

T
1183

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124217

124217



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA PRESENILINA 1 (PS1)
COMO CAUSA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR”.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

M en C. PETRA YESCAS GÓMEZ

Comité tutorial:

Cotutor: **DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

Cotutora: **DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ**

Asesor: **DR. HÉCTOR FERNANDO SERRANO**

MÉXICO

DICIEMBRE, 2007

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93.

Proyecto parcialmente apoyado por CONACyT, con el convenio 28664M.

El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó:

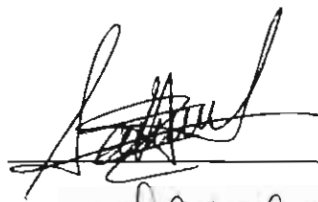
M en C. PETRA YESCAS GÓMEZ.

Matrícula: **205182542**

El día 13 de Diciembre del año 2007.

JURADO:

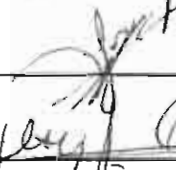
Cotutor: Dr. Samuel Canizales Quinteros



Cotutora: Dra. Marisol López López



Asesor: Dr. Héctor Fernando Serrano



Sinodal: Dr. Diego Julio Arenas Aranda



Sinodal: Dra María Elisa Alonso Vilatela





Este trabajo fue realizado en el Depto. de Genética y Biología
Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"

Al Posgrado de Ciencias Biológicas y de la Salud por las facilidades otorgadas durante la realización del doctorado y por la oportunidad de presentar este proyecto .



A todos los pacientes y familiares con enfermedad de Alzheimer, por su valiosa participación y apoyo lo que nos permitió realizar éste estudio. Por su confianza, esperanza y lucha constante en beneficio de aquellos que sufren tan devastador padecimiento y que su colaboración nos ha permitido conocer más de la enfermedad de Alzheimer en población mexicana.

A la memoria de mi madre

Guadalupe

*¡A donde quiera que se encuentre el cielo tú estas presente,
porque ere mi ángel y eterna compañía, siempre te agradeceré
lo que hiciste por mi y mis hermanos... darnos la vida!
Y a pesar de que ya no éstas presente, siempre estas con
nosotros porque no olvidamos tu esfuerzo y amor que siempre
nos diste y llenaron nuestras vidas.*

Dedicatorias

A mi padre

Alberto

Por tu ejemplo y esfuerzo que me han dado la oportunidad de realizarme, te agradezco tu compañía y amor a todo momento.

Gracias.

A mis hijos

Pedro Iván y Mixie Elizabeth

Por su tiempo, su cariño y confianza porque son mi razón de ser y me han dado la oportunidad de realizar un sueño no solo como mamá, sino como profesional.

A Pedro

Por ser mi compañero, darme su apoyo y amor en los buenos y malos momentos. Por nuestra familia incluyendo a los abuelos Jesús y Consuelo por su gran cariño y respeto

A mis hermanos

Enrique-Felisa, Paco-Lola, Maty, Mary-Arturo, Beto, Claudia, David, Linda, Juan Carlos-Ruth.

A mis sobrinos

Paola, Lidya, Fanny, Lupita, Jesús y Diego

Por su confianza y apoyo incondicional en cualquier momento, lo que me ha permitido crecer y que sin su apoyo no lo hubiera logrado. Por su cariño y respeto. Dándome siempre lo mejor de ustedes porque son parte de mi gran familia.

A todos ustedes gracias.

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, a mis asesores y personal que labora en ella, por brindarme la oportunidad de concluir un ciclo más en mi vida en beneficio de la ciencia y de mi país.

A los miembros del jurado Dr. Samuel Canizales Quinteros, Dra. Marisol López López, Dr. Héctor Fernando Serrano, Dr. Diego Arenas Aranda, Dra. María Elisa Alonso Vilatela y Dr. Ramón González Camarena, por su tiempo y comentarios en la revisión crítica de éste trabajo.

A la Dra. María Elisa Alonso Vilatela, por darme la oportunidad en la realización de éste trabajo, por su apoyo incondicional, confianza y cariño en mi formación profesional, por permitirme cumplir un logro importante en mi vida y hacer realidad nuestro trabajo.

A Samuel, por compartir conmigo su sabiduría y amistad. Por los buenos y malos logros en este andar de la ciencia. Sobre todo por su paciencia y enseñanzas, por hacer realidad este proyecto.

A Marisol, por su apoyo y confianza en la realización de este trabajo, por sus comentarios y por compartir este momento tan importante para mí.

A Rosario, por ser mi amiga y compañera incondicional en todo momento por su gran amistad y cariño que nos une junto a Javier y Emiliano en los buenos y malos ratos que nos da la vida y la ciencia.

A Adriana Huertas y Tere Virrarreal, por su amistad y apoyo compartido durante la realización de éste trabajo.

Agradecimientos.

A la Dra. Teresa Tusié y al Biol. Salvador Ramírez por su apoyo y asistencia técnica en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Depto. de Genética y Biología Molecular Lety, Adriana, Aurelio, Jorge, Alberto, Conchita y Gabino por su participación y apoyo a éste trabajo.

A mis queridos y entrañables estudiantes Minerva, José Luís, Agustín, Rox, y Christopher por su apoyo en todo momento, por su trabajo, amistad y por los buenos momentos compartidos. Así como a los nuevos integrantes del Depto. de Genética.

Resumen

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en el adulto mayor. Es un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central que se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y un deterioro intelectual debido a la aparición de dos lesiones cerebrales fundamentales: las placas seniles y las marañas neurofibrilares. La alteración bioquímica exacta que origina la neurodegeneración es aún desconocida. Aunque la mayoría de los casos los primeros síntomas de las alteraciones de memoria y conducta aparecen después de los 65 años (EA de inicio tardío o senil), en algunos casos la enfermedad inicia más temprano (EA de inicio temprano o presenil).

La etiología de la EA es compleja. A la fecha los estudios genéticos en varias familias afectadas con la EA han identificado 3 genes asociados con la EA de inicio temprano con una penetrancia elevada. El gen de la presenilina 1 (*PSEN1*), el gen de la presenilina 2 (*PSEN2*) y el gen de la proteína precursora del β -amiloide (*APP*) y un gen (Apolipoproteína E) asociado con la EA de inicio tardío. En este trabajo se realizó el análisis molecular del gen *PSEN1* mediante secuenciación directa del DNA genómico. Se estudiaron 12 familias no relacionadas con la EA de inicio temprano y en todas se identificó una mutación patogénica. La mutación Met233Leu en el exón 7, en una familia de Guanajuato, 2 familias con la mutación Glu318Gly en el exón 9 (provenientes de Aguascalientes y Morelos) y la mutación Ala431Glu en el exón 12 del gen

PSEN1 se encontró en 9 de estas familias (75%) que segregaba mostrando un patrón de herencia autosómico dominante. Debido a que estas 9 familias eran originarias del estado de Jalisco se sospechó que pudieran tener un origen común. La posibilidad de que fuera un efecto fundador se investigó utilizando dos marcadores microsatélites cercanos al gen. El análisis de los haplotipos de estos microsatélites mostró un origen en común en estas 9 familias. En conclusión, la mutación Ala 431Glu es una causa prevalente de la EA de inicio temprano en familias del estado de Jalisco. La evidencia genética apoya que es una mutación fundadora originada a partir de un solo ancestro común. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el diagnóstico certero y para el consejo genético en pacientes mexicanos con EA familiar que provengan de Jalisco.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of the dementia in the elderly. It is a neurodegenerative disorder of the central nervous system characterized by progressive memory loss and intellectual decline due to the appearance of two major brain lesions: senile plaques and neurofibrillary tangles. The exact biochemical pathway leading to neurodegeneration is still unknown. Although, in most cases the first symptoms of memory dysfunction or behavioral change become apparent after age 65 years (late-onset or senile AD), in some cases, the disease starts earlier in life (early-onset or presenil AD).

The etiology of Alzheimer's disease (AD) is complex. To date molecular genetic studies in several families affected with AD have identified three genes associated with highly penetrated early-onset AD: Presenilin 1 (*PSEN1*), Presenilin 2 (*PSEN2*) and β -amyloid precursor protein (APP); and one gene (Apolipoprotein E) associated with late-onset AD. Herein, a molecular analysis of the *PSEN1* gene was performed by direct sequencing of genomic DNA.

Twelve unrelated Mexican families with early-onset AD were analyzed and a pathogenic mutation was identified in all of them. The Met233Leu in the exón 7 of a Guanajuato's family, two families with Glu318Gly mutation in exon 9 (from Aguascalientes and Morelos) and the Ala431Glu mutation in exón 12 of *PSEN1* was found in 9 (75%) of these families, which segregated showing autosomal dominant inheritance. Because all families bearing the mutations are from the State of Jalisco (located in Western México), a founder effect was hypothesized. The possible

founder effect was investigated analyzing two highly polymorphic microsatellite markers flanking the *PSEN1* gene. Microsatellite haplotype analysis suggested a common ancestor in these 9 kindred's. In conclusion, the Ala431Glu mutation is a prevalent cause of early-onset familial Alzheimer disease in families from the State of Jalisco, México.

Genetic evidence supports that it is a founder mutation descending from a single common ancestor. These findings have important implications for prompt diagnosis and genetic counseling for Mexican patients with familial AD from Jalisco.

Índice General

ÍNDICE.	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 ANTECEDENTES.	1
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.	2
1.3 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	4
1.4. EPIDEMIOLOGÍA.	9
2. GENES ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	12
3. FORMAS FAMILIARES DE EA DE INICIO TEMPRANO	16
4. GEN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL β -AMILOIDE.	17
5. MUTACIONES EN EL GEN <i>PPA</i> .	20
6. PRESENILINAS.	22
6.1. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS PRESENILINAS.	22
6.2. EA Y MUTACIONES EN LAS PRESENILINAS.	25
6.3. PRESENILINA 2	29
6.4 FUNCIÓN DE LAS PRESENILINAS EN LA EA.	33
6.5. PRESENILINAS Y ANIMALES TRANSGÉNICOS	
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA	
DE INVESTIGACIÓN	42
III. HIPÓTESIS	42
IV.- OBJETIVO GENERAL	43
V.- RELEVANCIA E IMPACTO.	44
VI.- MATERIAL Y METODOS.	45
1.1 SUJETOS DE ESTUDIO.	45
1.2. AISLAMIENTO DE DNA.	46
1.2.1. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO	46
1.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CON SALES	46
1.2.2.1 LISIS DE CÉLULAS ROJAS.	46

1.2.2.2- EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.	47
1.2.2.3- PRECIPITACIÓN CON ISOPROPANOL.	47
1.2.2.4 CUANTIFICACIÓN DEL DNA.	48
2. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL <i>GEN PSEN1</i>	49
2.1. SECUENCIACIÓN.	53
2.1.1. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	53
2.1.2. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN.	55
3.-DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DEL <i>GEN APOE</i> POR PCR	56.
3.1. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.	57
3.2. ELECTROFÓRESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.	58
VII. RESULTADOS	59
VIII. DISCUSIÓN	71
IX. CONCLUSIONES	74
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Fig. 1 Áreas del cerebro.....	4
Fig. 2 Placa neurítica.....	6
Fig. 3. Marañas neurofibrilares.....	8
Fig. 4. Estructura de la <i>PPA</i>	18
Fig. 5. Producción del beta-amiloide.....	19
Fig. 6. Localización cromosómica del gen <i>PSEN1</i>	23
Fig. 7. Estructura de la <i>PSEN1</i>	24
Fig. 8. Topología de la <i>PSEN1</i>	28
Fig. 9. Topología de la <i>PSEN2</i>	32
Fig. 10 Complejo multiproteico de <i>PSEN1</i>	35
Fig. 11. Rutas de apoptosis.....	40
Fig. 12. Gel de agarosa.....	49
Fig. 13 Gel con productos de PCR.....	52
Fig. 14. Mutación M233L.....	60
Fig. 15. Genealogías con la mutación E318G.....	61
Fig. 16. Electroferogramas con la mutación E318G.....	62
Fig. 17. Genealogía de familia con la mutación A431E.....	64
Fig. 18. Electroferogramas con la mutación A431E.....	65
Fig. 19. Gel de poliacrilamida con genotipos ApoE.....	67
Fig. 20. Mapa de la República Mexicana.....	68
Fig. 21. Marcadores microsatélite.....	70

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Incidencia de la EA.....	11
Tabla 2. Genes y factores de riesgo en la EA.....	13
Tabla 3. Sustitución de aminoácidos en las isoformas ApoE.....	14
Tabla 4. Mutaciones en <i>PPA</i>	21
Tabla 5. Mutaciones en <i>PSEN1</i>	26
Tabla 6. Mutaciones en <i>PSEN2</i>	30
Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos.....	50
Tabla 8. Reacción de PCR.....	51
Tabla 9. Reacción de secuenciación.....	54
Tabla 10. Reacción de PCR para genotipos <i>APOE</i>	56
Tabla 11. Familias estudiadas.....	59
Tabla 12. Características de las familias con la mutación A431E.....	63

Introducción

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 ANTECEDENTES.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento degenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por la pérdida de memoria y deterioro de las funciones cognoscitivas; fue descrito en 1907 por Alois Alzheimer y los criterios para realizar el diagnóstico de EA fueron establecidos en 1984 por McKhann y cols. En ellos se refiere que para un diagnóstico definitivo de la enfermedad es necesaria la evidencia histopatológica obtenida por biopsia o autopsia (Tanzi y cols., 1991; Bäckman, Small., 2007). Han transcurrido cien años desde que un grupo de psiquiatras describiera los depósitos anormales de proteína en el cerebro de estos pacientes y definiera a la más común de las enfermedades neurodegenerativas.

En el 2006 se calculó que la prevalencia mundial de la EA fue de 26.6 millones y se espera que para el 2050 ésta se pueda cuadruplicar (Goedert y Spillantini., 2006).

El desarrollo científico de las últimas décadas ha permitido la disminución de la mortalidad y el mejoramiento en la calidad de vida. Sin embargo como resultado ha habido un aumento en la esperanza de vida lo que permite que las enfermedades propias del envejecimiento se incrementen, como es el caso de las demencias, las cuales son un importante problema de salud entre los adultos mayores y son cada vez más frecuentes conforme avanza la edad (Kawas, Brookmeyer., 2001).

La demencia es un síndrome complejo que puede ser causado por más de 60 padecimientos, sin embargo se considera que el 60% de los casos corresponden a la enfermedad de Alzheimer (EA), 20% a demencia vascular y el 20% restante a

diversas enfermedades que incluyen padecimientos metabólicos, infecciosos, tóxicos, hereditarios, etc. (Alonso y cols., 1998; Ramírez y cols., 2005).

Se considera a la enfermedad de Alzheimer como la 4^{ta} causa de muerte en el adulto, su incidencia produce una pendiente vertiginosa conforme a la edad y es dos veces más común en mujeres que en hombres (Gao y cols., 1998; Lunetta y cols., 2007).

I.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un síndrome con múltiples variantes patogénicas, sin embargo las principales características clínicas son:

Alteraciones de la memoria, que constituyen el aspecto clínico predominante y son las primeras manifestaciones que se presentan, ya que olvidan información nueva o sucesos recientes, ésta se va haciendo más notoria y progresa conforme avanza el padecimiento (Khachaturian, 1985; American Psychiatric Association., 1994).

Afasias: que corresponden a alteraciones del lenguaje tanto en su comprensión (lenguaje hablado y escrito) como en su emisión, puede haber repetición de lo que oye por medio de sonidos o palabras una y otra vez. En estadios avanzados los pacientes pueden enmudecer por la dificultad generada por la pérdida de vocabulario, ocasionalmente repitiendo sólo las sílabas finales de una palabra (Alberca y cols., 1998).

Apraxias: se refieren al deterioro de la capacidad de ejecución de actividades motoras, se pierde la habilidad del uso de objetos para realizar una tarea, así como la actividad constructiva de actos motores conocidos, por ejemplo el movimiento de

las manos para saludar, decir adiós, peinarse, cepillarse los dientes, etc. (Khachaturian, 1985; American Psychiatric Association., 1994).

Agnosias: la incapacidad de reconocerse a si mismo y/o a sus familiares, así como para identificar objetos, a pesar de tener una función sensorial y visual intacta.

Alteraciones en la capacidad de ejecución: implica el deterioro del pensamiento abstracto, para planificar, iniciar, secuenciar, monitorizar y detener un comportamiento complejo. El paciente es incapaz de encontrar diferencias entre dos objetos, también se puede manifestar por la incapacidad de afrontar situaciones nuevas ya que requieren del procesamiento de información nueva y compleja, lo que le impide realizar actividades de la vida diaria como bañarse, vestirse, el uso del sanitario, etc. (Pérez-Tur, 2000) (Fig. 1).

En etapas finales o más tardías, el deterioro cognoscitivo progresa y se acompaña de ansiedad, depresión, trastornos del sueño, alucinaciones y en algunos casos pueda presentarse crisis convulsivas (Pérez-Tur, 2000; Pérez-Tur, 2001; Bäckman y Small., 2007).

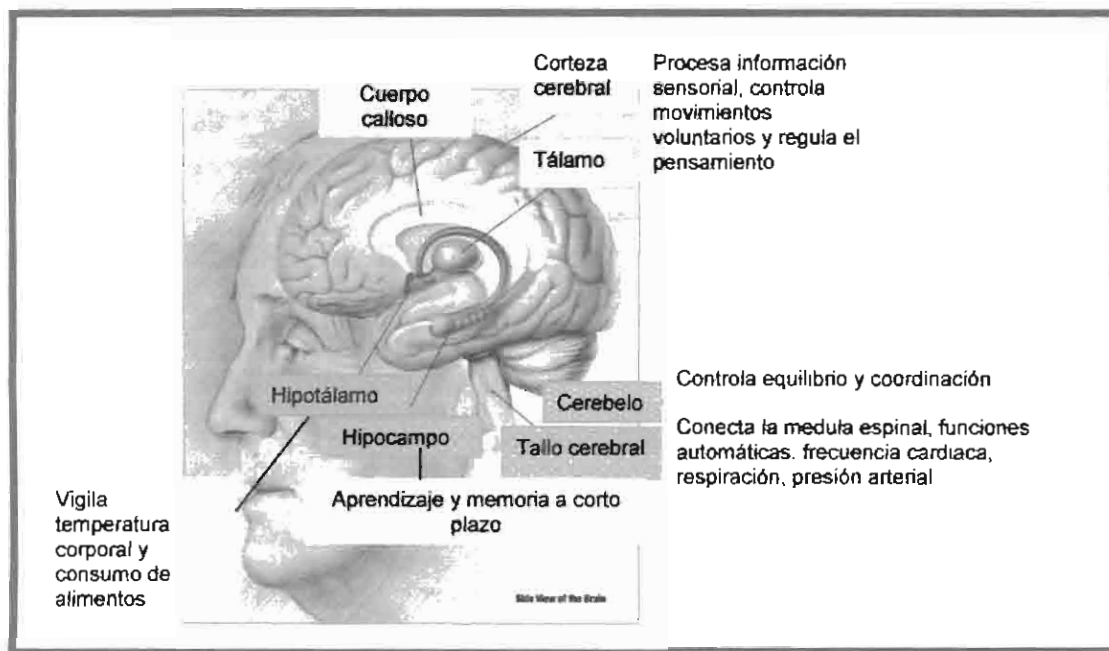


Fig.1 Se muestran las principales áreas del cerebro y su función, que en la EA se encuentran alteradas y dan como resultado los principales síntomas de la enfermedad (Tomada y modificada de www.criticalcare.com)

1.3 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Las principales características de la EA son la acumulación masiva de amiloide compuesto de agregados fibrilares del péptido β -amiloide (β -A) y la acumulación intracelular de la proteína tau anormalmente fosforilada que conduce a una extensa neurodegeneración. Esto da como resultado la demencia progresiva e irreversible, la cual es eventualmente fatal (Hardy y Selkoe., 2002).

Los hallazgos más importantes en el cerebro de los pacientes con EA son la atrofia cerebral, la pérdida de neuronas, presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas, también se puede observar degeneración granulovacuolar y cuerpos de

Hirano principalmente en neuronas piramidales del hipocampo (Katzman, 1986; Mena y García, 1998; Girones y cols., 2002).

La EA interrumpe cada uno de los tres procesos que mantienen las neuronas saludables: la comunicación, el metabolismo y la reparación. Esta interrupción causa que ciertas células nerviosas interrumpan su función, pierdan las conexiones con otras células nerviosas, y por último, mueran (Mizutani y cols., 1990).

La destrucción y la muerte de las células nerviosas provocan una falla en la memoria, cambios de personalidad, problemas para llevar a cabo las actividades diarias y otras características de la enfermedad. Aunque la patogénesis de la enfermedad todavía no está completamente entendida, dos cambios histopatológicamente ocurren dentro del cerebro e involucran agrupamientos anormales de proteínas dentro y fuera de la neurona (Mehler y Gokhan., 2000; Mehler y Gokhan., 2001). Los cambios tempranos ocurren dentro de la corteza entorrinal proyectándose dentro del hipocampo lo cual lleva a interrumpir los procesos de aprendizaje y memoria a corto plazo. Las dos principales lesiones localizadas en hipocampo y corteza cerebral son:

Placas neuríticas: están compuestas de racimos de terminaciones nerviosas degeneradas tanto dendríticas como axonales unidas a un corazón (core) que contiene filamentos lineales ordenados extracelularmente que corresponden a la proteína β -amiloide. Este péptido está formado de 42 a 43 aminoácidos (aa) es insoluble y es el principal componente de la placa que se deposita en el cerebro de estos pacientes (Fig. 2). Las placas neuríticas o seniles tienen un tamaño de 100 a

200 μ de diámetro, es posible observarlas con tinciones de Golgi y con técnicas de inmunohistoquímica (Guimera y cols., 2005).

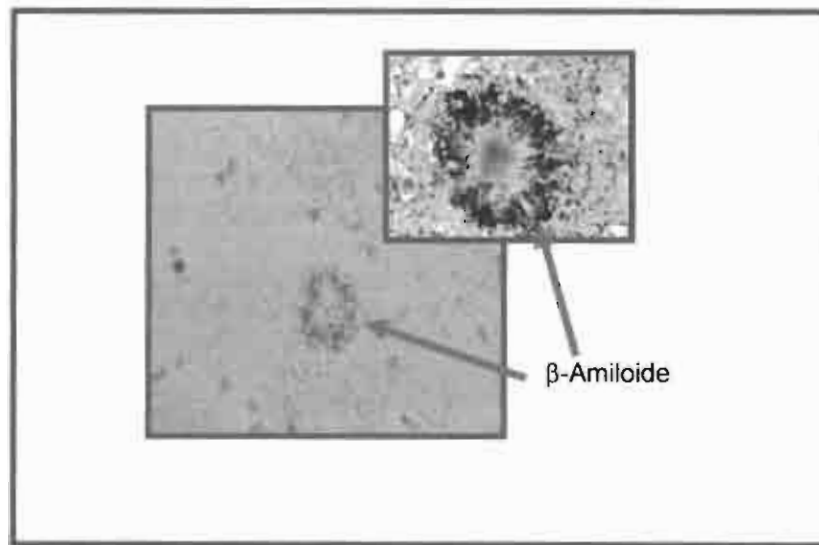


Fig. 2 Se muestra en un corte de tejido cerebral la presencia de una placa neurítica o placa senil constituida por una zona central de β -amiloide rodeada de neuritas distróficas y algunas células gliales (lesión extracelular). Cortesía del Dr. Rembao Daniel del Dpto. de Patología del INNN y www.neurologia.it, www.hipocampo.org

El componente fundamental es el péptido β -amiloide, otros constituyentes no celulares de las placas son: mucopolisacáridos que forman parte del amiloide, α 1-antiquimotripsina, inmunoglobulinas, factores del complemento, fibrinógeno, ApoE, presenilinas y elementos inorgánicos principalmente aluminio y sílice. (Gandy, Petanceska., 2000; Guimera y cols., 2005). Además, otro componente de las placas son las células gliales, en especial se ha tomado atención a las microgliales como elementos inmunitarios del SNC con capacidad de liberar citocinas y de producir daño oxidativo por liberación de radicales libres (Selkoe, 1989; Selkoe, 1991).

Marañas neurofibrilares: se localizan intraneuronalmente, ya que corresponden a neuronas anormales cuyo citoplasma está lleno de estructuras filamentosas globulares (Fig. 3). Están compuestas de filamentos apareados o entrelazados en forma helicoidal y de microtúbulos los cuales precipitan en el interior de la célula causándole la muerte (Nee y cols., 1993; Gandy, Petanceska., 2000). El principal componente de los filamentos es la proteína tau (de 50 a 70 KDa) que está anormalmente fosforilada. La proteína tau forma parte del citoesqueleto, es una proteína de unión a microtúbulos que estabiliza la tubulina, al alterarse su función normal, conduce a la desorganización de los mismos y altera el transporte axonal, ocasionando la formación de las marañas neurofibrilares, a diferencia de la estructura normal de la neurona como se muestra en Fig. 3 (Selkoe, 1991). En la EA, la proteína tau está altamente fosforilada, es insoluble y difícilmente degradable, por este motivo los complejos formados por proteínas tau anormales y otras proteínas del citoesqueleto no se degradan por proteólisis y se acumulan ocasionando la degeneración neurofibrilar (Gandy y Petanceska., 2000).

Las marañas neurofibrilares pueden observarse en grandes neuronas piramidales del hipocampo, corteza entominal y parahipocampal y se tiñen perfectamente con técnicas específicas de plata y también con anticuerpos específicos de distintas proteínas normales y anormales del citoesqueleto (Mizutani y cols., 1990). En el examen con microscopia electrónica se pueden observar dos tipos de fibrillas anormales: fibrillas formadas por pares de filamentos de 8 a 10 nm de diámetro plegados helicoidalmente y otras fibrillas están constituidas por filamentos rectos de

10 a 20 nm de diámetro, ambos se pueden encontrar en una misma neurona (Coria y cols., 1994; Guimera y cols., 2005)

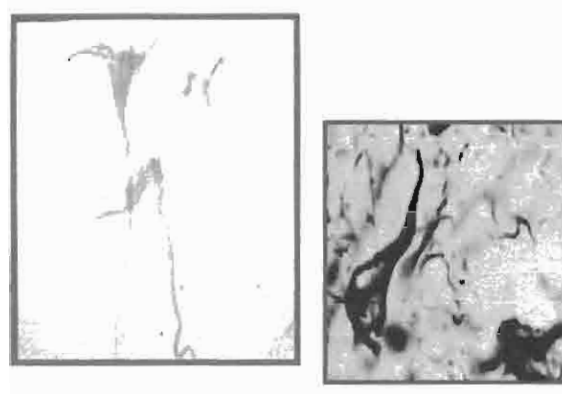


Fig. 3. Se muestra las marañas neurofibrilares. La proteína tau al estar hiperfosforilada desestabiliza la formación del citoesqueleto y forma filamentos insolubles que se acumulan en forma de degeneración neurofibrilar y dañan la apariencia de la neurona como se muestra en forma de fantasmas. Cortesía del Dr. Rembao Daniel del Dpto. de Patología del INNN, www.neurologia.it , www.hipocampo.org.

Una vez muerta la neurona, la permanente acumulación de fibrillas anómalas en el neuropilo, da lugar a la formación de las llamadas madejas fantasma (ghost tangles). Se ha sugerido que la degeneración neurofibrilar conlleva a una reducción de las prolongaciones celulares (atrofia neuronal) y mas adelante conduce a la muerte neuronal. Sin embargo algunos trabajos han mostrado que las neuronas con degeneración neurofibrilar pueden vivir décadas (Guimera y cols., 2005).

I.4. EPIDEMIOLOGÍA.

Los estudios epidemiológicos en la EA se basan en diseños observacionales y requieren de un diagnóstico con elevada sensibilidad y especificidad; sin embargo, existen limitaciones importantes en estos estudios, como la dificultad para conocer el momento exacto en el que el sujeto inicia una demencia o desde cuando podrá ser reconocida. Existen diferentes estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia de la enfermedad, la cual varía de 1.9 a 11% en población mayor de 65 años, siendo mucho mayor (47%) en población entre 75 a 84 años (Evans y cols., 1989).

La prevalencia entre los individuos de 85 años o más varía según los diferentes estudios entre 20 a 50%, siendo mayor su frecuencia entre las personas que se encuentran hospitalizada (Bachman y cols., 1993; Katzman y cols., 1986). Algunos investigadores han encontrado que la prevalencia se duplica cada 5 años entre las edades de 65 y 85 años (Wernicke y cols., 1994).

