):9649-53

265. Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Müller WE, Eckert A. Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. J Neural Transm. 2004 Sep;111(9):1167-82

266. Selkoe DJ. Alzheimer’s disease: genes, proteins and therapy. Physio Rev. 2001; 81(2):741-766

267. Seripa D, Matera MG, Dal Forno G, Gravina C, Masullo C, Daniele A, Binetti G, Bonvicini C, Squitti R, Palermo MT, Davis DG, Antuono P, Wekstein DR, Dobrina A, Gennarelli M, Fazio VM. Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients. Neurobiol Aging. 2005 Apr;26(4):455-64

268. Serrano-Sanchez T, Diaz-Armesto I. Participation of interleukin 1 and interleukin 6 in the aetiopathogenesis of Alzheimer’s disease. Rev Neurol. 2001. Oct 1-15;33(7):648-52

269. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. Cell. 1997 May 16;89(4):629-39

270. Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS. In vivo and *in vitro* evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis.Neurobiol Aging. 1996 Sep-Oct;17(5):761-6

271. Sheng JG, Zhu SG, Jones RA, Griffin WS, Mrak RE. Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo.Exp Neurol. 2000 Jun;163(2):388-91

272. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature. 1995 Jun 29;375(6534):754-60

273. Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T, Baba H, Ishizuka T, Ohtsuka M, Ueki A, Nagao M, Arai H. Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype-phenotype association study in Japanese cases. Am J Med Genet. 2002. May 8;114(4):436-9

274. Shipley SJ, Parkin ET, Itzhaki RF, Dobson CB. Herpes simplex virus interferes with amyloid precursor protein processing. BMC Microbiology 2005, 5:48

275. Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. Science. 1992 Oct 2;258(5079):126-9

276. Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J; WHIMS Investigators. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA. 2003 May 28; 289(20):2651-62

277. Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. Science. 1990 Apr 27;248(4954):492-5

278. Small GW, Matsuyama SS. HLA-A2 as a possible marker for early-onset Alzheimer disease in men. Neurobiol Aging. 1986 May-Jun;7(3):211-4

279. Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM. Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. Neurology. 2009 Jan 6;72(1):50-5

280. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM.Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. The Journal of Cell Biology. 2002. 156 (6):1051-1063

281. Starkstein SE, Sabe L, Petracca G, Chemerinski E, Kuzis G, Merello M, Leiguarda R. Neuropsychological and psychiatric differences between Alzheimer's disease and Parkinson's disease with dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1996 Oct;61(4):381-7

282. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 8;91(23):11183-6

283. 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 U S A. 1993a Mar 1;90(5):1977-81

284. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber 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 Sep 1;90(17):8098-102

285. Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-10 in the brain. Crit Rev Immunol. 2001;21(5):427-49

286. Styczynska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Styczynski G, Peplonska B, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Kobrys M, Barcikowska M. Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2003 Jun 26;344(2):99-102

287. Styczyńska M, Strosznajder JB, Religa D, Chodakowska-Zebrowska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Czapski GA, Kobryś M, Karciauskas G, Barcikowska M. Association between genetic and environmental factors and the risk of Alzheimer's disease. Folia Neuropathol. 2008;46(4):249-54

288. Suh YH, Checler F.Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev. 2002 Sep;54(3):469-525

289. Tan ZS, Beiser AS, Vasan RS, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris TB, Benjamin EJ, Au R, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. Neurology. 2007 May 29;68(22):1902-8

290. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science. 1987 Feb 20;235(4791):880-4

291. Tanzi RE. Alzheimer's disease risk and the interleukin-1 genes. Ann Neurol. 2000 Mar;47(3):283-5

292. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttilä T. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. Arch Neurol. 2009 Mar;66(3):382-9

293. Tasker A, Perry EK, Ballard CG. Butyrylcholinesterase: impact on symptoms and progression of cognitive impairment. Expert Rev Neurother. 2005 Jan;5(1):101-6

294. Taylor GR, Crow TJ, Markakis DA, Lofthouse R, Neeley S, Carter GI. Herpes simplex virus and Alzheimer's disease: a search for virus DNA by spot hybridisation. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1984 Oct;47(10):1061-5

295. Taylor GR, Crow TJ. Viruses in human brains: a search for cytomegalovirus and herpes virus 1 DNA in necropsy tissue from normal and neuropsychiatric cases. Psychol Med. 1986 May;16(2):289-95

296. Thal DR, Griffin WS, Braak H .Parenchymal and vascular Abeta-deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. J Cell Mol Med. 2008 Oct;12(5B):1848-62

297. Theuns J, Van Broeckhoven C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility.Hum Mol Genet. 2000 Oct;9(16):2383-94

298. Thinakaran G, Parent AT. Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. Pharmacol Res. 2004 Oct;50(4):411-8

299. Thinakaran G.The role of presenilins in Alzheimer's disease.J Clin Invest. 1999 Nov;104(10):1321-7

300. Thomas P, Fenech M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. Mutagenesis. 2007 Jan;22(1):15-33

301. Tolboom N, Yaqub M, van der Flier WM, Boellaard R, Luurtsema G, Windhorst AD, Barkhof F, Scheltens P, Lammertsma AA, van Berckel BN. Detection of Alzheimer pathology in vivo using both 11C-PIB and 18F-FDDNP PET. J Nucl Med. 2009 Feb;50(2):191-7

302. Tsai SJ, Liu HC, Liu TY, Wang KY, Hong CJ. Lack of association between the interleukin-1alpha gene C(-889)T polymorphism and Alzheimer's disease in a Chinese population. Neurosci Lett. 2003 Jun 5;343(2):93-6

303. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog Neurobiol. 2003 May;70(1):1-32

304. Usui C, Shibata N, Ohnuma T, Higashi S, Ohkubo T, Ueki A, Nagao M, Arai H. No genetic association between the myeloperoxidase gene -463 polymorphism and estrogen receptor-alpha gene polymorphisms and Japanese sporadic Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 2006;21(5-6):296-9

305. van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. Lancet. 1992 Oct 10;340(8824):879-80

306. van Oijen M, Arp PP, de Jong FJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Uitterlinden AG, Breteler MM. Polymorphisms in the interleukin 6 and transforming growth factor beta1 gene and risk of dementia. The Rotterdam Study. Neurosci Lett. 2006 Jul 10;402(1-2):113-7

307. Venneri A, McGeown WJ, Shanks MF. Empirical evidence of neuroprotection by dual cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. Neuroreport 2005 Feb 8;16(2):107-10

308. Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. Mol Neurodegener. 2006 Jun 12;1:4

309. Vilalta-Franch J, Lopez-Pousa S, Garre-Olmo J, Turon-Estrada A, Pericot-Nierga I. Heterogeneidad clínica de la enfermedad de Alzheimer según la edad de inicio. Rev Neurol. 2007 Jul 16-31;45(2):67-72

310. Vilalta-Franch J, López-Pousa S, Garre-Olmo J, Turón-Estrada A, Pericot-Nierga I. Síndrome metabólico en la enfermedad de Alzheimer: influencias clínicas y evolutivas.Rev Neurol. 2008 Jan 1-15;46(1):13-7

311. Wang HK, Hsu WC, Fung HC, Lin JC, Hsu HP, Wu YR, Hsu Y, Hu FJ, Lee-Chen GJ, Chen CM. Interleukin-1alpha and -1beta promoter polymorphisms in Taiwanese patients with dementia. Dement Geriatr Cogn Disord. 2007;24(2):104-10

312. Wang X, DeKosky ST, Luedecking-Zimmer E, Ganguli M, Kamboh MI. Genetic variation in alpha(1)-antichymotrypsin and its association with Alzheimer's disease. Hum Genet. 2002 Apr;110(4):356-65

313. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. J Neurochem. 2001 Mar;76(5):1509-20

314. 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 (2):158-163

315. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji 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 May 15;387(6630):288-92

316. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. Neurosci Lett. 2007 Dec 18;429(2-3):95-100

317. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. J Pathol. 2009 Jan;217(1):131-8

318. Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):8208-13

319. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. J Neurosci. 2002 May 15;22(10):RC221

320. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. Am J Pathol. 2007 Feb;170(2):680-92

321. Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. Curr Med Chem. 2006;13(9):1075-83

322. Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms. Arch Neurol. 2004 Mar;61(3):341-4

323. Zareparsi S, Camicioli R, Sexton G, Bird T, Swanson P, Kaye J, Nutt J, Payami H. Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes. Am J Med Genet. 2002a; 107: 156-161

324. Zareparsi S, James DM, Kaye JA, Bird TD, Schellenberg GD, Payami H. HLA-A2 homozygosity but not heterozygosity is associated with Alzheimer disease. Neurology 2002b; 58(6):973-5

325. Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, Rossi L, Munari MR, Zurlo A, Volpato S, Atti AR, Blè A, Fellin R. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. J Psychiatr Res. 2007 Oct;41(8):686-93

ANEXO I

CRITERIOS DIAGNOSTICOS

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

DIAGNÓSTICO DE DEMENCIA

El diagnóstico de demencia, hoy en día y en la mayoría de los países, se hace siguiendo las recomendaciones propuestas por Organización Mundial de la Salud (OMS) en la Décima Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10, 1992) y por la Asociación Americana de Psiquiatría (American Psychiatric Association) -recogido en el Manual de Diagnóstico Estadístico (DSM-IV, 1994) - y son los siguientes:

Según la CIE-10 en la demencia se encuentran estos síntomas (que pueden evaluarse objetivamente con pruebas específicas en muchos casos siempre que sea necesario):

1.- Deterioro de memoria*

- Alteración para registrar, almacenar y recuperar información nueva.
- Pérdida de contenidos mnésicos, o memorizados, relativos a la familia o al pasado.

2.- Deterioro del pensamiento y del razonamiento*

- La demencia es más, y más profunda y anómala, que una dismnesia o alteración patológica de la memoria.
- Existe reducción en el flujo de ideas
- Existe deterioro en el proceso de almacenar información
- Dificultad para prestar atención a más de un estímulo a la vez
- Dificultad para cambiar el foco de atención

3.- Interferencia en la actividad cotidiana

4.- Existe una conciencia clara inicialmente, pero hay la posibilidad de superposición delirio/demencia

Según la DSM-IV para diagnosticar demencia tiene que existir:

a) Pruebas evidentes de deterioro de la memoria a corto y largo plazo.

b) Al menos uno de los siguientes síntomas:

1. Deterioro del pensamiento abstracto
2. Deterioro de la capacidad del juicio
3. Otros trastornos de las funciones corticales posteriores, como afasia, apraxia, agnosia y "dificultades constructivas"
4. Modificaciones en la personalidad

c) La alteración en a) y b) debe interferir de forma significativa en las actividades laborales o sociales habituales, o en las relaciones con los demás.

d) Debe estar presente de manera continuada y no aparecer exclusivamente durante el curso de un "delirium"

e) Tiene que existir una de estas dos razones para la demencia:

- o bien una causa demostrable específica que se estima bien relacionada con esta alteración clínica
- o bien, en ausencia de tal evidencia, puede presuponerse que existe demencia cuando no exista ningún tipo de trastorno mental a la que pueda achacarse la patología que se observa (diagnóstico de exclusión) (este es el caso típico de las demencias neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer).

