

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Identificación de mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* en
sujetos con diagnóstico presuntivo de *Enfermedad de Alzheimer
Familiar* y *determinación alélica de APOE* en población abierta.”**

T E S I S

Que presenta

ROSALÍA ALEJANDRINA SANTOS MANDUJANO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis:
Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

México, D.F.

AGOSTO, 2015.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 5 del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de la maestría, a través de la beca con número de registro 367880.

- A mi abuela, Alejandrina Corzo Mandujano, por creer en mi incondicionalmente y alentarme a alcanzar mis sueños. Te llevo siempre conmigo.
- A mis padres, Alejandrina Mandujano y Miguel Santos, por su gran apoyo, por amarme tanto y respetar mis decisiones.
- A Lilian, por todas las noches de desvelo compartidas, tu empatía y comprensión. Por estar comprometida con este reto desde el principio. Jamás lo olvidaré.
- A mi hermano Alejandro y mis sobrinos Fer y Alex, por su admiración, respeto y amor.
- Al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por aceptarme en su grupo de trabajo, sus consejos de vida, su tiempo y su amistad.
- A la Dra. María del Rocío Gómez, por permitirme trabajar en su laboratorio, su asesoría científica e invaluable consejos.
- Al Dr. Michael Schnoor y al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por su asesoría en la realización de esta tesis.
- A mis compañeros de maestría, Luz, Sandra, Omar, Alfredo, Marcos, Carolina, Eduardo y Samuel, por todos los buenos momentos compartidos, su apoyo durante mi enfermedad y su amistad.
- A mis compañeros de laboratorio Bere, Lau, Carmen, Gus, Maricarmen y en especial a Moni por brindarme sus conocimientos. Gracias Koko y Perla, por su amistad sincera.

- A la M.en C. Pilar Figueroa Rangel por su ayuda técnica y teórica. Gracias también por tus valiosos consejos.

- A Julio César Ramírez Gómez, por su trato amistoso, su apoyo técnico y los momentos amenos.

ÍNDICE

1. Resumen	I
2. Abstract	II
3. Introducción	1
4. Antecedentes	12
5. Justificación	15
6. Hipótesis	16
7. Objetivo general	17
8. Objetivos particulares	17
9. Estrategia experimental	18
10. Materiales y métodos	20
11. Resultados	27
12. Discusión	34
13. Conclusiones	38
14. Perspectivas	39
15. Apéndices	40
16. Bibliografía	52

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Vía amiloidogénica y no amiloidogénica del procesamiento de APP.	3
2. Complejo γ -secretasa y sitios de corte en APP.	4
3. Distribución de mutaciones en PS1.	6
4. Distribución de mutaciones en APP.	7
5. Distribución de mutaciones en PS2.	8
6. Conformación espacial de ApoE según el alelo expresado.	10
7. Árboles genealógicos de familias participantes.	23
8. Integridad del ADN extraído de controles y del sujeto en estudio F1-3.1.	29
9. Integridad del ADN extraído del sujeto en estudio F2-4.3.	29
10. Exones amplificados a partir de ADN de sujeto F1-3.1.	31
11. Supuesta delección encontrada en exón 9 de <i>PSEN1</i> del sujeto F1-3.1.	32
12. Doble inmunofluorescencia de Tau en hipocampo de sujeto F1-2.3.	45
13. Lesión en flama en hipocampo de sujeto F1-2.3.	45

ÍNDICE DE TABLAS

1. Características de las familias participantes en el protocolo de estudio de Enfermedad de Alzheimer Familiar.	22
2. Cebadores para la amplificación de <i>PSEN1</i> .	27
3. Cebadores para la amplificación de <i>PSEN2</i> y <i>APP</i> .	28
4. Análisis por espectrofotometría de ADN extraído.	30
5. Condiciones de amplificación específica para <i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> y <i>APP</i> .	30
6. Distribución genotípica de <i>APOE</i> en población mestiza mexicana.	33
7. Mutaciones reportadas para <i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> y <i>APP</i> .	40

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más prevalente de demencia en el mundo. La mayoría de los casos (95%) corresponden a la Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE) la cual, se cree, es causada por la combinación de factores ambientales y genéticos, como el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, implicado en aproximadamente 40% de los casos. La Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), es la forma autosómica dominante de este padecimiento y afecta por lo menos al 5% de los enfermos con EA, sin embargo, su presentación clínica y los cambios neuropatológicos que la sustentan son equivalentes a los observados en EAE, y representa el modelo humano más importante para el estudio de esta enfermedad. En general, se ha demostrado que los factores genéticos implicados en ambos tipos de EA son elementos esenciales para entender la etiología de la demencia en este padecimiento y, por lo tanto, deben determinarse en todos los casos de EA diagnosticados. En el presente trabajo se buscó identificar la presencia de los principales factores genéticos involucrados en ambos tipos de Enfermedad de Alzheimer. Para este propósito, se analizaron dos familias con diagnóstico presuntivo de EAF mediante la amplificación y secuenciación de 16 exones de *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*. También se analizaron 300 muestras de RNA de 150 mujeres y 150 hombres de origen mexicano mestizo para determinar la expresión alélica de *APOE*. En una de las familias se encontró laa deleción de una adenina en el exón 9 de *PSEN1* a partir de dos análisis separados de secuenciación, aunque aún no se logró estandarizar las condiciones para secuenciar al exón completo y al resto de los exones de los demás genes, por lo que no se puede descartar la presencia de más mutaciones. Por último, se logró determinar que la distribución alélica de *APOE* es similar a lo ya reportado en la literatura para población de origen hispano latinoamericano, siendo el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ el más abundante con 79% y con una frecuencia alélica de $\epsilon 4$ de 15.7%.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the most prevalent cause of dementia worldwide. Nearly all of the cases (95-99%) correspond to Sporadic Alzheimer's Disease (SAD) which is most likely caused by the combination of environmental and genetic factors, such as *APOE* $\epsilon 4$ allele, implicated in approximately 40% of SAD cases. Familial Alzheimer's Disease (FAD), the autosomal dominant form of the disease, accounts for at least 1% of those affected by AD, however, its clinical presentation and underlying neuropathological changes are equivalent to those seen in SAD, and represent the most important human model for the study of this condition. Overall, genetic factors in both forms have been shown to be essential to understand the etiology of dementia and therefore, they must be determined in every diagnosed AD case. This study aimed to identify the presence of the major genetic factors implicated in SAD and FAD respectively in mexican population. For this purpose, two mexican families with allegedly FAD were analyzed by PCR amplification and sequencing of 16 *PSEN1*, *PSEN2* and *APP* exons. Also, 300 RNA samples obtained from 150 women and 150 men of mexican mestizo origin were analyzed in order to define their *APOE* allelic expression. The results showed in one of the families the deletion of an adenine within exon 9 of *PSEN1* gene. This was evidenced by two different sequencing reactions, although the conditions for optimal sequencing of the complete exon and the rest from the three genes was not achieved. Finally, the allelic distribution of *APOE* could be determined and it showed similar results as previously reported for latin american hispanic population, being $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype the most prevalent with 79%. The $\epsilon 4$ allele frequency was 15.7%