En México no tenemos investigaciones epidemiológicas que nos permitan conocer la prevalencia de la enfermedad. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se revisaron 6258 expedientes, se encontró diagnóstico de EA en 0.2% de ellos (Alonso y cols., 1989). Una revisión reciente sobre la prevalencia de la EA de 25 estudios realizados, sugiere que se ha producido un aumento en las tasas de prevalencia en los últimos 20 años. A este incremento contribuyen varios factores: el progresivo envejecimiento de la población que supone un mayor porcentaje de personas en edad de riesgo, las condiciones

socioeconómicas, los avances en el tratamiento médico y la mayor supervivencia después del inicio de la enfermedad.

El número de estudios sobre incidencia es mas bajo que los de prevalencia debido a que tienen un costo económico mayor y a que se han de realizar durante un periodo de tiempo mas largo. Estos estudios nos permiten evaluar factores de riesgo y sus distribuciones. Todos los estudios sobre incidencia muestran un aumento con la edad y que el número de casos se multiplica por 3 cada 10 años a partir de los 65 años (Hofman, 2000; Luukinen y cols., 1999; van Duijn y cols., 1991).

La tasa de incidencia total oscila entre unos 10.3- 39.1/1000 casos anuales en mayores de 65 años, dependiendo de la metodología utilizada y la zona geográfica en la que se ha llevado el estudio (Lobo y cols., 2000). La incidencia de la EA parece ser menor en Asia y África que en Estados Unidos o en Europa, aunque estas variaciones son atribuidas a las diferencias metodológicas entre estudios. Las tasas más bajas a nivel mundial se han observado en un estudio Indo-Americano de seguimiento durante 2 años y en Taiwan y Nigeria con tasas muy inferiores a las de los países en desarrollo como se muestra en la Tabla 1 (Chandra y cols., 2001; Fratiglioni y cols., 2000).

La edad es el principal factor de riesgo para la presentación de la enfermedad, aunque existe discrepancia en los datos en edades avanzadas (>90 años) debido a la falta de estudios. Algunos investigadores sostienen que existe una disminución de la misma en edades avanzadas. A la controversia sobre si la EA es edad dependiente o edad relacionada, contribuye el limitado poder estadístico de los

datos por el bajo número de casos a esa edad y el poder mantener un seguimiento (Rocca y cols., 1986; Rocca y cols., 1991; Thomas y cols., 2006).

Tabla 1. Incidencia de la EA según diversos estudios (casos/1000 habitantes/año)

Edad	Euroderm ¹	Baltimore ²	Taiwan ³	India ⁴	Nigeria ⁵	Indianápolis ⁵
65-74	2.2	2.7	2.5	1.2	3.8	13.8
75-84	15.4	15.2	11.4	4.8	14.1	32.9
+84	44.4	64.8	42.6	24.8	50.2	70.7

¹ Fratiglioni y cols., 2000 ² Kawas y cols., 2000 ³ Liu y cols., 1998 ⁴ Chandra y cols., 2001 ⁵ Hendrie y cols., 2001

Se ha observado también una mayor incidencia en el sexo femenino, sin embargo, existen inconsistencias entre los diferentes estudios, aunque es posible que estas diferencias se deban a la distribución de los factores genéticos y ambientales, que deben tenerse en cuenta (Evans y cols., 1997; Fratiglioni y cols., 2000; Kawas y cols., 2000; Liu y cols., 1998; Chandra y cols., 2001; Hendrie y cols., 2001).

Las razones por las cuales el sexo femenino puede presentar mayor riesgo son inciertas, algunas explicaciones pueden ser: una supervivencia selectiva de los hombres en edades avanzadas, bajos niveles de estrógenos en mujeres o que el sexo femenino presenta mayor susceptibilidad genética (Fratiglioni y cols., 1991 y 2000, Gao y cols., 1998; Rapp y cols., 2003; Pirskanen y cols., 2005).

2. GENES ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La EA esporádica representa a la mayoría de los casos de EA y la evidencia de que hay influencia genética en la EA dio lugar a la búsqueda de factores genéticos (Thomas y Fenech., 2007; Serretti y cols., 2007).

De los múltiples loci y genes candidatos que hasta la fecha se han descrito como factores de susceptibilidad para la EA (Tabla 2), el único observado de manera consistente en los distintos estudios es la apolipoproteína E (*APOE*), que constituye el principal gen de susceptibilidad que aumentan de 20 a 90% el riesgo de padecer la EA y su efecto es dosis-dependiente con respecto al alelo $\epsilon 4$ (Corder y cols., 1993; van-Duijn y cols., 1994; Warwick y cols., 2000).

El gen que codifica para la *APOE* se localiza en el brazo largo del cromosoma 19q13.2 y codifica para una proteína de 299 aa con tres variantes polimórficas o alelos (Strittmatter y cols., 1993). El gen *APOE* posee tres secuencias polimórficas denominadas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ (que dan origen a 6 genotipos: $\epsilon 2/2$, $\epsilon 3/2$, $\epsilon 3/3$, $\epsilon 4/2$, $\epsilon 4/4$ y $\epsilon 4/3$). Las isoformas *APOE* 2, 3 y 4 difieren en los residuos 112 y 158 de su secuencia de aa como se muestra en la Tabla 3. (Zannis y cols., 1981; Payami y cols 1994).

El análisis de las distribuciones alélicas de $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ en diferentes poblaciones demuestran que el alelo más frecuente en cualquier grupo humano es el $\epsilon 3$ (78%), mientras que la frecuencia alélica de $\epsilon 4$ es mayor en mujeres que en hombres (Strittmatter y cols., 1993; Hixson, Vernier., 1990; Payami y cols., 1996)

Tabla 2. Genes y factores de riesgo genético implicados en la EA

Nombre	Localización cromosómica	Inicio	Familiar/Esporádica	Implicación en la EA
PPA	21q21.3	Temprano	Familiar	Confirmado
PSEN1	14q24.3	Temprano	Familiar	Confirmado
PSEN2	1q42.1	Temprano	Familiar	Confirmado
APOE	19q13.2	Tardío	Familiar/Esporádica	Confirmado
A2M	12p13.31	Tardío	Esporádica	Incierto
LRP	12q13-q14	Tardío	Esporádica	Incierto
ACE	Xp22	Tardío	Esporádica	Incierto
VLDL-R	9p24	Tardío	Esporádica	Incierto
BChE	3q26.1-q26.2	Tardío	Esporádica	Incierto
MPO	17q21.3-q23	Tardío	Esporádica	Incierto
LPL	8p22	Tardío	Esporádica	Incierto
IL6	7p21-p15	Tardío	Esporádica	Incierto
TGF	19q13.1	Tardío	Esporádica	Incierto
BLMH	17q11.2	Tardío	Familiar/Esporádica	Incierto
MAPT	17q21	Tardío	Esporádica	Incierto
IL1A	2q12-q21	Tardío	Esporádica	Incierto
NOS3	7q36	Tardío	Esporádica	Incierto

Strittmatter y cols. (1993b), reportaron que la APOE tiene elevada afinidad para unirse al β -amiloide, así como un incremento en la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con EA familiar de inicio tardío y en casos esporádico (Evans y cols., 1997; Kamboh, 1995b, Luo y cols., 1986; Walden, Hegele., 1994, Poirier y cols., 1993; Xu y cols., 1996).

Tabla 3. Sustitución del aminoácido que distingue a cada isoforma de apolipoproteína E.

Codón	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
112	Cisteína	Cisteína	Arginina
158	Cisteína	Arginina	Arginina

El análisis de las secuencias polimórficas de APOE en poblaciones americanas, asiáticas y europeas en individuos sanos, ha permitido determinar que las frecuencias de estos alelos varían de 61.9 a 84.6% para $\epsilon 3$ y de 4.6 a 13.0% para $\epsilon 2$ y entre 7.4 a 29.1% para $\epsilon 4$ (Hallman y cols., 1991; Hong y cols., 1996; Tang y cols., 1996; Muros y cols., 1996; Sahota y cols., 1997; Tang y cols., 1998, Tang y cols., 2001). Asimismo la asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de APOE y la EA ha sido confirmada en diferentes grupos étnicos y se ha calculado un aumento de riesgo para desarrollar la enfermedad de 2.2 a 4.4 para heterocigotos con alelo $\epsilon 4$ y de 5.1 a 17.9 para homocigotos según diferentes estudios (Maestre y cols., 1995; Tsai y

cols., 1994; van-Duijn y cols., 1994). Sin embargo, algunos investigadores han observado falta de asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y la EA (Sobel y cols., 1995). La mayoría de los portadores $\epsilon 4$ no desarrollan demencia y la mitad de los pacientes con EA no tienen asociación por lo tanto no puede usarse como prueba predictiva para detectar portadores de EA en estado presintomático (Lannfelt y cols., 1994).

Corder y cols. (1994), reportaron que el alelo $\epsilon 2$ parece ser característico de personas longevas y podría conferir un efecto protector para desarrollar la EA, sin embargo esto aun no es muy claro.

Las distintivas propiedades de unión de las isoformas de APOE al péptido $A\beta$ (Strittmatter y cols., 1993) y a la proteína tau pueden indicar la manera mediante la cual APOE interviene en el desarrollo de la EA. APOE- $\epsilon 4$ promueve la formación de fibrillas $A\beta$ mejor que APOE- $\epsilon 3$, ya que este se une con mayor rapidez que la isoforma 3 (LaDu y cols., 1994). Es posible que la interacción entre APOE- $\epsilon 3$ y tau sirva de protección contra la fosforilación de tau y por tanto evite la formación de madejas neurofibrilares, ya que *in vitro* se ha demostrado que APO- $\epsilon 4$ no se une a tau (Poirier, 1994; Strimatter y cols., 1994a; Strimatter y cols., 1994b). De igual manera se ha sugerido que APOE puede actuar como una proteína de respuesta a daño neuronal, posiblemente transportando lípidos durante la regeneración y remodelación nerviosa. Demostrándose, en experimentos con cultivos de raíces dorsales de neuronas ganglionares en presencia de β -VLDL, APOE ϵ -3 promueve el crecimiento neurítico, mientras que APOE ϵ -4 inhibe el crecimiento y ramificación (Nathan y cols., 1994; Strimatter y cols., 1993a; Strimatter y cols., 1993b).

De manera interesante, el alelo $\epsilon 4$ no se ha asociado a los casos de EA familiar de inicio temprano, los cuales son motivo de estudio en este trabajo; sin embargo este alelo ha mostrado asociación a una edad de inicio más temprana, así como un mayor incremento del depósito βA en pacientes con EA (Gómez-Isla y cols., 1996; Levy-Lahad y cols., 1995a).

3. FORMAS FAMILIARES DE EA DE INICIO TEMPRANO

Aunque la mayoría de los casos con EA son esporádicos y de etiología compleja producto de factores de susceptibilidad genética y ambiental, existen también formas familiares monogénicas de EA debidos a mutaciones en una serie de genes los cuales se describen en este apartado. En la mayoría de los casos de EA, los primeros síntomas de alteración de la memoria o cambios en la conducta aparecen después de los 65 años (EA senil).

La etiología de la enfermedad de Alzheimer se desconoce, se han establecido causas genéticas y ambientales que conducen a la demencia y desde hace varios años se inició la búsqueda de los genes responsables de producir EA en las formas familiares. Aproximadamente el 10% de los casos de EA corresponden a formas familiares de inicio temprano y co-segregan con un patrón de herencia autosómico dominante. En estas familias se han identificado mutaciones en 3 genes: la proteína precursora del β -amiloide (*PPA*) en cromosoma 21, presenilina 1 (*PS-1*) en cromosoma 14 y presenilina 2 (*PS-2*) en cromosoma 1 (Raux y cols., 2005; Lendon y cols., 1997; Ray y cols., 1998; Spence y cols., 1986; Weitkamp y cols., 1983, Lunetta y cols., 2007).

4. GEN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL β -AMILOIDE.

En 1987 se localizó y aisló el gen que codifica para la *Proteína Precursora Del β -Amiloide (PPA)* en el cromosoma 21q21.3 (Goldgaber y cols., 1987).

El gen *PPA* tiene 18 exones, presenta procesamiento alternativo (splicing) que da lugar a 3 isoformas comunes de 695, 775 y 777 aa respectivamente, al menos 2 isoformas contienen un dominio con función de inhibición de proteasas (Chartir-Harlin y cols., 1991a; Hardy y Selkoe., 2002). Esta glucoproteína transmembranal de las células neuronales, está constituida de dominio amino-terminal extracelular, un dominio transmembranal corto e hidrofóbico y un dominio carboxilo-terminal intracelular (Chartir-Harlin y cols., 1991a; Hardy y Selkoe., 2002; Fig. 4).

La PPA sufre un procesamiento complejo, del que resulta la formación de varios fragmentos solubles que se segregan al espacio extracelular y la proteólisis esta mediada por acción de una α -secretasa que corta a la PPA y origina una forma extracelular, denominada Nexina II (fragmento amino-terminal largo y soluble), que se incorpora a la matriz extracelular y un péptido de 83 aa, denominado C83 (un fragmento carboxilo terminal de 10 kD). Este último puede ser degradado aún más por la acción de una γ -secretasa para formar uno o más péptidos de menor tamaño (3 kD), no tóxicos y solubles (PPA α s) denominados p3 (Hiltunen y cols., 2006, Lleó y cols., 2002; Xia., 2000; Betanhir y cols. 2006).

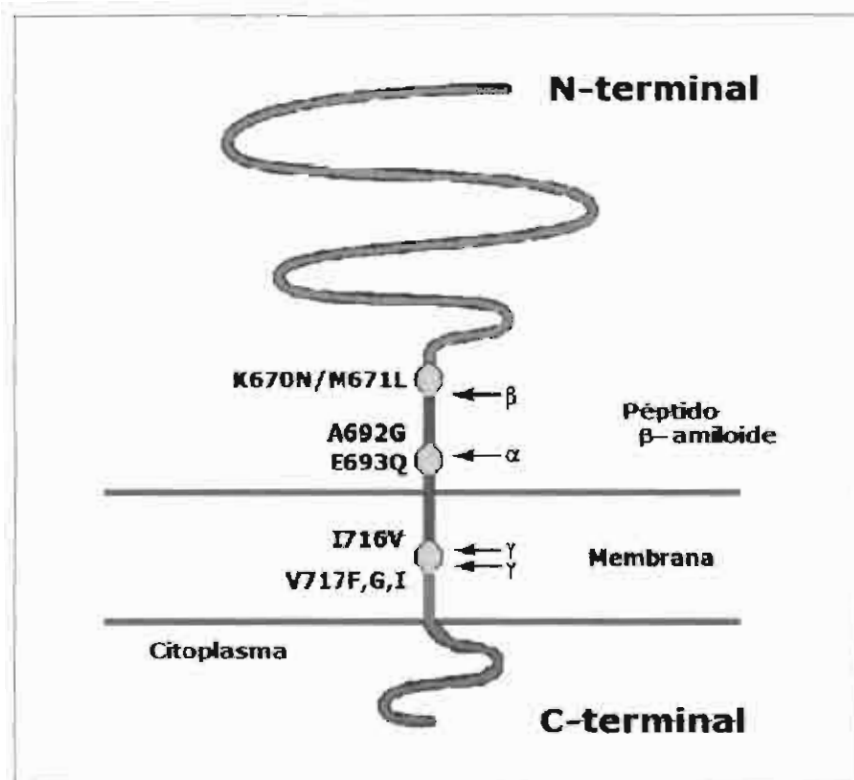


Fig. 4. Estructura de la PPA donde se indica el sitio donde actúan las proteasas, así como donde se localizan las mutaciones y el β -A. (Tomada y modificada de López de Munain., 2003)

En la segunda vía amiloidogénica o amiloidea, la acción es realizada por una β -secretasa, que al cortar la proteína PPA y libera dos fragmentos que se segregan al medio extracelular, un amino-terminal soluble de 100 kD (PPA β s) y otro formado por el péptido β y el extremo carboxilo de la PPA, de 12 kD llamado C99. Este último sufre una nueva digestión proteolítica por la γ -secretasa, que corta el extremo carboxilo del péptido β y libera al péptido β A maduro de 4 kD como se muestra en la Fig. 5 (Alberca y cols., 1998; Vassar y cols., 1999; Thomas y Fenech., 2007).

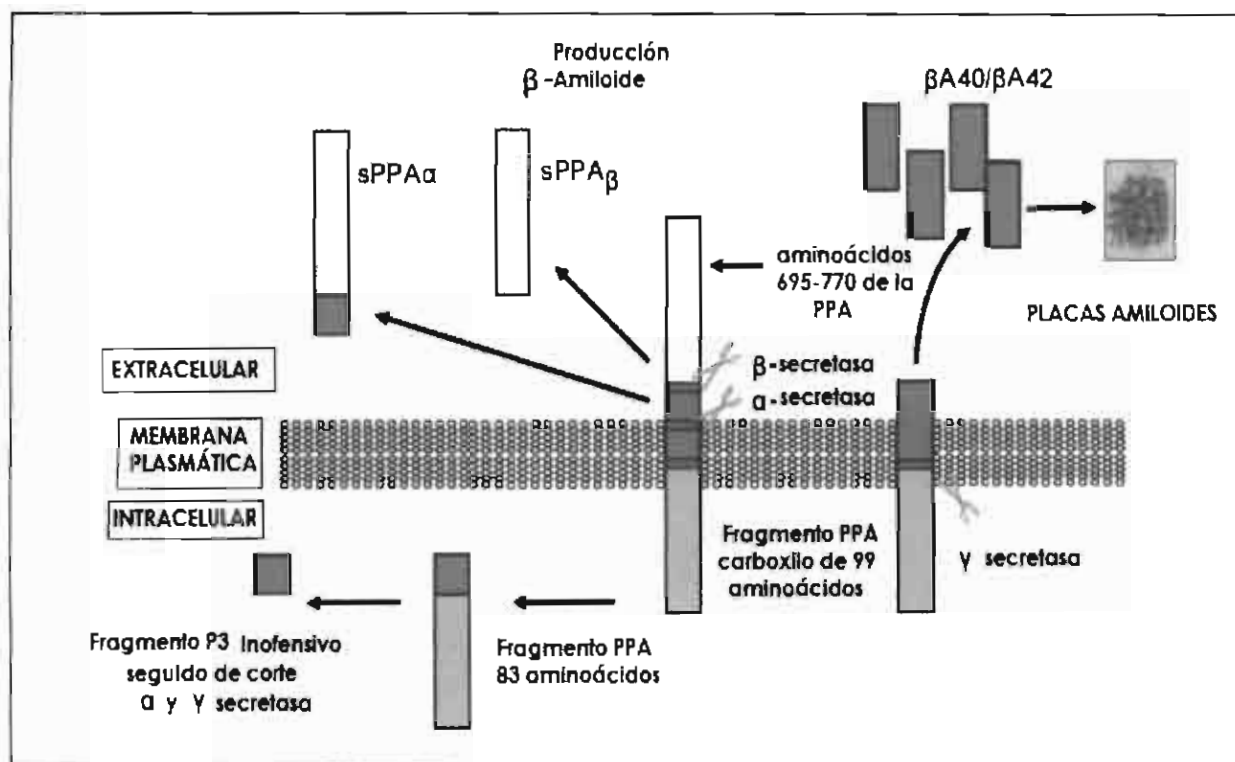


Fig. 5. Producción de β -A. La PPA es una proteína de la membrana que produce un número de isoformas de diferente tamaño, con un rango de 695 a 770 aa. La proteólisis de la PPA involucra: α , β y γ -secretasas. La PPA es cortada de la membrana por una α -secretasa y libera PPA α s (fragmento de 83 aa). Mientras que el corte de la PPA por una β -secretasa libera de la membrana al fragmento PPA β s de 99 aa, el cual puede ser cortado por una γ -secretasa para producir fragmentos extracelulares de β -A 40/42 aa (Tomada y modificada de Thomas y Fenech., 2007).

La función de la PPA esta relacionada con el crecimiento neurítico, la adhesión celular, en la función sináptica y la inducción de apoptosis. Al parecer la PPA tiene un número importante de funciones neurológicas postnatales y durante el desarrollo. Cuando se alcanza un cierto grado de muerte neuronal, el trastorno se expresa clínicamente como deterioro cognitivo y finalmente demencia. Los

mecanismos moleculares implicados en la producción, agregación y depósito de β -A están sirviendo de fundamento para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Leschik y cols., 2007)

5. MUTACIONES EN EL GEN *PPA*.

Desde la descripción de la primera mutación por Goate y cols. en el gen *PPA* hasta la fecha, se han identificado 27 mutaciones patogénicas en el gen *PPA* para EA de inicio temprano (Tabla 4), 4 de las cuales están en el codón 717 (exón 17), cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína, que normalmente codifica para valina y en estas mutaciones hay sustitución por isoleucina 717, fenilalanina 717 y glicina 717 (Chartier-Harlin y cols., 1991a; Chartier-Harlin y cols., 1991b., Goate y cols., 1991). Se ha reportado una doble mutación en algunas familias que resulta en una sustitución de lisina por asparagina y metionina por leucina en los codones 670 y 671, respectivamente (Goate y cols., 1991; Murrell y cols., 1991). En conjunto estas mutaciones originan un poco más del 10% de las formas familiares de EA de inicio temprano. La penetrancia de estas mutaciones que se transmiten de forma autosómica dominante es casi completa a los 60 años. La edad media de inicio de la EA en los pacientes con estas mutaciones oscila entre los 48 y 55 años, la presencia de un alelo APOE- ϵ 4 puede favorecer un inicio más precoz de las características clínicas en los individuos con mutaciones en el gen *PPA*. (Nussbaum y cols., 2003)

Tabla 4. – Mutaciones más frecuentes en la PPA asociadas con la EA.

DOMINIO	# FAMILIAS	# MUTACIONES
PPA Completa	7 (25.0 %)	8 (10.53%)
N-terminal	7 (25.0 %)	15 (19.74%)
TM-I	13 (46.43 %)	52 (68.42%)
C-terminal	1 (3.57 %)	1 (1.32%)
TOTAL	28	76

Las mutaciones en PPA se encuentran en: [Alzheimer Disease Mutation Database](#) (ADMD), elaborado y actualizado por Marc Cruts y de [www.molgen.ua.ac.be/AD mutations](#)

Los diferentes trabajos sugieren que las mutaciones en la PPA pueden causar EA, por un incremento en la producción del péptido β A debido presumiblemente a una mayor susceptibilidad de los sitios de corte proteolítico (Suzuki y cols., 1994; Games y cols., 1995)

En conjunto estas mutaciones originan un poco más del 10% de las formas familiares de EA de inicio temprano. La penetrancia de estas mutaciones que se transmiten de forma autosómica dominante es casi completa para los 60 años, aunque existen al menos tres casos de ausencia de penetrancia ligados a un haplotipo APOE protector. La edad media de inicio oscila entre las diferentes familias entre los 48 y 55 años, la presencia de un alelo APOE- ϵ 4 puede favorecer un inicio

más precoz de las características clínicas en los individuos con mutaciones en el gen *PPA* (Cai y cols., 1993; Citron y cols., 1994)

Las mutaciones en el gen *PPA* son raras, se observan en un número muy reducido de familias (<10%) con herencia autosómica dominante (AD) e inicio temprano, lo cual ha sugerido heterogeneidad genética (St George-Hyslop, 2000).

6. PRESENILINAS.

El segundo *locus* relacionado con una forma de herencia dominante de EA, se localizó en el cromosoma 14, en un grupo de familias con EA de inicio temprano, que no estaban asociadas con mutaciones en el cromosoma 21 (Sherrington y cols., 1995).

Las mutaciones en el gen de la *PPA* del β -amiloide son raras y corresponden entre un 5 a 10% de las familias con inicio temprano y patrón de herencia autosómico dominante, sin embargo existen familias con las mismas características pero debidas a mutaciones en los genes de las presenilinas y éstas corresponden entre un 50 a 70% de los casos (Gómez-Isla y cols., 1999; St George-Hyslop, 2000).

6.1. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS PRESENILINAS.

Schellenberg y cols. (1992), encontraron ligamiento en familias de inicio temprano y herencia AD con marcadores del cromosoma 14, este hallazgo fue confirmado por otros autores (Mullan y cols., 1992; St George-Hyslop y cols., 1992; Schellenberg y cols., 1992). Por clonaje posicional en 1995, se aisló el gen denominado *S182* que

se localizó en la región 14q24.3 y codifica para una proteína denominada presenilina 1 (Fig 6), en el cual se encontraron 5 mutaciones que cosegregan en pacientes con EA familiar de inicio temprano (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995; Sherrington y cols., 1995).

Cromosoma 14

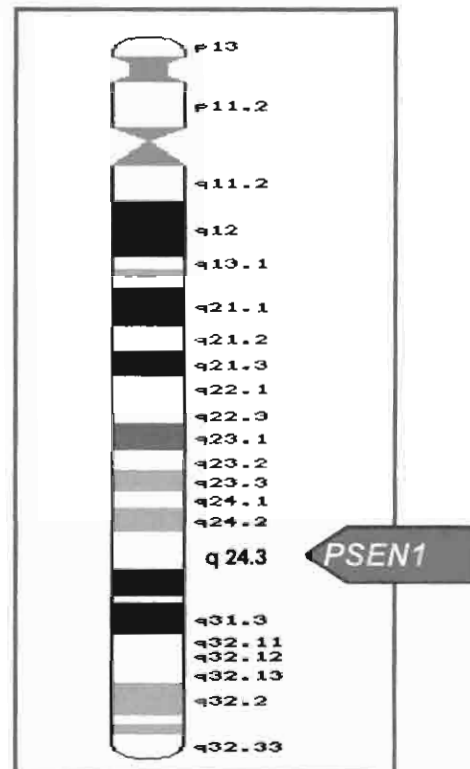


Fig. 6. Localización cromosómica del gen de la *presenilina 1* (*PSEN1*). Tomada y modificada de GENEATLAS.NCBI Homeo Page.

El gen codifica para la proteína presenilina 1 (*PSEN1*), una proteína integral de membrana de 467 aa, que contiene 8 dominios transmembranales cuyos extremos amino y carboxilo terminal se orientan hacia el citosol (Fig.7), las mutaciones en

PSEN-1 aumentan la producción del $A\beta_{42}$ a 43 aa que es el amiloide que se deposita en las placas seniles (Mann y cols., 1995; Jankowsky y cols., 2004). El gen de la *PSEN-1* está constituido por 12 exones de los cuales los dos primeros son regiones 5' no traducidas de manera que la proteína está codificada por los exones del 3 al 12 resultando en una proteína de 467 aa (Sherrington y cols., 1995; Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995).

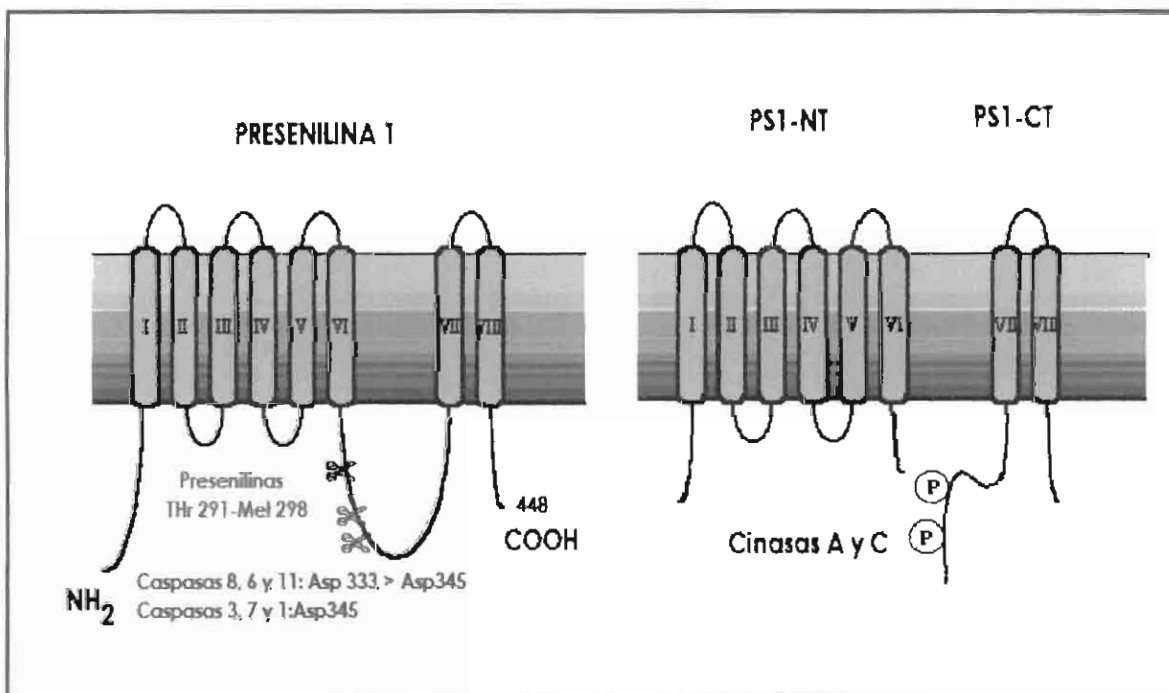


Fig. 7. Estructura de la presenilina 1, donde se muestran los 8 dominios transmembranales, horquillas hidrofóbicas e hidrofílicas y la generación de los extremos amino y carboxilo terminal que se orientan hacia el citosol, así como las regiones blanco de acción de caspasas y cinasas.