* Demostrados por exploración psicopatológica y testimoniadas por informante.

Para realizar el diagnóstico de demencia según la CIE-10 o la DSM-IV, es necesario:

- Que los síntomas esten presentes y/o progresen al menos durante seis meses.
- Que se afecte más de una función cognoscitiva
- Que haya una causa de demencia

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.- CRITERIOS CLÍNICOS ESTANDARIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER [Instituto Nacional de Desórdenes y Daños Neurológicos y Comunicativos, y las Asociaciones de Enfermedad de Alzheimer y Desórdenes Relacionados; NINCDS & ADRDA = National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, y Alzheimer's Disease and Related Disorders Associations]

POSIBLE:

- Demencia en ausencia de otros trastornos neurológicos, psiquiátricos o sistémicos que puedan ser causa de demencia, con variaciones en el inicio, presentación o curso clínico
- Presencia de una enfermedad sistémica o cerebral que puede provocar demencia aunque no se considere como la causa de la misma
- En estudios de investigación cuando se identifique un déficit cognitivo progresivo y grave en ausencia de otra causa identificable

PROBABLE:

- Demencia establecida por exámen clínico y documentado por el MMSE (Mini-Mental State Examination) o la Escala de Demencia Blessed y confirmada además por baterías neuropsicológicas.
- Déficits en dos o más areas de cognición
- Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas
- Ausencia de trastornos de la conciencia
- Inicio entre los 40 y 90, más a menudo después de los 65 años
- Ausencia de trastornos sistémicos u otras enfermedades del cerebro que pudieran explicar los déficit progresivos de la memoria y la cognición

DEFINITIVO:

- Cumplir los criterios de enfermedad de Alzheimer probable
- Evidencias histopatológicas obtenidas por necropsia o biopsia
- Los tests neuropsicológicos permiten un análisis en profundidad de las habilidades cognitivas de un paciente, así como de los atributos emocionales, psicológicos, motores y sensoriales. Son unas herramientas para el diagnóstico de AD muy sensibles y específicas, y proveen un camino para seguir y documentar la progresión de la enfermedad.

1.2.- CRITERIOS CLÍNICOS ESTANDARIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER [Robles, 2002]

I.- Demencia

a) Inicio en la edad adulta
b) Instauración insidiosa, referida en meses o años
c) Evolución lentamente progresiva
d) Afectación precoz de la memoria y de la capacidad de aprendizaje, objetivada en la exploración

II.- Ausencia, en fases iniciales, de:

a) Parkinsonismo espontáneo
b) Inestabilidad de la marcha y caídas frecuentes
c) Síndrome cerebeloso
d) Síndrome piramidal
e) Alucinaciones visuales
f) Depresión mayor
g) Alteraciones destacadas del comportamiento

III.- Exclusión de otras causas de demencia

a) A través de las pruebas complementarias estándar
b) Ausencia de ictus cerebral reciente (6 meses)

IV.- Apoyan el diagnóstico:

a) Alteración en la capacidad de denominar objetos en la fase inicial de la demencia

b) Alteraciones de la comprensión verbal, de la fluidez verbal categorial

c) y de la orientación visuospacial en estadios iniciales

d) Presencia de uno o dos alelos E4 en el gen que codifica la apolipoproteina E.

e) Atrofia de los complejos hipocámpicos (región temporomesial) en neuroimagen estructural, mayor que la del resto de la corteza cerebral, en la fase inicial de la demencia.

f) Hipometabolismo o hipoperfusión bilateral en áreas corticales temporoparietales, en PET o SPECT.

g) Reducción del péptido $A\beta_{42}$ e incremento simultáneo de la proteína tau en líquido cefalorraquídeo.

V.- Hacen improbable el diagnóstico:

a) Predominio de las dificultades en el componente expresivo del lenguaje con respecto a las alteraciones de la comprensión y de otros aspectos semánticos

b) Bradipsiquia intensa en fases iniciales

c) Fluctuaciones acusadas y frecuentes de las funciones cognitivas

d) Parálisis de la mirada vertical

e) Aparición de incontinencia urinaria de causa no urológica en la fase inicial de la demencia

f) Atrofia (neuroimagen estructural) o hipoperfusión o hipometabolismo (neuroimagen funcional) exclusiva de lóbulos frontales o/y polos temporales, en estadio intermedio o avanzado de la demencia

g) Electroencefalograma, o cartografía cerebral, normal en estadios avanzados de la demencia.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PROBABLE:

Deben cumplirse los criterios I, II y III y hallarse ausentes los elementos de V.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER POSIBLE:

Se cumplen todos los criterios I, II y III excepto uno de Ib, Ic o Id, o se da uno o más de V.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER CONFIRMADA:

1. Enfermedad de Alzheimer probable o posible + criterios neuropatológicos de EA, o
2. Demencia + criterios neuropatológicos de EA + ausencia de otras alteraciones neuropatológicas que pudieran causar demencia,
3. Demencia familiar + presencia de una de las mutaciones conocidas como productoras de EA autosómica dominante (en los genes de la presenilina 1 –cromosoma 14-, de la presenilina 2 –cromosoma 1– o de la proteína precursora del amiloide –cromosoma 21–)

DEMENCIA COMBINADA:

1. Demencia + alteraciones clínicas o neuropatológicas características de al menos dos entidades nosológicas que podrían contribuir a la producción del deterioro cognitivo.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER CON ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL ASOCIADA

1. Enfermedad de Alzheimer probable + evidencia en la neuroimagen de lesiones vasculares cerebrales, o
2. Demencia + criterios neuropatológicos de EA + presencia concomitante de lesiones cerebrales vasculares.

Criterios para el diagnóstico clínico de la EA

			EA Pr demencia	EA Pos demencia
	a	Edad adulta	**X**	**X**
	b	Instauración insidiosa (meses o años)	**X**	(2)
I	**c**	Evolución lentamente progresiva (años)	**X**	(2)
	d	Alteración precoz de memoria/aprendizaje	**X**	(2)
	a	No parkinsonismo espontáneo en FID	**X**	**X**
	b	No ataxia o caídas frecuentes en FID	**X**	**X**
	c	No síndrome cerebeloso en FID	**X**	**X**
II	**d**	No síndrome piramidal en FID	**X**	**X**
	e	No alucinaciones visuales en FID	**X**	**X**
	f	No depresión mayor	**X**	**X**
	g	No alteraciones conductuales destacadas en FID	**X**	**X**
III	**a**	Exclusión de otras causas, con pruebas estándar[1]	**X**	**X**
	b	No ictus en 6 últimos meses (en FID)	**X**	**X**
	a	Anomia para objetos infrecuentes en FID		
	b	Alteración de comprensión verbal, fluidez verbal categorial y orientación visuospacial en FID o en FMD		
IV	**c**	Genotipo Apo E homocigoto o heterocigoto para E4		
	d	Mayor atrofia de región temporomesial (RM o TC)		
	e	Hipoactividad TP posterior bilateral (SPECT o PET)		
	f	Descenso de $A\beta_{42}$ + Incremento de tau en lcr		
	a	Predomina el componente expresivo en la afasia	**X**	
	b	Bradipsiquia intensa en FID	**X**	
	c	Fluctuaciones notables de las funciones cognitivas	**X**	
V[3]	**d**	Parálisis de la mirada vertical	**X**	
	e	Incontinencia urinaria no urológica en FID	**X**	
	f	Atrofia (RM o TC) o hipoactividad (SPECT o PET) exclusivamente frontal y/o temporopolar, en FMD	**X**	
	g	EEG o MAEC normales en fase de demencia avanzada	**X**	

1. Es obligatorio realizar a todos los pacientes al menos un análisis de sangre, que incluya hemograma, VSG, glucosa, colesterol, triglicéridos, urea, creatinina, ácido úrico, GPT, gamma-GT, fosfatasa alcalina, Na, K, Ca, T4 libre, TSH, vitamina B12, ácido fólico y serología de lúes, así como una prueba de neuroimagen estructural (resonancia magnética o tomografía axial computarizada del encéfalo), una radiografía del tórax y un electrocardiograma. El resto de pruebas complementarias mencionadas en los demás apartados son optativas.

2. Sólo puede estar ausente uno de los aspectos marcados con este epígrafe.

3. Este apartado describe manifestaciones que deben estar ausentes en el paciente.

1.3.- CRITERIOS CLÍNICOS ESTANDARIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER [Dubois, 2007]

PROBABLE EA

Criterio diagnóstico central

A. Presencia de alteración en la memoria episódica significativa que incluye las siguientes características:

1. Cambio gradual y progresivo en la función mnésica referido por el paciente o informadores de al menos 6 meses de evolución

2. Evidencia objetiva de la alteración significativa de la memoria episódica medida mediante tests que evalúen, principalmente, el déficit de evocación que no mejore con pistas o enlas pruebas de reconocimiento, controlando previamente que la fijación haya sido normal

3. La alteración de la memoria episódica puede ser aislada o asociada con otros cambios cognitivos

Rasgos que apoyan el diagnóstico

B. Presencia de atrofia del lóbulo temporal medio

- Pérdida de volumen hipocampal, córtex entorrinal y amígdala, evidenciado por cambios cualitativos visuales observados en la RM, teniendo en cuenta las características de la población de la misma edad o cambios cuantitativos evaluados mediante estudios de volumetría en las regiones de interés (teniendo en cuenta las normas de la población de la misma edad)

C. Biomarcador anormal en líquido cefalorraquídeo

- Concentraciones bajas de beta amiloide, concentraciones incrementadas de tau, o concentraciones incrementadas de fosfotau, o bien una combinación de estas tres
- Otros biomarcadores futuros si están bien validados

D. Patrón específico funcional cerebral mediante PET

- Reducción del metabolismo en áreas temporo-parietales bilaterales
- Otros ligandos bien validados, incluyendo aquellos que emergerán como el componente B de Pittsburg B o el FDDNP

E. Mutación autosómica dominante probada con un familiar de primer grado

Criterios de exclusión

Historia

- Inicio agudo
- Aparición temprana de los siguientes síntomas: alteraciones de la marcha, crisis epilépticas, cambios conductuales

Características clínicas

- Signos neurológicos focales incluyendo hemiparesia, pérdida sensitiva
- Signos extrapiramidales tempranos