INTRODUCCIÓN

La demencia es un síndrome de naturaleza progresiva y crónica causada por una variedad de enfermedades cerebrales que afectan la memoria, el pensamiento, el comportamiento y la habilidad para llevar a cabo actividades de la vida diaria.¹ La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia a nivel mundial, siendo responsable del 60% al 80% de los casos. En el año 2013, la Asociación Internacional de Alzheimer (Alzheimer's Disease International) publicó en su reporte anual una estimación de la prevalencia de demencia en el mundo de 44 millones de personas (0.6% de la población mundial). De los casos estimados, se calcula que 62% se encuentran en países de nivel de desarrollo económico medio a bajo, en los cuales, además, la tasa de incidencia anual es mayor.²

La EA se clasifica en dos grupos según su etiología:³

1. Enfermedad de Alzheimer Familiar: Constituye del 1% al 5% de los casos totales de EA. Es causada por la presencia de mutaciones en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*.
2. Enfermedad de Alzheimer Esporádica: Abarca del 95 al 99% de los casos totales de EA. A pesar de desconocerse los mecanismos etiopatogénicos exactos, se dice que es de origen multifactorial.

Aunque los eventos que conllevan a la demencia por EA son distintos en ambos grupos, el cuadro clínico y la patología cerebral son paralelos y casi indistinguibles. Dado esto, el diagnóstico definitivo de EA, cual fuere su origen, es definido por el hallazgo histopatológico de placas amiloides, marañas neurofibrilares (MNF) y muerte neuronal en el hipocampo y neocórtex, áreas cerebrales encargadas de la memoria y otras funciones cognitivas.^{4,5}

1.1 Placas amiloides en la fisiopatogenia de la EA.

Las placas amiloides son acúmulos de fibrillas altamente insolubles conformadas por oligómeros de β A. La proteína beta amiloide (β A) es un péptido de 38 a 42 aminoácidos generado a partir de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante la acción coordinada y subsecuente de las enzimas beta y gamma secretasa (BACE y γ -secretasa) en un proceso denominado vía amiloidogénica.^{6,7} Aunque la formación de placas amiloides extracelulares es un evento central en la patología cerebral de EA y en cortes histológicos es posible observar dendritas distróficas, microglía activada y astrocitos reactivos en sus alrededores, numerosos estudios histopatológicos post-mórtem han reportado la presencia de placas amiloides en sujetos clínicamente sanos hasta su muerte.⁸⁻¹¹ Además, las inmunoterapias dirigidas a la disminución de la formación de placas amiloides, a pesar de lograr su objetivo en modelos animales, no son capaces de revertir el déficit cognitivo en humanos.^{12,13}

El β A desempeña un rol fisiológico en el cerebro, sin embargo, se le conoce más por su amplia contribución a la fisiopatogenia de la EA.¹⁴⁻¹⁶

1.1.1 Vía amiloidogénica y el complejo gamma secretasa.

Durante el procesamiento de APP por medio de la vía amiloidogénica, la primera enzima en cortar al péptido es BACE, con lo cual se libera un fragmento conocido como APPs β . El fragmento que queda anclado a la membrana es un péptido de 99 aminoácidos denominado C99, el cual es escindido por γ -secretasa, generando un fragmento AICD que se traslada al núcleo y al péptido β A. Este procesamiento se lleva a cabo de manera normal en varios compartimentos subcelulares y compite con su contraparte,

la vía no amiloidogénica, la cual genera un producto final conocido como p3, no patológico.¹⁷

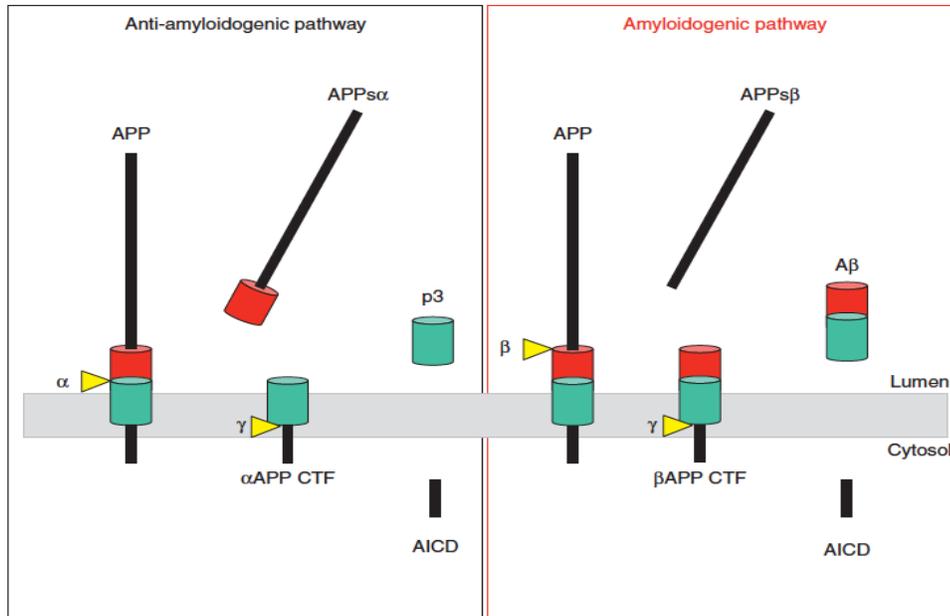


Figura 1. Vía no amiloidogénica y amiloidogénica del procesamiento de APP.

La enzima γ -secretasa es una aspartil proteasa transmembranal que tiene como sustrato no sólo a APP, sino a varias proteínas como Notch, N-cadherina y Erb-B4. Está conformada por cuatro unidades protéicas:^{18,19}

- Anterior pharynx defective-1 (Aph-1): Promueve el ensamblaje y tránsito de la enzima, además de su estabilización.
- Nicastrina (Nct): Asiste con la selección del sustrato.
- Presenilin enhancer-2 (Pen-2): Desencadena la endoproteólisis de PS1.
- Presenilina 1 (PS1): Es la unidad catalítica de la enzima. Posee nueve dominios transmembranales los cuales interaccionan en un extremo con Pen-2 y por el otro con Nct. Para activarse, primero se somete a una auto-endoproteólisis, con lo cual forma un heterodímero N-terminal (NTF) y otro C-terminal (CTF). Lo anterior permite que se forme un canal dentro de la membrana plasmática, separando a los dominios 6 y

7 que contienen los residuos de aspartato necesarios para la catálisis del sustrato.