6.2. EA Y MUTACIONES EN LAS PRESENILINAS.

El gen de *PSEN-1* presenta procesamiento alternativo y el Grupo Colaborativo para el estudio de la EA en 1995, encontró en 40 familias de inicio temprano 6 mutaciones diferentes a las previamente descritas. Hasta la fecha se han descrito más de 166 mutaciones distintas en más de 356 familias de diferentes orígenes étnicos (Tabla 5, Fig 8), la mayoría de ellas son de sentido equivocado y en el marco del sitio de procesamiento (splicing), este gen se ha considerado responsable de la EA en la mayoría de las familias de inicio temprano (Cruts y cols., 1996; Thomas y Fenech, 2007; Alzheimer Disease Mutation Database , www.molgen.ua.ac.be/AD).

Desde el punto de vista clínico, la edad de inicio en estas familias oscila entre 35 a 55 años, con un margen estrecho dentro de cada familia y una penetrancia completa a la edad de 60 años, aunque puede existir penetrancia incompleta (Alonso y cols., 1992; Raux y cols., 2005). Las mioclonías es un rasgo fenotípico característico de estas mutaciones, así como la presencia de crisis epilépticas y semiología extrapiramidal (Lopera y cols., 1997)

El cuadro histopatológico es el característico de la EA y la duración de la enfermedad es más corta que en otras formas familiares o esporádicas de EA; (Karlstrom y cols., 2007).

Tabla 5. Mutaciones descritas en el gen *PSEN1* asociadas a la EA familiar de inicio temprano

DOMINIO	# FAMILIAS	# MUTACIONES
N-terminal	1 (0.61 %)	7 (1.94 %)
TM-I	8 (4.88 %)	9 (2.49 %)
HL-I	17 (10.37 %)	36 (9.97%)
TM-II	20 (12.20 %)	56 (15.51%)
HL-II	3 (1.83%)	17 (4.71%)
TM-III	17 (10.37%)	24 (6.65%)
HL-III	2 (1.22%)	3 (0.83%)
TM-IV	10 (6.10%)	28 (7.76%)
HL-IV	4 (2.44 %)	5 (1.39%)
TM-V	16 (9.76 %)	23 (6.37%)
TM-VI	8 (4.88 %)	15 (4.16%)
HL-VIa	15 (9.15 %)	28 (7.76%)
HL-VI	14 (8.54 %)	36 (9.97%)
HL-VIb	2 (1.22%)	2 (0.55%)
TM-VII	11 (6.71 %)	17 (4.71%)
HL-VII	1 (0.61 %)	1 (0.28%)
TM-VIII	7 (4.27 %)	10 (2.77%)
HL-VIII	2 (1.22 %)	35 (9.70%)
TM-IX	6 (3.66 %)	9 (2.49%)
TOTAL	164	361

TM: horquilla transmembranal, HL: asa hidrofílica o hidrofílica

En los casos con mutaciones en PSEN1 el alelo ϵ -4 de la Apolipoproteína E (APOE) no modifican la edad de inicio de la enfermedad. Un gran número de mutaciones aparecen agrupadas (Fig.8) en el segundo dominio transmembranal codificado por el exón 5 y el sexto dominio hidrofílico codificado por los exones del 8 al 11, lo que sugiere un papel funcional importante en estas zonas (Tandon, 2000; Tedde y cols., 2003). La mayoría de las mutaciones son puntuales y producen la sustitución de un aminoácido, están predominantemente localizadas en los dominios transmembranales (TM) altamente conservados, cercanos a la interfase de la membrana, o en el amino terminal hidrofóbico, o en los residuos hidrofóbicos del C-terminal putativos a la horquilla del dominio TM6-TM7 y se muestran en la Fig. 8 y 9. Se han identificado dos mutaciones que afectan el sitio de *splicing*, una mutación puntual en el sitio aceptor de *splicing* hacia el extremo 5' localizado en el exón 9. Esta mutación ocasiona que este exón se fusione con el exón 11, removiendo una serie de residuos cargados (carga ácida) en la punta de la horquilla hidrofílica, entre los dominios TM6 y TM7 sin embargo ésta no modifica el marco de lectura de la proteína (Queralt y cols., 2000; Russo y cols., 2000; Russo y cols., 2001).

La segunda mutación en el sitio de *splicing* resulta de la delección de una G (guanina) del nucleótido del sitio donador de *splicing* localizado hacia el extremo 3', en el exón 5; por lo que es necesario usar un sitio donador alternativo, causando una inserción en el marco de lectura de una tirosina dentro de la horquilla formada entre los dominios TM1 y TM2 (Rogaev y cols., 1997; Russo y cols., 2000).

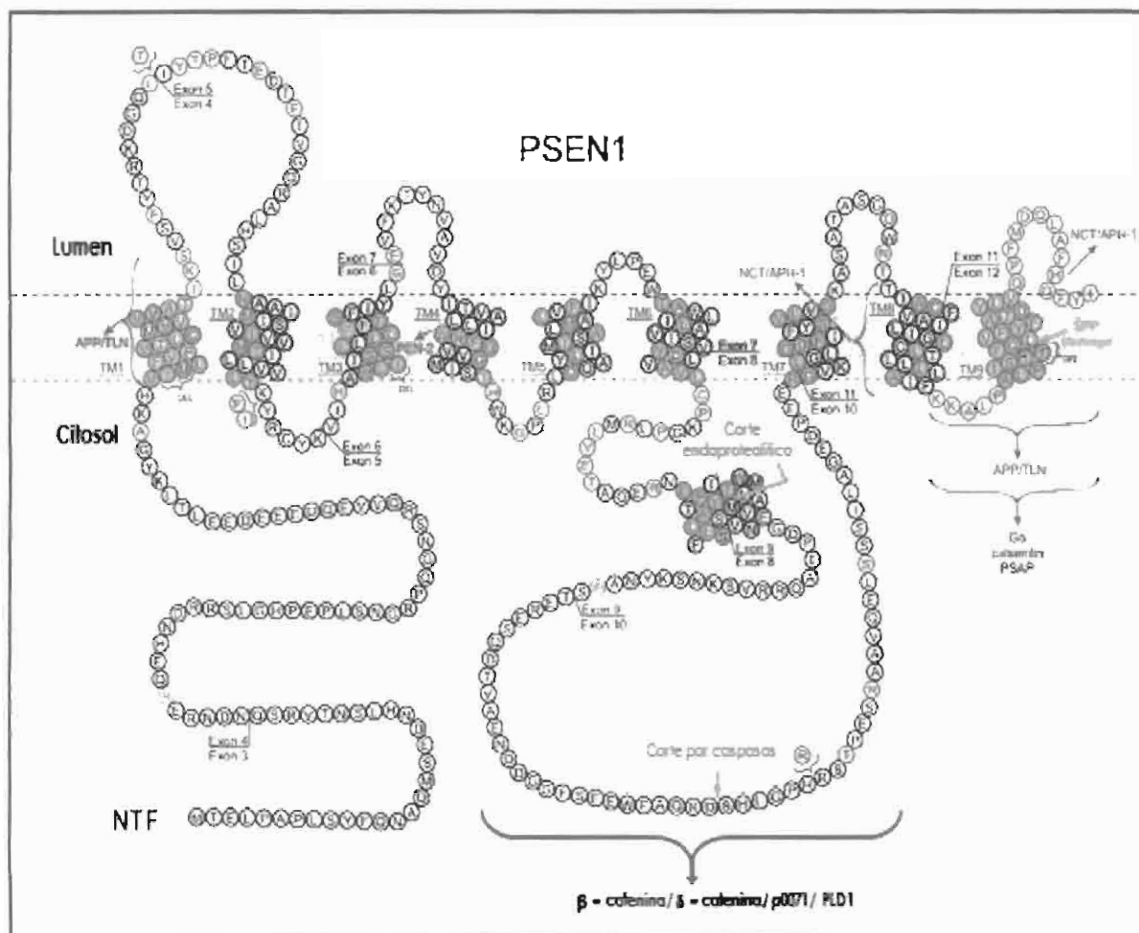


Fig. 8. Representación esquemática de la topología de la Presenilina 1 humana, en donde se muestran los nueve sitios transmembranales (TM) y la distribución de mutaciones, que son indicadas por los círculos rojos, mutaciones no patológicas por círculos naranja. Los dominios de interacción con PPA/TLN o NCT/APH-1/PEN 2 son marcados en azul, así como los residuos conservados D257 y D385 forman el sitio catalítico putativo. La interacción con el dominio C-terminal y el asa hidrofílica mayor con proteínas G, Go del cerebro, calsenilina, proteínas asociadas a PSEN1 (PSAP), β y δ -cateninas, p0071 y PLD1, son mostradas en verde oscuro. Los sitios de corte endoproteolítico que separan NTF-PSEN1 y CTF en la séptima región hidrofóbica SSP en el TM 9 y los sitios de corte de caspasas en el asa hidrofílica son indicados por flechas amarillas. (Tomada y modificada de Dillen K y Annaert W, 2006; www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2006.asp).

Se ha informado de casos con mutaciones en PSEN1 en pacientes diagnosticados como demencia frontotemporal, que después del estudio anatomopatológico resultaron ser Alzheimer (Zekanowski y cols., 2006), así como una probable *mutación de novo* (S170F) en un caso de inicio temprano (Golan y cols., 2007; Piccini y cols., 2007)

Se ha descrito un efecto fundador con la mutación Gly206Ala, en el exón 7 de la *PSEN1*, en 8 de 19 familias Hispano Caribeñas con EA de inicio temprano con patrón de herencia AD, se trataba de una mutación no reportada en las bases de datos públicas, en la que los individuos portadores de la mutación presentaban una variante alélica de un marcador microsatélite cercano al gen *PSEN1*, el cual segregaba con la mutación, lo que indicaba un ancestro común. (Athán y cols., 2001)

6.3. PRESENILINA 2

El tercer *locus* se pudo conocer a partir de un grupo de casos de EA familiar en las comunidades descendientes de colonos alemanes instalados por los zares en la región del Volga, en Rusia y que en los últimos 100 años y tras la segunda Guerra Mundial, han emigrado a los Estados Unidos y a Alemania (Bird y cols., 1998, Bird y cols., 1989a; Bird y cols., 1989b). Mediante análisis de ligamiento, estas familias mostraron ligamiento a marcadores del cromosoma 1. En 1995 se localizó y clonó el gen responsable en el cromosoma 1q42.1, que produce una proteína llamada STM2 o presenilina 2 de 448 aa, la cual tiene 84% de homología (en los dominios hidrofóbicos transmembranales y en menor grado hacia la región amino terminal,

Fig. 9) con la secuencia de aa de la PSEN1 (Cruts y cols., 1996; Levy-Lahad y cols., 1995b, Levy-Lahad y cols., 1995c).

En el caso del gen *PSEN2* sólo se han descrito 10 mutaciones (Tabla 6) en este gen, las primeras 3 de ellas identificadas en las familias germanas del Volga, en una familia italiana y en una holandesa (Piscopo y cols., 2005; Finckh y cols., 2005). La edad de inicio de la enfermedad en las familias alemanas es alrededor de los 54 años, con una gran variabilidad y la duración de la enfermedad es significativamente más larga que en las familias con mutación en *PSEN1*. Al igual que en *PSEN 1*, no se ha observado cambio en la edad de inicio, en función del haplotipo APOE acompañante y desde el punto de vista neuropatológico, esta demencia es indistinguible de la EA esporádica.

Tabla 6. Mutaciones descritas en el gen *PSEN2* asociadas a la EA de inicio temprano.

DOMINIO	# FAMILIAS	# MUTACIONES
N-terminal	1 (10.0 %)	1 (5.56%)
HL-I	2 (20.0%)	3 (16.67%)
TM-II	2 (20.0%)	9 (50.00%)
TM-V	3 (30.0%)	3 (16.67%)
TM-IX	1 (10.0%)	1 (5.56%)
C-terminal	1 (10.0%)	1 (5.56%)
TOTAL	10	18

Las mutaciones en PS2 se encuentran en: [Alzheimer Disease Mutation Database](http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations) (ADMD), elaborado y actualizado por Marc Cruts y de: [www.molgen.ua.ac.be/AD mutations](http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations). TM: horquilla transmembranal, HL: horquilla hidrofóbica

Otra profunda diferencia entre las mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2*, es que el fenotipo asociado con *PS2* es mucho más variable, así el rango de edad de inicio en portadores heterocigotos de mutaciones en *PS2* es entre 40 y 80 años de edad (Cruts y cols., 1998). Existe una falta de penetrancia en algunos octogenarios que transmiten la enfermedad a su descendencia, en contraste con el reducido rango de edad de inicio y la alta penetrancia de las mutaciones en *PSEN1* (Gómez-Isla y cols., 1999, Leo y cols., 2002). Estas diferencias se observan a pesar de las fuertes similitudes en estructura y en secuencia de aa de las proteínas *PSEN1* y *PSEN2*, pero es probable que tengan actividades similares o las sobrelapen. Las mutaciones en ambas presenilinas incrementan la secreción del péptido β -amiloide $_{42}$, además de que las mutaciones en *PSEN2* también incrementan la sensibilidad a apoptosis, pero no es claro aún si se trata de un efecto independiente (Xia, 2000; Lleo y cols., 2001; Walter y cols., 2005; Bentahir y cols., 2006). Las mutaciones en las presenilinas producen proteínas que se ha encontrado están localizadas dentro de la membrana nuclear, centrómeros y cinétocoros (Lamb y cols., 2005). Por lo que su papel en la segregación y organización del cromosoma pueden alterar la capacidad y funcionamiento de otras proteínas para bloquear o eliminar cromosomas de la membrana nuclear durante la mitosis, conduciendo a errores en la segregación de cromosomas dando como resultado una elevación de aneuploidias principalmente de cromosomas 18 y 21 (Petronis, 1999; Thomas y Fenech.,2007; Panossian y cols.,2003). Las células aneuploides pueden ser susceptibles para la muerte celular programada lo que conduce directamente a la neurodegeneración por sobre-

expresión de los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *PPA* que se incrementa en células sensibles a estímulo apoptótico. Estas células sucumben a la apoptosis producen áreas de inflamación inducidas por fagocitos de la microglía cerebral, que rodea la placa neurítica (Leschik y cols., 2007)

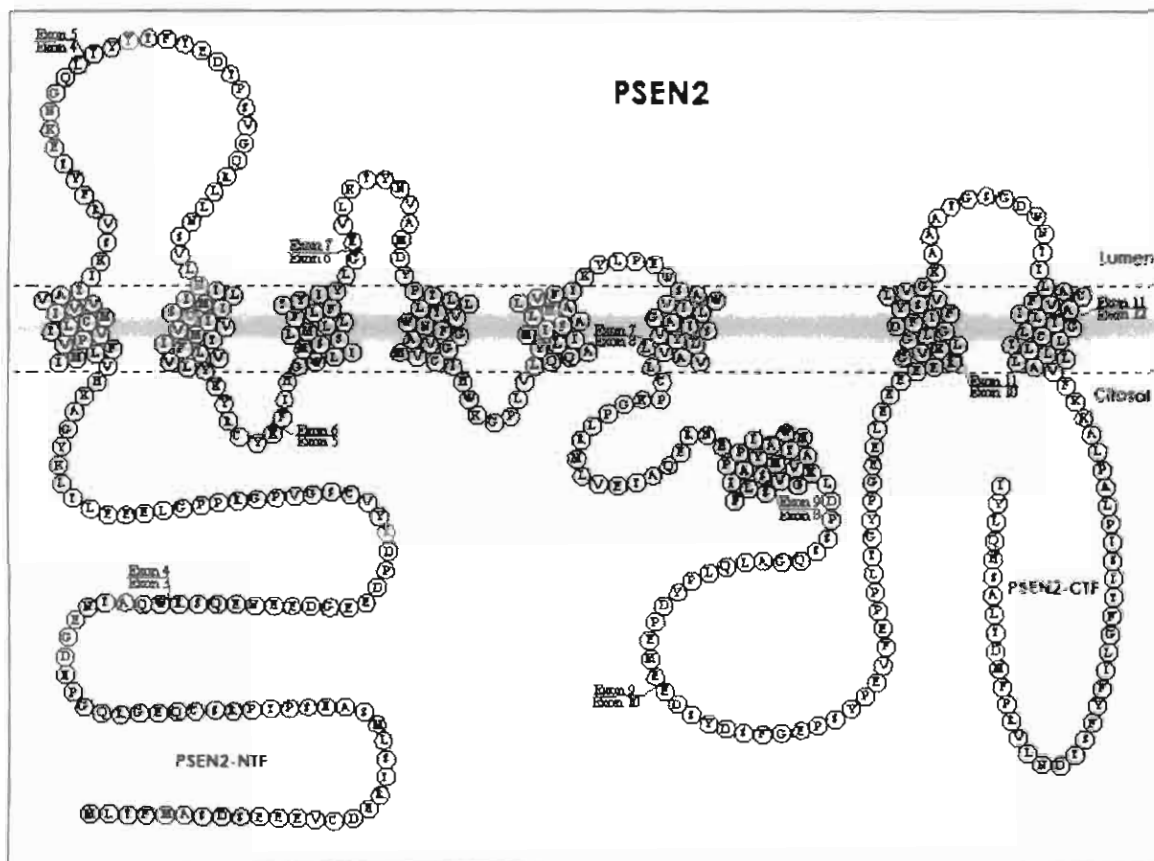


Fig. 9. Representación esquemática de la topología de la Presenilina 2 humana, en donde se muestran los ocho sitios transmembranales (TM) y la distribución de mutaciones. Se representan también las regiones hidrofóbicas (RH7 y RH8), entre ambas una asa hidrofílica mayor. (Tomada y modificada de Crook R., 2002, www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2.asp).

La hiperfosforilación de tau conduce al rompimiento del sistema de microtúbulos, lo cual produce aneuploidias por defectos en el huso mitótico (Fath y cols., 2002; Thomas y Fenech., 2007)

6.4 FUNCIÓN DE LAS PRESENILINAS EN LA EA.

Las presenilinas se expresan en diferentes tejidos como: corazón, hígado, páncreas, bazo, riñón, testículo y cerebro, sus transcritos están presentes en neuronas de hipocampo, corteza cerebral, cerebelo y plexos coroides (Levy-Lahad y cols., 1995c).

El análisis histoquímico de secciones de cerebro de pacientes con EA usando un anticuerpo policlonal para el carboxilo terminal de la PSEN1, ha permitido localizarla en las placas neuríticas en forma similar al β -amiloide. La PSEN1 funciona como un complejo multiproteico que compromete al menos 3 proteínas transmembranales denominadas: nicastrina, Aph-1 y Pen-2 como se muestra en la fig. 18. La biogénesis de estas cuatro proteínas y su ensamblaje forma un complejo de alto peso molecular, que esta altamente regulado, por un proceso que depende de la disponibilidad de cada uno de las proteínas en concentraciones estequiométricas (Leem y cols., 2003).

PSEN1 es sintetizada como un polipéptido de 42 a 43 kD y sufre un proceso endoproteolítico en la horquilla citoplasmática que une a los segmentos transmembranales 6 y 7 para generar un fragmento amino terminal de 27 a 28 kDa (NTF) y un fragmento carboxilo terminal de 16 a 17 kDa (CTF)

En células transfectadas sólo una fracción de PSEN1 se sobreexpresa y es convertida a un NTF y CTF estable, mientras que la mayoría del polipéptido nascente es rápidamente degradado, indicando que la acumulación del NTF y CTF es regulado y saturable (LaVoie y cols., 2003). Así la endoproteólisis de las presenilinas es un proceso altamente conservado de eventos que regulan la acumulación de estos fragmentos y su posible función biológica. Existen evidencias directas de que el ensamblaje NTF/CTF es parte activa del complejo enzimático de la γ -secretasa, resultado de los estudios realizados con análogos inhibitorios de proteasas aspárticas (Duyckaerts y cols., 2007).

Evidencias bioquímicas, genéticas y farmacológicas recientes en *Caenorhabditis elegans* demuestran que la endoproteólisis y la acumulación de fragmentos son regulados por la disponibilidad de nicastrina, Aph-1 y Pen-2. (Fig 10)

Interesantemente, cada una de estas proteínas parece ser co-dependiente para su biogénesis, maduración y estabilidad por ejemplo: la nicastrina es una proteína de membrana tipo I, altamente glicosilada no madura, ni sale al RE en células que carecen de la expresión PS1, mientras que PS1 falla en la endoproteólisis para generar NTF y CRF estables en células $-/-$ nicastrina (Georgakopoulos y cols., 1999; Xia y cols., 2000)

Es claro ahora que la actividad de γ -secretasa depende de la expresión estequiométrica de cada uno de estos componentes y de su propio ensamblaje y tráfico a las localizaciones subcelulares apropiadas. Strooper y cols., fueron los primeros en reportar el papel directo de PSEN1 en el proceso de liberación del β -A,

cuando notaron la pérdida de secreción del β -A y la acumulación de fragmentos CT de la PPA en neuronas PSEN 1^{-/-} y la fuerte similitud con del corte proteolítico del receptor transmembranal Notch (Tabaton y Tamago., 2007).

Por su homología con otras proteínas del reino animal, se han establecido similitudes funcionales que tienen de homología las proteínas spe-4 y sel-12 del *C. elegans* (57%) e incluso plantas como la *Arabidopsis thaliana* (33%) y en un 90% con *Xenopus laevis*. Esta homología con otras especies reside en la secuencia de aa dentro de las regiones hidrofóbicas (Fraser y cols., 2000).

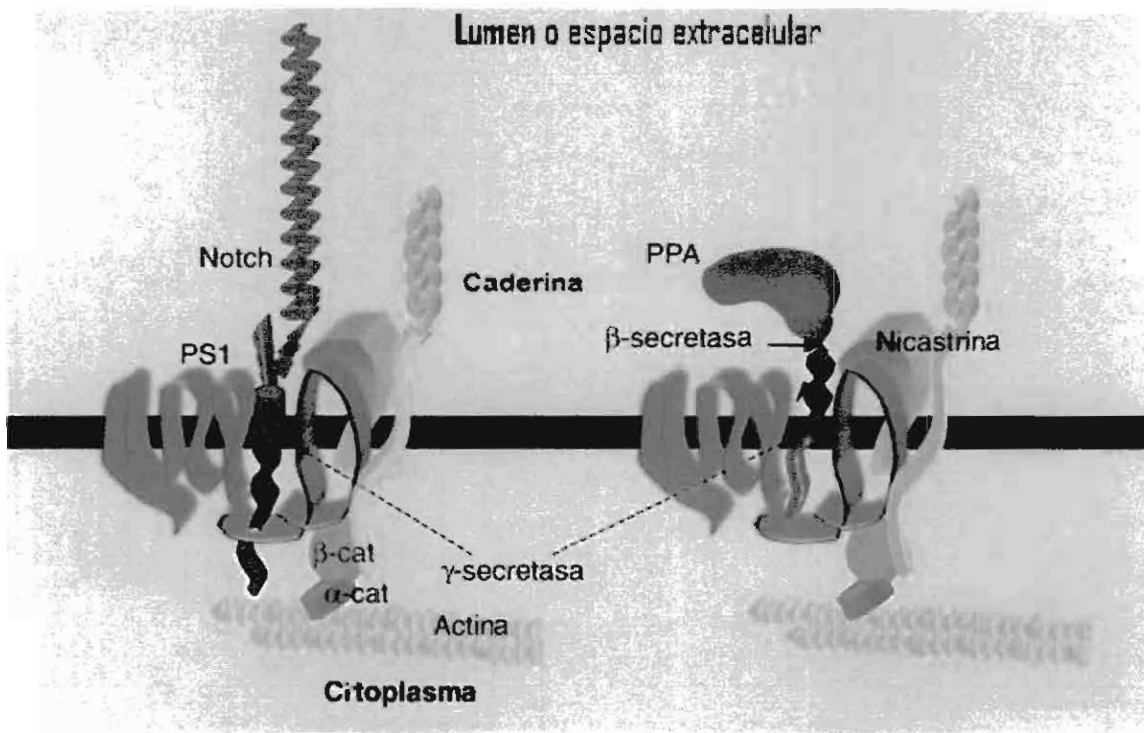


Fig. 10. Complejo multiproteico de PSEN 1, en que involucra a las proteínas Notch, nicastrina, α y β caderinas. Tomada y modificada de La Voine y cols., 2003)

El gen *Sel 12* de *C. elegans* afecta la vía de señalamiento intercelular mediada por *lin12/notch* en el intercambio de señales entre la superficie celular y el núcleo (Ray y cols., 1999; Czech y cols., 2000).

El segundo gen *spe 4* se expresa en organelos de unión a membrana derivados de Golgi de espermátocitos primarios, se requiere para la unión de los organelos a los cuerpos fibrosos de estos precursores espermáticos y esta unión es esencial para el transporte intracelular de proteínas durante la espermatogénesis de *C. elegans* y podría realizar funciones similares en las neuronas (sin olvidar que en humanos la presenilina 1 se expresa de manera importante en las gónadas masculinas) (Wittenburg y cols., 2000; Yu y cols., 2000).

La presenilina 1 humana muestra un 48% de identidad en su secuencia de aa con la proteína sel-12, la cual participa durante el desarrollo de *C. elegans* en la transmisión directa de señales de la superficie al núcleo. La presenilina 2 muestra homología con alg-3 una proteína que bloquea la transducción de señales durante la inducción por células T de muerte celular por apoptosis, lo que explica el posible papel funcional de estas proteínas (Czech y cols., 2000; Wittenburg y cols., 2000).

Se han desarrollado ratones deficientes en PSEN1 y se ha demostrado que la PSEN1 de mamífero también puede funcionar en el señalamiento Notch, a partir del acumuló de fragmentos derivados de la actividad β -secretasa, se ha propuesto que la presenilina sea la enzima que participa en al rotura de Notch además del β -A (Holcomb y cols., 1998; Kostyszyn y cols., 2001).

6.5. PRESENILINAS Y ANIMALES TRANSGÉNICOS

Los ratones nulicigóticos mueren antes o poco después del nacimiento con malformaciones esqueléticas, pérdida de células neuronales y hemorragias severas en cerebro y médula espinal, estos hallazgos sugieren que *PSEN1* se requiere para el desarrollo del SNC (Donoviel y cols., 1999; Russo y cols., 2001).

Para entender los mecanismos patológicos de las mutaciones en *PSEN1*, en pacientes con EA familiar de inicio temprano es importante determinar si se debe a una ganancia o pérdida de la función, el hecho es que estas mutaciones incrementan la producción del β A-42/43 influyendo en las actividades de β y γ secretasas (Ponting y cols., 2002; Russo y cols., 2000).

Esto se ha confirmado parcialmente por dos observaciones en ratones *knock-out* ($PS^{-/-}$): primero, estos animales presentan un fenotipo de mortalidad perinatal temprana, sin evidencia de enfermedad de Alzheimer (Czech y cols., 2000).

Esta pérdida de función en animales con el fenotipo ($PS^{-/-}$), puede ser completamente rescatada por transgenes silvestres (*wildtype*) o *PSEN1*, ya que los ratones con mutaciones homocigotas no sobreviven al primer día de vida. Mientras aquellos con mutaciones heterocigotas pueden ser viables y fértiles y sólo presentar algunas alteraciones fenotípicas como: bajo peso al nacer, estatura corta, anomalías esqueléticas en la columna vertebral, curvatura en la cola (Donoviel y cols., 1999). Las alteraciones esqueléticas observados en ratones *knock-out* para *PSEN1*, se observan al 9º día de vida embrionaria y hallazgos similares se han

encontrado en animales *knock-out* para la proteína Notch y DLL1 (homólogo de Notch en drosófila) sufren una anomalía similar en la somitogénesis, lo cual ha sugerido una relación entre PSEN1 y Notch. La vía de señalización Notch es importante para el desarrollo embrionario, la hematopoyesis y la diferenciación neuronal. Confirmándose estos resultados en ratones nulicigóticos para PSEN1 que mueren durante la embriogénesis y muestran malformaciones esqueléticas y defectos del SNC causados por la pérdida de células neuronales y hemorragias severas las cuales indican que PSEN1 se requiere para el desarrollo del SNC (Struhl y cols., 2000).