Otros trastornos médicos que sean suficientes para causar la alteración de la memoria o síntomas relacionados

- Demencia no EA
- Depresión mayor
- Enfermedad cerebrovascular
- Alteraciones metabólicas y tóxicas, que requerirían un estudio específico
- Anormalidades de señal MR FLAIR o T2 en el lóbulo temporal medio compatibles con procesos infecciosos o vasculares

CRITERIO PARA EA DEFINITIVA

Se considera EA definitiva si están presentes los siguientes criterios

- Evidencia clínica e histopatológica de la enfermedad (mediante biopsia o autopsia cerebral), aplicando los criterios NIA-Reagan para el diagnóstico post-mortem de EA; ambos criterios deben estar presentes
- Evidencia de criterios clínicos y genéticos de EA (mutaciones en los cromosomas 1, 14 o 21); ambos criterios deben estar presentes

ANEXO II

PUBLICACIONES

Fuerte modulación del sexo sobre el riesgo conferido por el gen de la apolipoproteína E para la enfermedad de Alzheimer en la población de las Islas Canarias, España

M.C. Déniz-Naranjo [a], C. Muñoz-Fernández [b], M.J. Alemany-Rodríguez [b], M.C. Pérez-Viéitez [b], Y. Aladro-Benito [b], J. Irurita-Latasa [c], R. Suárez-Armas [d], M.P. Suárez-Valentín [d], F. Sánchez-García [a]

GENDER HAS A STRONG MODULATING EFFECT ON THE RISK OF ALZHEIMER'S DISEASE CONFERRED BY THE APOLIPOPROTEIN E GENE IN THE POPULATION OF THE CANARY ISLANDS, SPAIN

Summary. Objectives. *Apolipoprotein E (ApoE) gen has been found to confer risk for Alzheimer disease in every population studied. We are interested in analyzed the exonic variants and the promoter polymorphisms in our Canary population.* Subjects and methods. *By means of PCR-RFLP analysis of DNA from patients (NINCS-ADRDA criteria) and controls (cognitive state CAMCOG test measured) we analyzed the known exonic and promoter polymorphism of ApoE gen.* Results. *We have found an association of Alzheimer disease risk based on exonic variants of ApoE gen, with a clear cut dose-effect on susceptibility and no risk conferred by the promoter polymorphisms. Age at onset are not affected by variants of ApoE gen, and patients gender strongly modulate the disease susceptibility.* Conclusion. *We have found in our Canary population an association between Alzheimer disease with exonic variants of ApoE gen with a strong modulation by the patients gender. [REV NEUROL 2004; 38: 615-8]*

Key words. *Alzheimer disease. Canary Islands. Exonic ApoE polymorphisms. Promoter ApoE polymorphisms. Spain.*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo progresivo, que conlleva una pérdida gradual de las funciones cognitivas y las capacidades funcionales del sujeto. En el desarrollo de esta enfermedad colaboran un gran número de factores genéticos y ambientales, como la edad, la historia familiar o el sexo del individuo.

Desde 1991, un número creciente de estudios de casos y controles y epidemiológicos han confirmado la asociación entre la EA y el alelo ε4 del gen de la apolipoproteína E (ApoE) [1-5]. Aunque la presencia del alelo ε4 no es necesaria, ni suficiente, para el desarrollo de la enfermedad, dicho alelo se ha detectado como factor de riesgo tanto en la EA temprana como tardía, familiar o esporádica [6,7]. Del mismo modo, la herencia de uno o dos alelos ε4 se ha asociado con una edad de aparición más temprana [8,9], y el riesgo está condicionado por la dosis de alelo ε4 [10]. Se sabe que hay variaciones étnicas en la proporción de los diferentes alelos ApoE y su relación con la EA [7].

Recibido: 22.05.03. Recibido en versión revisada: 21.01.04. Aceptado: 26.01.04.

[a] Servicio de Inmunología. [b] Servicio de Neurología. [c] Servicio de Psiquiatría. Hospital Dr. Negrín de Gran Canaria. [d] Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Insular de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria, España.

Correspondencia: Dr. Florentino Sánchez-García. Servicio de Inmunología. Hospital Dr. Negrín de Gran Canaria. Bco. de la Ballena, s/n. E-35020 Las Palmas de Gran Canaria. Fax: +34 928 449 293. E-mail: fsangarj@gobiernodecanarias.org

Agradecimientos. A los pacientes y controles, por su desinteresada colaboración en este trabajo. A la Unidad de Investigación de nuestro Hospital, por la ayuda y asistencia prestada.

Este trabajo se financió en parte con una beca de la Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS-PI 04/98), y una beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-00/0572).

© 2004, *REVISTA DE NEUROLOGÍA*

Se han detectado varios polimorfismos de promotor del gen de la ApoE (–491A/T, –427T/C y –219T/G), que parecen tener actividad funcional en la transcripción de dicho gen, y se han encontrado asociados en algunas poblaciones a la EA [11]. Pero existen controversias en cuanto a la asociación de algunos de estos polimorfismos con la EA en poblaciones étnicamente distintas.

El propósito del presente estudio es analizar las variantes alélicas comunes del gen de la ApoE, tanto exónicas como de promotor, y su asociación con la EA, con base en un estudio de casos y controles en nuestra población canaria, sobre la que hasta el momento no se ha publicado nada.

SUJETOS Y MÉTODOS

Para el propósito de este estudio, hemos analizado 131 pacientes mayores de 60 años, diagnosticados de probable EA, basándose en los criterios NINCS-ADRDA, reclutados en el Servicio de Neurología de nuestro hospital. De la misma población, hemos recabado la participación de 85 controles sin déficit cognitivo, medido por el test de CAMCOG, del mismo intervalo de edades. Antes de participar en el presente estudio, tanto los pacientes como los controles otorgaron su consentimiento informado. El análisis de los alelos de promotor se ha realizado sobre los genotipos de 128 pacientes y 80 controles. Este estudio ha sido aprobado por el comité ético de nuestro hospital.

Determinación del genotipo de la ApoE

Se aisló ADN a partir de 10 mL de sangre en EDTA, por un método de extracción estándar de fenol-cloroformo [12]. El genotipo de los polimorfismos exónicos del gen ApoE se determinó de acuerdo con el método descrito por Hixson y Vernier [13], con ligeras modificaciones; en breve, se amplificó el ADN con los cebadores 5'-ACA GAA TCC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' y 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'. Además del tampón descrito por el fabricante de la taq polimerasa (Perkin Elmer), cada reacción de amplificación contenía 1 µM de cada cebador, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 10% DMSO, 1,25 U Amplitaq Perkin-Elmer, y 200-400 ng de ADN en un volumen final de 50 µL. Cada mezcla de reacción se calentó a 95 ºC durante 5 minutos, y se sometió a 35 ciclos de

amplificación mediante desnaturalización (95 ºC, 30 s), anillado (60 ºC, 30 s) y extensión (70 ºC, 20 s), y un ciclo final de extensión de 72 ºC durante 10 minutos. Los genotipos ApoE se identificaron tras digestión con Hha-I y resolución en electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20%; los fragmentos individuales de ADN se visualizaron y fotografiaron tras su tinción con bromuro de etidio.

Determinación de los polimorfismos de promotor

El ADN se amplificó según el protocolo de Artiga et al [14,15], con pequeñas modificaciones. Se utilizó la PCR para la amplificación de un fragmento de 1.423 pb de la región promotora del gen de la ApoE, desde la posición –1017 a la +406, relativas al sitio de inicio de la transcripción. Los cebadores 5'-CAA GGT CAC ACA GCT GGC AAC-3' y 5'-TCC AAT CGA CGG CTA GCT ACC-3' amplifican la región reguladora indicada, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización, 95 ºC durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación de 94 ºC, 30 s, 68 ºC, 30 s, y 72 ºC, 40 s, seguidos de un paso final de extensión a 72 ºC durante 10 min. Cada reacción de amplificación contenía: dNTP 0,1 mM, 0,2 µM de cada cebador y 1,25 U de taq polimerasa (Qiagen), en un volumen final de 50 µL. Un microlitro de esta PCR se ha utilizado como ADN de partida para las siguientes reacciones de amplificación de los fragmentos que contienen los polimorfismos –491 A/T, –427 T/C y –219 G/T .

El análisis RFLP de los polimorfismos –491 A/T y –427 T/C se realizó por digestión del producto que cubre la región –512 a –285 con las enzimas Dra-I y Alu-I, respectivamente, –cebadores: 5'-TGT TGG CCA GGC TGG TTT TAA-3' (*mismatched*), y 5'-CCT CCT TTC CTG ACC CTG TCC-3'; condiciones: desnaturalización a 95 ºC durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 ºC durante 30 s, 68 ºC durante 30 s y 72 ºC durante 40 s, y un paso de extensión final de 72 ºC durante 10 min; cada reacción de amplificación contenía dNTP 0,1 mM, 0,4 µM de cada *primer* y 1,25 U de taq polimerasa (Qiagen) en un volumen final de 50 µL–. Para el análisis del polimorfismo –219 G/T, un producto de PCR que comprende las posiciones –240 a –147 se digirió con Taq I –cebadores 5'-CAG AAT GGA GGA GGG TGT CTC-3' *(mismatched)* y 5'-GGA GGT GGG GCA TAG AGG TCT-3'; condiciones de desnaturalización: 95 ºC, 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 ºC durante 30 s, 56 ºC durante 30 s y 72 ºC durante 5 s; cada reacción de amplificación contenía: dNTP 0,1 mM, 0,4 µM de cada *primer* y 1,25 U de taq polimerasa (Qiagen) en un volumen final de 50 µL.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas de casos y controles se calcularon por recuento directo de alelos y cálculo de proporciones simples. Las comparaciones de alelos y genotipos se realizaron con el test de chi al cuadrado de Pearson (χ^2), o el test exacto de Fisher, cuando fue necesario. Los valores de *P* se corrigieron por el número de comparaciones efectuadas (pc). Se utilizó el método de Woof-Haldane para el cálculo de los *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95%. La comparación de la edad de inicio se realizó por medio del test no paramétrico de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS versión 10.0 para Windows.

RESULTADOS

La proporción de mujeres es más abundante que la de hombres, tanto en el grupo de pacientes como en el de los controles, sin presentar estas diferencias significación estadística ($p = 0,124$; $\chi^2 = 2,367$). Ambos grupos de individuos estaban en equilibrio de Hardy-Weimberg, pero las diferencias en las distribuciones de las frecuencias alélicas fueron altamente significativas en los alelos ε4 (OR = 3,35; IC = 1,98-5,66), y ε3 (OR = 0,41; IC = 0,26-0,66) (Tabla I).