Dependiendo del sitio de corte en C99, será el tamaño del βA producido. Las especies más abundantes de este péptido son las de 40 y 42 aminoácidos (βA -40 y βA -42), en una proporción de 10 a 1.⁶ De éstas, βA -42 es la más amiloidogénica al contener residuos hidrofóbicos externos en su forma monomérica, haciéndola más propensa a organizarse en conjuntos de 3 a 50 monómeros que son altamente neurotóxicos. Estos efectos citotóxicos son producidos por una variedad de mecanismos que comprenden la generación de estrés oxidativo, la disrupción de la membrana celular por canales iónicos, inflamación y apoptosis, entre otras.^{20,21}

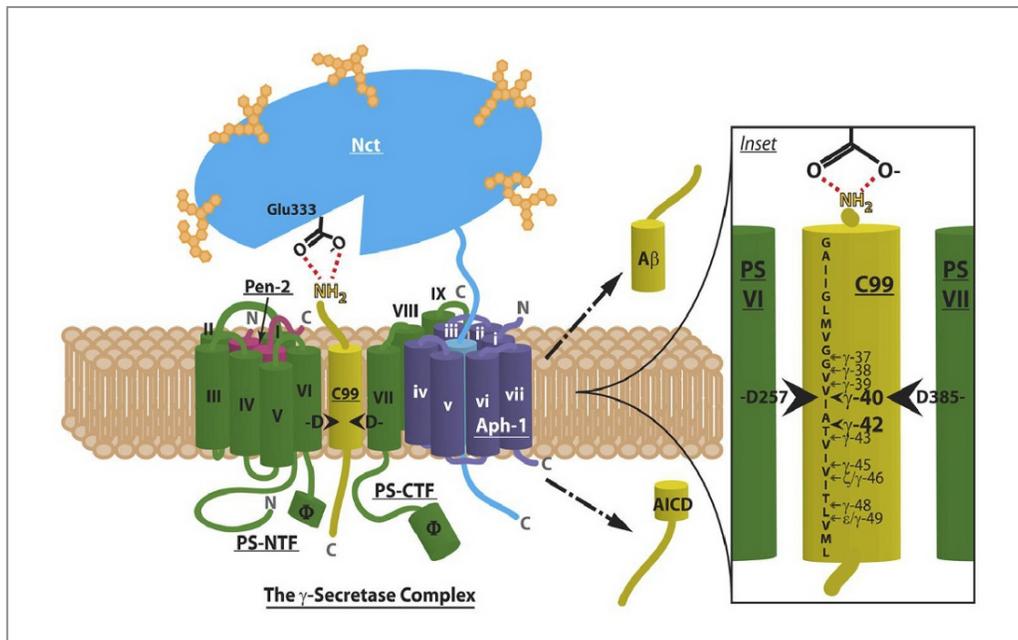


Figura 2. Complejo γ -secretasa y sitios de corte en C99 para la generación de βA .

En la EA, una proporción significativa de pacientes presenta un índice βA -42/ βA -40 aumentado, aunque actualmente se desconoce si esto se deba a la alteración directa de la función de γ -secretasa, como se cree que sucede en pacientes portadores de mutaciones en *PSEN1* o *PSEN2*, o por un efecto

secundario al aumentar la actividad de BACE, por la disminución en la degradación de β A-42 u otro mecanismo aún no descrito.²²

1.2 Genética de la Enfermedad de Alzheimer.

1.2.1 Enfermedad de Alzheimer Familiar.

Este tipo de EA es una forma Autosómica Dominante, con penetrancia completa.^{3,23} A la fecha se han descrito 231 mutaciones causantes de EA (Apéndice 1), de las cuales el 80% se encuentran repartidas en los exones 4 a 12 del gen *PSEN1*, el 14% en los exones 16 y 17 del gen *APP* y el 6% en los exones 4 a 7 y 12 del gen *PSEN2*.²⁴ La EAF también es conocida como Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano (Early Onset Alzheimer's Disease) debido a que la edad de inicio de la enfermedad sintomática es típicamente antes de los 65 años. La progresión del cuadro clínico es rápida, con una expectativa de vida promedio de 5 años a partir del diagnóstico.^{23,25}

PSEN1

Este gen da origen a la proteína PS1, subunidad de la enzima γ -secretasa. Está codificado en el cromosoma 14q24.3, posee doce exones y se conocen siete isoformas, siendo canónica la de 467 aminoácidos. Actualmente se han descrito 185 mutaciones repartidas a lo largo de los exones 4 a 12.²⁶ La mayoría corresponden a mutaciones puntuales, aunque también se han reportado deleciones e inserciones de distintas longitudes que pueden o no resultar en splicing alternativo. Algunas de estas mutaciones han sido estudiadas en modelos transgénicos de ratón en donde se demostró que inducen una pérdida de función de PS1 que produce daño neuronal y una consecuente alteración de la memoria.^{27,28} En cuanto al fenotipo, las personas que portan mutaciones en *PSEN1* suelen tener un inicio sintomático más

temprano, sintomatología más grave y una expectativa de vida más corta. Así mismo, la edad de presentación clínica en todos los miembros de una familia afectada es similar y puede manifestarse acompañada de síntomas motores e incluso mioclonías, aunque no de forma generalizada.²⁹ También se han reportado casos de pacientes portadores que presentan sintomatología conductual atípica, como agresividad, o inclusive con alteraciones psiquiátricas graves como depresión crónica o esquizofrenia.³⁰ Fuera del contexto de EAF, se han descrito polimorfismos que aumentan el riesgo de padecer EAE y otros que parecen tener un efecto protector para el EA.³¹⁻³³

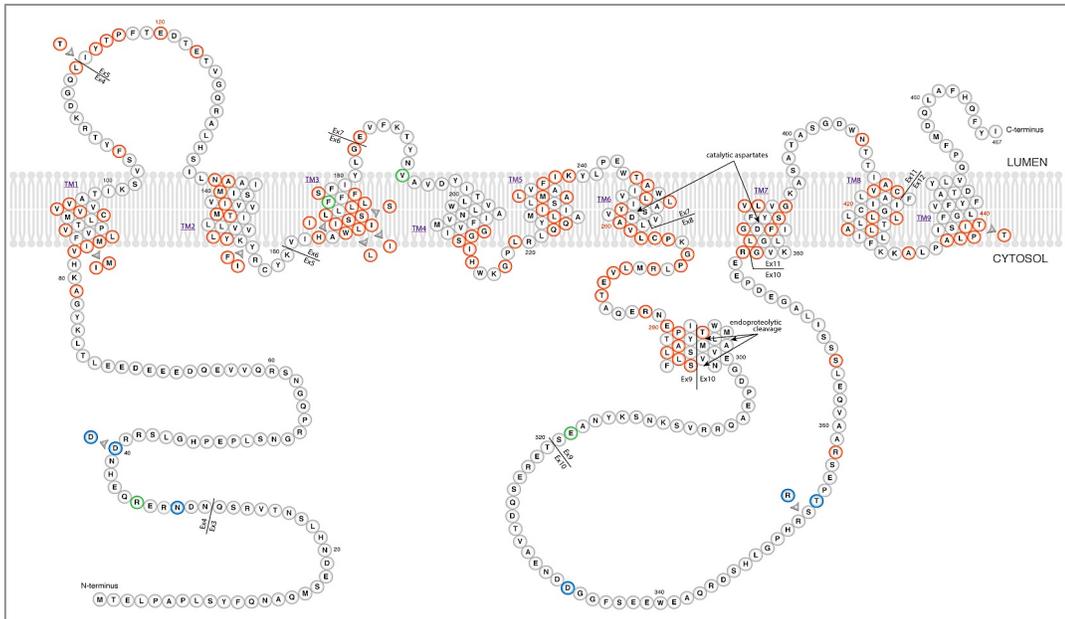


Figura 3. Distribución de mutaciones en PS1.