Los ratones ($PS^{-/-}$) tienen un defecto en el procesamiento de la PPA manifestándose por una falla en el corte realizado por la γ -secretasa y la acumulación de fragmentos C-terminal de la PPA producidos por el corte de α y β -secretasas. El defecto en el procesamiento PPA es completamente revertido por transgenes silvestres o mutantes PSEN1 (Qian y cols., 1998; Rosenberg, 2000).

La ganancia de función es dada por los transgenes mutantes porque además inducen a un incremento del β A-42, lo cual es consistente con los efectos bioquímicos de las mutaciones PS1. Sin embargo y usando cDNAs de PS1 humana en ensayos de complementariedad de mutantes sel12 en *C. elegans* sugieren que la PS1 humana tipo silvestre es capaz de complementar la pérdida de la función en mutantes sel12, pero no así los cDNAs de PS1 mutantes (Price y cols., 1998; Struhl y cols., 2000).

Independientemente de que las mutaciones en *PSEN1* o *PSEN2* causen una ganancia o pérdida de la función, se ha visto que probablemente un efecto sea alterar el procesamiento de la PPA al favorecer la producción del péptido de 42 aa, potencialmente tóxico (Sisodia y cols., 1999; Lleo y cols., 2002).

La liberación del péptido tóxico forma parte del mecanismo por el cual es procesada la PPA por γ -secretasas, ya que el amiloide polimeriza en la placa neurítica con una configuración de hojas beta contribuyendo así a su neurotoxicidad. Es interesante también como las placas amiloides co-localizan con diversas moléculas involucradas también en la patogénesis de la EA, incluyendo ubiquitina, APOE, α_1 -anti-quimotripsina, α_2 -macroglobulina, *PSEN1* y *PSEN2* (Hutton y cols., 1997).

En cultivo de fibroblastos con mutaciones *PSEN1* se produce un incremento del 50% de productos de corte de 28 y 18 kD incrementándose también en un 50% la producción β -amiloide de 42 a.a., sugiriendo que el corte por presenilina tiene un efecto directo sobre la síntesis y procesamiento del β -amiloide (Lleo y cols., 2001).

Las mutaciones en ambas presenilinas alteran el proceso proteolítico normal del β -A mediante la β y γ secretasas dando lugar a un acumulo de β -A junto con la degeneración neurofibrilar y una mayor pérdida neuronal en el cerebro de los pacientes con EA.

Las presenilinas pueden funcionar influyendo con la actividad de γ -secretasas o pueden ser un cofactor de γ -secretasa (Czech y cols., 2000; Fraser y cols., 2000).

Las mutaciones en *PSEN1* incrementan la actividad de caspasas (proteasas específicas de aspartato dependientes de cisteína), inducen apoptosis y una

desregulación en importantes vías de señalización (Fig.11), en el plegamiento de proteínas de respuesta en el retículo endoplasmático (Scheper y cols., 2000; Yukioka y cols.2007).

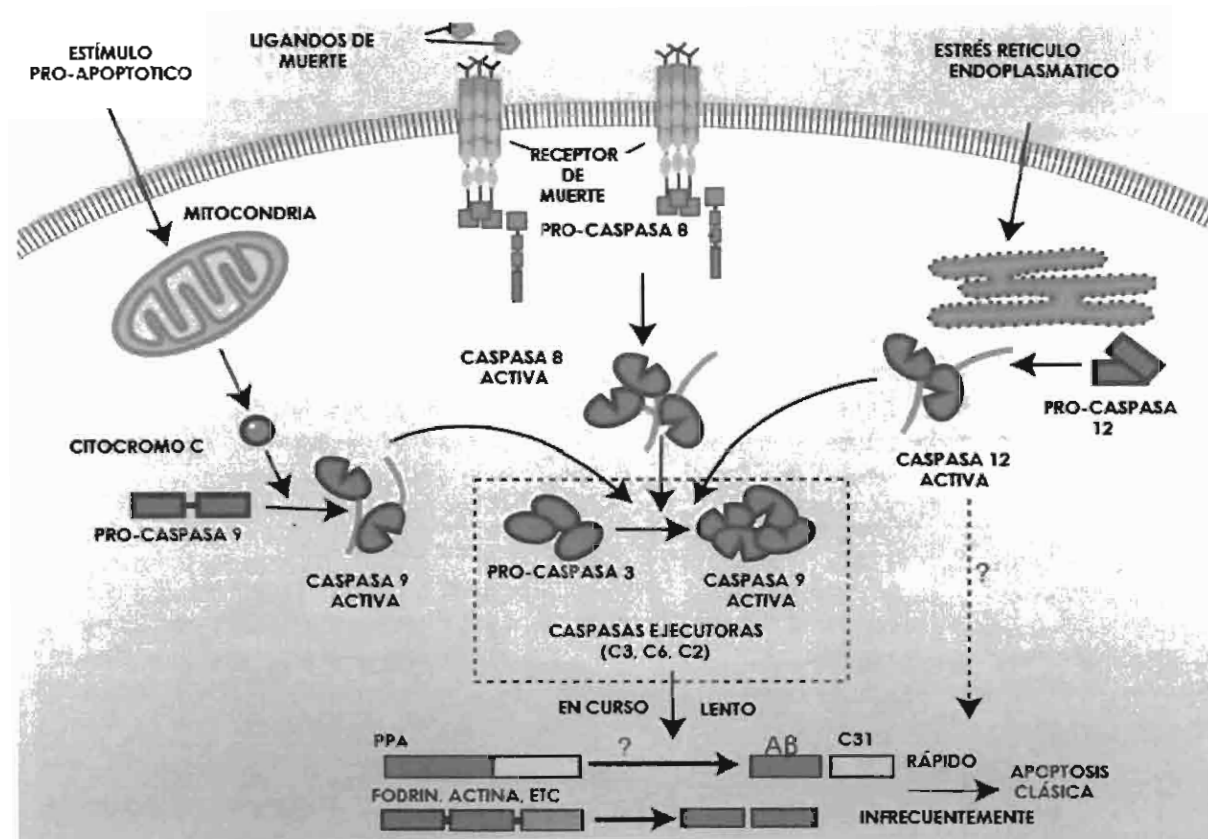


Fig. 11. Rutas de apoptosis, su actividad se dispara por diferentes vías y puede ser conducida por la actividad de las caspasas en las neuronas de los cerebros de los pacientes con EA. Esto conduce a la producción del β -A, así como al rompimiento de proteínas neuronales, que provocan mal funcionamiento neuronal y finalmente la muerte neuronal. (Tomada y modificada de Marx J., 2001)

Las mutaciones en *PSEN-1*, *PSEN-2* y *PPA* conducen a la patología de la EA familiar a través de una vía bioquímica común, y en el caso de *PSEN1* condicionan a un inicio más temprano y severo de la enfermedad. Además de estos genes implicados en las formas familiares de EA, existen otros genes relacionados con la susceptibilidad a padecer la EA en conjunto con otros factores genéticos o ambientales no conocidos. Sin embargo en nuestra población no se conoce la frecuencia de mutaciones en las *presenilinas* principal causa de EA familiar de inicio temprano y menos aún su efecto, por lo que es de gran interés establecerlo, ya que la EA tiene un pronunciado impacto en nuestra vida social y económica.

Un diagnóstico temprano y preciso en orden para identificar la expresión anormal de estos genes conocidos, incluyendo factores de riesgo en individuos presintomáticos con un incrementado riesgo de padecer la EA, permitirá el desarrollo e implementación de medidas preventivas contra esta enfermedad.

Planteamiento del problema

Hipótesis

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Debido a que la EA es la principal causa de demencia en las distintas poblaciones, desde hace más de 10 años en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS) se han realizado estudios clínicos en familias con EA, siendo de particular interés aquellas que presentan un patrón de herencia autosómico dominante, en las cuales resulta de gran interés investigar la causa molecular que condiciona el desarrollo de la EA. Los resultados obtenidos permitirán conocer la participación de mutaciones en el gen de la presenilina 1 en familias mexicanas con EA de inicio temprano, así como determinar cómo segregan estas mutaciones en el resto de la familia e investigar si en estas familias existen mutaciones frecuentes que pudiera sugerir un efecto fundador.

III. HIPÓTESIS

Mutaciones en el gen de la Presenilina 1 son causa frecuente de enfermedad de Alzheimer de inicio temprano en familias mexicanas.

Objetivos

IV.- OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización genética y molecular de las mutaciones y/o polimorfismos en el gen de la *PSEN1* implicados en la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Consolidar y ampliar el acopio actual de las muestras de DNA genómico de pacientes con EA familiar de inicio temprano y de sus familiares en riesgo.
- 2.- Identificar mutaciones y/o polimorfismos en el gen *PSEN1*, en pacientes con EA familiar de inicio temprano y estudiar su segregación en el resto de la familia.
- 3.- Correlacionar fenotipo y genotipo mediante el análisis de las mutaciones y/o polimorfismos identificados con las características clínicas de los pacientes.

Relevancia e Impacto

V.- RELEVANCIA E IMPACTO.

Se contribuirá al conocimiento de la etiología de la enfermedad de Alzheimer en familias mexicanas, ya que se desconoce en nuestro país las causas de la misma.

Se conocerá cómo contribuyen las mutaciones y/o polimorfismos de *PSEN1* en los mecanismos bioquímicos y patológicos de la enfermedad, así como en la edad de inicio y progresión de la enfermedad, para ofrecer un mejor diagnóstico y poder establecer los riesgos genéticos en el resto de la familia.

Se contribuirá al conocimiento, manejo y asesoramiento genético y en un futuro poder ofrecer diagnóstico presintomático en los individuos en riesgo que lo soliciten.

Material y Métodos

VI.- MATERIAL Y METODOS.

1.1 SUJETOS DE ESTUDIO.

Se realizó la captación de pacientes con EA y familiares de primer grado que acudieron al Depto. de Neurogenética del INNNMVS que cumplieron los criterios diagnósticos para probable EA propuestos por McKhann y cols (1984), del grupo de NINCDS-ADRDA y por el DSM-IV-R (1994) y que aceptaron donar una muestra de sangre, previa firma de una carta de consentimiento informado. La muestra consistió de 97 individuos que pertenecen a 12 familias con enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, 12 fueron probandos y el resto familiares en riesgo.

Para determinar si un cambio en la secuencia del gen *PSEN1* era un polimorfismo o una mutación patogénica, se utilizó una muestra de 100 controles sanos, con un rango de edad de 60 a 92 años (50 individuos de la ciudad de México y del Edo. De México, así como 50 individuos del Estado de Jalisco), individuos no relacionados, sin antecedentes familiares de demencia, que acudieron a donar sangre al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS), así como de organizaciones gubernamentales de jubilados y pensionados (INSEN).

Criterios de Inclusión. Se incluyeron pacientes con EA familiar de inicio temprano que cumplieron los criterios clínicos descritos en el DMS-IV, previa valoración neurológica y psicológica. Así como a los familiares que aceptaron participar en el estudio. En el caso del grupo control a los individuos mayores de 60 años se les

aplicó la prueba de Minimental para asegurar que no presentaban deterioro cognoscitivo.

Criterios de Exclusión. Pacientes que no cumplieron los criterios clínicos y genéticos para EA y aquellos que no aceptaron participar en el estudio.

1.2. AISLAMIENTO DE DNA.

Se tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica en tubos vacutainer con anticoagulante ACD, a cada uno de los probandos, así como a los familiares en riesgo y al grupo control previo consentimiento informado.

1.2.1. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos, empleando dos métodos de extracción, dependiendo de la cantidad de muestra obtenida. Se empleó el método de precipitación por sales extracción/fenol-cloroformo (Miller y cols., 1988, modificado por nuestro laboratorio) o el uso de un kit comercial (Qiagen o Eppendorf), siguiendo los siguientes pasos:

1.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CON SALES

Se realizó el procedimiento de lisis de células rojas, hasta obtener el botón de células blancas libre de hemoglobina.

1.2.2.1 LISIS DE CÉLULAS ROJAS.

Se vertió el contenido de los tubos vacutainer a un tubo cónico de 50 ml y se adicionaron 2 volúmenes del amortiguador de lisis de células rojas (5mM $MgCl_2$, 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM NaCl), se mezclaron por inversión cuidadosamente para después ser centrifugados por 10 min., a 5,000 rpm a 4°C. Después de la

centrifugación se eliminó el sobrenadante y se añadió nuevamente amortiguador para volver a repetir este paso hasta que el botón de células blancas que se forma quedara libre de hemoglobina.

El botón se resuspendió con 1 ml. del amortiguador de células rojas y se adicionaron al vial: 886 μ l de NaCl 5 mM, 46 μ l de SDS al 10%, se mezcló con vortex y se adicionó 308 μ l de NaCl saturado, se mezcló nuevamente y se centrifugó durante 15 min. a 11,000 rpm a 4°C. Después de centrifugar el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se realizó el método de extracción con fenol-cloroformo y la precipitación se realizó con un volumen de isopropanol frío.

1.2.2.2- EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.

- a) Se añadió un volumen equivalente (v/v) de fenol saturado, se mezcló por inversión manual, durante 10 min. , hasta obtener una emulsión completa.
- b) Se centrifugó durante 10 min. a 3,000 rpm/4°C, se tomó la fase superior y se pasó a un tubo limpio (evitando llevarse la interfase).
- c) Se realizó una segunda extracción con la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (v/v), repitiéndose el paso de centrifugación.
- d) La fase superior se pasó a un tubo limpio y se realizó la tercera extracción con la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (v/v), repitiendo las mismas condiciones.

1.2.2.3- PRECIPITACIÓN CON ISOPROPANOL

La fase superior de la última extracción se pasó a un tubo limpio y se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol frío a -20°C , se mezcló suavemente por inversión hasta que el DNA precipitó.

Se lavó el DNA con etanol al 70% dos veces, centrifugando entre cada una de las lavadas y eliminando el sobrenadante sin remover el botón de DNA. Se eliminó el exceso de etanol y se secó el DNA para ser resuspendido en agua estéril.

1.2.2.4 CUANTIFICACIÓN DEL DNA.

Se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089M, ácido Bórico 0.089 M, EDTA, pH 8, 0.002 M), el corrimiento se realizó a 100 V por 30 min. Después de la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio ($0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$) y se analizó bajo luz UV.

Se cuantificó el DNA por espectrofotometría a 260 nm y se estableció su pureza mediante la relación 260/280.

Se realizaron dos métodos de extracción de DNA dependiendo de la cantidad de sangre que se podía obtener, en general por ambos métodos se obtuvo DNA genómico de alto peso molecular, de buena calidad e integridad como se muestra en la Fig. 12.

En promedio se obtuvo una concentración de $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ y la relación 260/280 fue de 1.8, lo cual cumple con lo establecido en pureza para DNA genómico.

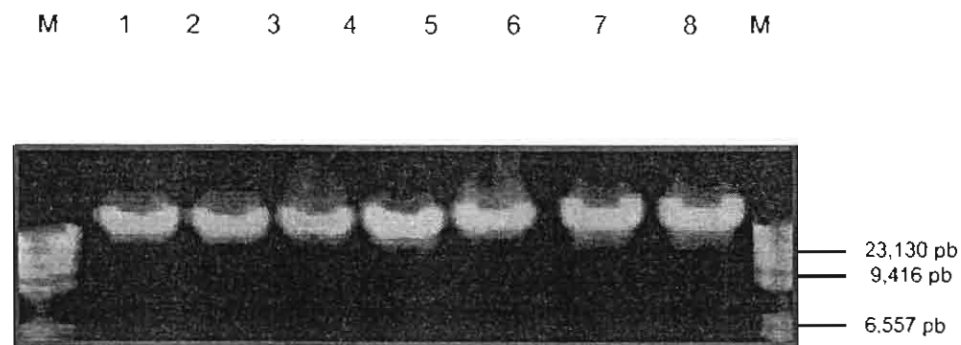


Fig. 12. Gel de agarosa al 1% muestra DNA genómico de alto peso molecular (carriles 1 al 8), extraído a partir de sangre periférica, comparado con el marcador (M) de peso molecular (DNA λ Hind III, concentración 0.5 μ g/ μ l, donde se observa que la banda superior es de 23,130 pb).

2. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *PSEN1*

Se establecieron las condiciones para el análisis de las mutaciones del gen *PSEN1*, el cual se realizó mediante la amplificación en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA genómico y secuenciación directa. Se analizaron las regiones codificantes (exones 3 al 12) y las uniones intrón-exón del gen *PSEN1* en la tabla 7 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y el tamaño obtenido en cada uno de los exones amplificados. (Cruts y cols., 1998)

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño de los productos de PCR amplificados de los exones 3-12

Exón	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (pb)
3	S182ex3-1	ACAAAGTTCTGTTTTCTTTCCC	247
	S182ex3-2	CAGCATTTCTCAGAGGTGAGG	
4	S182ex4-1	CGTTACCTTGATTCTGCTGA	371
	S182ex4-2	GACATGCTGTAAAGAAAAGCC	
5	S182ex5-3	GATTGGTGAGTTGGGGAAAAGTG	335
	S182ex5-4	ATACCCAACCATAAGAAGAACAGG	
6	S182ex6-3	GGTTGTGGGACCTGTTAATT	149
	S182ex6-4	TTAATTCTGAAAGACAGACCC	
7	S182ex7-1	GGAGCCATCACATTATTCTAAA	326
	S182ex7-2	AACAAATTATCAGTCTTGGGTTT	
8	S182ex8-1	TTACAAGTTTAGCCCATACATTTT	215
	S182ex8-2	TCAAGTTCCCGATAAATTCTAC	
9	S182ex9-1	TGTGTGTCCAGTGCTTACCTG	188
	S182ex9-2	TGTTAGCTTATAACAGTGACCCTG	
10	S182ex10-1	CCAGCTAGTTACAATGACAGC	345
	S182ex10-2	TCAAAAAGGTTGATAATGTAGCT	
11	S182ex11-1	GGTTGAGTAGGGCAGTGATA	275
	S182ex11-2	TTAAAGGGACTGTGTAATCAAAG	
12	S182ex12-1	GTCTTTCCCATCTTCTCCAC	199
	S182ex12-2	GGGATTCTAACCGCAAATAT	

La reacción de PCR se realizo de la siguiente manera (Tabla 8):

DNA (200 ng/ µl)	2.0 µl
Master Mix (10X)	10.0 µl
Primer F (250 µM/ µl)	2.0 µl
Primer R (250 µM/ µl)	2.0 µl
Agua (cbp 25 µl)	9.0 µl

Se estableció el programa de PCR de acuerdo a la temperatura de desnaturalización (tm) de cada uno de los oligonucleótidos, la cual determina la temperatura de alineamiento. La reacción de PCR se sometió al programa y se realizo en un Termociclador (Applied Biosytem) en forma general consistió de:

Desnaturalización inicial	94°C, 10 min.	
Desnaturalización	94°C, 30 seg.	} 35 ciclos
Alineamiento	52°C, 30 seg.	
Extensión	72°C, 45 seg.	
Extensión final	72°C, 5 min.	
4°C	α	

Se analizó el tamaño de cada uno de los productos esperados para cada exón, por electroforesis en geles de agarosa al 3% en TBE1X, comparándolos con el marcador de peso molecular VIII (Roche) (Fig. 13).

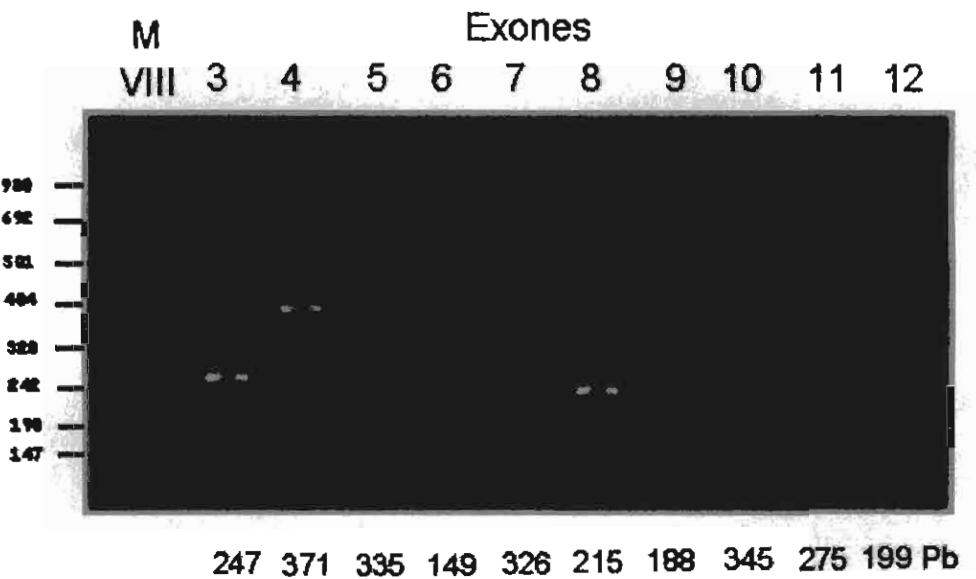


Fig. 13 Se muestran los tamaños de los productos de PCR obtenidos para los exones de la región codificante del gen *PSEN1*, analizados en gel de agarosa al 2.5%/TBE1X.

2.1. SECUENCIACIÓN.

Para determinar las mutaciones presentes en la región codificante del gen *PSEN1* los productos amplificados fueron secuenciados, por lo que fue necesario purificarlos empleando el kit QIAquick (QIAGEN) y el siguiente método:

- 1.- Se adicionaron 5 volúmenes de amortiguador PB por un volumen de reacción de PCR. Se mezcló antes de poner en la columna (150 µl de amortiguador PB X 30 µl de reacción de PCR).
- 2.- Se colocó la columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml y se adicionó la mezcla del paso 1, para unir el DNA a la columna.
- 3.- Se centrifugó a 13,000 rpm / 30 - 60 seg.
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se colocó nuevamente la columna en el mismo tubo.
- 5.- Para lavar la columna, se adicionaron 0.75 ml del amortiguador PE y después se centrifugó a 13,000 rpm por 30 a 60 seg.
- 6.- Se eliminó el fluido y se puso nuevamente la columna sobre el mismo tubo, se centrifugó por un minuto a máxima velocidad para eliminar de esta forma restos de etanol.
- 7.- Se pasó la columna a un tubo nuevo de microcentrífuga previamente rotulado.

8.- Se eluyó el DNA de la columna adicionándole 50 µl del amortiguador EB o agua estéril a pH: 7 – 8.5, en el centro de la columna y se centrifugó por un minuto para recuperar el DNA.

2.1.1. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Los productos purificados fueron nuevamente analizados en geles de agarosa al 2.5 % en TBE1X, previo a la reacción de secuenciación (Tabla 9) la cual consistió de:

Tabla 9. Reacción de secuenciación componentes de la reacción.

Producto de PCR purificado	1.0 µl
Big Dye V3.3	1.0 µl
Primer F o R	1.0 µl
Amortiguador 5X	3.5 µl
Agua cbp 20µl	13.5 µl

La reacción se realizó en un Termociclador (Applied Biosystem) bajo el siguiente

programa:	Desnaturalización	96°C, 30 seg	
	Desnaturalización	95°C, 30 seg	
	Alineamiento	50°C, 10 seg	} 25 ciclos
	Extensión	60°C, 4 min	
	Extensión final	72°C, 1min	
	4°C	α	

2.1.2. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN.

1. Después de realizar la reacción de secuenciación los productos se purificaron para eliminar productos inespecíficos, por medio de columnas Centri-sep previa hidratación con 750 µl de agua estéril.
2. Se invirtieron varias veces las columnas y con ayuda del vortex se eliminaron las burbujas de aire en la columna.
3. Se dejaron en refrigeración durante 2 horas las columnas, para asegurar una hidratación completa, posteriormente se quitó el tapón inferior y el superior para eliminar el resto de agua.
4. Después se centrifugaron a 3,000 rpm durante un minuto para empaquetarlas y eliminar el resto de agua.
5. La reacción de secuenciación se colocó al centro de la columna y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante un minuto.
6. El producto purificado se secó por vacío (speed-vac) durante 45 min.
7. El producto seco se rehidrató con 16 µl de formamida ultrapura, se desnaturalizó y finalmente fue secuenciado (secuenciador de DNA automatizado ABI PRISM 3100).

Se analizaron primero los casos índices de cada una de las familias y en caso de encontrar un cambio se buscaron en los individuos en riesgo que aceptaron participar en el estudio, para establecer la relación fenotipo-genotipo.

3.-DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DEL GEN APOE POR PCR.

Se amplificó DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando los oligonucleótidos que flanquean el exón 4 del *gen APOE* descritos por Emi y cols. (1988). Se realizó la amplificación de las secuencias ApoE que incluía los aminoácidos en la posición 112 y 158, esperándose un producto amplificado de 193 pb. El segundo paso fue la digestión del producto amplificado con la enzima de restricción *HhaI* que reconoce y corta el sitio (GCGC). Se realizó la amplificación empleando la metodología descrita por Hixson y Vernier (1990), con modificaciones hechas en el laboratorio (Tabla 10), para lo que fue necesaria la siguiente reacción:

Tabla 10. Componentes de la mezcla de reacción para la determinación del gen ApoE.

DNA genómico	300-400 ng	2.0 µl
Oligonucleótido F4	200 ng	2.0 µl
Oligonucleótido F6	200 ng	2.0 µl
Amortiguador 10X	1X	3.0 µl
Amplitaq (10 U/µl)	2 U	0.2 µl
DMSO	10%	3.0 µl
Agua cbp	30 µl	17.8 µl

De esta manera se realizó la isotipificación de los fragmentos polimórficos de restricción (RFLPs) generados, que nos permitieron identificar los 6 genotipos posibles E3/3, 4/4, 2/2,4/3,4/2 y 3/2.

La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de PCR:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min.	
Desnaturalización	94°C	30 seg.	} 40 ciclos
Alineamiento	60°C	30 seg.	
Extensión	70°C	1.5 min.	
Extensión final	70°C	10 min.	

3.1. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.

Se realizó una digestión del producto amplificado con la enzima de restricción *Hha I* (3U) y se obtiene un corte completo del producto amplificado, cuando se digieren a 37°C, durante 4 hrs.

3.2. ELECTROFÓRESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.

Los productos amplificados y digeridos con la enzima de restricción *Hha* I, se resolvieron en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%, durante 2.5 hrs. a 45 mA, flanqueando el gel con marcadores de peso molecular conocidos, marcador V (pBR322 DNA-Hae III) y VIII (pUCBM2 DNA-Hpa II+ pUCBM 21 DNA Dra I + Hind III de ROCHE). Después de la electrofóresis el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se analizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Se tomó fotografía del gel para su posterior análisis. Los tamaños de los fragmentos se estimaron por comparación con los marcadores de peso molecular conocidos.

Resultados

VII. RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS FAMILIAS EN ESTUDIO.

Las características clínicas son similares a las descritas en los pacientes con EA, todos ellos muestran atrofia cortical y subcortical por imagen en estudios de Tomografía axial computarizada (TAC) o por Resonancia Magnética (RMN). Ninguno de ellos muestra un rasgo fenotípico particular, sin embargo si muestran variabilidad fenotípica entre los pacientes. Un paciente sufre de paraplejía espástica, otro manifiesta mioclonías y uno más tiene una historia positiva de crisis parciales 20 años antes del inicio de la enfermedad.

MUTACIONES EN EL GEN DE LA PRESENILINA 1

En 12 probandos se identificaron 3 mutaciones en gen de la *PSEN1*, la ubicación y el cambio de nucleótido se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Familias estudiadas para el gen *PSEN1*.

#Probandos estudiados	# Familias estudiadas	Exón	Mutación	Nucleótido	Cambio de AA
1	1	7	M233L	945	Met-Leu
2	2	9	E318G	1201	Glu-Gly
12	9	12	A431E	1540	Ala -Glu

Mutación M233L

La mutación M233L se determinó en el probando de una familia (Fig 14), el cambio que presenta es de una A por una T en el nucleótido 945, lo cual origina que cambie el de aminoácido y se traduce como la mutación Met233Leu, la secuencia se muestra en el electroferograma de la Fig. 14, la cual se localiza en el exón 7. El paciente presentó una edad de inicio de 48 años y es originaria del estado de Guanajuato.