El número de pacientes con al menos un alelo ε4, comparado con los controles, mostró una asociación altamente significativa con la EA ($p <$ 0,000; OR = 3,719, IC = 2,039-6,785) (Tabla II).

Tabla I. Frecuencias alélicas del gen ApoE.

	Diagnóstico	
	Alzheimer (*n* = 131)	Controles (*n* = 85)
Alelo ε2	0,031	0,059
Alelo ε3	0,649	0,818
Alelo ε4	0,321	0,124

Tabla II. Distribución de alelos ε4.

		Diagnóstico		Total
		Alzheimer	Control	
Sujetos	ε4/ε4	12 (9,2%)	0	12
	ε4/–	60 (45,8%)	21 (24,7%)	81
	–/–	59 (45,0%)	64 (75,3%)	123
Total		131	85	216 (100%)

Tabla III. *Odds ratio* de los genotipos ε4/3 y ε4/4. Método de Woolf-Haldane.

	pc	OR	IC inf.	IC sup.	Fisher
ε4/3	0,008	2,76	1,49	5,11	0,001438
ε4/4	0,024	17,89	2,30	139,33	0,004022

Tabla IV. Distribución de los alelos ε4 entre pacientes y controles según el sexo.

		Diagnóstico	
		Alzheimer *n* = 131	Control *n* = 85
Masculino	ε4 presente	17 (12,9%)	12 (14,1%)
	ε4 ausente	25 (19,1%)	24 (28,2%)
Femenino	ε4 presente	55 (42%)	9 (10,6%)
	ε4 ausente	34 (26%)	40 (47,1%)

El análisis del efecto de dosis de los alelos ε4 sobre el desarrollo de la EA muestra una gran correlación entre ambos, ya que el valor del OR para un alelo se incrementa 6,5 veces bajo la presencia de dos alelos ε4 (OR = 2,6, frente a 17,89) (Tabla III).

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las edades medias en el momento del diagnóstico de los pacientes con dos alelos (72,08 años) frente a los pacientes con un alelo (74,10) o ningún alelo ε4 (73,85), por lo que en nuestra población, ni la presencia ni la dosis del alelo ε4 parecen estar relacionadas con la edad de aparición de la enfermedad.

El estudio de nuestra casuística para la presencia de al menos un alelo ε4, estratificada por sexos, muestra que el alelo ε4 se relaciona con la EA sólo en el sexo femenino ($p = 0,000$; $\chi^2 = 23,969$; OR = 7,190; IC = 3,104-16,665), y no con el sexo masculino ($p = 0,515$; $\chi^2 = 0,423$; OR = 1,36; IC = 0,538-3,437) (Tabla IV).

Esto implica que en nuestra población canaria existe una interacción entre el sexo de los pacientes y la presencia del alelo ε4, y es destacable que para las mujeres la asociación es al menos tres veces mayor (OR = 7,19), que cuando se calcula el OR sobre el total de los pacientes (OR = 2,76).

Tabla V. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de promotor de ApoE.

Promotor de ApoE		Diagnóstico	
		Pacientes (*n* = 128)	Controles (*n* = 80)
–491	A	0,824	0,863
	T	0,176	0,138
–427	T	0,930	0,919
	C	0,070	0,081
–219	T	0,516	0,494
	G	0,484	0,506

La tabla V muestra las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos de promotor analizados en este estudio; como se puede observar, no existen diferencias significativas que muestren una asociación con la EA.

La distribución de alelos de promotor, considerando simultáneamente la presencia o ausencia del alelo ε4, tampoco ha mostrado relación significativa entre estos polimorfismos de promotor y la EA.

DISCUSIÓN

La alta prevalencia de mujeres, tanto entre el grupo de pacientes como de controles, es similar a la encontrada en la población general de Canarias para estos grupos de edades. Todavía más, en la mayoría de las casuísticas publicadas, la prevalencia de mujeres es mayor en los distintos grupos étnicos estudiados, y parece que es un patrón común distribuido por todo el mundo, tal como se ha analizado recientemente [16].

En nuestra población, la presencia de uno o más alelos ε4 se asocia a la EA, como se ha descrito ampliamente en publicaciones previas [17-22]; la presencia de al menos un alelo ε4 conlleva un riesgo de padecer la enfermedad casi tres veces mayor que el de los sujetos que no lo presentan, y tener los dos alelos ε4 incrementa el riesgo a 17,9 veces, uno de los más altos publicados hasta ahora y un claro indicador de la existencia de un efecto relacionado con la dosis del gen.

Al contrario que en otros, en nuestro estudio no hemos encontrado relación entre una presentación más precoz de la enfermedad y la presencia del alelo ε4 [23].

No obstante, nuestro estudio ha puesto de manifiesto una fuerte asociación del alelo ε4 con la EA en las mujeres, y nos hace apreciar que en nuestra población, dicha asociación está modulada fuertemente por el sexo, hecho que ha sido publicado por otros autores en otras poblaciones [24-28], pero no unánimemente [29].

Ninguno de los alelos de promotor del gen de la ApoE que hemos estudiado ha presentado una asociación significativa con la enfermedad, aun teniendo en cuenta la presencia o no del alelo ε4. Estos resultados están en desacuerdo con las publicaciones de Bullido et al [11] y Town et al [30,31], pero en consonancia con otros estudios [32-35] en poblaciones caucásica, japonesa y china.

En conclusión, las variantes exónicas del gen de la ApoE se asocian fuertemente con la EA en la población de las Islas Canarias, con un efecto de dosis muy claro sobre la susceptibilidad y una modulación muy fuerte por el sexo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. Am J Hum Genet 1991; 48: 1034-50.
2. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. 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 U S A 1993; 90: 1977-81.
3. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology. 1993; 43: 1467-72.
4. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell Jr, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer. Nat Genet 1994; 7: 180-4.
5. Roses AD, Strittmatter WJ, Pericak-Vance MA, Corder EH, Saunders AM, Schmechel DE. Clinical application of apolipoprotein E genotyping to Alzheimer's disease. Lancet 1994; 343: 1564-5.
6. Frisoni GB, Manfredi M, Geroldi C, Binetti G, Zanetti O, Bianchetti A, et al. The prevalence of apoE-epsilon4 in Alzheimer's disease is age dependent. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998; 65: 103-6.
7. Kim HC, Kim DK, Choi IJ, Kang KH, Yi SD, Park J, et al. Relation of apolipoprotein E polymorphism to clinically diagnosed Alzheimer's disease in the Korean population. Psychiatry Clin Neurosci 2001; 55: 115-20.
8. Goldstein FC, Ashley AV, Gearing M, Hanfelt J, Penix L, Freedman LJ, et al. Apolipoprotein E and age at onset of Alzheimer's disease in African American patients. Neurology 2001; 57: 1923-5.
9. Dal Forno G, Carson KA, Brookmeyer R, Troncoso J, Kawas CH, Brandt J. ApoE genotype and survival in men and women with Alzheimer's disease. Neurology 2002; 58: 1045-50.
10. Saunders AM. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. J Neuropathol Exp Neurol 2000; 59: 751-8.
11. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Aldudo J, et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. Nat Genet 1998; 18: 69-71.
12. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. E3-4.
13. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. J Lipid Res 1990; 31: 545-8.
14. Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, et al. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. Hum Mol Genet 1998; 7: 1887-92.
15. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. FEBS Lett 1998; 421: 105-8.
16. Alberca R, Montes-Latorre E, Gil-Néciga E, Mir-Rivera P, Lozano-San Martín P. Enfermedad de Alzheimer y mujer. Rev Neurol 2002; 35: 571-9.
17. Adroer R, Santacruz P, Blesa R, López-Pousa S, Ascaso C, Oliva R. Apolipoprotein ε4 allele frequeny in Spanish Alzheimer and control cases. Neurosci Lett 1995; 189: 182-6.
18. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. 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.
19. López OL, López-Pousa S, Kamboh MI, Adroer R, Oliva R, Lozano-Gallego M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer's disease: a comparative study of two research populations from Spain and the United States. Eur Neurol 1998; 39: 229-33.
20. Quiroga P, Calvo C, Albala C, Urquidi J, Santos JL, Pérez H, et al. Apolipoprotein E polymorphism in elderly Chilean people with Alzheimer's disease. Neuroepidemiology 1999; 18: 48-52.
21. Graff-Radford NR, Green RC, Go RC, Hutton ML, Edeki T, Bachman D, et al. Association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African American subjects. Arch Neurol 2002; 59: 594-600.
22. Benedetti MD, Salviati A, Filipponi S, Manfredi M, De Togni L, Gómez-Lira M, et al. Prevalence of dementia and apolipoprotein E genotype distribution in the elderly of Buttapietra, Verona province, Italy. Neuroepidemiology 2002; 21: 74-80.
23. Aerssens J, Raeymaekers P, Lilienfeld S, Geerts H, Konings F, Parys W. APOE genotype: no influence on galantamine treatment efficacy nor on rate of decline in Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12: 69-77.
24. Payami H, Zareparsi S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bird TD, et

al. Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for familial Alzheimer disease: a possible clue to the higher incidence of Alzheimer disease in women. Am J Hum Genet 1996; 58: 803-11.
25. Molero AE, Pino-Ramírez G, Maestre GE. Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E-varepsilon4 allele in Latin Americans: findings from the Maracaibo Aging Study. Neurosci Lett 2001; 307: 5-8.
26. Bretsky PM, Buckwalter JG, Seeman TE, Miller CA, Poirier J, Schellenberg GD, et al. Evidence for an interaction between apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord 1999; 13: 216-21.
27. Ghebremedhin E, Schultz C, Thal DR, Rub U, Ohm TG, Braak E, et al. Gender and age modify the association between APOE and AD-related neuropathology. Neurology 2001; 56: 1696-701.
28. Bretsky PM, Buckwalter JG, Seeman TE, Miller CA, Poirier J, Schellenberg GD, et al. Evidence for an interaction between apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord 1999; 13: 216-21.
29. Combarros O, Leno C, Oterino A, Berciano J, Fernández-Luna JL, Fernández-Viadero C, et al. Gender effect on apolipoprotein E epsilon4 allele-associated risk for sporadic Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand 1998; 97: 68-71.
30. Town T, París D, Fallin D, Duara R, Barker W, Gold M, et al. The –491 A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. Neurosci Lett 1998; 252: 95-8.
31. Helisalmi S, Hiltunen M, Valonene P, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, et al. Promoter polymorphism (–491 A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. J Neurol 1999; 246: 821-4.
32. Halimi G, Duplan L, Bideau C, Iniesta D, Berthézéne P, Oddoze C, et al. Association of APOE promoter but not A2M polymorphisms with risk of developing Alzheimer's disease. Neuroreport 2000; 11: 3599-601.
33. Toji H, Maruyama H, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. Neurosci Lett 1999; 259: 56-8.
34. Thome J, Gewirtz JC, Sakai N, Zachariou V, Retz-Junginger P, Retz W, et al. Polymorphism of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia? Neurosci Lett 1999; 274: 37-40.
35. Chen L, Baun L, Ng HK, Chan LY, Sastre I, Artiga MJ, et al. Apolipoprotein E promoter and alpha 2-macroglobulin polymorphisms are not genetically associated with Chinese late onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett 1999; 269: 173-7.