APP

Codificado en el cromosoma 21q21.3, este gen origina a la proteína APP. Está conformado por dieciocho exones que por splicing alternativo dan origen a once transcritos denominados con base en el número de aminoácidos en los que se traducen: APP770, APP746, APP639, APP714, APP305, APP752, APP733, APP677, APP751, APP695 y APP696. De estas isoformas, las tres más importantes en la patología de la EA son APP695 (forma predominante en neuronas), APP770 y

APP751 (expresadas en sistema nervioso central y periférico). La región génica que contiene los sitios de corte de BACE y γ -secretasa está comprendida entre los exones 16 y 17 de estas variantes.³⁴ Se han identificado hasta el momento 33 mutaciones y, al igual que en PSEN1, la mayoría son mutaciones puntuales. También se han descrito duplicaciones de longitudes variables que pueden involucrar solamente

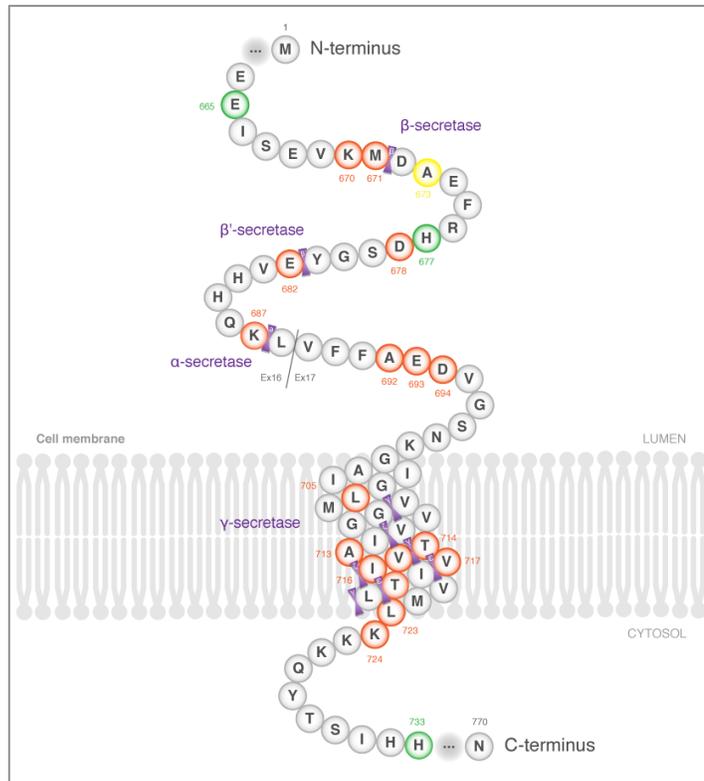


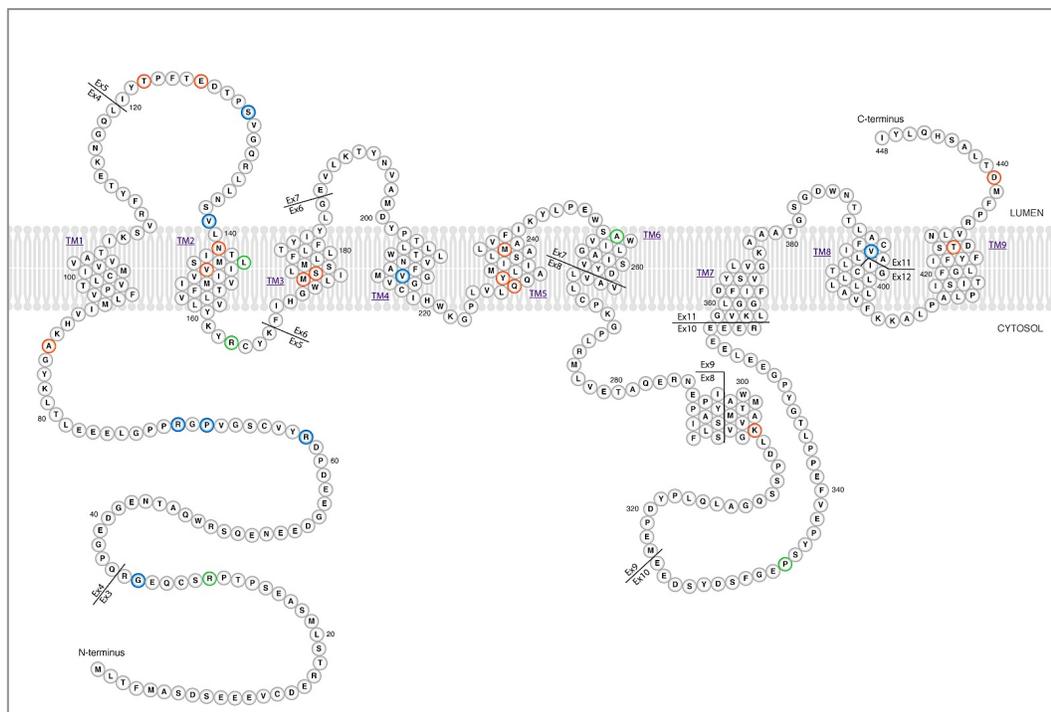
Figura 4: Distribución de mutaciones en APP.

al gen APP o a genes contiguos a éste (p.ej. dupAPP[F229] que incluye a los genes *NCAM2*, *MRPL39*, *JAM2*, *ATP5J*, *GABPA*, *CYYR1*, *ADAMTS1* y *ADAMTS5*).²⁶ Un gran modelo de estudio para la demencia tipo EAF por duplicaciones en el gen de APP han sido los cultivos celulares derivados de células progenitoras neuronales de pacientes con Síndrome de Down. Estas células producen una mayor cantidad de β A-40 y β A-42, presentan un índice β A-42/ β A-40 aumentado y una mayor fosforilación de la proteína Tau, similar a lo que sucede *in vivo*.³⁵ Los pacientes portadores de mutaciones o duplicaciones en el gen

APP, suelen padecer angiopatía cerebral amiloide (ACA), la cual causa microhemorragias asintomáticas resultado de los depósitos de amiloide en arterias y arteriolas cerebrales. La ACA es frecuentemente un hallazgo clínico evidenciado en estudios de imagen.²⁵

PSEN2

Este gen parálogo de PSEN1 se localiza en el cromosoma 1q42.13 y está conformado por doce exones. La proteína en la que se traduce, Presenilina 2 (PS2), se ha encontrado como parte del complejo γ -secretasa sustituyendo a PS1, sin embargo, su expresión es relativamente baja en el cerebro excepto en el cuerpo caloso.^{18,36,37} Debido a lo anterior, las mutaciones causantes de EAF en este gen



P Figura 5: Distribución de mutaciones en PS2.

r esentan penetrancia incompleta. Se han descrito 13 mutaciones puntuales, todas en familias de origen europeo. La edad de presentación clínica es variable entre miembros de una misma familia afectada y se han reportado casos donde el inicio de los síntomas es

después de los 65 años, por lo que es posible confundirla con una demencia tipo EAE.^{38,39}