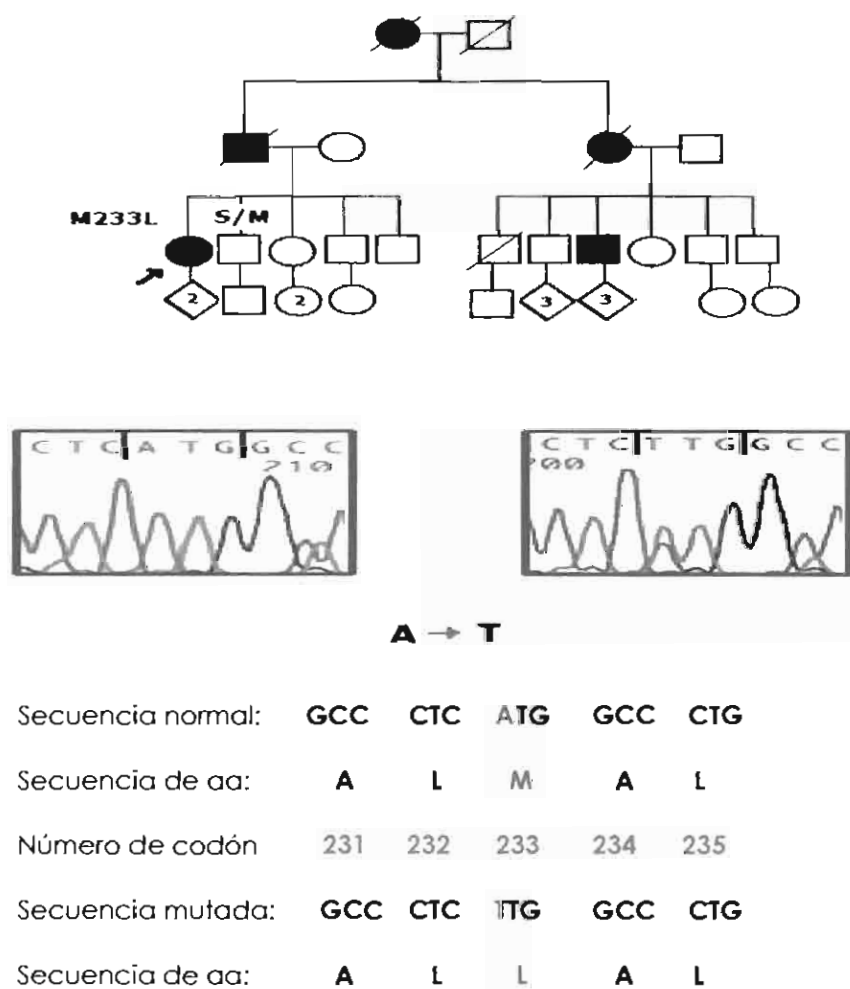
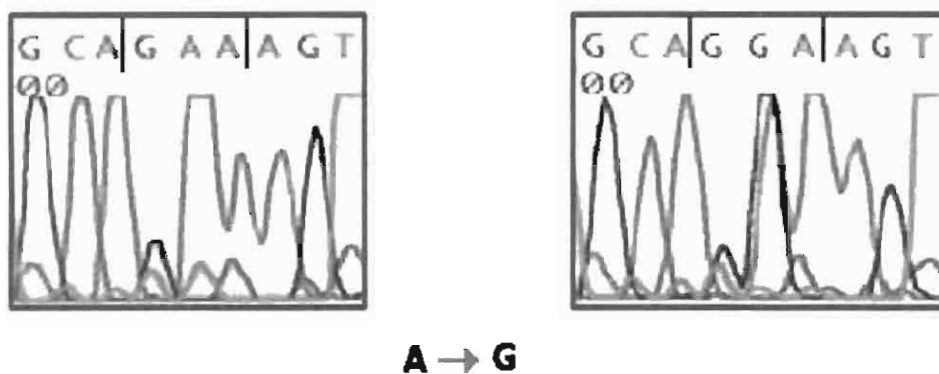


Fig. 14. Se muestra el árbol genealógico y los electroferogramas con la secuencia normal y con la mutación Met233Leu, así como la ubicación del cambio de aa en la secuencia de PSEN1

MUTACIÓN E318G



Secuencia normal: **AAT GCA GAA AGC**

Secuencia de aa: **N A E S**

Número de codón: **316 317 318 319**

Secuencia mutada: **AAT GCA GGA AGC**

Secuencia de aa: **N A G S**

Fig. 16. Se muestra el electroferograma con normal y con la mutación E318G, así como la ubicación del cambio de aa en la secuencia de PSEN1

Para confirmar si este cambio corresponde a una mutación o aun polimorfismo de riesgo se analizaron 50 controles sanos, sin presentar el cambio ninguno de ellos.

MUTACIÓN A431E

De manera interesantemente 9 de los 12 probandos estudiados pertenecientes a 9 familias distintas, presentan una misma mutación en el exón 12 localizada en el nucleótido 1540 el cual se traduce en el cambio del aa del codón 318 de Alanina por ácido Glutámico (A431E), todos los probandos presentaron inicio temprano (34 a 46 años), así como historia familiar positiva de EA. Las características de estas familias se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Se muestran las características estructurales de las familias mexicanas con la mutación A431E del gen de la PSEN1

Características	Familias con la mutación A431E
Nº de familias estudiadas	9
Nº de pacientes con EA	13
Nº de familiares en riesgo	60
Total de individuos con mutación	41
Edad de inicio, promedio y rango	40 (34-48 años)
Edad de fallecimiento, promedio y rango	48 (44-57 años)
Duración de la EA, promedio y rango	10 (6-14 años)
Alelos APOE-ε4	presente en 2 pacientes heterocigotos

La mutación A431E se encontró en 28/60 (46.6%) individuos en riesgo aparentemente sanos, por el tipo de herencia AD ellos tenían un 50% de riesgo de presentar la enfermedad y con estos resultados se confirma este riesgo. De las 12 familias mexicanas estudiadas 9 presentan la mutación A431E que corresponde al 75% de la muestra estudiada. Se muestra la genealogía de una de las familias con la mutación, así como los electroferogramas se muestran en la Fig. 17. Esta mutación se identificó empleando el oligonucleótido reverso, por lo que se incluyen ambas secuencias Fig 18.

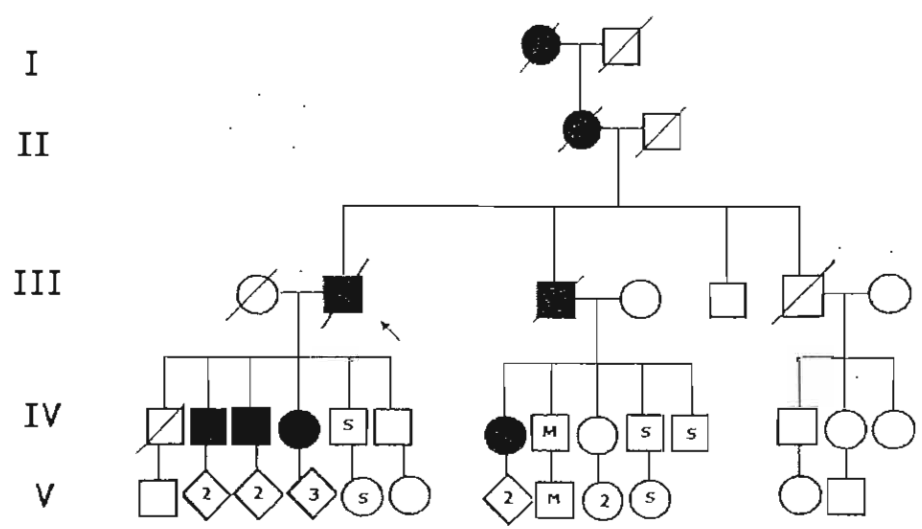
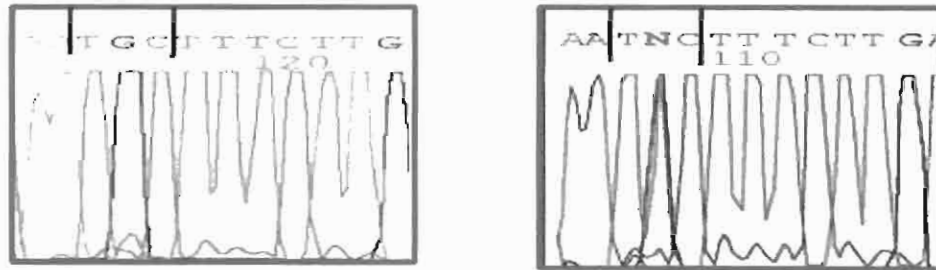


Fig. 17. Se muestra la genealogía de una familia con 4 generaciones afectadas y que portan la mutación A431E, indicándose con una M los individuos con la mutación y síntomas. Los individuos sin mutación se indican con la letra S y también se muestran los individuos que portan la mutación pero que se encuentran actualmente asintomático, las flechas rojas indican el caso índice o probando.

MUTACIÓN A431E



C → A forward

G → T reverse

Secuencia normal:	AAG	AAA	GCA	TTG	CCA
Secuencia reversa:	TTC	TTT	CGT	AAC	GGT
Secuencia de aa:	K	K	A	L	P
Número de codón:	429	430	431	432	433
Secuencia mutada:	AAG	AAA	GAA	TTG	CCA
Secuencia reversa:	TTC	TTT	CTT	AAC	GGT
Secuencia de aa:	K	K	E	L	P

Fig. 18. Se muestra el electroferograma con normal y con la mutación A431E, así como la ubicación del cambio de aa en la secuencia normal reversa y mutada reversa de PSEN1

Debido a la frecuencia elevada que muestra el cambio del codón 431 con mayor frecuencia en las familias estudiadas, se evaluó si se trataba de un polimorfismo de riesgo o de una mutación con un posible efecto fundador, ya que las 9 familias pertenecen al Estado de Jalisco.

Para probar estas hipótesis se analizaron 50 controles sanos del estado de Jalisco y 50 de la población en general del Distrito Federal. Interesantemente, la mutación A431E no se encontró en ninguno de los 100 controles sanos.

El efecto del alelo $\epsilon 4$ del *gen de la APOE* fue evaluado como factor modificador de la edad de inicio de la EA en las familias en estudio.

El alelo $\epsilon 4$ estuvo presente en 2 pacientes heterocigotos (4/3) con la mutación A431E, aparentemente sin afectar la edad de inicio, ya que en los individuos con $\epsilon 4$ la edad de inicio fue de 41.50 años y sin alelo $\epsilon 4$ fue de 41.56 años.

Estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.980$), el resto de los sujetos de estudio presentaron el alelo común $\epsilon 3$ y los genotipos encontrados se muestran en la Fig. 19

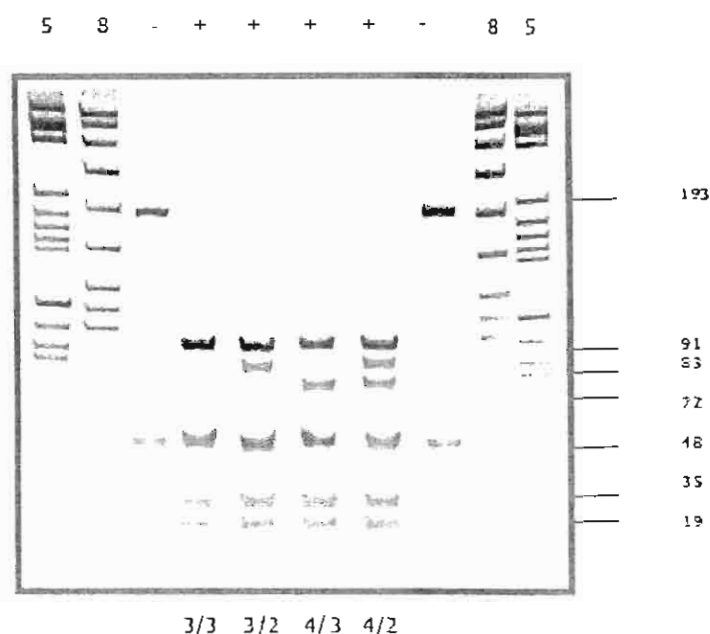


Fig. 19. Gel de poliacrilamida al 8%, donde se muestran los diferentes genotipos ApoE encontrados en los individuos portadores de la mutación A431E . Se identifican individuos homocigotos 3/3 (carril 4), así como los heterocigotos 3/2, 4/3 y 4/2 (carriles 5, 6 y 7). El gel muestra los productos amplificados de 193 pb sin digerir (-), carriles 3 y 8. El tamaño de los fragmentos se determinó por los marcadores de peso molecular que flanquean el gel marcador pBR322 DNA-Hae III) y VIII (pUCBM2 DNA-Hpa II+ pUCBM 21 DNA Dra I + Hind III de ROCHE)

Los 12 probandos con la mutación A431E provienen de los Altos del estado de Jalisco como se muestra en la Fig. 27, el cual se localiza al Oeste de la República Mexicana con una densidad de población de 6 322,000 habitantes.

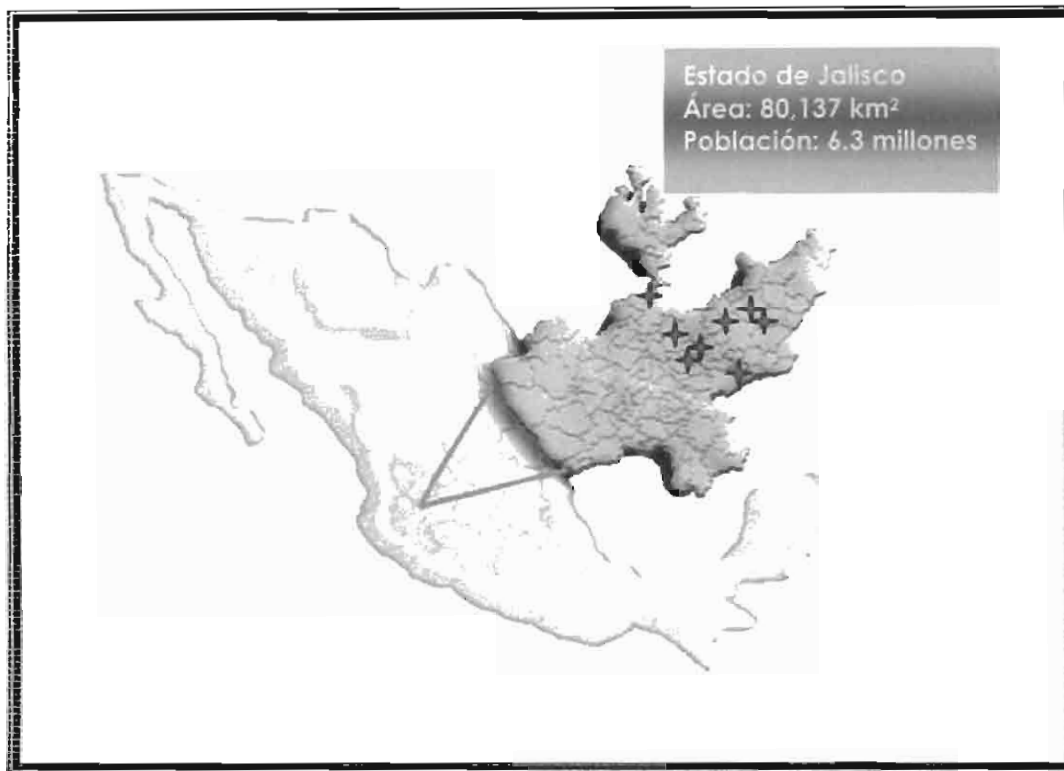


Fig. 20. Mapa de la República Mexicana donde sobresale el estado de Jalisco, con estrellas rojas se denotan los pueblos a partir de los cuales provienen las familias con la mutación A431E

En base a los árboles genealógicos de estas familias estudiadas se realizó el análisis de segregación de la mutación A431GE en aquellos individuos en riesgo a partir del caso índice o probando a partir del cual se realizó el estudio, todos los probandos estudiados tienen la mutación A431E, la cual segrega con el resto de la familia indicándonos que se trata de una mutación patogénica. Esto se confirmó al estudiar 50 controles sanos de la ciudad de México y 50 controles sanos del estado de Jalisco en los cuales no se encontró el cambio, lo cual sugiere se trata de una mutación patogénica y no de un polimorfismo de riesgo.

Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de que se trate de una mutación con efecto fundador. Se investigó esta posibilidad y se analizaron dos microsatélites polimórficos cercanos al gen de la PS1, ambos marcadores fueron dinucleótidos CA y GT en posición 33117 y 23000 (Genbank accesión N° AF109907) en los integrantes de estas familias incluyendo el caso índice, así como 50 controles sanos de la ciudad de México y 50 controles sanos del estado de Jalisco. Los resultados obtenidos mostraron que los individuos afectados con la mutación y los individuos en riesgo portadores de la mutación A431E segregan con el mismo haplotipo (haplotipo 4/5), siendo para el marcador CA el alelo común fue 4 de 273 pb, mientras que para el marcador GT fue el alelo 5 de 205 pb, estos marcadores fueron analizados también en los dos grupos control (Fig. 21). Del grupo control del estado de Jalisco, 4 (8%) presentaron el alelo 4 del marcador CA, mientras que sólo 2 (4%) presentan el alelo 5 del marcador GT respectivamente, mientras que estos alelos no se encuentran en ninguno de los controles de la ciudad de México.

Discusión

Análisis del Efecto Fundador Repetido CA y GT

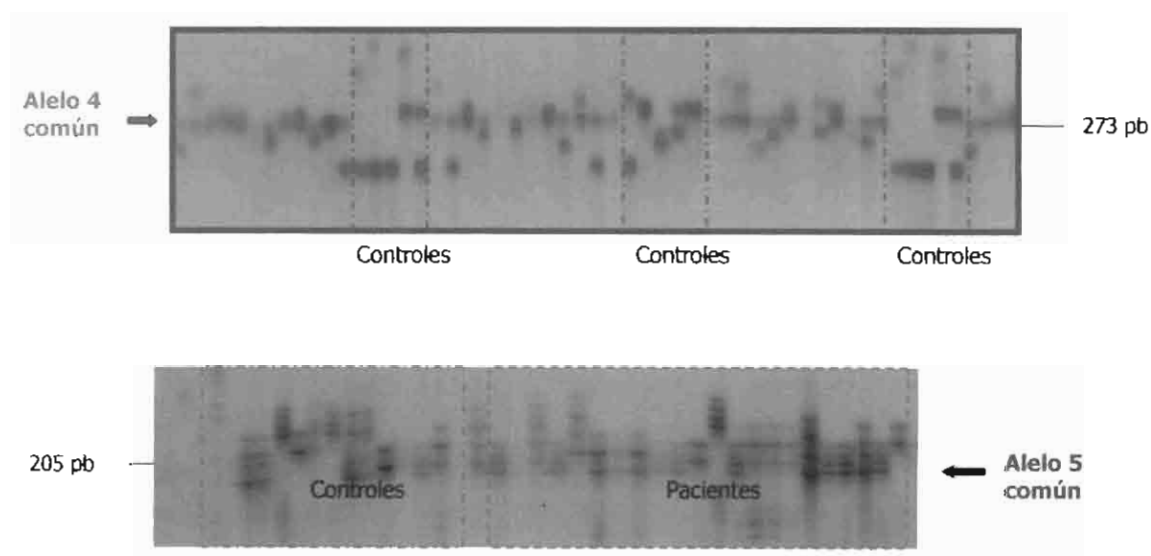


Fig.21. Se muestra que todos los portadores de la mutación A431E, segregan con un alelo en común en los dos marcadores utilizados a diferencia de los controles indicados en las cajas rojas.

VIII. DISCUSIÓN

La EA es la forma más común de demencia y parece ser una patología genéticamente compleja ya que se han descrito 3 genes causales de formas familiares y diferentes polimorfismos genéticos que alteran el riesgo de la misma. En este trabajo nosotros describimos tres mutaciones en el gen de la *PSEN1* causales de EA de inicio temprano, con patrón de herencia autosómico dominante en 12 familias mexicanas, no relacionadas.

Las características clínicas de nuestros pacientes son similares a la de los casos reportados en la literatura, existe variabilidad fenotípica y un caso con paraparecia espástica la cual se ha asociado con mutaciones en el gen de la *PSEN1* (Karlstromy cols., 2007)

Las mutaciones encontradas en estas familias no son nuevas, se encuentran reportadas en la literatura en diferentes bases de datos y han sido identificadas en diferentes poblaciones del mundo (Aldudo y cols., 1997; Roagaeva y cols 2001: Sandbrink y cols., 1996: Cruts M y cols., 1998; Aldudo y cols., 1998; Mattila y cols., 1998; Dermaut y cols., 1999; Helisalmi y cols., 2000; Raux y cols., 2005)

La mutación Met233Leu se localiza en el exón 7, en la región transmembranal V de *PSEN1* afectando residuos no conservados. Asimismo, la mutación Glu318Gly localizada en la parte media de la horquilla hidrofílica VI de la proteína *PSEN1* está cercana al sitio de reconocimiento de caspasas y a una secuencia consenso para proteína cinasa A y C que fosforilan *PSEN1* y son causa de EA familiar (Aldudo y cols., 1997; Roagaeva y cols 2001: Sandbrink y cols., 1996: Cruts M y cols., 1998;

Aldudo y cols., 1998; Mattila y cols., 1998; Dermaut y cols.,1999; Helisalmi y cols., 2000; Raux y cols., 2005)

Para determinar su frecuencia y evaluar su contribución en la EA en población mexicana, analizamos 100 cromosomas sanos, sin encontrar en ellos la mutación. Sin embargo la encontramos en 2 familias y en una tercera la cual además portaba la mutación A431E.

Nuestros resultados difieren de los reportados, ya que en la mayoría de ellos encuentran una baja frecuencia de la mutación en población sana, considerándola como un potencial factor de riesgo que contribuye a la patogénesis de la enfermedad, similar al papel que desempeña ApoE como factor de riesgo genético para la EA.

Sin embargo nuestros datos sugieren al igual que el estudio realizado por Taddei y cols (2002), que se trate de una mutación parcialmente penetrante o neutra; para confirmar esto requerimos de un número mayor de pacientes.

La localización de la mutación Glu318Gly en este sitio puede ser compatible con la ausencia de los efectos patogénicos (polimorfismo) o con efectos patogénicos débiles (penetrancia reducida)(Mattila y cols 1998; Helisalmi y cols., 2000; Taddei y cols., 2002; Raux y cols., 2005)

La patogenicidad de esta mutación ha sido cuestionada porque no ha sido posible demostrar su co-segregación en familias con la EA, debido a la falta de suficientes miembros de la familia en todos los casos reportados incluyendo el nuestro.

Se describió también la mutación Ala431Glu (A431E) en 15 pacientes de 12 familias no relacionadas con EA. Estas familias provienen del estado de Jalisco (Rogaeva y cols., 2001; Miravalle , y cols.2002; Lee y cols., 2006; Murrell y cols., 2006)

Todos los portadores de la mutación muestran el mismo haplotipo para dos marcadores microsatélites en el locus PSEN1. Además este haplotipo no se encontró en 100 controles mexicanos, incluyendo 50 individuos del estado de Jalisco, esto sugiere fuertemente que todos los individuos portadores de la mutación Ala431Glu tienen un ancestro común.

Esta mutación pudo haber ocurrido por un cambio en un haplotipo extremadamente raro o que el alelo mutado pudo haberse originado de una población de inmigrantes que no comparte este haplotipo con la población local. Esta mutación ha sido descrita en 9 pacientes de diferente origen étnico con diagnóstico clínico de EA.

La mutación Ala431Glu se localiza en la horquilla hidrofílica VIII y esta altamente conservada entre las diferentes especies y de acuerdo al programa PolyPhen (<http://www.tux.embl-heidelberg.de/ramensky/index.shtml>), el cual predice las consecuencias funcionales de la sustitución de aa, en este caso la sustitución del ácido glutámico en la posición 431 puede ser posiblemente dañina para la función de PSEN1.

Más de 166 mutaciones en PSEN1 se han identificado y la gran mayoría tienen penetrancia completa, sin embargo a pesar de ser recurrentes en el gen *PSEN1* son debidas a simples fundadores. Son raros los efectos fundadores sin embargo para PSEN1, se han descrito en tres mutaciones localizadas en los exones 4, 7 y en el

intrón 4. Uno de estos efectos fundadores se ha descrito con la mutación Gly206Ala localizada en el exón 7, como causa de EA de inicio temprano en familias Hispano-Caribeñas. Sin embargo el componente étnico en este grupo Hispánico es muy diferente de las familias mestizo mexicana (Athán y cols., 2001).

En términos de composición genética la población mexicana mestiza es el resultado de la mezcla predominante de españoles (50-60%), Amerindios (37-49%) y en menor contribución de Africanos (1-3%) (Cerdeira y cols., 2002)

Es importante mencionar que la mutación Ala431Glu, no ha sido reportada en pacientes españoles y esto nos permite especular que esta mutación se pudo originar en generaciones más recientes de mestizos-mexicanos o en los primeros grupos Amerindios, sin embargo serán necesarios futuros estudios para verificar esta hipótesis.

La alta prevalencia de la mutación Ala431Glu en familias procedentes del estado de Jalisco, nos facilita el diagnóstico molecular porque directamente se realiza su identificación en el exón 12. La detección de la mutación permite la realización del diagnóstico presintomático en individuos en riesgo y proporciona un asesoramiento genético adecuado y preciso. La identificación de las mutaciones ha sido útil para la creación de blancos terapéuticos, así como la elaboración de modelos animales ya que hasta el momento el tratamiento está limitado a mejorar los síntomas y no la progresión.

El avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido hacer diagnósticos moleculares precisos en muchas enfermedades como es el caso de la

EA. Esto ha dado lugar a la posibilidad de diagnóstico presintomático, el cual nos permite identificar al individuo que presenta la mutación antes de que manifieste síntomas de la enfermedad.

En el caso de enfermedades neurodegenerativas de inicio tardío como es la EA este tipo de diagnósticos tiene implicaciones éticas importantes, ya que hemos desarrollado la capacidad de predecir, pero no de prevenir ni curar. Por esto el diagnóstico presintomático de la EA debe realizarse mediante un programa asesoramiento genético y apoyo psicoterapéutico antes y después de la prueba y debe seguir los lineamientos internacionales publicados para la enfermedad de Huntington. En este programa debe participar un equipo multidisciplinario formado por neurólogo, psiquiatra, genetista, biólogo molecular y trabajadora social.

Este diagnóstico debe ser voluntario y sus resultados confidenciales. Con este trabajo hemos estandarizado la técnica para detectar mutaciones en el gen de la *PSEN1* lo cual nos permite ahora poder ofrecer el diagnóstico presintomático a los individuos en riesgo que lo soliciten siguiendo los lineamientos antes mencionados.

Sin embargo es importante aclarar en el caso de la EA que si el individuo en riesgo no presenta la mutación, no se le puede asegurar que no presentara la EA porque debido a su elevada frecuencia y heterogeneidad genética podría desarrollarla, por otras causas independientes de la mutación (Lannfelt y cols., 1995; Steinlart y cols., 2001)

Conclusiones

IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron 3 mutaciones causativas de formas familiares de EA de inicio temprano, estas mutaciones ya han sido descritas en otras poblaciones del mundo.
- El efecto patogénico de la mutación Glu318Gli (E318G) es controversial ya que por nuestros resultados nos sugiere que puede tratarse de una mutación de baja penetrancia, debido a que esta no se encontró en controles sanos y esta presente en 2 familias o que este actuando como un potencial factor de riesgo para la EA y no interacciona con APOE. Debido a que los portadores de este cambio fueron homocigotos para el alelo común (3/3). Esto da evidencia que la asociación entre la mutación E318G y la EA familiar varía entre los diferentes grupos étnicos.
- La mutación Ala431Glu (A431E) tiene una alta frecuencia en familias con EA familiar de inicio temprano provenientes del estado de Jalisco y es una mutación proveniente de un ancestro común. Estos hallazgos facilitaran el diagnóstico molecular de la EA y permitirán realizar el apropiado consejo genético a estas familias.

Bibliografía

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adle-Biassette H, Duyckaerts C, Wasowicz M, He Y, Fornes P, Foncin F, Lecomte D, Hauw J. 1996. **Beta AP deposition and head trauma.** *Neurobiol Aging* 17:415-419
- Alberca R. 1998. **Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.** Edit. Panamericana. España. Págs. 26:82-84, 150-176
- Aldudo J, Bullido J, Frank A, Valdivieso F. 1998. **Missense mutation E318G of the presenilin-1 gene appears to be a nonpathogenic polymorphism.** *Ann Neurol.* 44:985-986.
- Aldudo J, Bullido J, Valdivieso F. 1999. **DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of the Alzheimer's disease presenilin-1 gene: Two novel mutations.** *Human Mutation* 14: 433-439.
- Alonso E, Gómez L, Otero E, Figueroa H. 1989. **Importance of hereditary disease at a Neuropsychiatry Institute in Mexico City.** *Genet Epidemiol* 6:589-595.
- Alonso E, Otero E, Martínez C. 1992. **Clinical and genetic aspects of a group of patients with Alzheimer's disease.** *J Tropic Geo Neurol* 2:27-31.
- Alonso E, Yescas P. 1998. **Genética de la Enfermedad de Alzheimer.** *Rev Invest Clin* 50:155-162.