FUERTE MODULACIÓN DEL SEXO SOBRE EL RIESGO CONFERIDO POR EL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN LA POBLACIÓN DE LAS ISLAS CANARIAS, ESPAÑA

Resumen. Objetivos. *En la mayoría de las poblaciones estudiadas se ha encontrado que el gen de la apolipoproteína E (ApoE) es un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (EA). El objetivo del presente trabajo es el estudio de los polimorfismos de dicho gen, tanto de las variantes exónicas como los polimorfismos de promotor, en nuestra población canaria.* Sujetos y métodos. *Hemos analizado, por medio de técnicas de PCR-RFLP, tanto las variantes exónicas como tres de los polimorfismos de promotor más comunes del gen de la ApoE, sobre el ADN de 131 pacientes diagnosticados clínicamente de probable EA, según criterios NINCS-ADRDA, y 85 controles sin déficit cognitivo medido por el test de CAMCOG.* Resultados. *Hemos encontrado que las variantes alélicas exónicas del gen de la ApoE se relacionan fuertemente con la EA, presentan un claro efecto de dosis sobre la susceptibilidad a la enfermedad, mientras que no muestran ninguna asociación con la enfermedad las variantes de promotor. En nuestra muestra analizada, el gen de la ApoE no parece influir en la edad de presentación de la enfermedad, mientras que el sexo de los pacientes confiere características de susceptibilidad distintivas.* Conclusión. *En nuestra población, el gen de la ApoE se relaciona con la EA, y está condicionado por una fuerte modulación del sexo de los pacientes. [REV NEUROL 2004; 38: 615-8]*

Palabras clave. *Canarias. Enfermedad de Alzheimer. Gen ApoE. Polimorfismos de promotor. Variantes exónicas.*

FORTE MODULAÇÃO DE GÉNERO SOBRE O RISCO CONFERIDO PELO GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER NA POPULAÇÃO DAS ILHAS CANÁRIAS, ESPANHA

Resumo. Objectivos. *Na maioria das populações estudadas encontrou-se que o gene da apolipoproteína E (ApoE) é um factor de risco para a doença de Alzheimer (DA). O objectivo do presente trabalho é o estudo dos polimorfismos do referido gene, quer das variantes exónicas, quer dos polimorfismos do promotor na nossa população canária.* Sujeitos e métodos. *Analisámos, por meio de técnicas de PCR-RFLP, tanto as variantes exónicas, como três dos polimorfismos do promotor mais comuns do gene da ApoE, sobre o ADN de 131 doentes com diagnóstico clínico de provável DA, segundo os critérios do NINCS-ADRDA, e 85 controlos sem défice cognitivo medido pelo teste de CAMCOG.* Resultados. *Encontrámos que as variantes alélicas exónicas do gene da ApoE estão fortemente relacionadas com a DA. Apresentam um claro efeito dose sobre a susceptibilidade à doença, e as variantes do promotor não mostram qualquer associação com a doença. Na nossa amostra analisada, o gene da ApoE não parece influir na idade da apresentação da doença, enquanto que o género dos doentes confere características de susceptibilidade distintivas.* Conclusão. *Na nossa população, o gene da ApoE está relacionado com a DA, sendo condicionado por uma forte modulação do género dos doentes. [REV NEUROL 2004; 38: 615-8]*

Palavras chave. *Doença de Alzheimer. Espanha. Gene ApoE. Ihas Canárias. Polimorfismos do promotor. Variantes exónicas.*

Author's personal copy

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Neuroscience Letters 427 (2007) 34–38
Neuroscience Letters
www.elsevier.com/locate/neulet

Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain)

Maria Cándida Déniz-Naranjo [a], Carmen Muñoz-Fernández [b], Maria Jesús Alemany-Rodríguez [b], Maria del Carmen Pérez-Vieitez [b], Yolanda Aladro-Benito [b], Juncal Irurita-Latasa [c], Florentino Sánchez-García [a,*]

[a] *Immunology Department, Hospital Universitario Dr. Negrín de Gran Canaria, Bco. de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain*
[b] *Neurology Department, Hospital Universitario Dr. Negrín de Gran Canaria, Bco. de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain*
[c] *Psychiatry Department, Hospital Universitario Dr. Negrín de Gran Canaria, Bco. de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

Received 26 June 2007; received in revised form 24 August 2007; accepted 30 August 2007

Abstract

Aim: Cholinergic dysfunction is a major neurochemical feature in Alzheimer's disease (AD), accountable for many cognitive dysfunctions and some psychiatric symptoms. Butyrylcholinesterase (BChE) is one of the cholinesterases with increased activity in the brain of Alzheimer's patients. Several mutations code for different BChE, such as the K variant, which is the most common and is capable of reducing BChE activity by 30%. We studied the relationship between this K variant and Alzheimer's disease in our population from the Canary Islands (Spain). *Patients and methods*: We used DNA PCR-RFLP techniques to compare 282 patients who had been diagnosed with probable Alzheimer's disease – according to NINCS-ADRDA criteria – with 312 control subjects confirmed to be free of cognitive impairment as assessed by using the CAMDEX cognitive subscale CAMCOG. *Results*: In our population the K variant of BChE is linked to the age of diagnosis of Alzheimer's disease, since AD individuals with this allele presented the disease at a later stage. No other susceptibility relations are exposed in this study. In addition, the BChE allelic frequencies in our population are higher than those previously reported.
© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: BChK polymorphism; ApoE; Alzheimer's disease; Canary Islands; Spain

One of the most relevant neurochemical abnormalities in Alzheimer's disease (AD) is the cholinergic dysfunction in the central nervous system. Cholinergic neurons situated in the cerebrobasal nuclei regions, projecting to the hippocampus and extensive cortical areas undergo degeneration. This cholinergic effect is responsible for many cognitive dysfunctions and some psychiatric symptoms [15].

Some important features of cholinesterase-related cerebral functions are linked to enzymatic differences. Two cholinesterase enzyme forms are present in mammal brains: acetilcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), both enzymes differ in structure, kinetics and genetics. Both molecules AChE and BChE catalyze the hydrolysis of the excess of acetylcholine neurotransmission in the synaptic space producing choline and acetic acid. This reaction is essential to allow a cholinergic neuron to recover the baseline situation following activation.

In 1978, Perry reported a significant increase in butyrylcholinesterase activity in the brain of Alzheimer's patients [21], suggesting an association with the beta-amyloid transformation from a benign to a malign form associated with nervous tissue degeneration and clinical dementia [8,10,17,18]. Darreh even proposed that levels of BChE in cerebrospinal fluid vary inversely with the content of the amyloid plaques. Hence, low concentrations of BChE in the cerebrospinal fluid could predict a high rate of deposition in neuritic plaques, increased neurotoxicity and greater central neural degeneration [6]. BChE can also be related to a reduced Tau phosphorylation in patients with Alzheimer's type and Levy bodies dementia [2].

Several mutations have been described to code for different BChE. In the K variant [3], there is an alanine to threonine substitution in the 539 amino acid position (GCA, ACA; Ala539Thr) due to a guanine to adenine transition in the 1615 nucleotide (exon4) [13]. The mutation of this K variant induces a 30%

* Corresponding author. Tel.: +34 928 449509; fax: +34 928 449293.
E-mail address: fsangarj@gobiernodecanarias.org (F. Sánchez-García).

0304-3940/$ – see front matter © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neulet.2007.08.059

Author's personal copy

reduction in serum BChE activity increasing up to 45% in AD patients [12].

Studies regarding the possible association between AD and the BChE variant have dissimilar results; some revealed higher frequencies of K variant among AD cases with late presentation. Moreover, when we take into account ApoE genotypes, the allelic frequencies increase in those individuals with E4 allele. This suggests a possible BChE-K and ApoE4 interaction [14,19,24]. On the other hand, some authors have reported the K variant as an independent risk factor, synergistic with ApoE4 [4,22]. Finally, some reports failed to prove an association with the disease [5].

The aim of this study is to determine whether butyrylcholinesterase K variant is a potential risk factor for AD in a Canarian population. Historically inhabitants from the Canary Islands have been admixed with people coming from northern Africa and Europe, with certain degree of endogamy due to geographic isolation.

After the Ethics Committee from the Hospital had given consent, members of the Neurology Department of the latter studied 282 consecutive patients aged over 60 (88 males and 194 females). These patients had been diagnosed of possible Alzheimer's disease according to NINCS-ADRDA criteria and they all lacked a family history of AD and 312 control subjects (192 males and 120 females) who were mainly relatives of the patients or simply members of the general population were included after confirming that they had no cognitive impairment, as assessed by cognitive subscale CAMCOG of the CAMDEX test. The age range was similar in both groups. All participants were asked to sign a letter of consent before participating in the study. Family members were asked to give their consent when patients were not in a position to decide.

Variables analyzed: (a) Gender of the subjects; (b) ApoE and butyrylcholinesterase genotypes and allele frequencies; (c) age at diagnosis.

DNA was isolated from their blood samples (10 ml stored in EDTA) with standard phenol–chloroform method [23].

Genotyping of the exonic polymorphisms of the ApoE gene was performed according to Hixson's description [11], with slight adjustments. In brief, DNA was amplified with the primers 5′-ACA GAA TCC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3′ and 5′-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3′, which generated a 244 base pair band. Besides the buffer described by the Taq polymerase manufacturer (PerkinElmer Inc.), we added 1 μM of each primer, 200 μM of dNTP, 1.5 mM of $MgCl_2$, 10% DMSO, 1.25 u Amplitaq, and 200–400 ng DNA to each amplifying reaction with a final volume of 50 μl. Each reaction mixture was heated to 95 °C, for 5 min, undergoing 30 cycles of amplification: denaturation (95 °C, 30 s), primer annealing (60 °C, 20 s), extension (72 °C, 20 s), and a final elongation cycle of 72 °C during 10 min. ApoE genotypes were identified following digestion with Hha-I and separated by electrophoresis in a 20% polyacrilamide gel; individual DNA fragments were visualized after ethidium bromide staining and photographed.