1.2.2 Enfermedad de Alzheimer Esporádica.

La heterogeneidad de los factores implicados en la génesis de EAE es clara, sin embargo, existe evidencia derivada principalmente de estudios en gemelos homocigotos que sugiere una heredabilidad de hasta el 79%. En estudios de asociación del genoma completo o GWAS (Genome-Wide Association Studies) se han encontrado múltiples loci cuya influencia genética sobre este padecimiento es variable, empero, ninguno de estos genes ha demostrado aumentar el riesgo de padecer EAE como *APOE ε4*.^{40,41}

APOE

Es un gen localizado en el cromosoma 19q13.32 conformado por cuatro exones y que posee tres alelos distintos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) como resultado de dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), rs429358 y rs7412, que originan un cambio de aminoácidos en las posiciones 112 y 158 del péptido (C130R o R176C) respectivamente.³⁶ A nivel mundial el alelo más frecuente es $\epsilon 3$, con una prevalencia del 50 al 70% en presentación bialélica ($\epsilon 3/\epsilon 3$) y hasta el 80% en forma monoalélica ($\epsilon 3/x$). El alelo $\epsilon 4$ se encuentra en 10 al 15% de la población general y su incidencia es mayor en afro-americanos (18%), seguida en segundo lugar por caucásicos (14%).^{41,42} La proteína a la que da origen es la Apolipoproteína E (ApoE), componente principal de los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), cuya función es el transporte de lípidos, principalmente triglicéridos y colesterol, a través de la sangre y la linfa hacia varios tejidos.

En el cerebro, ApoE es expresada por astrocitos, oligodendrocitos,

microglía activada, células endodiales y neuronas.³⁶ Ahí se encarga de unir lípidos circulantes o derivados de neuronas apoptóticas y redistribuirlos a células que los requieran para proliferar, reparar membranas o mielinizar nuevos axones. Lo anterior, a través de endocitosis mediada por la unión a su receptor.

En la EAE, se ha encontrado que hasta el 40% de los enfermos expresan ApoE4. La expresión de esta proteína suscita la formación de un enlace iónico entre un residuo de Arginina en la posición 61 y un residuo de Glutamato en el lugar 255 de ApoE, haciéndola más afín a la unión de VLDL, contrario a Apo E2 y E3, que se unen con mayor afinidad a lipoproteínas de alta densidad (HDL).⁴¹ Experimentos *in vitro* han demostrado que ApoE4 posee una baja eficiencia en promover el eflujo de colesterol en comparación con las otras dos isoformas. Dicha

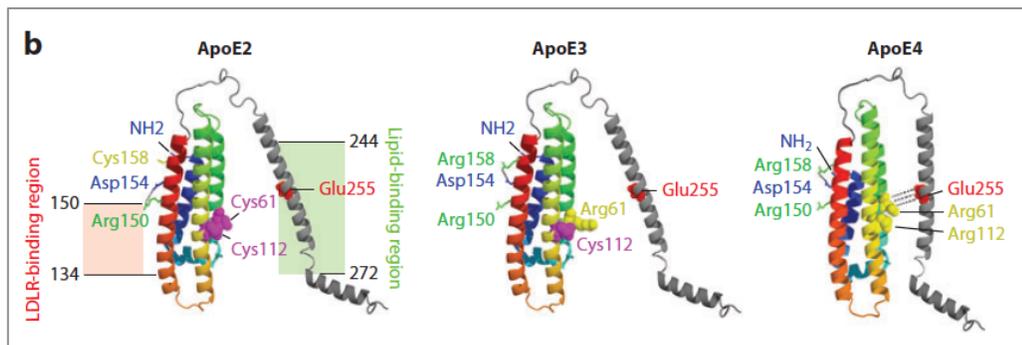


Figura 6: Conformación espacial de ApoE para cada alelo.

evidencia podría explicar el por qué los individuos portadores de este alelo tienen niveles séricos de colesterol total y LDL más altos.⁴³ Su relación con la fisiopatología de EAE no se conoce por completo, pero hay evidencia de que interactúa directamente con β A y disminuye su tasa de aclaramiento propicia su acumulación por la vía del Cobre y Zinc. También, por mecanismos independientes al β A, inhibe la regeneración neuronal y altera la función de interneuronas GABAérgicas en asociación con Tau.⁴⁴⁻⁴⁷

Las personas portadoras del alelo $\epsilon 4$ en forma monoalélica ($\epsilon 4/ \epsilon X$) poseen hasta tres veces más riesgo de padecer EAS que los no portadores y cuando portan ambos alelos ($\epsilon 4/ \epsilon 4$) el riesgo es de hasta doce veces mayor.^{48,49} Las personas con EA y ApoE4 muestran un inicio sintomatológico a edades más tempranas y una progresión más rápida de la demencia comparadas con enfermos no portadores. Así mismo, en la EAF, ApoE4 se asocia a un peor pronóstico y disminuye el tiempo de sobrevida del paciente.^{40,50}

ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de la EAF, diversos grupos de estudio han dedicado esfuerzos para la identificación de nuevas mutaciones en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* mediante el uso de técnicas de secuenciación.⁵¹ Europa es el continente con más mutaciones de EAF identificadas, abarcando aproximadamente el 85% de los casos. Países como España, Alemania, Italia, Grecia y Polonia han reportado al menos una mutación en cada uno de los tres genes involucrados.²⁶ En América, Estados Unidos es el país que más recursos destina para la investigación de EA y dada su alta proporción de inmigrantes, se han podido identificar mutaciones en personas de origen latinoamericano que residen en tal país. Tal es el caso de ocho familias aparentemente no relacionadas que provenían de Puerto Rico y República Dominicana, en donde se pudo aislar una mutación en el exón 7 de *PSEN1* (Gly206Ala).⁵² Así mismo, se pudo determinar que estas familias comparten un ancestro común al poseer un mismo haplotipo en una secuencia polimórfica cercana a *PSEN1*. Tal mutación se buscó intencionadamente en 151 pacientes con demencia del Centro de Enfermedad de Alzheimer de la Universidad de Pennsylvania, encontrándose en 19 sujetos no emparentados. De éstos, uno tenía un diagnóstico clínico de probable Demencia Frontotemporal y otro de Demencia Vasculare, mientras que el resto cumplió con los criterios clínicos para EA, recalcando la falta de especificidad de las pruebas clínicas para el diagnóstico de esta enfermedad en pacientes con sintomatología atípica.³⁰

Dado que la población actual de México es producto de un gran mestizaje y que nuestra ancestría paterna europea, definida por la presencia de los haplogrupos R1b1, R, R1a, I y E1b1b1 del cromosoma Y en población mestiza mexicana, es del 64%, la probabilidad de que haya familias portadoras de EAF sin identificarse aún es muy alta.⁵³ En nuestro país solamente se ha descrito una mutación causante de EAF en veinticuatro familias originarias de ocho diferentes poblaciones en el estado de

Jalisco.^{54,55} Esta mutación se localiza en el exón 12 de *PSEN1* y corresponde a una sustitución Ala431Glu reportada con anterioridad en diez familias de Europa y América del Norte. Mediante el análisis de dos microsatélites altamente polimórficos que flanquean al gen *PSEN1* se determinó que estas familias comparten el mismo haplotipo, por lo que se concluyó que la mutación se originó de un ancestro común causante de un efecto fundador. El mecanismo patogénico producido por esta mutación en *PSEN1* no ha sido comprobado con ningún método experimental, pero se ha observado que segrega con la enfermedad y tiene una aparente penetrancia del 100%. No se ha reportado la presencia de esta mutación en individuos sanos.²⁶

APOE es objeto de estudio de varios grupos de investigación no sólo por los efectos de $\epsilon 4$ en la EA, sino también por otros polimorfismos que han comprobado tener influencia sobre otros padecimientos como el síndrome metabólico, cardiopatía isquémica, litiasis vesicular y otras enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson. Actualmente, gracias a reportes generados en diversos países, se conoce que el alelo $\epsilon 4$ se encuentra presente en 60% de los casos de EA en población caucásica y hasta en 20% de la población general.