Alzheimer's Disease Collaborative Group. 1995. **The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families.** Nat Genet 11:219-222.

American College of Medical Genetics, American Society of Human Genetics Working Group on Apo E and Alzheimer disease. 1995. **Statement on use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease.** JAMA 270:1627-1629.

American Psychiatric Association. 1994. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.** 4th edition (DSM-IV); Revised Washington, DC

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. 1992. **Structure and novel exons of the human tau gene.** Biochemistry 31:10626-10633.

Bäckman L, Small BJ. 2007. **Cognitive deficits in preclinical Alzheimer's disease and vascular dementia: patterns of findings from the Kungsholmen Project.** Physiol Behav. 92:80-86

Balbin M, Grubb A, Abrahamson M. 1993. **An Ala/Thr variation in the coding region of the human cystatin C gene (CST3) detected as an SstII polymorphism.** Hum Genet 92:206-207.

Basun H, Corder EH, Guo Z, Lannfelt L, Corder LS, Manton KG, Winblad B, Viitanen M. 1996. **Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population sample aged 75 years or more.** Stroke 27:1310-1315.

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. 1989. **The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein.** Nature 341:162-164.

Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis M, Go R, Vekrellis K, Selkoe D, Saunders A, Tanzi R. 2000. **Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q.** Science 290:2302-2303.

Bertram L, Tanzi RE. 2004. **Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?** Hum Mol Genet 13:135-14

Bird TD, Lampe TH, Nemens EJ, Miner GW, Sumi SM, Schellenberg GD. 1988. **Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: probable genetic founder effect.** Ann Neurol 23:25-31.

Bird TD, Sumi SM, Nemens EJ, Nochlin D, Schellenberg G, Lampe TH, Sadovnick A, Chui H, Miner GW, Tinklenberg J. 1989. **Phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease: a study of 24 kindreds.** Ann Neurol 25:12-25.

Bjarnadottir M, Wulff BS, Sameni M, Sloane BF, Keppler D, Grubb A, Abrahamson M. 1998. **Intracellular accumulation of the amyloidogenic L68Q variant of human cystatin C in NIH/3T3 cells.** Mol Pathol 51:317-326.

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. 1998. **Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease.** Nat Genet 19:357-360.

Blesa R, Adroer R, Santacruz P, Ascaso C, Tolosa E, Oliva R. 1996. **High apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency in age-related memory decline.** Ann Neurol 39:548-551.

Breitner JC, Wyse BW, Anthony JC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Norton MC, Tschanz JT, Plassman BL, Meyer MR, Skoog I, Khachaturian A. 1999. **APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study.** *Neurology* 53:321-331.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. 1981. **Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors.** *Science* 212:628-635.

Bruni AC, Montesi MP, Salmon D, Gei G, Perre J, el Hachimi KH, Foncin JF. 1992. **Alzheimer's disease: a model from the quantitative study of a large kindred.** *J Geriatr Psychiatry Neurol* 5:126-131.

Cai XD, Golde TE, Younkin SG. 1993. **Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor.** *Science* 259:514-516.

Castelli P, Campillo C, Nicolini H, Sosa A. 1998. **Estudio de la Asociación genética de la apolipoproteína E con la longevidad, el deterioro cognoscitivo y la demencia.** *Salud Mental* 21:43-49.

Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortés-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R. 2002. **Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci.** *Am J Hum Biol.* 14:257-263.

Chandra V, Pandav R, Dodge HH, Johnston JM, Belle SH, DeKosky ST, Ganguli M. 2001 **Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study.** *Neurology* 57(6):985-9.

Chartier-Harlin M, Crawford F, Hamandi K, Mullan M, Goate A, Hardy J, Backhovens H, Martin J, Broeckhoven C. 1991b. **Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val-Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease.** Neurosci Lett 129:134-135.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J. 1991a. **Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene.** Nature 353:844-846.

Chui H, Teng E, Henderson V, Moy A. 1985. **Clinical subtypes of dementia of the Alzheimer type.** Neurology 35:1544-1550.

Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. 1994. **Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation.** Proc Natl Acad Sci U S A 91:11993-11997.

Corder E, Basun H, Libius L, Corder S, Vütanen M, Winblad B, Lannfelt L. 1996a. **Alzheimer's disease risk in relation to α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E polymorphism in very old adults age 75+.** Alzheimer's Research 2:51-54.

Corder E, Lannfelt L, Viitanen M, Corder L, Manton K, Winblad B, Basun H. 1996b. **Apolipoprotein E genotype in the prediction of cognitive decline and dementia in a prospectively studied elderly population.** Dementia 7:169-174.

Corder E, Lannfelt L, Viitanen M, Corder L, Manton K, Winblad B, Basun H. 1996c. **Apolipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition.** Arch Neurol 53:418-422.

Corder E, Saunders A, Risch N, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Rimmler J, Locke P, Conneally P, Schmechel K. 1994. **Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease.** Nat Genet 7:180-184.

Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses A, Haines J, Pericak-Vance M. 1993. **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** Science 261:921-923.

Coria F, Rubio I, Bayón C. 1994. **Alzheimer's disease, beta-amyloidosis, and aging.** Rev Neurosci. 5:275-292.

Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. 2000. **A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease.** Neurology 55:763-768.

Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. 1996. **The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology.** Hum Mol Genet 5:1449-1455

Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, St George-Hyslop P, Hofman A, Van

Broeckhoven C. 1998. **Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease.** Hum Mol Genet. 7:43-51.

Cummings J, Cole G. 2002. **Alzheimer disease.** JAMA 287:2335-2338.

Czech C, Tremp G, Pradier L. 2000. **Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanism.** Prog Neurobiol 60:363-384.

Dal Forno G, Rasmusson D, Brandt J, Carson K, Brookmeyer R, Troncoso J, Kawas C. 1996. **Apolipoprotein E genotype and rate of decline in probable Alzheimer's disease.** Arch Neurol 53:345-350.

Deng J, Rudick V, Dory L. 1995. **Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages.** J Lipid Res 36:2129-2140.

Dermaut B, Cruts M, Slooter A, Van Gestel S, De Jonghe C, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Breteler MM, Hofman A, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. 1999. **The Glu318Gly substitution in presenilin 1 is not causally related to Alzheimer disease.** Am J Hum Genet. 64:290-292

Dillen K, Annaert W. 2006. **A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of Alzheimer's disease: are we progressing toward therapy?** Int Rev Cytol. 254:215-300.

Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS, Bernstein A. 1999. **Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects.** Genes Dev 13:2801-2810.

Doraiswamy P. 2002. **Non cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer disease.** CNS Drugs 16:811-824.

Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmuller F, Muller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR. 2000. **Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease.** Neurology 55:480-483.

Duara R, Barker WW, Lopez-Alberola R, Loewenstein DA, Grau LB, Gilchrist D, Sevush S, St George-Hyslop S. 1996. **Alzheimer's disease: interaction of apolipoprotein E genotype, family history of dementia, gender, education, ethnicity, and age of onset.** Neurology 46:1575-1579.

Emi M, Fujiwara Y, Nakamura Y. 1993. **A primary genetic linkage map of 14 polymorphic loci for the short arm of human chromosome 8.** Genomics 15:530-534.

Emi M, Wu L, Robertson M, Myers R, Hegele R, Williams R, White R, Lalouel J. 1988. **Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms.** Genomics 3:373-379.

Esler WP, Wolfe MS. 2001. **A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces.** Science 293:1449-1454.

Evans D, Beckett L, Field T, Feng L, Albert M, Bennett D, Tycko B, Mayeux R. 1997. **Apolipoprotein E epsilon4 and incidence of Alzheimer disease in a community population of older persons.** JAMA 277:822-824.

Evans D, Ganguli M, Harris T, Kawas C, Larson B. 1999 **Women and alzheimer disease.** Alzheimer Dis Assoc Disord 3:187-189.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. 1989. **Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported.** JAMA 262:2551-2556.

Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, Patsouris E, Pantos GV, Gatzonis S, Kapaki E, Davaki P, Lamszus K, Stavrou D, Gal A. 2005. **Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease.** Neurogenetics. 6: 85-89

Fraser PE, Yang DS, Yu G, Levesque L, Nishimura M, Arawaka S, Serpell LC, Rogaeva E, St George-Hyslop P. 2000. **Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease.** Biochim Biophys Acta 1502:1-15.

Fratiglioni L, Grut M, Forsell Y, Viitanen M, Grafström M, Holmén K, Ericsson K, Bäckman L, Ahlbom A, Winblad B. 1991 **Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: relationship with age, sex, and education.** Neurology 1:1886-1892.

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

Friedman G, Froom P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda B, Groswasser Z. 1999. **Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury.** Neurology 52:244-248.

Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengard JH, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF. 2000. **Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism.** Am J Hum Genet. 67:881-900.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, et al. 1995. **Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein.** Nature 373:523-527.

Gandy S, Petanceska S. 2000. **Regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism.** Biochim Biophys Acta. 1502:44-52.

Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK, Juyal RC, Pandav R, Belle SH, DeKosky ST. 2000. **Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: The Indo-US Cross-National Dementia Study.** Arch Neurol 57:824-830.

Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S. 1998. **The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis.** Arch Gen Psychiatry 55:809-815.

Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H.-C., Schutte M., Gordon R., Holstein G.R., Martinelli G., Mehta P., Friedrich V.L. Jr., Robakis N. 1999. **Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts.** Mol. Cell 4:893-902

Gironès X, Guimerà A, Cruz-Sánchez F. 2002. **Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer.** Rev. Esp. Patol.1:21-48

Glennner GG, Wong CW. 1984b. **Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.** Biochem Biophys Res Commun 120:885-890.

Glennner GG, Wong CW. 1984a. **Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.** Biochem Biophys Res Commun 122:1131-1135.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra I, Haynes A, Irving N, James L, et al. 1991. **Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.** Nature 349:704-706.

Goedert M, Spillantini G, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989. **Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.** Neuron 3:519-526.

Goedert M, Spillantini G. 2006 **A century of Alzheimer's disease.** Science. 314:777-781.

Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987. **Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.** Science 235:877-880.

Goldstein FC, Ashley AV, Gearing M, Hanfelt J, Penix L, Freedman LJ, Levey AI. 2001. **Apolipoprotein E and age at onset of Alzheimer's disease in African American patients.** Neurology 57:1923-1925.

Gómez L, Alonso ME, Figueroa HH, Escobar A. 1986. **Enfermedad de Alzheimer presentación de 7 casos en 3 familias.** Rev Invest Clin 38:261-267.

Gómez-Isla T, Growdon WB, McNamara MJ, Nochlin D, Bird TD, Arango JC, Lopera F, Kosik KS, Lantos PL, Cairns NJ, Hyman BT. 1999. **The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors.** Brain 122:1709-1719.

Gómez-Isla T, Wasco W, Pettingell W, Gurubhagavatula S, Schmidt S, Jondro P, McNamara M, Rodes L, DiBlasi T, Growdon W, Seubert P, Schenk D, Growdon J, Hyman B, Tanzi R. 1997. **A novel presenilin-1 mutation: increased beta-amyloid and neurofibrillary changes.** Ann Neurol 41:809-813.

Gómez-Isla T, West H, Rebeck G, Harr S, Growdon J, Locascio J, Perls T, Lipsitz L, Hyman., West H, Rebeck G, Harr S, Growdon J, Locascio J, Perls T, Lipsitz L,

Hyman B. 1996. **Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease.** Ann Neurol 39:62-70.

Goudsmit J, White BJ, Weitkamp LR, Keats BJ, Morrow CH, Gajdusek DC. 1981. **Familial Alzheimer's disease in two kindreds of the same geographic and ethnic origin. A clinical and genetic study.** J Neurol Sci 49:79-89.

Greenberg S, Briggs M, Hyman B, Kokoris G, Takis C, Kanter D, Kase C, Pessin M. Greenberg S, Briggs M, Hyman B, Kokoris G, Takis C, Kanter D, Kase C, Pessin M. 1996. **Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy.** Stroke 27:1333-1337.

Growdon J, Locascio J, Corkin S, Gómez-Isla T, Hyman B. 1996. **Apolipoprotein E genotype does not influence rates of cognitive decline in Alzheimer's disease.** Neurology 47:444-448.

Haan J, Maat-Schieman M, van Duinen S, Jensson O, Thorsteinsson L, Roos R. 1994. **Co-localization of beta/A4 and cystatin C in cortical blood vessels in Dutch, but not in Icelandic hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis.** Acta Neurol Scand 89:367-371.

Hallman D, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel H, Csazar A, Utermann G. 1991. **The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations.** Am J Hum Genet 49:338-349.

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** Science 297:353-356.

Helbecque N, Richard F, Neuman E, Guez D, Levy R, Amougel P. 1996. **Interaction between α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E gene polymorphisms in the risk of Alzheimer's disease.** *Alzheimer's Research* 2:149-152.

Helisalmi S, Hiltunen M, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Ryyänen M, Soininen H. 2000. **Is the presenilin-1 E318G missense mutation a risk factor for Alzheimer's disease?** *Neurosci Lett*. 278:65-68.

Hendrie C, Ogunniyi A, Hall S, Baiyewu O, Unverzagt W, Gureje O, Gao S, Evans M, Ogunseyinde O, Adeyinka O, Musick B, Hui L. 2001 **Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana.** *JAMA*. 285(6):739-47.

Heston L, Mastri R, Anderson E, White J. 1981. **Dementia of the Alzheimer type. Clinical genetics, natural history, and associated conditions.** *Arch Gen Psychiatry* 38:1085-1090.

Hixson E, Vernier T. 1990. **Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI.** *J Lipid Res* 31:545-548.

Hofman A. 2000 **Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group.** *Am J Epidemiol*. 151:1064-1071.

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada

- CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. 1998. **Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes.** Nat Med 4:97-100.
- Holtzman DM, Mobley WC. 1991. **Molecular studies in Alzheimer's disease.** Trends Biochem Sci 16:140-144.
- Hong C, Liu T, Liu H, Wang S, Fuh J, Chi C, Lee K, Sim C. 1996. **Epsilon 4 allele of apolipoprotein E increases risk of Alzheimer's disease in a Chinese population.** Neurology 46:1749-1751.
- Hutton M, Hardy J. 1997. **The presenilins and Alzheimer's disease.** Hum Mol Genet 6:1639-1646.
- Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. 1997. **Longitudinal study of the effect of apolipoprotein e4 allele on the association between education and cognitive decline in elderly men.** BMJ 314:34-35.
- Kamboh M, Sanghera D, Ferrell R, DeKosky S. 1995a. **APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha1-antichymotrypsin polymorphism.** Nat Genet 10:486-488.
- Kamboh M, Weiss K., Ferrell R. 1991. **Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico.** Clin Genet 39:26-32.
- Kamboh M. 1995b. **Apolipoproteína E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease.** Hum Biol 67:195-215.
- Katzman R. 1986. **Alzheimer's disease.** N Engl J Med 314:964-973.

- Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, Ueda K, Kimura J. 1994. **Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's disease or vascular dementia.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 57:1414-1416.
- Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. 2000 **Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging.** Neurology 54:2072-2077.
- Kawas H, Brookmeyer R. 2001. **Aging and the public health effects of dementia.** N Engl J Med. 344:1160-1166.
- Kehoe PG, Williams H, Holmans P, Wilcock G, Cairns NJ, Neal J, Owen MJ. 1998. **The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease.** J Med Genet 35:1034-1035.
- Khachaturian S. 1985. **Diagnosis of Alzheimer's disease.** Arch Neurol. 42:1097-10105.
- Koster MN, Dermaut B, Cruts M, Houwing-Duistermaat JJ, Roks G, Tol J, Ott A, Hofman A, Munteanu G, Breteler MM, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. 2000. **The alpha2-macroglobulin gene in AD: a population-based study and meta-analysis.** Neurology 55:678-684.
- Kostyszyn B, Cowburn RF, Seiger A, KJ/Eldgaard A, Sundstrom E. 2001. **Expression of presenilin 1 and Notch-1 receptor in human embryonic CNS.** Neuroscience 103:885-898.
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. 1995. **LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE**

receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. Cell 82:331-340.

Kowal R, Herz J, Goldstein L, Esser U, Brown M. 1989. **Low density lipoprotein receptor related protein mediates lipoproteins.** Proc Natl Aca Sci USA 86:5810.

Kwiterovich PO Jr. 2002b. **Lipoprotein heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications.** Am J Cardiol 90:1i-10i.

LaDu M, Falduto M, Manelli A, Reardon C, Getz G, Frail D. 1994. **Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid.** J Biol Chem 269:23403-23406.

Lai F, Williams R. 1989. **A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome.** Arch Neurol. 46:849-853.

Lamb N, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman S. 2005. **Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21.** Am J Hum Genet. 76:91-99.

Lannfelt L, Axelman K, Lilius L, Basun H. 1995. **Genetic counseling in a Swedish Alzheimer family with amyloid precursor protein mutation.** Am J Hum Genet 56:332-335.

Lannfelt L, Lilius L, Nastase M, Viitanen M, Fratiglioni L, Eggertsen G, Berglund L, Angelin B, Linder J, Winblad B. 1994. **Lack of association between apolipoprotein E allele epsilon 4 and sporadic Alzheimer's disease.** Neurosci Lett 169:175-178.

LaVoie M, Fraering P, Ostaszewski B, Ye W, Kimberly W, Wolfe M, Selkoe D. 2003. **Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin.** *J Biol Chem.* 278:37213-3722.

Lee P, Medina L, Ringman JM. **The Thr354Ile substitution in PSEN1: disease-causing mutation or polymorphism?** 2006 *Neurology* 66: 1955-1956.

Leem JY, Vijayan S, Han P, Cai D, Machura M, Lopes KO, Veselits ML, Xu H, Thinakaran G. 2002. **Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin.** *J Biol Chem.* 277:19236-29240.

Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. 1997. **Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease.** *Hum Mol Genet* 6:1933-1936.

Lendon CL, Ashall F, Goate AM. 1997. **Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics.** *JAMA* 277:825-831.

Levy-Lahad E, Lahad A, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD. 1995a. **Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease.** *Ann Neurol* 38:678-680.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. 1995b. **Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.** *Science* 269:973-977.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. 1995c. **A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1.** Science 269:970-973.

Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G, Hock C, Mueller-Thomsen T, Lleo A, Blesa R, Gendre J, Castellvi M, Pastor P, Queralt R, Oliva R. 2001. **A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer disease.** Neurology 57:1926-1928.

Liu K, Lai L, Tai T, Lin T, Yen Y, Howng L. 1998. **Incidence and subtypes of dementia in southern Taiwan: impact of socio-demographic factors.** Neurology. 50:1572-1579.

Lleo A, Blesa R, Queralt R, Ezquerra M, Molinuevo JL, Peña-Casanova J, Rojo A, Oliva R. 2002. **Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain.** Arch Neurol 59:1759-1763.

Lobo A, Launer L, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler M, Copeland J, Dartigues J, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. 2000 **Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group.** Neurology 54:S4-9.

Lopera, F, Ardilla A, Martinez A, Madrigal L, Arango-Viana J, Lemere C, Arango-Lasprilla J, Hincapie L, Arcos-Burgos M, Ossa J, Behrens I. 1997. **Clinical**

features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. JAMA. 277: 793-799

Lopera, F, Ardilla A, Martinez A, Madrigal L, Arango-Viana J, Lemere C, Arango-Lasprilla J, Hincapie L, Arcos-Burgos M, Ossa J, Behrens I, Norton J, Lendon C, Goate A, Ruiz-Linares A, Rosselli M, Kosik F, Ardilla A, Martinez A, Madrigal, L, Arango-Viana J, Lemere C, Rosselli M, Kosik K. 1997. **Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation.** JAMA. 277: 793-799

López de Munain. **La enfermedad de Alzheimer genéticamente determinada.** En: **Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.** 2003, 2 Edición, cap.12. PP141-155.Edit Panamericana. 1997.

Luo C, Li W, Moore M, Chan L. 1986. **Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family.** J Mol Biol 187:325-340.

Luukinen H, Viramo P, Koski K, Laippala P, Kivela L. 1999. **Head injuries and cognitive decline among older adults: A population-based study.**Neurology. 52: 557 - 567.

Maestre G, Ottman R, Stem Y, Gurland B, Chun M, Tang M, Shelanski M, Tycko B, Mayeux R. 1995. **Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: ethnic variation in genotypic risks.** Ann Neurol 37:254-259.

Mahley R, Rall S. 1995. **Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The role of Apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism.** Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D: The

metabolic and molecular bases of inherited disease. Seventh Edition. Mc Grow Hill Book Co., New York. Cap.61:1953-1980.

Mahley R. 1986. **Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.** Science 240:622-638.

Mak YT, Chiu H, Woo J, Kay R, Chan YS, Hui E, Sze KH, Lum C, Kwok T, Pang CP. 1996. **Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese.** Neurology 46:146-149.

Mandelkow EM, Mandelkow E. 1998. **Tau in Alzheimer's disease.** Trends Cell Biol 8:425-427.

Mann A, Iwatsubo T, Cairns N. 1995. **Amyloid β Protein ($A\beta$) Deposition in Chromosome 14 linked Alzheimer's disease.** Nature 375:754-760.

Mann U, Zuchowski K, Beisiegel U, Staehelin H, Growdon JH, Tanzi RE, Hyman BT. 1998. **Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease.** Hum Mol Genet 7:1953-1956.

Marx J. 2001. **New Leads on the 'How' of Alzheimer's.** Science .5538:2192-2194.

Matthijs G, Marynen P. 1998. **A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene.** Nucleic Acid Res 19:5102.

Mattila KM, Forsell C, Pirttilä T, Rinne JO, Lehtimäki T, Röyttä M, Lilius L, Eerola A, St George-Hyslop PH, Frey H, Lannfelt L. 1998. **The Glu318Gly mutation of the presenilin-1 gene does not necessarily cause Alzheimer's disease.** Ann Neurol. 44:965-967

Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. 1995. **Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease.** *Neurology*. 45:555-557.

Mayeux R, Stern Y, Spanton S. 1985. **Heterogeneity in dementia of the Alzheimer type: evidence of subgroups.** *Neurology* 35:453-461.

McCarron M, Muir K, Weir C, Dyker A, Bone I, Nicoll J, Lees K. 1998. **The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease.** *Stroke* 29:1882-1887.

McGeer P, McGeer E. 2001. **Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease.** *Arch Neurol* 58:1790-1792.

McIlroy SP, Crawford VL, Dynan KB, McGleenon BM, Vahidassr MD, Lawson JT, Passmore AP. 2000. **Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland.** *J Med Genet* 37:182-185.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. **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* 34:939-944.

Mehler F, Gokhan S. 2000 **Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat.** *Trends Neurosci.* 23:599-605.

- Mehler F, Gokhan S. 2001. **Developmental mechanisms in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.** Prog Neurobiol. 63:337-363.
- Mena R, García F. 1998. **Bases neuropatológicas y moleculares de la enfermedad de Alzheimer.** Arch Neurosc 3:164-173.
- Mendez MF, McMurtry A. 2006. **Frontotemporal dementia-like phenotypes associated with presenilin-1 mutations.** Am J Alzheimers Dis Other Demen. 21:281-286.
- Miller A, Dykes D, Polesky F. 1988. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acid Res 16:1215.
- Millichap D, Oliver C, Maquillan S, Kalsy S, Lloyd V, Hall S. 2003. **Descriptive functional analysis of behavioral excesses shown by adults with Down syndrome and dementia.** Int J Geriatr Psychiatry 18:844-854.
- Millichap D, Oliver C, McQuillan S, Kalsy S, Lloyd V, Hall S. 2003. **Descriptive functional analysis of behavioral excesses shown by adults with Down syndrome and dementia.** Int J Geriatr Psychiatry 18:844-854.
- Miravalle L, Murrell JR, Takao M, Glazier B, Piccardo P, Vidal R, Ghetti B. 2002. **Genetic mutations associated with presenile dementia.** *Neurobiology of Aging* 23 (1S): S32
- Mirra SS, Murrell JR, Gearing M, Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Levey AI, Jones R, Green J, Shoffner JM, Wainer BH, Schmidt ML, Trojanowski JQ, Ghetti B. 1999. **Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau.** J Neuropathol Exp Neurol. 58:335-345.

Mizutani T, Amano N, Sasaki H, Morimatsu Y, Mori H, Yoshimura M, Yamanouchi H, Hayakawa K, Shimada H. 1990 **Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex.** Acta Neuropathol 80:575-580.

Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K. 1992. **A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene.** Nat Genet 2:340-342.

Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. 2000 **Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study.** JAMA 283:1007-1015.

Muros M, Rodríguez-Ferrer C. 1996. **Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4.** Atherosclerosis 121:13-21.

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. 1991. **A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease.** Science 254:97-99.

Murrell JR, Koller D, Foroud T, Goedert M, Spillantini MG, Edenberg HJ, Farlow MR, Ghetti B. 1997. **Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17.** Am J Hum Genet 61:1131-1138.

Myers R, Schaefer E, Wilson P, D'Agostino R, Ordovas J, Espino A, Au R, White R, Knoefel J, Cobb J, McNulty K, Beiser A, Wolf P. 1996. **Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study.** Neurology 46:673-677.

Nathan B, Bellosta S, Sanan D, Weisgraber K, Mahley R, Pitas R. 1994. **Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro.** Science 26:850-852.

Nee L, Polinsky R, Eldridge R, Weingartner H, Smallberg S, Ebert M. 1993. **A family with histological confirmed Alzheimer's disease.** Arch Neurol 40:203-208.

Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. **Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** N Engl J Med 348:1356-1364.

Okuizumi K, Onodera O, Namba Y, Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanaka H, Takahashi H. 1995. **Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease.** Nat Genet 11:207-209.

Okuizumi K, Onodera O, Seki K, Tanaka H, Namba Y, Ikeda K, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Tsuji S. 1996. **Lack of association of very low**

density lipoprotein receptor gene polymorphism with Caucasian Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:251-254.

Panossian L, Porter V, Valenzuela H, Zhu X, Reback E, Masterman D, Cummings J, Effros R. 2003. **Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status.** *Neurobiol Aging*. 24:77-84

Payami H, Montee K, Kaye J, Bird T, Yu C, Wijsman E, Schellenberg G. 1994. **Alzheimer's disease, apolipoprotein E4, and gender.** *JAMA* 271:1316-1317.

Payami H, Zarepari S, Montee K, Sexton G, Kaye J, Bird T, Yu C, Wijsman E, Heston L, Litt M, Schellenberg G. 1996. **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* 58:803-811.

Pérez-Tur J. 2001. **Presenilins in the genesis of Alzheimer s disease.** *Rev Neurol* 33:967-972.

Pérez-Tur J. **La genética y la Enfermedad de Alzheimer.** 2000. *Rev Neurol* 30:161-169.

Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM, Saunders AM, Roses AD, Haines JL. 1997. **Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12.** *JAMA* 278:1237-1241.

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA. 1991. **Linkage studies in**

familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. Am J Hum Genet 48:1034-1050.

Pericak-Vance MA, Haines JL. 1995. **Genetic susceptibility to Alzheimer disease.** Trends Genet 11:504-508.

Petronis A. 1999. **Alzheimer's disease and Down syndrome: from meiosis to dementia.** Exp Neurol. 158:403-413.

Pirkanen M, Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Lehtovirta M, Hänninen T, Soininen H. 2005. **Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women.** Eur J Hum Genet. 13:1000-1006

Piscopo P, Crestini A, Malvezzi-Campeggi L, Manfredi A, Deiana E, Cherchi R, Vanacore N, Marcon G, Piras MR, Confaloni AM. 2005. **A novel PSEN-2 mutation in a large Italian pedigree.** Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Insights, Progress and Perspectives. 7th International Conference AD/PD 2005 Book of Abstracts : 24

Plassman B, Breitner J. 1996. **Apolipoprotein E and cognitive decline in Alzheimer's disease.** Neurology 47:317-320.

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. 1993. **Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease.** Lancet 342:697-699.

Poirier J, Delisle M, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM}. 1995. **Apolipoprotein E4 allele as a predictor of**

cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 92:12260-12264.

Poirier J. 1994. **Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease.** Trends Neurosci 17:525-530.

Ponting CP, Hutton M, Nyborg A, Baker M, Jansen K, Golde TE. 2002. **Identification of a novel family of presenilin homologues.** Hum Mol Genet 11:1037-1044.

Post SG, Whitehouse PJ, Binstock RH, Bird TD, Eckert SK, Farrer LA, Fleck LM, Gaines AD, Juengst ET, Karlinsky H, Miles S, Murray TH, Quaid KA, Relkin NR, Roses AD, St George-Hyslop PH, et al. 1997. **The clinical introduction of genetic testing for Alzheimer disease. An ethical perspective.** JAMA 277:832-836.

Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. 1998. **Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models.** Annu Rev Genet 32:461-493.

Qian S, Jiang P, Guan XM, Singh G, Trumbauer ME, Yu H, Chen HY, Van de Ploeg LH, Zheng H. 1998. **Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates A β 1-42/43 expression.** Neuron 20:611-617.

Queralt R. 2000. **A novel mutation V89 in the presenilin 1 gene in a family with early onset Alzheimer's disease and marked behavioral disturbances.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 72:266-269.

Ramirez P, Gregório G, Ribera M, Casado J, Reynish E, Ousset J, Vellas B, Salmon E. 2005 **The need for a consensus in the use of assessment tools for Alzheimer's disease: the Feasibility Study (assessment tools for dementia in Alzheimer Centres across Europe), a European Alzheimer's Disease Consortium's (EADC) survey.** *Int J Geriatr Psychiatry* 8:744-748.

Rao V, Cupples A, van Duijn C, Kurz A, Green R, Chui H, Duara R, Auerbach S, Volicer L, Wells J, van Broeckhoven C, Growdon J, Haines J, Farrer L. 1996. **Evidence for major gene inheritance of Alzheimer disease in families of patients with and without apolipoprotein E epsilon 4.** *Am J Hum Genet* 59:664-675.

Rapp S, Espeland M, Shumaker S, Henderson V, Brunner RL, Manson J, Gass M, Stefanick M, Lane D, Hays J, Johnson K, Coker L, Dailey M, Bowen D. 2003. **Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial.** *JAMA*. 289:2663-2672.

Raux G, Guyant-Maréchal L, Martin C, Bou J, Penet C, Brice A, Hannequin D, Frebourg T, Campion D. 2005. **Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update.** *J Med Genet*. 42:793-795.

Ray W, Ashall F, Goate A. 1998. **Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease.** *Mol Med Today* 4:151-157.

- Ray W, Yao M, Mumm J, Schroeter E, Saftig P, Wolfe M, Selkoe D, Kopan R, Goate A. 1999. **"Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch."** J. Biol. Chem. 274:36801-36807.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. 1993. **Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions.** Neuron 11:575-580.
- Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D. 1996. **Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E.** N Engl J Med 334:752-758.
- Relkin NR, Kwon YJ, Tsai J, Gandy S. 1996. **The National Institute on Aging/Alzheimer's Association recommendations on the application of apolipoprotein E genotyping to Alzheimer's disease.** Ann N Y Acad Sci 802:149-176.
- Rocca W, Amaducci L, Schoenberg B. 1986. **Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease.** Ann Neurol 19:415-424.
- Rocca W, van Duijn C, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves A, Heyman A, Jorm A, Kokmen E, Kondo K. 1991. **Maternal age and Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies.** EURODEM Risk Factors Research Group. Int J Epidemiol.; 20 S 2:S21-7.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. 2003. **Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review.** Brain Res Bull. 61:1-24.

Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P. 1997. **Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease.** Genomics 40:415-424.

Rogaeva EA, Fafel KC, Song YQ, Medeiros H, Sato C, Liang Y, Richard E, Rogaev EI, Frommelt P, Sadovnick AD, Meschino W, Rockwood K, Boss MA, Mayeux R, St George-Hyslop P. 2001. **Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations.** Neurology. 57:621-625

Rogers J. 2000. **An IL-1 alpha susceptibility polymorphism in Alzheimer's disease: new fuel for the inflammation hypothesis.** Neurology 55:464-465.

Rosenberg RN. 2000. **The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture.** Neurology 54:2045-2054.

Roses AD. 1994. **Apolipoprotein E is a relevant susceptibility gene that affects the rate of expression of Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging 15 Suppl 2:S165-167.

Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. 2001. **Molecular consequences of presenilin1 mutation.** Nature 411:654-655.

Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. 2000. **Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease.** Nature 405:531-532.

Sahota A, Yang M, Gao S, Hui S, Baiyewu O, Gureje O, Oluwole S, Ogunniyi A, Hall K, Hendrie H. 1997. **Apolipoprotein E-associated risk for Alzheimer's disease in the African-American population is genotype dependent.** Ann Neurol 42:659-661.

Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 2nd. Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, B 24.

Sanchez P, Alvarez V, Avila J. 2001. **La proteína Tau en enfermedades neurodegenerativas. Tautopatias.** Rev Neurol 33:169-177.

Sandbrink R, Zhang D, Schaeffer S, Masters CL, Bauer J, Förstl H, Beyreuther K. 1996. **Missense mutations of the PS-1/S182 gene in German early-onset Alzheimer's disease patients.** Ann Neurol. 40:265-266.

Saunders A, Schmechel K, Breitner J, Benson M, Brown W, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring M, Szymanski M, McCown N. 1993a. **Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases.** Lancet 342:710-711.

Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, George-Hyslop P, Pericak-Vance M, Joo S, Rosi B, Gusella J, Crapper-MacLachlan D, Alberts M. 1993b. **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.** Neurology 43:1467-1472.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME. 1992. **Genetic linkage evidence for**

a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Science 258:668-671

Schellenberg GD. 1995. **Progress in Alzheimer's disease genetics.** Curr Opin Neurol 8:262-267.

Scheper W, Zwart R, Sluijs P, Annaert W, Gool WA, Baas F. 2000. **Alzheimer's presenilin 1 is a putative membrane receptor for rab GDP dissociation inhibitor.** Hum Mol Genet 9:303-310.

Selkoe DJ. 1991. **Amyloid protein and Alzheimer's disease.** Sci Am 265:68-78.

Selkoe DJ. 1989. **Molecular pathology of amyloidogenic proteins and the role of vascular amyloidosis in Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging. 10:387-395.

Serretti A, Olgiati P, De Ronchi D. 2007. **Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field.** J Alzheimers Dis. 12:73-92

Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. 2002. **Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase.** J Biol Chem 277:4334-4342.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. 1995. **Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.** Nature 375:754-760.

Sisodia SS, Kim SH, Thinakaran G. 1999. **Function and dysfunction of the presenilins.** Am J Hum Genet 65:7-12.

ARCHIVO HISTÓRICO

Sjögren T, Sjögren H, Lindgren AG. 1952. **Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study.** Acta Psychiatr Neurol Scand 82:1-152.

Slooter AJ, Tang MX, van Duijn CM, Stern Y, Ott A, Bell K, Breteler MM, Van Broeckhoven C, Tatemichi TK, Tycko B, Hofman A, Mayeux R. 1997. **Apolipoprotein E epsilon 4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation.** JAMA 277:818-821.

Small B, Graves A, McEvoy C, Crawford F, Mullan M, Mortimer J. 2000. **Is APOE--epsilon4 a risk factor for cognitive impairment in normal aging?** Neurology 54:2082-2088.

Smith Mark A. 2002. **Amyloid- β and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain.** Free Radical Biology Medicine 33:1194-1199.

Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H, Tikkanen M, Kainulainen K, Tilvis R. 1995. **Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians.** Neurology 45:903-907.

Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Kirchgessner TG, Komaromy MC, Mohandas T, Schotz MC, Lusis AJ. 1987. **Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21.** Genomics 1:138-144.

Spence MA, Heyman A, Marazita ML, Sparkes RS, Weinberg T. 1986. **Genetic linkage studies in Alzheimer's disease.** Neurology 36:581-584.

Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR, Ghetti B. 1997.

Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. Proc Natl Acad Sci USA 94:4113-4118.

St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S. 1992. **Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14.** Nat Genet 2:330-334.

St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D. 1987. **The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21.** Science 235:885-890.

St George-Hyslop PH. 2000. **Piecing together Alzheimer's.** Sci Am 283:76-83.

Strittmatter J, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. 1994b. **Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci USA 91:11183-11186.

Strittmatter J, Saunders M, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen S, Roses D. 1993a. **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 90:1977-1981.

Strittmatter J, Weisgraber H, Goedert M, Saunders M, Huang D, Corder H, Dong M, Jakes R, Alberts J, Gilbert R. 1994a. **Hypothesis: microtubule instability**

and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. Exp Neurol 125:163-171.

Strittmatter J, Weisgraber H, Huang Y, Dong M, Salvesen S, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders M, Goldgaber D, Roses D. 1993. **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. 90:8098-8102

Struhl G, Adachi A. 2000. **Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins.** Mol Cell 6:625-636.

Suastegui RA, Yescas P, Camacho JL, Ochoa A, Granados J, Jara A, López A, Alonso ME. 2002. **Frecuencia de la apolipoproteína E en una población Nahua.** Rev Invest Clin 54:415-421.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. 1994. **An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.** Science 264:1336-1340.

Tall AR. 1995a. **Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies.** J Intern Med 237:5-12.

Tall AR. 1995b. **Plasma lipid transfer proteins.** Annu Rev Biochem 64:235-257.

Tandon A, Rogaeva E, Mullan M, St George-Hyslop PH. 2000. **Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins.** *Curr Opin Neurol* 13:377-384.

Tang M, Cross P, Andrews H, Jacobs D, Small S, Bell K, Merchant C, Lantigua R, Costa R, Stern Y, Mayeux R. 2001. **Incidence of AD in African-Americans, Caribbean Hispanics, and Caucasians in northern Manhattan.** *Neurology* 56:49-56.

Tang M, Maestre G, Tsai W, Liu X, Feng L, Chung W, Chun M, Schofield P, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. 1996. **Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City.** *Am J Hum Genet* 58:574-584.

Tang M, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, Andrews H, Feng L, Tycko B, Mayeux R. 1998. **The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics.** *JAMA* 279:751-755.

Tanzi R, Saunders A. 2007. **An AICD-based functional screen to identify APP metabolism regulators.** *Mol Neurodegener.*; 2: 15-33.

Tanzi R, St. George-Hyslop H, Gusella J. 1991 **Molecular genetics of Alzheimer disease amyloid.** *J. Biol. Chem.* 266: 20579-20582.

Tedde A, Nacmias B, Ciantelli M, Forleo P, Cellini E, Bagnoli S, Piccini C, Caffarra P, Ghidoni E, Paganini M, Bracco L, Sorbi S. 2003. **Identification of**

new presenilin gene mutations in early-onset familial Alzheimer disease.

Arch Neurol. 60:1541-1544.

Lunetta K, D'Agostino R, Karasik D, Benjamin E, Guo C, Govindaraju R, Kiel D, Kelly-Hayes M, Massaro J, Pencina M, Seshadri S, Murabito JM. 2007. **Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study.** BMC Med Genet. 8 Suppl 1:S13

Teisberg P, Gjone E. 1974. **Probable linkage of LCAT locus in man to the alpha haptoglobin locus on chromosome 16.** Nature 249:550-551.

Thomas P, Lalloué F, Preux P, Hazif-Thomas C, Paniel S, Inscale R, Belmin J, Clément J. 2006 **Dementia patient's caregiver's quality of life: the PIXEL study.** Int J Geriatr Psychiatry 21:50-56.

Thorsteinsson L, Georgsson G, Asgeirsson B, Bjarnadottir M, Olafsson I, Jensson O, Gudmundsson G. 1992. **On the role of monocytes/macrophages in the pathogenesis of central nervous system lesions in hereditary cystatin C amyloid angiopathy.** J Neurol Sci 108:121-128.

Tierney M, Szalai J, Snow W, Fisher R, Tsuda T, Chi H, McLachlan D, St George-Hyslop P. 1996. **A prospective study of the clinical utility of ApoE genotype in the prediction of outcome in patients with memory impairment.** Neurology 46:149-154.

Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. 2000. **The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism.** Curr Opin Lipidol 11:123-131.

Tsai M, Tangalos E, Petersen R, Smith G, Schaid D, Kokmen E, Ivnik R, Thibodeau S. 1994. **Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease.** Am J Hum Genet 54:643-649.

Utermann G. 1995. **Lipoprotein (a).** Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** Seventh edition Mc Grow Hill; Cap.58:1887-1912.

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

van Duijn C, Stijnen T, Hofman A. 1991. **Risk factors for Alzheimer's disease: overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies.** EURODEM Risk Factors Research Group. Int J Epidemiol. 20 S 2:S4-12.

van Duijn CM, Hendriks L, Farrer LA, Backhovens H, Cruts M, Wehnert A, Hofman A, Van Broeckhoven C. 1994. **A population-based study of familial Alzheimer disease: linkage to chromosomes 14, 19, and 21.** Am J Hum Genet 55:714-727.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, et al. 1999. **Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.** Science 286:735-741.

Walden C, Hegele R. 1994. **Apolipoprotein E in hyperlipidemia.** *Ann Intern Med* 120:1026-1036.

Warwick Daw E, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, Wijsman EM. 2000. **The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease.** *Am J Hum Genet* 66:196-204.

Weitkamp LR, Nee L, Keats B, Polinsky RJ, Guttormsen S. 1983. **Alzheimer disease: evidence for susceptibility loci on chromosomes 6 and 14.** *Am J Hum Genet* 35:443-453.

Wernicke TF, Reischies FM. 1994. **Prevalence of dementia in old age: clinical diagnoses in subjects aged 95 years and older.** *Neurology* 44:250-253.

Wilhelmsen KC. 1997. **Frontotemporal dementia is on the MAPtau.** *Ann Neurol* 41:139-140.

Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. 1985. **Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome.** *Ann Neurol* 12:278-282.

Wittenburg N, Eimer S, Lakowski B, Rohrig S, Rudolph C, Baumeister R. 2000. **Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*.** *Nature* 406:306-309.

Xu H, Gouras G, Greenfield J, Vincent B, Naslund J, Mazzei L, Fried G, Jovanovic J, Seeger M, Relkin N, Liao F, Checler F, Buxbaum J, Chait B, Thinakaran G, Sisodia S, et al. 1998. **Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides.** *Nat Med* 4:447-451.

Xu P, Schmechel D, Rothrock-Christian T, Burkhardt D, Qiu H, Popko B, Sullivan P, Maeda N, Saunders A, Roses A, Gilbert J. 1996. **Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice.** *Neurobiol* 3:229-245.

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song Y, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang D, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang D, Xu DH, Sato C, Rogaev E, et al. 2000. **Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing.** *Nature* 47:48-54.

ra Yescas · Adriana Huertas-Vazquez ·
ría Teresa Villarreal-Molina · Astrid Rasmussen ·
ría Teresa Tusié-Luna · Marisol López ·
nuel Canizales-Quinteros · María Elisa Alonso

Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families

Received: 20 December 2005 / Accepted: 23 March 2006 / Published online: 21 April 2006
Springer-Verlag 2006

Abstract The etiology of Alzheimer's disease (AD) is complex. To date, molecular genetic studies in several families affected with AD have identified three genes associated with highly penetrant early-onset AD: Presenilin 1 (PSEN1), Presenilin 2 (PSEN2) and β -amyloid precursor protein (APP); and one gene (apolipoprotein E) associated with late-onset AD. Molecular analysis of the PSEN1 gene was performed by direct sequencing of genomic DNA. The possible founder effect was investigated analyzing two highly polymorphic microsatellite markers flanking the

PSEN1 gene. Twelve unrelated Mexican families with early-onset AD were analyzed. The Ala431Glu mutation in exon 12 of PSEN1 was found in nine (75%) of these families, which segregated showing autosomal dominant inheritance. Because all families bearing the mutation are from the State of Jalisco (located in Western Mexico), a founder effect was hypothesized. Microsatellite haplotype analysis suggested a common ancestor in these nine kindreds. In conclusion, the Ala431Glu mutation is a prevalent cause of early-onset familial Alzheimer's disease in families from the State of Jalisco, Mexico. Genetic evidence supports that it is a founder mutation descending from a single common ancestor. These findings have important implications for prompt diagnosis and genetic counseling for Mexican patients with familial AD from Jalisco.

A summary of the results of this study was presented at the Congress of the Human Genome Organization (HUGO, April, 2003). Workshop Abstract No. 11, pp. 14.

Yescas · A. Rasmussen · M. E. Alonso
Departamento de Neurogenética y Biología Molecular,
Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez,
México D.F., México

Yescas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma Metropolitana,
México D.F., México

Huertas-Vazquez · M. T. Villarreal-Molina
T. Tusié-Luna · S. Canizales-Quinteros
Departamento de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM,
México D.F., México

López
Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,
México D.F., México

E. Alonso (✉)
Departamento de Neurogenética, Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez,
Carreteras Anticéntricas Sur 3877, Colonia La Fama, Tlalpan,
06702 México D.F., México
e-mail: elisaav@servidor.unam.mx
Tel.: +52-55-56063822
Fax: +52-55-54240808

Keywords Early-onset Alzheimer's disease ·
PSEN1 gene · Mutation · Founder effect

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. It is a neurodegenerative disorder of the central nervous system characterized by progressive memory loss and intellectual decline due to the appearance of two major brain lesions: senile plaques and neurofibrillary tangles. The exact biochemical pathway leading to neurodegeneration is still unknown. Although, in most cases, the first symptoms of memory dysfunction or behavioral changes become apparent after age 65 years (late-onset or senile AD), in some cases, the disease starts earlier in life (early-onset or presenile AD) [1]. Three genes are currently known to have a causal role in early onset autosomal dominant AD: the β -amyloid precursor protein (APP) gene on chromosome 21q21.1 [2], presenilin 1 (PSEN1) on chromosome 14q24.3 [3], and presenilin 2 (PSEN2) on chromosome 1q42.1 [4]. These three genes together account for about half of all cases of familial early

AD, PSEN1 mutations being the most frequent [5]. In addition, the Apolipoprotein E (APOE) $\epsilon 4$ variant is considered as a susceptibility allele, as it significantly increases the risk of AD and decreases the age of onset [6, 7]. In this study, we describe a single missense mutation (Ala431Glu) in the PSEN1 gene found in nine of the 12 unrelated Mexican families with early onset AD. We find evidence that the mutation originated from a common ancestor.

Methods

Study subjects

The sample consisted of 12 unrelated probands with early-onset AD, whose ages of onset ranged between 34 and 46 years (mean 40 years). Patients and their first degree relatives were recruited from Genetics Department of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Sosa Suarez (INNNMVS) in Mexico City over a 17-year period (1986 to 2003) including patients from all over the country. All cases met McKhann's criteria for probable AD, and one was diagnosed as definite AD on autopsy [8]. The study received approval from the INNNMVS Review Board and informed consent was obtained from all subjects at the moment of blood drawing. Cases were considered familial if at least one first-degree relative suffered from early-onset dementia. Age at onset was based on the verbal reports of the patient and family members. All pedigrees showed autosomal dominant transmission in at least three generations, with a mean age of onset of 40 years (range 34–48 years).

All probands recruited agreed to participate, so that a total of 97 individuals (12 probands and 85 first degree relatives) were included in the study. The control sample consisted of 100 healthy unrelated individuals (50 individuals from Mexico City or its surroundings and 50 individuals from the State of Jalisco in Western Mexico) aged 60 to 92 years (mean 76 years) with no signs of dementia after a minimal mental test evaluation.

Mutational analysis of PSEN1

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a salting-out/salt chloroform method [9]. Subsequently, eight exons (exons 5–12) of the PSEN1 gene were amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) with exon-specific sets of primers and nucleotides as previously described [10] and sequenced using ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 in an ABI3100 automated sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems).

Genotyping of polymorphisms flanking presenilin 1

Two highly polymorphic microsatellites markers (CA and GT repeats located 31.5 and 21.3 kb upstream of the PSEN1 gene, respectively [Genebank accession no. AF109907]) were genotyped as previously described [11].

Apolipoprotein E genotyping

APOE haplotyping was performed as described [12].

Results

Mutational analysis of PSEN1 was performed in probands of the 12 Mexican families with early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. The structure and clinical characteristics of these families are summarized in Table 1. Clinical aspects of some of these families had been previously reported [13, 14]. All showed cortical and subcortical atrophy on computerized axial tomography scans or magnetic resonance imaging. No particular phenotypic trait was observed in these patients, although phenotypic variability was observed. One proband (family 18) suffered spastic paraplegia, another (family 3) exhibited myoclonias and one more (family 22) had a history of partial seizures 20 years before AD onset which was most likely unrelated to the disease.

We identified a single mutation (Ala431Glu) in exon 12 of PSEN1 in 9/12 probands (75%). All probands had early-onset (34–46 years) and a family history of AD. The Ala431Glu mutation was found in 19/60 (31.7%) apparently unaffected individuals tested in the nine families, but not in 100 healthy unrelated individuals. APOE $\epsilon 4$ was present in four of the 22 patients with the Ala431Glu mutation, apparently without affecting the age of disease onset (with $\epsilon 4$ 41.50 years; without $\epsilon 4$ 41.56 years, $p=0.980$). Detailed information on APOE genotypes for AD family members is shown in Table 2.

Table 1 Clinical and structural characteristics of early-onset AD Mexican families with the Ala431Glu Presenilin 1 mutation

Characteristics	Early onset families with PS1 Ala431Glu mutation
Number of families	9
Number of patients with AD	13
Number of family members	60
Total family members with the mutation	41
Age at onset, mean (range)	40 (34–48) years
Age at death	48 (44–57) years
Duration of AD	10 (6–14) years
ApoE $\epsilon 4$ allele present in AD patients	2

et AD, PSEN1 mutations being the most frequent [5]. In addition, the Apolipoprotein E (APOE) $\epsilon 4$ variant is considered as a susceptibility allele, as it significantly increases the risk of AD and decreases the age of onset [6, 7]. In this study, we describe a single missense mutation (Ala431Glu) in the PSEN1 gene found in nine of the 12 apparently unrelated Mexican families with early onset AD. We find evidence that the mutation originated from a common ancestor.

Methods

Study subjects

The sample consisted of 12 unrelated probands with early-onset AD, whose ages of onset ranged between 34 and 46 years (mean 40 years). Patients and their first degree relatives were recruited from Genetics Department of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez (INNNMVS) in Mexico City over a 17-year period (1986 to 2003) including patients from all over the country. All cases met McKhann's criteria for probable AD, and one was diagnosed as definite AD on autopsy [8]. The study received approval from the INNNMVS Review Board and informed consent was obtained from all subjects at the moment of blood drawing. Cases were considered familial if at least one first-degree relative suffered from early-onset dementia. Age at onset was based on the verbal reports of the patient and family members. All pedigrees showed autosomal dominant transmission in at least three generations, with a mean age of onset of 40 years (range 34–48 years). All probands recruited agreed to participate, so that a total of 97 individuals (12 probands and 85 first degree relatives) were included in the study. The control sample consisted of 100 healthy unrelated individuals (50 individuals from Mexico City or its surroundings and 50 individuals from the State of Jalisco in Western Mexico) aged 60 to 92 years (mean 76 years) with no signs of dementia after a minimal mental test evaluation.

Mutational analysis of PSEN1

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a salting-out/salt chloroform method. Subsequently, eight exons (exons 5–12) of the PSEN1 gene were amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) with exon-specific sets of primers and nucleotides as previously described [10] and sequenced using ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 on an ABI3100 automated sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems).

Genotyping of polymorphisms flanking presenilin 1

Two highly polymorphic microsatellites markers (CA and GT repeats located 31.5 and 21.3 kb upstream of the PSEN1 gene, respectively [Genebank accession no. AF109907]) were genotyped as previously described [11].

Apolipoprotein E genotyping

APOE haplotyping was performed as described [12].

Results

Mutational analysis of PSEN1 was performed in probands of the 12 Mexican families with early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. The structure and clinical characteristics of these families are summarized in Table 1. Clinical aspects of some of these families had been previously reported [13, 14]. All showed cortical and subcortical atrophy on computerized axial tomography scans or magnetic resonance imaging. No particular phenotypic trait was observed in these patients, although phenotypic variability was observed. One proband (family 18) suffered spastic paraplegia, another (family 3) exhibited myoclonias and one more (family 22) had a history of partial seizures 20 years before AD onset which was most likely unrelated to the disease.

We identified a single mutation (Ala431Glu) in exon 12 of PSEN1 in 9/12 probands (75%). All probands had early-onset (34–46 years) and a family history of AD. The Ala431Glu mutation was found in 19/60 (31.7%) apparently unaffected individuals tested in the nine families, but not in 100 healthy unrelated individuals. APOE $\epsilon 4$ was present in four of the 22 patients with the Ala431Glu mutation, apparently without affecting the age of disease onset (with $\epsilon 4$ 41.50 years; without $\epsilon 4$ 41.56 years, $p=0.980$). Detailed information on APOE genotypes for AD family members is shown in Table 2.

Table 1 Clinical and structural characteristics of early-onset AD Mexican families with the Ala431Glu Presenilin 1 mutation

Characteristics	Early onset families with PSEN1 Ala431Glu mutation
Number of families	9
Number of patients with AD	13
Number of family members	60
Total family members with the mutation	41
Age at onset, mean (range)	40 (34–48) years
Age at death	48 (44–57) years
Duration of AD	10 (6–14) years
ApoE $\epsilon 4$ allele present in AD patients	2

Table 2 Presence of Ala431Glu mutation and APOE genotypes in subjects from nine early-onset AD Mexican families

Family number	Subject	Sex	Alzheimer disease	Ala431Glu mutation	APOE genotype	Current age or age at onset ^a
	Proband	M	+	+	3/3	45
	Sibling	F	-	-	4/3	33
	Offspring	M	-	-	3/3	36
	Offspring	F	-	-	3/3	32
	Niece	F	-	-	3/3	39
	Niece	F	-	-	3/3	36
	Niece	F	-	-	3/3	33
	Niece	F	-	+	4/3	40
	Nephew	M	-	-	4/3	43
	Nephew	M	-	-	4/3	35
	Nephew	M	-	-	4/3	45
	Nephew	M	-	+	4/3	42
	Proband	F	+	+	3/3	37
	Sibling	F	+	+	3/3	46
	Nephew	M	-	-	3/3	35
	Niece	F	-	-	3/3	38
	Niece	F	-	+	3/3	35
	Niece	F	-	+	3/3	32
	Niece	F	-	+	3/3	38
	Proband	F	+	+	3/2	41
	Sibling	M	+	+	3/3	43
	Sibling	M	+	+	3/3	43
	Sibling	F	-	-	3/3	53
	Offspring	F	-	+	3/2	29
	Offspring	F	-	+	3/2	24
	Offspring	F	-	+	3/3	22
	Offspring	F	-	+	3/3	37
	Offspring	F	-	+	3/2	32
	Offspring	F	-	+	3/2	39
	Offspring	M	-	+	3/3	33
	Offspring	F	-	-	3/3	37
	Nephew	M	-	+	4/3	26
	Nephew	M	-	-	3/3	23
	Niece	F	-	+	4/2	23
	Proband	M	+	+	3/3	40
	Sibling	F	+	+	3/3	42
	Sibling	M	+	+	3/3	44
	Sibling	F	-	-	4/3	39
	Offspring	F	-	-	3/3	33
	Proband	M	+	+	3/3	46
	Sibling	F	-	-	3/3	46
	Sibling	F	+	+	3/3	42
	Sibling	F	+	+	3/3	36
	Sibling	F	+	+	3/3	48
	Offspring	M	-	+	4/3	19
	Offspring	M	-	+	3/3	20
	Offspring	F	-	+	4/3	23
	Nephew	M	-	-	3/3	23
	Nephew	M	-	-	3/3	21
	Niece	F	-	-	3/3	22
	Niece	F	-	-	3/3	15

le 2 (continued)

Family number	Subject	Sex	Alzheimer disease	Ala431Glu mutation	APOE genotype	Current age or age at onset ^a
	Proband	F	+	+	3/3	34
	Sibling	F	+	+	3/3	43
	Sibling	F	+	+	4/2	38
	Sibling	F	-	-	4/2	45
	Sibling	M	-	-	3/3	54
	Sibling	F	-	-	4/3	49
	Sibling	F	-	+	3/3	33
	Sibling	F	+	+	3/3	37
	Nephew	M	-	-	4/3	24
	Nephew	M	-	+	4/3	25
	Niece	F	-	-	4/3	22
	Niece	F	-	-	4/3	26
	Proband	F	+	+	4/3	40
	Sibling	F	+	+	4/3	48
	Offspring	M	-	-	4/3	32
	Proband	M	+	+	3/2	39
	Sibling	F	+	+	4/3	40
	Proband	F	+	+	3/3	42

F, female; M, male

^aAge at onset if demented (years)

Because all nine probands bearing the Ala431Glu mutation came from the state of Jalisco located in Western Mexico, with a population of 6,322,000 habitants (Fig. 1), we further investigated the possibility of a common ancestor causing a founder effect. We studied two highly polymorphic microsatellites (CA and GT markers) flanking the PSEN1 gene in the nine AD families with the Ala431Glu mutation and 100 control individuals (50 from Mexico City and 50 from Jalisco, Mexico). All 41 mutation bearers shared the same 4-5 haplotype (allele 4=273 bp for the CA marker, and allele 5=205 bp for the GT marker), which was in contrast absent from all 100

unrelated Mexican controls. Moreover, only four (8%) and 2 (4%) controls from Jalisco showed alleles 4 and 5, respectively, while these alleles were not found in any of the controls from Mexico City.