Each subject underwent double genotyping; that is, two separate PCR-RFLP's: one for the K variant typing and the second for the "wild" variant or W typing, according to the method described by Altamirano et al. [1], with slight variations. The primers were the following:

- K Variant: 5′ TTA ATA CAA CTT ATT CCA TAT TTT ACA GGA AAT ATT GAT GTA 3′ and 5′ AAG CTC CTG ATA TTT TTG CCT TGA TCT AAA GGA AAA 3′, which generated a 217 base pair band and
- wild variant (W): 5′ TGT ACT GTG TAG TTA GAG AAA ATG GCT TTT GT 3′ and 5′ ATG TTA TTG TTC CAG CGA TGG AAT CCT GCT TTC CAC GCC CAT TCG G 3′, which generated a 169 base pair band. Besides the buffer described by the Taq polymerase manufacturer (PerkinElmer Inc.), each reaction contained 0.5 μM of each primer, 200 μM of dNTP, 3 mM of $MgCl_2$, 2.5 u of Amplitaq and 300–500 ng of DNA in a final volume of 50 μl. Each reaction mixture was heated to 95 °C for 5 min, undergoing 30 cycles of amplification: denaturation (95 °C, 1 min), annealing (60 °C, 1 min), extension (72 °C, 1 min), and a final extension cycle of 72 °C for 5 min. The PCR products were digested by Mae-III and Bgl-I restriction endonucleases, generating BChE-K and BChE-W genotypes, respectively. These were separated and resolved by electrophoresis in a 13% polyacrilamide gel; individual fragments of DNA were visualized after ethidium bromide staining and photographed.

Case and control genotypes and allelic frequencies were calculated by direct counting of the genotypes and alleles and simple proportion calculus.

Genotype and allele comparisons, odds ratio (OR) and confidence interval (CI) calculations were done based on a crosstabs module included in the SPSS v10 for Windows statistic analysis package. Age comparisons were carried out with the Mann–Witney non-parametric test from the same statistic package.

In our patient series of 282 subjects 88 were males and 194 females, whereas in the 312 subjects of the control group 192 were males and 120 females. All our patients were diagnosed with sporadic Alzheimer's disease of late onset.

As can be seen in Table 1 females are predominant in our case population. It is well known that AD is strongly associated with age, and its frequency increases in individuals above 60 years of age. In our case groups, the frequency of AD increases from 16.3% in the age group 60–69 y.o. to 34% in individuals over 80 years old.

We could not find statistically significant differences regarding the cases mean age at diagnosis between males and females,

Table 1
Gender distribution of patients and frequency of patients on distinct age groups

	Patients ($n = 282$)
Gender (M:F)	88:194
Under 80 years old (M:F)	60:126
Over 80 years old (M:F)	28:68
60–69 years old group	16.3%
Over 80 years old group	34.0%

M = male; F = female.

Author's personal copy

Table 2
Genotype and allele distribution in patients and controls

Polymorphism	Genotypes ($n = 594$) alleles ($n = 1188$)	Patients $n = 282$ (%)	Controls $n = 312$ (%)	Significance
ApoE	Presence E4	138 (48.9)	69 (22.1)	$p = 0.000$
	Absence E4	144 (51.1)	243 (77.9)	
Genotypes BChE ($n = 594$)	KK	14 (5.0%)	16 (5.1%)	$p = 0.987$
	KW	82 (29.0%)	89 (28.5%)	
	WW	186 (66.0%)	207 (66.4%)	
Alleles BchE ($n = 1188$)	K	110 (19.5%)	121 (19.4%)	$p = 0.931$
	W	454 (80.5%)	503 (80.6%)	

W = wild; K = K variant.

therefore gender does not appear to be related to the age at diagnosis of the disease [males = 75.22 years; females = 76.43 years; $p = 0.167$ (n.s.)].

In the case and control populations, the distribution of both genotypes [BChE and ApoE], were in the Hardy–Weinberg equilibrium. As it happens in many different populations – as we also described in a previous report [7] – the E4 allele of the ApoE gene is strongly related to the disease; thus, 50% of our cases and only 22% of the controls are ApoE4 carriers [$p = 0.000$; O.R. = 3.375; C.I. (2.367–4.813)]. This association is strong in both genders (data not shown). We found that the risk of developing the disease increases by a threefold in individuals with a single E4 allele and is 37 times more likely to appear in carriers of both E4 alleles (data not shown). This suggests an intense multiplying dose effect regarding the number of ApoE E4 alleles. The ApoE genotype was not linked to the age at diagnosis of the disease.

Regarding the BChE genotypes, the percentage of patients carrying K and wild alleles was similar to that of the control subjects, and no association with the disease could be proved (Table 2). Similar results were obtained when tested for the presence/absence of BChE-K, even by adjusting by gender or presence/absence of E4 allele of ApoE gen.

But the study of the age at diagnosis showed that the presence/absence of the K allele is related to it. The carriers of the K allele tend to develop the disease at older ages than the wild allele carriers (Table 3). Thus, the K allele is associated with an old age at diagnosis.

Table 3
Association of age in patients with the presence/absence of BChE-K allele

K allele	*N*	Mean age	Significance
K present	96	77.30	$p = 0.028$
K absent	186	75.41	

When we divided by the presence/absence of E4, the individuals with a K allele are older than those who lack it in both cases, which agrees with the general result, but is only statistically significant in the subjects without ApoE E4 allele ($p = 0.043$) (data not shown).

As an additional result of the study, we found that our allelic frequency of BCHE-K is one of the highest reported so far, even though we could not prove statistical differences between patients and controls [$p = 0.902$] (Table 4).

In our patient series the number of females is twice the number of males. Such a difference, points out a possible association between Alzheimer's disease and female gender. However, it could be also attributed to the fact that men generally experience early death due to other reasons. But reviewing the Canarian Institute of Statistics (ISTAC), the number of females does not

Table 4
BChK allelic frequencies reported in different populations

		Cases		Controls	
		N	Frequency	*N*	Frequency
Oxford (Lehmann et al.)	1997	LOAD = 74	0.17	104	0.09
		EOAD = 14	0.07		
USA (Crawford et al.)	1998	Community = 62	0.097	201	0.144
		Clinic = 329	0.17		
Bristol (Kehoe et al.)	1998	181	0.21	71	0.20
Finland (Hiltunen et al.)	1998	78	0.14	97	0.15
USA (Grubber et al.)	1999	245	0.19	241	0.23
Montreal (Wiebusch et al.)	1999	135	0.23	70	0.13
Northern Ireland (McIlroy et al.)	2000	175	0.27	187	0.14
Tehran, Iran (Raygani et al.)	2004	105	0.24	129	0.12
Northern Spain (Combarros et al.)	2005	187	0.10	172	0.15
CANARY ISLANDS, SPAIN	2007	282	0.34	312	0.33

Author's personal copy

exceed the number of males until the 80–84 age group. And when we stratified our case series to look at those under and over 80 years of age (Table 1), the proportion of females in the category under 80 y.o. is twice that of males. This suggests an association of Alzheimer's disease with gender in our population.

The presence of the K allele is associated with the age of diagnosis of the disease; thus individuals of AD without the allele present the disease at earlier ages than the BChE-K variant carriers. Knowing that K variant presence implies 30% less acetylcholine metabolization, individuals with this variant would be less efficient in metabolizing acetylcholine. Therefore, its degradation would take longer and clinical signs would appear later. To reinforce this, Perry et al. found a highly significant association between lower activity of BChE in the temporal cortex and a slower rate of cognitive decline by looking at autopsy-confirmed cases of Lewy-bodies dementia [20]. In addition, Greig et al. found in an animal model that selective inhibition of BChE increases levels of brain acetylcholine, enhances learning and lowers Alzheimer's beta-amyloid peptide content [9].

Stratifying by the presence/absence of E4, we found that K allele carriers are older, but only statistically significant in patients without ApoE E4 allele ($p = 0.043$). No other association of BChE-K polymorphism with Alzheimer's disease was disclosed in our population.

As an additional finding of our study we have found that the allelic frequencies of BChE-K in our Canarian population is the highest reported so far, way beyond the highest Northern Ireland frequency described by McIlroy [16].

The high frequency was double-checked typing BChE wild variant. Each butyrylcholinesterase genotype was confirmed twice (typing both K and wild variants) therefore, assessing the genuine genotype.

Acknowledgments

We want to thank our patients and controls for the patience and generous contribution to the study, and to the Research Unit of our hospital for their assistance.

This study has been made possible due to the financial support of a Canarian Research and Health Foundation, Canary Island Government (FUNCIS, Grant number 1/00).

References

[1] C.V. Altamirano, C.F. Bartels, O. Lockridge, The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme, J. Neurochem. 74 (2000) 869–877.

[2] C. Ballard, C. Morris, R. Kalaria, I. McKeith, R. Perry, E. Perry, The k variant of the butyrylcholinesterase gene is associated with reduced phosphorylation of tau in dementia patients, Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 19 (5–6) (2005) 357–360.

[3] C.F. Bartels, F.S. Jensen, O. Lockridge, A.F. Van der Spek, H.M. Rubinstein, T. Lubrano, B.N. La Du, 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. 50 (5) (1992) 1086–1103.

[4] K. Beyer, J.I. Lao, P. Latorre, A. Ariza, Age at onset: an essential variable for the definition of genetic risk factors for sporadic Alzheimer's disease, Ann. NY Acad. Sci. 1057 (2005) 260–278.

[5] L.J. Cook, L.W. Ho, L. Wang, E. Terrenoire, C. Brayne, J.G. Evans, J. Xuereb, N.J. Cairns, D. Turic, P. Hollingworth, P.J. Moore, L. Jehu, N. Archer, S. Walter, C. Foy, A. Edmondson, J. Powell, S. Lovestone, J. Williams, D.C. Rubinsztein, Candidate gene association studies of genes involved in neuronal cholinergic transmission in Alzheimer's disease suggests choline acetyltransferase as a candidate deserving further study, Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. 132 (1) (2005) 5–8.

[6] T. Darreh-Shori, S. Brimijoin, A. Kadir, O. Almkvist, A. Nordberg, Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism, Neurobiol. Dis. 24 (2) (2006) 326–333.

[7] M.C. Deniz Naranjo, C. Munoz Fernandez, M.J. Alemany Rodriguez, M.C. Perez Vieitez, J. Irurita Latasa, R. Suarez Armas, M.P. Suarez Valentin, F. Sanchez Garcia, Gender has a strong modulating effect on the risk of Alzheimer's disease conferred by the apolipoprotein E gene in the population of the Canary Islands, Spain Rev. Neurol. 38 (7) (2004) 615–618.

[8] P. Gomez-Ramos, M.A. Moran, Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase en senile plaques in the brains of aged and Alzheimer's disease patients, Mol. Chem. Neuropathol. 30 (3) (1997) 161–173.