En México se han realizado pocos estudios estadísticos que determinen la frecuencia alélica de este gen en la población mexicana en el contexto de Enfermedad de Alzheimer. Un estudio realizado en población hispano-mexicana residente de California en Estados Unidos reportó una frecuencia alélica de $\epsilon 4$ de 21.4% en pacientes con diagnóstico clínico de EA, siendo menor a la frecuencia encontrada para personas de origen caucásico-americano (42.9%).⁴² Otro estudio de cohorte realizado en México evaluó la frecuencia de los alelos $\epsilon 4$ y $\epsilon 3$ en 49 personas con diagnóstico presuntivo de EAE y 141 controles sanos de origen mexicano mestizo. Contrario a lo que se ha reportado en otras investigaciones, no se encontró una asociación entre el genotipo *APOE* $\epsilon 4$ y la presencia de EAE.⁵⁶ Una posible explicación

es que en este estudio el diagnóstico presuntivo de EA se realizó mediante la aplicación de cuestionarios como el Mini Mental Test, que a pesar de tener una alta sensibilidad, su especificidad es insuficiente para definir la causa de demencia, sobretodo si se utiliza de forma aislada sin complementarse con estudios de imagen y/o de análisis de líquido cefalorraquídeo. Ya que el test puede generar falsos positivos, el estudio pudo haber incluido personas con demencia de otro origen y no en todas se ha encontrado relación con *APOE*.

Existe otro estudio realizado en México para evaluar el desempeño cognitivo en función de memoria a corto plazo, índice de coeficiente intelectual (IQ) y metabolismo cerebral, en niños portadores del alelo $\epsilon 4$ en relación con la contaminación del aire de la Ciudad de México y área metropolitana.⁵⁷ Los resultados demostraron una clara disminución de la capacidad intelectual (>10 puntos de diferencia en IQ) entre los niños del grupo $\epsilon 4$ versus los del grupo $\epsilon 3$. Así mismo, los niños expuestos a un ambiente más contaminado demostraron los niveles más bajos de desempeño cognitivo entre portadores de $\epsilon 4$. El grupo concluyó que estos niños podrían tener un mayor riesgo de padecer EAE en edades adultas, con lo que constituye un grupo de riesgo que podría evaluarse en estudios prospectivos a largo plazo.

JUSTIFICACIÓN

La influencia genética es un factor preponderante para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer ampliamente demostrado en estudios experimentales. La búsqueda de mutaciones en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* en pacientes con antecedentes familiares de demencia con un patrón de herencia autosómico dominante permitirá identificar a familias con EAF que actualmente no son reconocidas en México. Estos sujetos representan posibles candidatos para estudios experimentales centrados en la fisiopatogenia de la EA. Así mismo, la determinación del genotipo de *APOE* en población abierta mexicana permitirá identificar a aquellos sujetos con mayor riesgo de padecer EAE en su vejez. Estos individuos podrán participar en protocolos de investigación enfocados en dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la etiopatogenia de la EA bajo la influencia de *APOE ε4*.

HIPÓTESIS

La identificación de mutaciones en *PSEN1*, *PSEN2* o *APP* en sujetos con probable EA autosómico dominante permite otorgar un diagnóstico definitivo de Enfermedad de Alzheimer Familiar.

La genotipificación de APOE en sujetos de origen mestizo mexicano permite la identificación de sujetos en riesgo de padecer Enfermedad de Alzheimer Esporádica en México.

OBJETIVO GENERAL

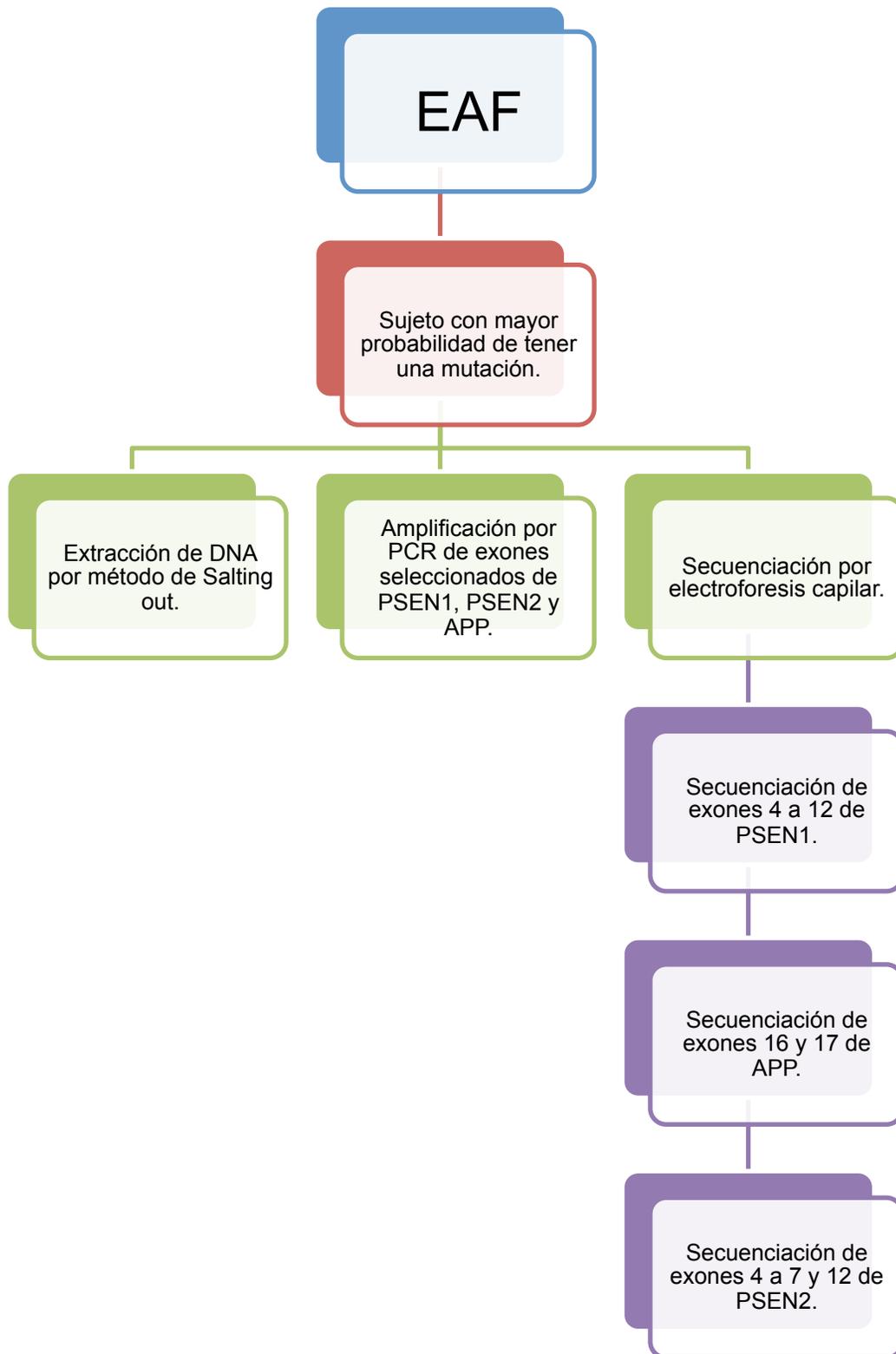
Identificar mutaciones en *PSEN1*, *PSEN2* o *APP* en sujetos con diagnóstico presuntivo de EAF y determinar los alelos de *APOE* presentes en población abierta de origen mestizo mexicano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia de mutaciones en *PSEN1*, *PSEN2* o *APP* en sujetos con diagnóstico presuntivo de EAF.
 - 1.1 Diseñar cebadores específicos para la amplificación por PCR de los exones 4 a 12 de *PSEN1*, 4 a 7 y 12 de *PSEN2* y 16 y 17 de *APP*.
 - 1.2 Amplificar por PCR los 16 exones de *PSEN1*, *PSEN2* o *APP* a partir de ADN genómico.
 - 1.3 Secuenciar por electroforesis capilar los exones previamente amplificados.