Discussion

We describe PSEN1 gene mutation (Ala431Glu) in 13 patients from nine apparently unrelated AD families from Mexico. These nine families were from Jalisco. All mutation carriers showed the same haplotype for two microsatellite markers in the PSEN1 locus. In addition, this haplotype was not found in 100 Mexican unrelated controls, including 50 individuals from Jalisco. This strongly suggests that all individuals carrying the Ala431Glu mutation had a common ancestor. The Ala431Glu PSEN1 mutation may have occurred by chance on an extremely rare haplotype or the mutated allele may have originated from an immigrated population not sharing this haplotype with the local population.

This mutation had been described in nine patients of undefined ethnic origin with clinical diagnosis of AD [16, 17]. It is important to point out that one of our nine families had participated in a previous study where the condition was linked to chromosome 14q24.3 [18] in whom the Ala431Glu mutation was subsequently identified (Schellenberg 1998, personal communication). The substituted alanine (Ala431) is highly conserved among different species and according to the PolyPhen program (<http://www.tux.embl-heidelberg.de/ramensky/index.shtml>), which predicts the functional consequence of amino acid substitutions, a glutamic acid residue at position 431 would

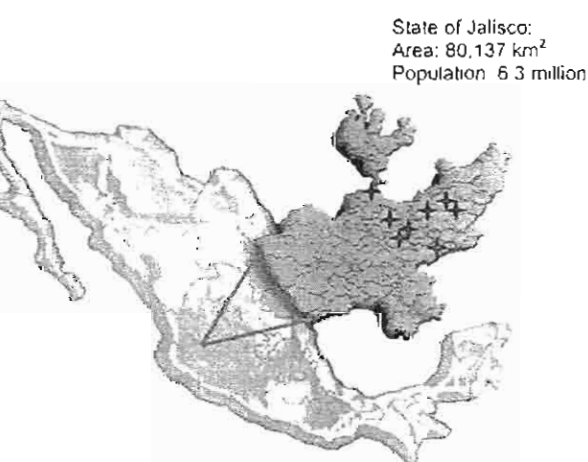


Fig. 1 Map of Mexico, with the State of Jalisco highlighted. The stars denote the location of the counties/cities from which eight of the Ala431Glu mutation families are from. The remainder family is from the State of Jalisco; however, the city of origin is unknown.

possibly damaging to the function of PSEN1. Neurobiological studies have been recently described in AD families with this mutation [19].

To our knowledge, a founder mutation in Alzheimer's disease was suggested for the first time in 1988 in a group of American Alzheimer families who were descendants of Volga Germans [20]. This was confirmed when a PSEN1 mutation was found in this group [4]. However, current mutations in AD are not always the consequence of a founder effect, and may be due to mutational hotspots. This is the case of APP mutations affecting codon 717 causing AD [21]. Nevertheless, the majority of recurrent mutations in the PSEN1 gene seem to be due to single founders. A founder effect for PSEN1 has been described for three other mutations located in exons 4 and 7, and exon 9 [10, 11, 22, 23]. One of these founder mutations (P206Ala in exon 7) causing early-onset Alzheimer's disease was identified in apparently unrelated Caribbean Hispanic families. However, the ethnic background of this Hispanic group is very different to that of our Mexican families. In terms of genetic composition, the Mexican mestizo population is the result of admixture with predominantly Spanish-European (50–60%) and Amerindian (37–49%) contributions, with a minor African (1–2%) contribution [24]. It is interesting to note that the Ala431Glu mutation has not been reported in patients from Mexico, so it can be speculated that it may have originated in the recent generations of Mexican-Mestizos, or perhaps in earlier Amerindian groups. Further studies are necessary to verify this hypothesis.

The high prevalence of the Ala431Glu mutation in AD families from Jalisco has implications for the diagnostic approach. For all early-onset AD cases from this region, the initial molecular approach should be to directly screen for Ala431Glu, and PSEN1 and other early-onset AD genes should be sequenced only if the mutation is absent. Positive Ala431Glu identification would allow accurate genetic counseling and presymptomatic genetic testing for at risk individuals could be offered. For this purpose, a careful protocol for counseling and support must be developed, following the guidelines for genetic presymptomatic testing in Huntington's disease [25].

In conclusion, the Ala431Glu mutation is prevalent among families with early-onset familial Alzheimer's disease from Jalisco, Mexico, and is a founder mutation extending from a single common ancestor. This finding allows a prompt diagnosis and genetic counseling of Mexican patients with familial AD from Jalisco.

Acknowledgements This study was partially supported by grant 444M from CONACYT, Mexico. We thank the patients and family members for participating in the study and S. Ramirez-Jimenez for laboratory technical assistance.

References

1. Ray WJ, Ashall F, Goate AM (1998) Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 4:151–157
2. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704–706
3. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Fonan JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Ramero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760
4. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977
5. Blacker D, Tanzi RE (1998) The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol* 55:294–296
6. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977–1981
7. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, CRAIN B, Goldgaber D, Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467–1472
8. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) 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* 34:939–944
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
10. Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Smeets S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, George-Hyslop PH, Hofman A, Van Broeckhoven (1998) Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 7:43–51
11. Athan ES, Williamson J, Ciappa A, Santana V, Romas SN, Lee JH, Rondon H, Lantigua RA, Medrano M, Torres M, Arawaka S, Rogaeva E, Song YQ, Sato C, Kawarai T, Fafel KC, Boss MA, Seltzer WK, Stern Y, St George-Hyslop P, Tycko B, Mayeux R (2001) A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA* 286:2257–2263
12. Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31:545–548
13. Gomez L, Aloriso ME, Figueroa H, Escobar A (1986) Enfermedad de Alzheimer presentación de 7 casos en 3 familias. *Rev Invest Clin* 38:261–267

Alonso ME, Otero E, Martínez C (1992) Clinical and genetic aspects of a group of patients with Alzheimer disease. *J Trop Geogr Neurol* 2:27–31

Censo de Población y Vivienda INEGI. México. 2000

Rogaeva EA, Fafel KC, Song YQ, H, Medeiros Sato C, Liang Y, Richard E, Rogaev EI, Frommelt P, Sadovnick AD, Meschino W, Rockwood K, Boss MA, Mayeux R, St George-Hyslop P (2001) Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology* 57:621–625

Miravalle L, Murell JR, Takao M, Glazier B, Piccardo P, Vidal R, Ghetti B (2002) Genetic mutations associated with presenile dementia. *Neurobiol Aging* 23:S322

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston L, Martin GM (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258:668–671

Ringman JM, Diaz Olavarrieta C, Rodriguez Y, Chavez M, Paz F, Murrell J, Macias MA, Hill M, Kawas C (2004) Female preclinical presenilin-1 mutation carriers unaware of their genetic status have higher levels of depression than their non-mutation carrying kin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:500–502

Bird TD, Lampe TH, Nemens EJ, Miner GW, Sumi SM, Schellenberg GD (1988) Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: probable genetic founder effect. *Ann Neurol* 23:25–31

21. Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, Patsouris E, Pantos GV, Gatzonis S, Kapaki E, Davaki P, Lamszus K, Siavrou D, Gal A (2005) Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics* 6:85–89
22. De Jonghe C, Cruts M, Rogaeva EA, Tysoe C, Singleton A, Vanderstichele H, Meschino W, Deraut B, Vanderhoeven I, Baekhovens H, Vanmechelen E, Morris CM, Hardy J, Rubinsztein DC, St George-Hyslop PH, Van Broeckhoven C (1999) Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased Abeta42 secretion. *Hum Mol Genet* 8:1529–1540
23. Tysoe C, Whittaker J, Xuereb J, Cairns NJ, Cruts M, Van Broeckhoven C, Wilcock G, Rubinsztein DC (1998) A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 62:70–76
24. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortes-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Cariacedo A, Xhong Y, Barton SA, Chakraborty R (2002) Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Human Biol* 14:257–263
25. International Huntington Association and the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's chorea (1994) Guidelines for the molecular genetics predictive testing in Huntington's disease. *Neurology* 44:1533–1536

Petra Yescas · Adriana Huertas-Vazquez ·
María Teresa Villarreal-Molina · Astrid Rasmussen ·
María Teresa Tusié-Luna · Marisol López ·
Samuel Canizales-Quinteros · María Elisa Alonso

Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families

Received: 20 December 2005 / Accepted: 23 March 2006 / Published online: 21 April 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The etiology of Alzheimer's disease (AD) is complex. To date, molecular genetic studies in several families affected with AD have identified three genes associated with highly penetrant early-onset AD: Presenilin 1 (PSEN1), Presenilin 2 (PSEN2) and β -amyloid precursor protein (APP); and one gene (apolipoprotein E) associated with late-onset AD. Molecular analysis of the PSEN1 gene was performed by direct sequencing of genomic DNA. The possible founder effect was investigated analyzing two highly polymorphic microsatellite markers flanking the

PSEN1 gene. Twelve unrelated Mexican families with early-onset AD were analyzed. The Ala431Glu mutation in exon 12 of PSEN1 was found in nine (75%) of these families, which segregated showing autosomal dominant inheritance. Because all families bearing the mutation are from the State of Jalisco (located in Western Mexico), a founder effect was hypothesized. Microsatellite haplotype analysis suggested a common ancestor in these nine kindreds. In conclusion, the Ala431Glu mutation is a prevalent cause of early-onset familial Alzheimer's disease in families from the State of Jalisco, Mexico. Genetic evidence supports that it is a founder mutation descending from a single common ancestor. These findings have important implications for prompt diagnosis and genetic counseling for Mexican patients with familial AD from Jalisco.

A summary of the results of this study was presented at the Congress of the Human Genome Organization (HUGO, April, 2003). Workshop Abstract No 11: pp 14.

P. Yescas · A. Rasmussen · M. E. Alonso
Departamento de Neurogenética y Biología Molecular,
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez,
México D.F., México

P. Yescas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma Metropolitana,
México D.F., México

A. Huertas-Vazquez · M. T. Villarreal-Molina ·
M. T. Tusié-Luna · S. Canizales-Quinteros
Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM,
México D.F., México

M. López
Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,
México D.F., México

M. E. Alonso (✉)
Departamento de Neurogenética, Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez,
Insurgentes Sur 3877, Colonia La Fama, Tlalpan,
04726 México D.F., México
e-mail: elisaav@servidor.unam.mx
tel.: +52-55-56063822
fax: +52-55-54240808

Keywords Early-onset Alzheimer's disease ·
PSEN1 gene · Mutation · Founder effect

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. It is a neurodegenerative disorder of the central nervous system characterized by progressive memory loss and intellectual decline due to the appearance of two major brain lesions: senile plaques and neurofibrillary tangles. The exact biochemical pathway leading to neurodegeneration is still unknown. Although, in most cases, the first symptoms of memory dysfunction or behavioral changes become apparent after age 65 years (late-onset or senile AD), in some cases, the disease starts earlier in life (early-onset or presenil AD) [1]. Three genes are currently known to have a causal role in early onset autosomal dominant AD: the β -amyloid precursor protein (APP) gene on chromosome 21q21.1 [2], presenilin 1 (PSEN1) on chromosome 14q24.3 [3], and presenilin 2 (PSEN2) on chromosome 1q42.1 [4]. These three genes together account for about half of all cases of familial early

onset AD, PSEN1 mutations being the most frequent [5]. In addition, the Apolipoprotein E (APOE) $\epsilon 4$ variant is considered as a susceptibility allele, as it significantly increases the risk of AD and decreases the age of onset [6, 7].

In this study, we describe a single missense mutation (Ala431Glu) in the PSEN1 gene found in nine of the 12 apparently unrelated Mexican families with early onset AD and find evidence that the mutation originated from a common ancestor.

Methods

Study subjects

The sample consisted of 12 unrelated probands with early-onset AD, whose ages of onset ranged between 34 and 48 years (mean 40 years). Patients and their first degree relatives were recruited from Genetics Department of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez (INNNMVS) in Mexico City over a 17-year period (1986 to 2003) including patients from all over the country. All cases met McKhann's criteria for probable AD, and one was diagnosed as definite AD on autopsy [8]. The study received approval from the INNNMVS Review Board and informed consent was obtained from all subjects at the moment of blood drawing.

Cases were considered familial if at least one first-degree relative suffered from early-onset dementia. Age at onset was based on the verbal reports of the patient and family members. All pedigrees showed autosomal dominant transmission in at least three generations, with a mean age of onset of 40 years (range 34–48 years).

All probands recruited agreed to participate, so that a total of 97 individuals (12 probands and 85 first degree relatives) were included in the study. The control sample consisted of 100 healthy unrelated individuals (50 individuals from Mexico City or its surroundings and 50 individuals from the State of Jalisco in Western Mexico) aged 60 to 92 years (mean 76 years) with no signs of dementia after a minimal test evaluation.

Mutational analysis of PSEN1

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a salting-out/salt chloroform method [9]. Subsequently, eight exons (exons 5–12) of the PSEN1 gene were amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) with exon-specific sets of oligonucleotides as previously described [10] and sequenced using ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 on an ABI3100 automated sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems).

Genotyping of polymorphisms flanking presenilin 1

Two highly polymorphic microsatellites markers (CA and GT repeats located 31.5 and 21.3 kb upstream of the PSEN1 gene, respectively [Genebank accession no. AF109907]) were genotyped as previously described [11].

Apolipoprotein E genotyping

APOE haplotyping was performed as described [12].

Results

Mutational analysis of PSEN1 was performed in probands of the 12 Mexican families with early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. The structure and clinical characteristics of these families are summarized in Table 1. Clinical aspects of some of these families had been previously reported [13, 14]. All showed cortical and subcortical atrophy on computerized axial tomography scans or magnetic resonance imaging. No particular phenotypic trait was observed in these patients, although phenotypic variability was observed. One proband (family 18) suffered spastic paraplegia, another (family 3) exhibited myoclonias and one more (family 22) had a history of partial seizures 20 years before AD onset which was most likely unrelated to the disease.

We identified a single mutation (Ala431Glu) in exon 12 of PSEN1 in 9/12 probands (75%). All probands had early-onset (34–46 years) and a family history of AD. The Ala431Glu mutation was found in 19/60 (31.7%) apparently unaffected individuals tested in the nine families, but not in 100 healthy unrelated individuals. APOE $\epsilon 4$ was present in four of the 22 patients with the Ala431Glu mutation, apparently without affecting the age of disease onset (with $\epsilon 4$ 41.50 years; without $\epsilon 4$ 41.56 years, $p=0.980$). Detailed information on APOE genotypes for AD family members is shown in Table 2.

Table 1 Clinical and structural characteristics of early-onset AD Mexican families with the Ala431Glu Presenilin 1 mutation

Characteristics	Early onset families with PS1 Ala431Glu mutation
Number of families	9
Number of patients with AD	13
Number of family members	60
Total family members with the mutation	41
Age at onset, mean (range)	40 (34–48) years
Age at death	48 (44–57) years
Duration of AD	10 (6–14) years
ApoE $\epsilon 4$ allele present in AD patients	2

Table 2 Presence of Ala431Glu mutation and APOE genotypes in subjects from nine early-onset AD Mexican families

Family number	Subject	Sex	Alzheimer disease	Ala431Glu mutation	APOE genotype	Current age or age at onset ^a
1	Proband	M	+	+	3/3	45
	Sibling	F	—	—	4/3	33
	Offspring	M	—	—	3/3	36
	Offspring	F	—	—	3/3	32
	Niece	F	—	—	3/3	39
	Niece	F	—	—	3/3	36
	Niece	F	—	—	3/3	33
	Niece	F	—	+	4/3	40
	Nephew	M	—	—	4/3	43
	Nephew	M	—	—	4/3	35
	Nephew	M	—	—	4/3	45
	Nephew	M	—	+	4/3	42
	Proband	F	+	+	3/3	37
	Sibling	F	+	+	3/3	46
	Nephew	M	—	—	3/3	35
	Niece	F	—	—	3/3	38
	Niece	F	—	+	3/3	35
	Niece	F	—	+	3/3	32
	Niece	F	—	+	3/3	38
	Proband	F	+	+	3/2	41
	Sibling	M	+	+	3/3	43
	Sibling	M	+	+	3/3	43
	Sibling	F	—	—	3/3	53
	Offspring	F	—	+	3/2	29
2	Offspring	F	—	+	3/2	24
	Offspring	F	—	+	3/3	22
	Offspring	F	—	+	3/3	37
	Offspring	F	—	+	3/2	32
	Offspring	F	—	+	3/2	39
	Offspring	M	—	+	3/3	33
	Offspring	F	—	—	3/3	37
	Nephew	M	—	+	4/3	26
	Nephew	M	—	—	3/3	23
	Niece	F	—	+	4/2	23
	Proband	M	+	+	3/3	40
	Sibling	F	+	+	3/3	42
	Sibling	M	+	+	3/3	44
	Sibling	F	—	—	4/3	39
	Offspring	F	—	—	3/3	33
	Proband	M	+	+	3/3	46
	Sibling	F	—	—	3/3	46
	Sibling	F	+	+	3/3	42
	Sibling	F	+	+	3/3	36
	Sibling	F	+	+	3/3	48
	Offspring	M	—	+	4/3	19
	Offspring	M	—	+	3/3	20
	Offspring	F	—	+	4/3	23
	Nephew	M	—	—	3/3	23
	Nephew	M	—	—	3/3	21
	Niece	F	—	—	3/3	22
	Niece	F	—	—	3/3	15

Table 2 (continued)

Family number	Subject	Sex	Alzheimer disease	Ala431Glu mutation	APOE genotype	Current age or age at onset ^a
3	Proband	F	+	+	3/3	34
	Sibling	F	+	+	3/3	43
	Sibling	F	+	+	4/2	38
	Sibling	F	—	—	4/2	45
	Sibling	M	—	—	3/3	54
	Sibling	F	—	—	4/3	49
	Sibling	F	—	+	3/3	33
	Sibling	F	+	+	3/3	37
	Nephew	M	—	—	4/3	24
	Nephew	M	—	+	4/3	25
	Niece	F	—	—	4/3	22
	Niece	F	—	—	4/3	26
8	Proband	F	+	+	4/3	40
	Sibling	F	+	+	4/3	48
	Offspring	M	—	—	4/3	32
1	Proband	M	+	+	3/2	39
	Sibling	F	+	+	4/3	40
2	Proband	F	+	+	3/3	42

F, Female, M, male

Age at onset if demented (years)

Because all nine probands bearing the Ala431Glu mutation came from the state of Jalisco located in Western Mexico, with a population of 6,322,000 habitants (Fig. 1) [15], we further investigated the possibility of a common ancestor causing a founder effect. We studied two highly polymorphic microsatellites (CA and GT markers) flanking the PSEN1 gene in the nine AD families with the Ala431Glu mutation and 100 control individuals (50 from Mexico City and 50 from Jalisco, Mexico). All 41 mutation bearers shared the same 4–5 haplotype (allele 4=273 bp for the CA marker, and allele 5=205 bp for the GT marker), which was in contrast absent from all 100

unrelated Mexican controls. Moreover, only four (8%) and 2 (4%) controls from Jalisco showed alleles 4 and 5, respectively, while these alleles were not found in any of the controls from Mexico City.

Discussion

We describe PSEN1 gene mutation (Ala431Glu) in 13 patients from nine apparently unrelated AD families from Mexico. These nine families were from Jalisco. All mutation carriers showed the same haplotype for two microsatellite markers in the PSEN1 locus. In addition, this haplotype was not found in 100 Mexican unrelated controls, including 50 individuals from Jalisco. This strongly suggests that all individuals carrying the Ala431Glu mutation had a common ancestor. The Ala431Glu PSEN1 mutation may have occurred by chance on an extremely rare haplotype or the mutated allele may have originated from an immigrated population not sharing this haplotype with the local population.

This mutation had been described in nine patients of undefined ethnic origin with clinical diagnosis of AD [16, 17]. It is important to point out that one of our nine families had participated in a previous study where the condition was linked to chromosome 14q24.3 [18] in whom the Ala431Glu mutation was subsequently identified (Schellenberg 1998, personal communication). The substituted alanine (Ala431) is highly conserved among different species and according to the PolyPhen program (<http://www.tux.embl-heidelberg.de/ramensky/index.shtml>), which predicts the functional consequence of amino acid substitutions, a glutamic acid residue at position 431 would

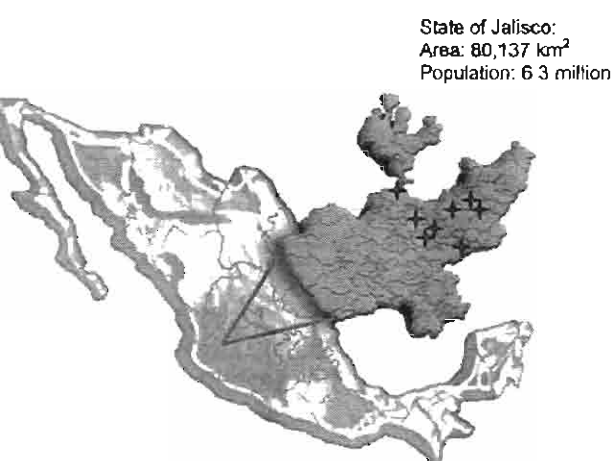


Fig. 1 Map of Mexico, with the State of Jalisco highlighted. The stars denote the location of the counties/cities from which eight of the Ala431Glu mutation families are from. The remainder family is from the State of Jalisco, however, the city of origin is unknown

be possibly damaging to the function of PSEN1. Neuropsychological studies have been recently described in AD Mexican families with this mutation [19].

To our knowledge, a founder mutation in Alzheimer's disease was suggested for the first time in 1988 in a group of American Alzheimer families who were descendants of the Volga Germans [20]. This was confirmed when a PSEN2 mutation was found in this group [4]. However, recurrent mutations in AD are not always the consequence of a founder effect, and may be due to mutational hotspots. Such is the case of APP mutations affecting codon 717 causing AD [21]. Nevertheless, the majority of recurrent mutations in the PSEN1 gene seem to be due to single founders. A founder effect for PSEN1 has been described for three other mutations located in exons 4 and 7, and intron 4 [10, 11, 22, 23]. One of these founder mutations (Gly206Ala in exon 7) causing early-onset Alzheimer's disease was identified in apparently unrelated Caribbean Hispanic families. However, the ethnic background of this Hispanic group is very different to that of our Mexican mestizo families. In terms of genetic composition, the Mexican mestizo population is the result of admixture with predominantly Spanish-European (50–60%) and Amerindian (37–49%) contributions, with a minor African (1–2%) contribution [24]. It is interesting to note that the Ala431Glu mutation has not been reported in patients from Spain, so it can be speculated that it may have originated in more recent generations of Mexican-Mestizos, or perhaps in earlier Amerindian groups. Further studies are necessary to verify this hypothesis.

The high prevalence of the Ala431Glu mutation in AD families from Jalisco has implications for the diagnostic approach. For all early-onset AD cases from this region, the initial molecular approach should be to directly screen for Ala431Glu, and PSEN1 and other early-onset AD genes should be sequenced only if the mutation is absent. Positive Ala431Glu identification would allow accurate genetic counseling and presymptomatic genetic testing for at risk individuals could be offered. For this purpose, a careful protocol for counseling and support must be developed, following the guidelines for genetic presymptomatic testing in Huntington's disease [25].

In conclusion, the Ala431Glu mutation is prevalent among families with early-onset familial Alzheimer's disease from Jalisco, Mexico, and is a founder mutation descending from a single common ancestor. This finding will allow a prompt diagnosis and genetic counseling of Mexican patients with familial AD from Jalisco.

Acknowledgements This study was partially supported by grant 8664M from CONACYT, Mexico. We thank the patients and family members for participating in the study and S. Ramirez-Jimenez for laboratory technical assistance.

References

1. Ray WJ, Ashall F, Goate AM (1998) Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 4:151–157
2. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704–706
3. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Fonan JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760
4. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977
5. Blacker D, Tanzi RE (1998) The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol* 55:294–296
6. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977–1981
7. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467–1472
8. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) 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* 34:939–944
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
10. Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Smeets S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, George-Hyslop PH, Hofman A, Van Broeckhoven (1998) Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 7:43–51
11. Athan ES, Williamson J, Ciappa A, Santana V, Romas SN, Lee JH, Rondon H, Lantigua RA, Medrano M, Torres M, Arawaka S, Rogaeva E, Song YQ, Sato C, Kawarai T, Fafel KC, Boss MA, Seltzer WK, Stern Y, St George-Hyslop P, Tycko B, Mayeux R (2001) A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA* 286:2257–2263
12. Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31:545–548
13. Gomez L, Alonso ME, Figueroa H, Escobar A (1986) Enfermedad de Alzheimer presentación de 7 casos en 3 familias. *Rev Invest Clin* 38:261–267

14. Alonso ME, Otero E, Martinez C (1992) Clinical and genetic aspects of a group of patients with Alzheimer disease. *J Trop Geogr Neurol* 2:27–31
15. Censo de Población y Vivienda INEGI. México. 2000
16. Rogaeva EA, Fafel KC, Song YQ, H, Medeiros Sato C, Liang Y, Richard E, Rogaev EI, Frommelt P, Sadovnick AD, Meschino W, Rockwood K, Boss MA, Mayeux R, St George-Hyslop P (2001) Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology* 57:621–625
17. Miravalle L, Murell JR, Takao M, Glazier B, Piccardo P, Vidal R, Ghetti B (2002) Genetic mutations associated with presenile dementia. *Neurobiol Aging* 23:S322
18. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston L, Martin GM (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258:668–671
19. Ringman JM, Diaz Olavarrieta C, Rodriguez Y, Chavez M, Paz F, Murrell J, Macias MA, Hill M, Kawas C (2004) Female preclinical presenilin-1 mutation carriers unaware of their genetic status have higher levels of depression than their non-mutation carrying kin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:500–502
20. Bird TD, Lampe TH, Nemens EJ, Miner GW, Sumi SM, Schellenberg GD (1988) Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: probable genetic founder effect. *Ann Neurol* 23:25–31
21. Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, Paisouris E, Pantos GV, Gatzonis S, Kapaki E, Davaki P, Lamszus K, Stavrou D, Gal A (2005) Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics* 6:85–89
22. De Jonghe C, Cruts M, Rogaeva EA, Tysoe C, Singleton A, Vanderstichele H, Meschino W, Dermaut B, Vanderhoeven I, Backhovens H, Vanmechelen E, Morris CM, Hardy J, Rubinsztein DC, St George-Hyslop PH, Van Broeckhoven C (1999) Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased Abeta42 secretion. *Hum Mol Genet* 8:1529–1540
23. Tysoe C, Whittaker J, Xuereb J, Cairns NJ, Cruts M, Van Broeckhoven C, Wilcock G, Rubinsztein DC (1998) A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 62:70–76
24. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortes-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Cariacedo A, Xhong Y, Barton SA, Chakraborty R (2002) Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on DIS80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Human Biol* 14:257–263
25. International Huntington Association and the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's chorea (1994) Guidelines for the molecular genetics predictive testing in Huntington's disease. *Neurology* 44:1533–1536



Grupo de Estudios
del Nacimiento A.C.

El Grupo de Estudios del Nacimiento

Otorga

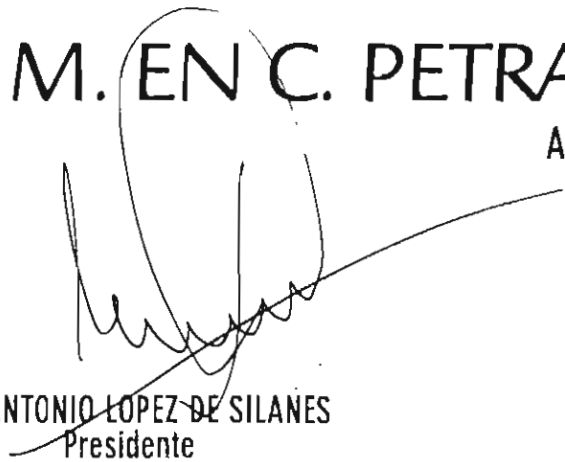
el Premio de Investigación sobre Defectos al Nacimiento
categoría de Investigación Clínica

por el trabajo titulado:

Founder Effect for the ala 431-GLU Mutation of the Presenilin 1 gene in
early - onset Alzheimer's disease in Mexican families

a: M. EN C. PETRA YESCAS GÓMEZ

AUTOR


LIC. ANTONIO LOPEZ DE SILANES
Presidente


DR. FABIAN
Coordinador

México, D.F., a 15