[9] N.H. Greig, T. Utsuki, D.K. Ingram, Y. Wang, G. Pepeu, C. Scali, Q.S. Yu, J. Mamczarz, H.W. Holloway, T. Giordano, D. Chen, K. Furukawa, K. Sambamurti, A. Brossi, D.K. Lahiri, Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer's beta-amyloid peptide in rodent, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (47) (2005) 17213–17218.

[10] A.L. Guillozet, J.F. Smiley, D.C. Mash, M.M. Mesulam, Butyrylcholinesterase in the life of amyloid plaques, Ann. Neurol. 42 (6) (1997) 909–918.

[11] J.E. Hixson, D.T. Vernier, Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI, J. Lipid Res. 31 (1990) 545–548.

[12] N.C. Inestrosa, R. Alarcon, J. Arriagda, A. Donoso, J. Alvarez, E.O. Campos, Blood markers in Alzheimer's disease: subnormal acetylcholineterase and butyrylcholinesterase in lymphocytes and erythrocytes, J. Neurol. Sci. 122 (1) (1994) 1–5.

[13] B.N. La Du, C.F. Bartels, C.P. Nogueria, A. Hajra, H. Lightstone, A. Van der Spek, O. Lockridge, Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants, Clin. Biochem. 23 (1990) 423–431.

[14] D.J. Lehmann, C. Johnston, A.D. Smith, Synergy between the genes por butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease, Hum. Mol. Genet. 6 (11) (1997) 1933–1936.

[15] J.M. Martínez Lage, Plan de formacion en Neurologia. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias, GlaxoSmithKline, Ediciones Ergon S.A., 2001.

[16] S.P. McIlroy, V.L.S. Crawford, K.B. Dynan, B.M. McGleenon, M.D. Vahidassr, J.T. Lawson, A.P. Passmore, Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland, J. Med. Genet. 37 (2000) 182–185.

[17] M.A. Moran, E.J. Mufson, P. Gomez-Ramos, Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Azlheimer's brain, Acta Neuropathol. (Berl) 85 (4) (1993) 362–369.

[18] M.A. Moran, E.J. Mufson, P. Gomez-Ramos, Cholinesterases colocalize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brains, Acta Neuropathol. (Berl) 87 (3) (1994) 284–292.

[19] P.K. Panegyres, C.D. Mamotte, S.D. Vasikaran, S. Wilton, V. Fabian, B.A. Kakulas, Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease, J. Neurol. 246 (5) (1999) 369–370.

[20] E. Perry, I. McKeith, C. Ballard, Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies, Neurology 60 (11) (2003) 1852–1853.

Author's personal copy

[21] E.K. Perry, R.H. Perry, G. Blessed, B.E. Tomlinson, Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 4 (4) (1978) 273–277.

[22] A.V. Raygani, M. Zahrai, A. Soltanzadeh, M. Doosti, E. Javadi, T. Pourmotabbed, Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease, Neurosci. Lett. 371 (2–3) (2004) 142–146.

[23] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning, in: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, p. E3–E4.

[24] H. Wiebusch, J. Poirier, P. Sevigny, K. Schappert, Further evidence for a synergistic association between ApoE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease, Hum. Genet. 104 (2) (1999) 158–163.

Cytokine IL-1 beta but not IL-1 alpha promoter polymorphism is associated with Alzheimer disease in a population from the Canary Islands, Spain

M. C. Déniz-Naranjo[a], C. Muñoz-Fernandez[b], M. J. Alemany-Rodríguez[b], M. C. Pérez-Vieitez[b], Y. Aladro-Benito[b], J. Irurita-Latasa[c] and F. Sánchez-García[a]

[a]*Departments of Immunology,* [b]*Neurology, and* [c]*Psychiatry, Hospital Universitario Dr. Negrín de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

Keywords:
Alzheimer disease, APOE4, Canary Islands, interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, promoter polymorphisms, Spain

Received 4 April 2008
Accepted 1 July 2008

Aims: Previous studies have reported the presence of low-grade inflammation in Alzheimer disease (AD). Based on these data, our work attempts to investigate the effects of some promoter polymorphisms of pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta] on AD. *Patients and methods:* A PCR-RFLP technique was used to analyze the promoter polymorphisms of both IL-1 alpha (−889 C/T) and IL-1 beta (−511 C/T) and the APOE genotype from the DNA samples of 282 patients (according to NINCDS-ADRDA criteria) and 312 control subjects. *Results:* (i) The risk of developing AD in our population was associated with the IL-1 beta (−511 C/T) promoter polymorphism; (ii) such risk was independent of the risk factor allele in the APOE gene (APOE4); and (iii) the IL-1 alpha promoter polymorphism (−889 C/T) was not associated with the disease. *Conclusion:* In our population, IL-1 beta promoter polymorphism (−511 C/T) is an independent risk factor for AD.

Introduction

Several unrelated pathological, genetic, and epidemiological studies have provided an insight into the inflammatory mechanisms involved in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD) [1–3]. Although the molecular basis of AD is not clearly understood, a neuroinflammatory process triggered by Abeta42 seems to play a central role in the neurodegenerative process. This inflammatory process is driven by activated microglia/astrocytes and by the induction of pro-inflammatory molecules and related signaling pathways, which in turn leads to both synaptic and neuronal damage as well as to further inflammatory cell activation [4]. This cascade is first mediated by the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1, which is overexpressed by activated microglia. IL-1 may cause neuronal death through different pathways, which activates more microglia and consequently increases IL-1 release, in a self-sustaining and self-amplifying fashion [5]. Over a period of years, this slow but continuous inflammation in the brain may destroy enough neurons to cause the clinical signs of AD.

The risk for an individual to develop AD could depend on the environment as well as on a genetic susceptibility profile, based on the combined influence of multiple risk alleles in genes regulating the immuno-inflammatory response, such as the cytokines [2,6].

Previous studies have reported an association between AD and both IL-1 alpha and IL-1 beta cytokine polymorphisms, with a marked population dependency [7–13]. However, contradictory results have led to several disagreements [14–19].

The aim of the present study was to analyze IL-1 alpha (−889 C/T) and IL-1 beta (−511 C/T) promoter polymorphisms to investigate their possible association with AD in our Caucasian population. It was performed as a case–control study on a sample from our population. To our knowledge, this has been the first time that a study of this kind has been carried out in the Canary Islands.

Patients and methods

Subjects

Following approval from the Hospital's Ethics Committee, we studied 282 consecutive AD patients (according to NINCDS-ADRDA criteria [20]) from the Neurology Department, who were over 60 years old, (88 males and 194 females, age range: 60–97 years) and lacked a family history of AD assessed by clinical interview. The control group comprised 312 age-matched individuals (192 males and 120 females, age range: 60–90 years), who were either relatives of the

Correspondence: Dr. Florentino Sánchez-García, Immunology Department, Hospital Universitario Dr. Negrin de Gran Canaria, Bco. de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain (tel.: 34 928449509; fax: 34 928449293; e-mail: fsangarj@gobiernodecanarias.org).

© 2008 The Author(s)
Journal compilation © 2008 EFNS

patients in the case group or simply members of the general population included in the study, after confirming that they had no cognitive impairment as assessed by the cognitive subscale Cambridge Cognitive Examination of the Cambridge Mental Disorders of the Elderly Examination test. Age range was similar in both groups. All participants were asked to sign an informed consent form before taking part in the study. When patients were not in a position to decide, family members were asked to consent on their behalf.

Variables studied

(i) APOE, IL-1 alpha and IL-1 beta promoter polymorphisms: genotype and allelic frequencies; (ii) gender of the subjects; and (iii) age at diagnosis.

Methods

DNA was isolated from blood samples (10 ml in ethylenediaminetetraacetic acid) following a standard phenol–chloroform method [21].

APOE genotyping

Exonic APOE gene polymorphism genotyping was performed as described by Hixson and Vernier [22], with slight adjustments. Briefly, DNA was amplified with the 5′-ACAGAATCCGCCCCGGCCTGGTACAC-3′ and 5′-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3′ which renders a 244 base-pair band. In addition to the buffer described by the Taq polymerase manufacturer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA), 1 μM of each primer, 200 μM of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 1.5 mM of $MgCl_2$, 10% dimethyl sulfoxide, 1.25 u amplitaq Perkin-Elmer, and 200–400 ng DNA were added to each amplifying reaction, giving a final volume of 50 μl. Each reaction mixture was heated to 95°C for 5 min, undergoing 30 amplification cycles consisting of denaturing (95°C, 30 s), annealing (60°C, 20 s), and extension, (72°C, 20 s), and a final 10 min extension cycle at 72°C. APOE genotypes were identified following digestion with Hha-I and resolution by electrophoresis in a 20% polyacrylamide gel. After staining with ethidium bromide dye, the individual DNA fragments were visualized and photographed.

IL-1 promoter polymorphisms genotyping

Genotyping of the promoter polymorphisms of IL-1 alpha and IL-1 beta was carried out as described by Kanemoto *et al.* [23] and Foster *et al.* [24], with slight variations. Primers for DNA amplification were: 5′-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3′ and 5′-GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3 (IL-1 beta −511 C/T) and 5′-GGGGGCTTCACTATGTTGCCCACACTGGACTAA-3′ and 5′-GAAGGCATGGATTTTTACATATGACCTTCCATG-3′ (IL-1 alpha −889 C/T), generating a 299 base-pair band and a 304 base-pair band, respectively. Each reaction mixture contained the Taq polymerase (Perkin-Elmer) buffer described by the manufacturer, 0.5 μM of each primer, 100 μM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 u amplitaq Perkin-Elmer, and 200 ng of DNA in a 50 μl final volume. The reaction mixture was heated to 95°C for 5 min, and underwent 35 amplification cycles, consisting of denaturing (94°C, 45 s), annealing (54°C, 50 s), and extension, (72°C, 1 min), with a final 5 min extension cycle at 72°C. IL-1 beta (−511 C/T) genotype was identified following digestion with Ava-l and resolution with electrophoresis in a 20% polyacrylamide gel; whereas IL-1 alpha (−889 C/T) genotype was identified following digestion with Nco-l and resolution in a 20% polyacrylamide gel. Individual fragments were visualized using an ethidium bromide dye and photographed.

Statistical analysis

Genotype and allelic frequencies in case and control groups were calculated by direct counting of the genotypes and alleles and simple proportion calculus. Genotype and allele frequencies comparison, odds ratio (OR) and confidence interval (CI) calculations were performed with a cross-tabs module included in the SPSS v10 (Chicago, IL, USA) for Windows statistic analysis package. Age comparisons were carried out with the Mann–Whitney, non-parametric test, from the same statistic package.

Results

In our series of 282 patients, 88 were males and 194 females, whereas in the control population of 312 individuals, there were 192 males and 120 females. Our case group was comprised by patients with sporadic late-onset AD.