2. Determinar el genotipo de *APOE* mediante PCR tiempo real a partir de 300 muestras de ADN de población abierta.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de la muestra.

Para identificar a familias con diagnóstico probable de EAF, se hizo una invitación abierta a participar en el protocolo a través de la Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares A.C. (AMAES), el departamento de Neurología del Hospital Central Militar, la sociedad de neurología del Hospital ABC Santa Fe y el departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los criterios de inclusión para participar en el estudio fueron los siguientes: A) Tener historia familiar de dos o más parientes consanguíneos con diagnóstico de EA o demencia. B) El inicio de los síntomas debió presentarse antes o hasta los 65 años de edad. C) Tener por lo menos un caso de demencia o EA en dos generaciones consecuentes. D) El tiempo entre el inicio de los síntomas a la muerte del familiar debió ser menor a 10 años. Dos familias, que en adelante se denominaran F1 y F2 respectivamente, cumplieron con los requisitos previamente indicados por lo que una vez firmado el consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de Salud en Seres Humanos (COBISH) del CINVESTAV, se les incluyó en el estudio. A continuación las características clínicas y árbol genealógico de cada una:

F1:

Familia originaria del estado de Jalisco. Actualmente residentes del Distrito Federal.

1.1: Mujer. Inicia padecimiento a los 45 años de edad, aproximadamente, con paresia de miembros pélvicos, disartria progresiva, anomia y alteraciones de la memoria. La paresia evoluciona en el transcurso de tres años a parálisis flácida. A los 49 años ya no reconoce a sus familiares cercanos y es incapaz de realizar sus actividades de la vida diaria. Finada a los 50 años de edad.

2.1: Mujer. Inicia padecimiento a los 48 años de edad, aproximadamente, con las misma sintomatología que el sujeto 1.1. A los 51 años se le diagnostica Esclerosis Amiotrófica Lateral. Finada a los 54 años de edad.

2.2: Mujer. Inicia padecimiento a los 40 años de edad, aproximadamente. Misma sintomatología que sujeto 1.1. Finada a los 55 años de edad.

2.3: Hombre. Inicia padecimiento a los 40 años de edad con alteraciones de la memoria a corto plazo y desorientación espacial. Un año después comienza con paresia de miembros pélvicos y disartria. A los 45 años se le realiza estudio histopatológico a través de biopsia cerebral (temporal) y recibe el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer. Por antecedentes familiares, se le diagnostica posteriormente con EAF (no se realiza estudio genético familiar). Recibe tratamiento farmacológico sintomático para EA desde los 46 años de edad con los cuales mejora su sintomatología. Finado a los 55 años de edad. Su cerebro es donado al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), y un fragmento se conserva en el Banco Nacional de Cerebros del CINVESTAV bajo el número de registro A0829. Ahí mismo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia mediante los cuales se confirma el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer.

2.4: Mujer. Inicia padecimiento a los 40 años de edad. La familia desconoce evolución clínica, pero refieren que fallece a los 55 años de edad con un síndrome demencial franco.

3.1: Hombre de 52 años de edad. **Sujeto en estudio.** Inicia padecimiento a los 46 años de edad con alteraciones en la marcha, paresia de miembros pélvicos y disartria progresivas. Actualmente sin aparentes datos de demencia, aunque no se ha realizado pruebas diagnósticas que lo sustenten. A los 51 años recibe el diagnóstico de Esclerosis Amiotrófica Lateral.

F2:

Familia originaria y residente del Distrito Federal (Xochimilco).

2.1: Mujer. Inicia padecimiento a los 63 años con depresión, alteraciones de la conducta (p. ej. agresividad) y pérdida de memoria reciente progresiva. A

los 64 años es incapaz de realizar actividades de la vida diaria sin asistencia y ya no reconoce a sus familiares. Fallece a los 65 años de edad.

3.1: Hombre. Inicia padecimiento a los 59 años de edad con depresión, ansiedad y crisis convulsivas. Se le diagnosticó un supuesto tumor cerebral benigno, pero en el transoperatorio no se reportaron hallazgos. Posterior a la cirugía, presenta síndrome demencial, agresividad y alucinaciones visuales y auditivas. La progresión de los síntomas es similar a la del sujeto 2.1. Fallece a los 66 años de edad.

3.2: Hombre. Inicia padecimiento a los 65 años de edad con ansiedad, agresividad y alteraciones de la memoria. A los 67 años ya no reconoce a familiares y comienza a presentar alucinaciones visuales y auditivas. También se agrega un trastorno del movimiento tipo Parkinson, pero no se diagnostica. Recibe diagnóstico de depresión crónica a descartar demencia por Enfermedad de Alzheimer en el INNN y es tratado con ansiolíticos y antidepresivos desde los 67 años hasta su muerte a los 68 años de edad.

	Generaciones afectadas	Miembros vivos afectados	Diagnóstico histopatológico de EA	Síntomas atípicos	Edad de presentación clínica (promedio)	Edad de muerte (promedio)
F1	3	1 (3.1)	Sí *	Alteraciones motoras en miembros inferiores.	44.5	53.8
F2	3	2 (4.1 y 4.2)	No	Depresión crónica y trastorno bipolar mixto.	60	65
* Imágenes de inmunohistoquímica se muestran en Apéndice 2.						

Tabla 1. Características de las familias participantes en el protocolo de estudio de EAF.