As can be seen in our case group, the number of females was twice the number of males. In searching for an explanation of this figure, and as this is only a sample of a larger population, we also looked at gender figures from the ISTAC (Official Canary Institute of Statistics), in order to find the general gender distribution for the Gran Canarian population. The distribution was similar (i.e. 1:1 males:females), with the exception of the upper age group (above 80 years old), where females seem to be predominant (Table 1).

It is well known that AD is strongly associated with age, its frequency increases in those who are over

© 2008 The Author(s)
Journal compilation © 2008 EFNS

Table 1 Patients below and over 80 years old, divided by gender

	Gender		
	Males (%)	Females (%)	Total rows (%)
Below 80 years old	60 (32.3)	126 (67.7)	186 (100)
Over 80 years old	28 (29.2)	68 (70.8)	96 (100)
Total gender	88 (31.2)	194 (68.8)	282 (100.0)

60 years old. In our population, AD frequency increases from 16.3% in the 60–69 years old age group, to 34% in those above 80 years old. No statistical differences were found in the onset mean age between males and females within the case group. Therefore, gender does not appear to be related to age at the time of diagnosis of AD in our population [males = 75.22; females = 76.43; $P = 0.167$ (n.s.)].

Genotype distribution of APOE, IL-1 alpha, and IL-1 beta in both groups were in Hardy–Weinberg equilibrium. Table 2 shows the genotype and allelic frequencies found in this study. As we described in a previous report [25], the E4 allele of the APOE gene is strongly related to AD, as described in most populations. This association was also found in this study population: about 50% of our patients were APOE4 carriers, whereas the allele was only present in 22% of controls ($P = 0.000$; OR = 3.375; CI: 2.367–4.813).

Alzheimer disease was also statistically associated with the IL-1 beta gene promoter (−511 C/T) polymorphism as shown in Table 3. When our data were stratified according to the presence of the APOE4 allele, the IL-1 beta −511 T allele was significantly more frequent in AD patients carrying the APOE4 allele, as well as in the non-APOE4 carriers. Therefore, the IL-1 beta polymorphism is a risk factor independent of APOE.

Our logistic regression model built with gender, the cytokine polymorphisms studied and the APOE genotype, confirmed that IL-1 beta T allele is an independent risk factor for AD. Regarding the age at the time of diagnosis of AD, no association was found in this study for any of the investigated polymorphisms.

Table 2 Genotypes and allelic frequencies of tested polymorphisms

Polymorphism	Genotypes (Ng) and Alleles (Na)	Patients (%), Ng = 282, Na = 564	Controls (%), Ng = 312, Na = 624	*P*-value
APOE	Presence E4	138 (48.9)	69 (22.1)	**0.000**
	Absence E4	144 (51.1)	243 (77.9)	
−511 C/T, IL-1 beta	CC	117 (41.5)	158 (50.6)	**0.026**
	CT	127 (45.0)	129 (41.3)	
	TT	38 (13.5)	25 (8.0)	
	C	361 (64.0)	445 (71.3)	**0.007**
	T	203 (36.0)	179 (28.7)	
−889 C/T, IL-1 alpha	CC	138 (48.9)	168 (53.8)	0.438
	CT	118 (41.8)	121 (38.8)	
	TT	26 (9.2)	23 (7.4)	
	C	394 (69.9)	457 (73.2)	0.197
	T	170 (30.1)	167 (26.8)	

Values in bold indicate significant values.

Table 3 Interleukin (IL)-1 beta risk and risks stratified by APOE4 presence

	APOE4 presence	*P*-value	OR	CI
IL-1 beta (−511 T)	No stratified	0.007	1.398	1.095–1.785
IL-1 beta (−511 T)	APOE4 yes	0.034	2.667	1.060–6.706
	APOE4 no	0.000	1.616	1.238–2.111

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Discussion

Despite the ultimate molecular and cellular mechanisms of AD are still unknown, growing evidence relates the beta-amyloid deposition with the inflammatory response observed in AD [26,27]. Moreover, several authors have reported data on different polymorphisms in various populations, unravelling the links between AD and some elements of the immuno-inflammatory response, such as some cytokines [28–30].

In such situations, the inflammation process triggered by the presence of beta-amyloid could be favored by an imbalance between pro- and anti-inflammatory ILs, in such a way that certain 'genetic profiles' responsible of their transcription regulation could promote either an excess of pro-inflammatory cytokines or a deficiency of anti-inflammatory cytokines.

However, these results are still controversial, as none of the other reports have conclusively demonstrated a relationship between the disease and the age of its clinical manifestations [18]. Contradictory results could be explained by considering the differences in the prevalence of some polymorphisms in different populations [31].

The fact that the gender differences arise only on the upper age group in the general Gran Canarian population, contrasting with the case group suggests that increased female longevity is not the main cause of the gender differences in our AD patients. No further explanations can we drawn from this case–control study. As it has been previously described in other populations, again we found a strong association between AD and the E4 allele of the APOE gene in this study based on a Canarian population [24].

Regarding IL-1, only IL-1 beta (−511 C/T) polymorphism was found to be associated with AD and, it was so, independently from the presence or absence of the APOE4 allele, suggesting that it is an independent risk factor for AD. The T allele, reported to be linked with higher IL-1 beta plasmatic levels [32], which could

© 2008 The Author(s)
Journal compilation © 2008 EFNS

induce a greater cytokine transcription and enhance inflammation in AD was more prevalent amongst patients.

We have not found any significant results regarding IL-1 alpha (−889 C/T) promoter polymorphism in our study, although some authors have described significant associations in their populations [13,14]. We think these may be due in part to a population effect. No association was found between any of the polymorphisms studied and the age of clinical onset in our population.

Conclusions

Our study has found that IL-1 beta (−511 C/T) gene promoter polymorphism behaved as an independent risk factor for AD in our population, whereas the IL-1 alpha (−889 C/T) promoter polymorphism had no impact in the presence of the disease. Neither of them affected the age of clinical presentation.

Acknowledgments

We want to thank our patients and controls for their patience and their generous contribution to this study; and to the Research Unit of our Hospital for their assistance.

This study has been partially possible through the financial support provided by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS 03/0101).

References

1. Eikelenboom P, Hoogendijk WJ, Jonker C, van Tilburg W. Immunological mechanisms and the spectrum of psychiatric syndromes in Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research* 2002; **36:** 269–280.
2. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. Immunological aspects of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *BioDrugs* 2001; **15:** 325–337.
3. Rogers J, Webster S, Lue LF, *et al*. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging* 1996; **17:** 681–686.
4. Weisman D, Hakimian E, Ho GJ. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitamins and Hormones* 2006; **74:** 505–530.
5. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006; **83:** 470S–474S (Review).
6. McGeer PL, McGeer EG. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 2001; **58:** 1790–1792.
7. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 1999; **54:** M357–M364.
8. Ehl C, Kölsch H, Ptok U, *et al*. Association of an interleukin-1beta gene polymorphism at position −511 with Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Medicine* 2003; **11:** 235–238.
9. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, Rozemuller AJ, Eikelenboom P. Interleukin-1beta induced cyclooxygenasa 2 expression and prostaglandin E2 secretion by human neuroblastoma cells: implications for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 2001; **36:** 559–570.
10. Sciacca FL, Ferri C, Licastro F, *et al*. Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2003; **24:** 927–931.
11. Serrano-Sanchez T, Diaz-Armesto I. Participation of interleukin 1 and interleukin 6 in the aetiopathogenesis of Alzheimer's disease. *Revista de Neurologia* 2001; **33:** 648–652.
12. Wang WF, Liao YC, Wu SL, Tsai FJ, Lee CC, Hua CS. Association of interleukin-I beta and receptor antagonist gene polymorphisms with late onset Alzheimer's disease in Taiwan Chinese. *European Journal of Neurology* 2005; **12:** 609–613.
13. Zhou YT, Zhang ZX, Zhang JW, He XM, Xu T. Association between interleukin-1 alpha −889 C/T polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese Han population. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006; **28:** 186–190 (Chinese, PubMed Abstract, accessed 28 March 2008).
14. Kuo YM, Liao PC, Lin C, *et al*. Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 2003; **17:** 94–97.
15. Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. Lack of association of the interleukin-1beta gene polymorphism with Alzheimer's disease in a Chinese population. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2003; **16:** 265–268.
16. Ravaglia G, Paola F, Maioli F, *et al*. Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study. *Experimental Gerontology* 2006; **41:** 85–92.
17. Rosenmann H, Meiner Z, Dresner-Pollak R, *et al*. Lack of association of interleukin-1beta polymorphism with Alzheimer's disease in the Jewish population. *Neuroscience Letters* 2004; **363:** 131–133.
18. van Oijen M, Arp PP, de Jong FJ, *et al*. Polymorphisms in the interleukin 6 and transforming growth factor beta1 gene and risk of dementia. The Rotterdam Study. *Neuroscience Letters* 2006; **402:** 113–117.
19. Wang HK, Hsu WC, Fung HC, *et al*. Interleukin-1alpha and -1beta promoter polymorphisms in Taiwanese patients with dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2007; **24:** 104–110.
20. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; **34:** 939–944.
21. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. E3–E4.
22. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of Lipid Research* 1990; **31:** 545–548.
23. Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1

© 2008 The Author(s)
Journal compilation © 2008 EFNS

receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000; **47:** 571–574.
24. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, *et al*. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 2000; **96:** 2562–2567.
25. Deniz-Naranjo MC, Muñoz-Fernandez C, Alemany-Rodriguez MJ, *et al*. Gender has a strong modulating effect on the risk of Alzheimer's disease conferred by the apolipoprotein E gene in the population of the Canary Islands, Spain. *Revista de Neurologia* 2004; **38:** 615–618.
26. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *International Review of Psychiatry* 2005; **17:** 503–514.
27. Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2006; **24:** 167–176.
28. Koivisto AM, Helisalmi S, Pihlajamaki J, *et al*. Interleukin-6 promoter polymorphism and late-onset Alzheimer's disease in the Finnish population. *Journal of Neurogenetics* 2005; **19:** 155–161.
29. Lio D, Annoni G, Licastro F, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha −308A/G polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; **127:** 567–571.
30. Ramos EM, Lin MT, Larson EB, *et al*. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 2006; **63:** 1165–1169.
31. Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, *et al*. Interleukin 6–174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Experimental Gerontology* 2004; **39:** 1567–1573.
32. Licastro F, Pedrini S, Ferri C, *et al*. Gene polymorphism affecting alpha1-antichymotrypsin and interleukin-1 plasma levels increases Alzheimer's disease risk. *Annals of Neurology* 2000; **48:** 388–391.

© 2008 The Author(s)
Journal compilation © 2008 EFNS