4.1: Mujer de 45 años de edad. Presenta alteraciones de la conducta como agresividad y datos de depresión sin tratamiento.

4.2: Mujer de 41 años de edad. **Sujeto en estudio.** Inicia padecimiento a los 30 años de edad con depresión, ansiedad y pérdida de la memoria.

Actualmente con anomia ocasional, alteraciones de la memoria y bajo tratamiento con ansiolíticos y antidepresivos.

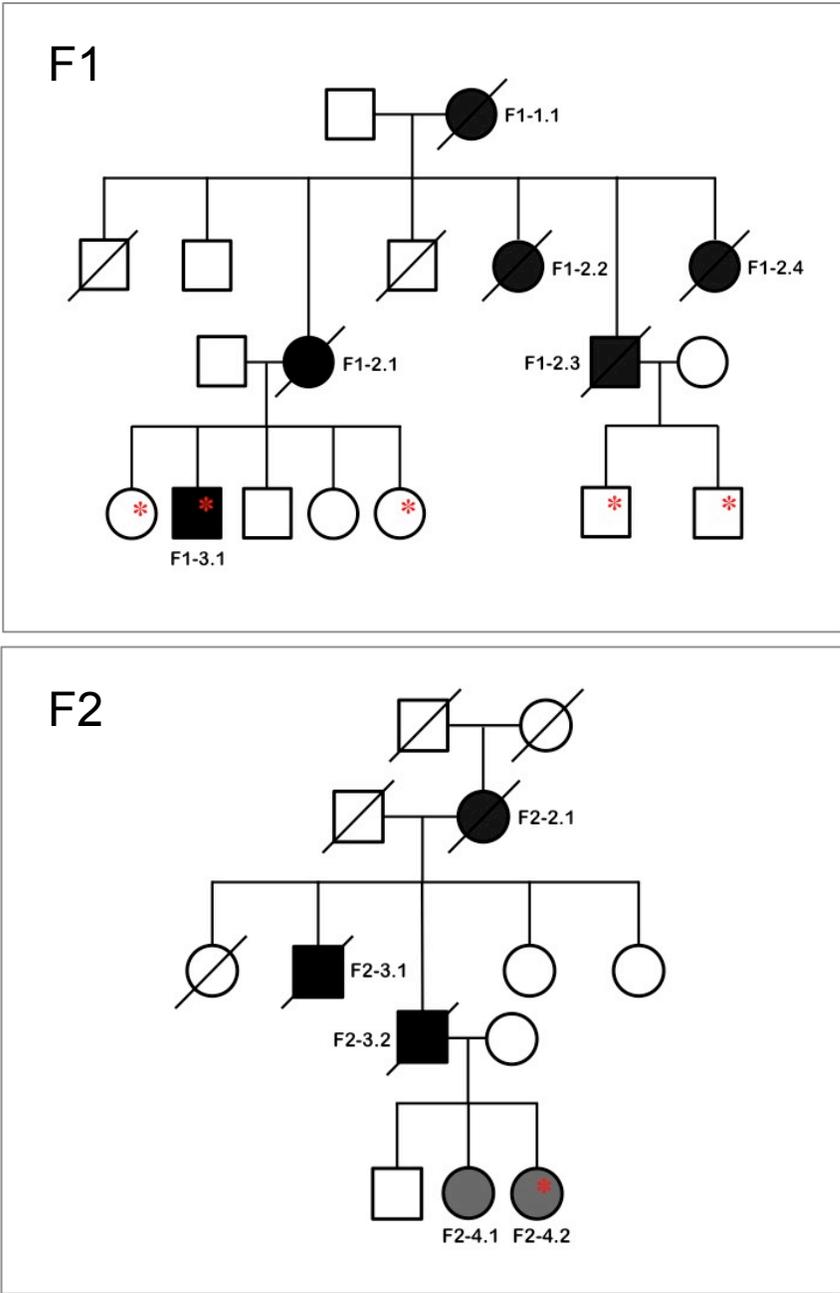


Figura 7: Árboles genealógicos de las familias F1 y F2. En asterisco (*) se indican los sujetos de los que se obtuvo muestra de sangre.

Para los ensayos de EAE, se obtuvieron muestras sanguíneas de 150 mujeres y 150 hombres captados por el laboratorio de biología molecular

BIMODI. Estas personas provienen de los estados de Guanajuato, Querétaro, Puebla y el Distrito Federal, no guardan ninguna relación parental entre ellos y se excluyeron a los que pertenecieran a algún grupo étnico particular.

2. Extracción de ADN leucocitario por método “Salting out”.

Para los ensayos de EAF, se tomaron dos muestras de sangre periférica de 5 mL cada una y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta la extracción. Para la extracción se utilizó el Blood DNA Preparation Kit de Jena Bioscience (cat. PP-205L) siguiendo el protocolo descrito continuación: Por cada muestra se tomaron 300 µL de la capa leucocitaria y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se adicionaron 900 µL de la solución “Red Blood Cell Lysis Solution” y se agitaron por 30 segundos a intensidad media en vórtex para luego centrifugarlos por un minuto a 6000 rpm. A continuación se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 µL de “Cell Lysis Solution”. Se agitó cada tubo por 30 segundos en vórtex a velocidad media y se colocaron en el agitador térmico a 800 rpm y 65°C por 3 horas. Posteriormente se añadieron 100 µL de “Protein Precipitation Solution”, se agitaron por 30 segundos a velocidad media en vórtex y se incubaron en el congelador a -20°C por 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, se centrifugó cada tubo a 13,000 rpm y 4°C por 20 minutos. Después se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 400 µL de etanol al 70%, invirtiéndose el tubo hasta ver la hebra de ADN. Se incubó cada tubo por 1 hora a 4°C y al término del tiempo se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de “Washing Buffer”, invirtiéndose cada tubo hasta despegar el botón de ADN de la pared del tubo. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y se añadieron 100 µL de “DNA Hydration Solution”, dejándose en agitación a 400 rpm y 65°C por 1 hora. Cada muestra de ADN obtenido se corrió en geles de agarosa al 1.2% para comprobar su

integridad y se hicieron alícuotas de 50 μL a una concentración de 100, 10 y 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ una vez cuantificados en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

3. Diseño de cebadores.

Para la amplificación específica de los exones 4 a 12 de *PSEN1*, 4 a 7 y 12 de *PSEN2* y 16 y 17 de *APP* se diseñaron cebadores tomando como base la secuencia de referencia GRCh38.p2 obtenida a través del portal del National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Una vez seleccionada la secuencia de los cebadores sentido y anti-sentido, se analizaron con la herramienta en línea Primer Blast, también de NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para descartar complementariedad con otras secuencias. Ya que se pretendía que éstos fueran útiles para PCR multiplex, se buscó que cada par de cebadores tuviera condiciones de amplificación similares a los demás.

4. Amplificación por PCR.

Se preparó cada reacción en un volumen total de 25 μL siguiendo el protocolo a continuación: En cada tubo de PCR se añadieron 2.5 μL de PCR Buffer 10x, 2.5 μL de dNTPs a 10 mM, 2.5 μL de MgCl_2 a 50 mM, 0.5 μL de Platinum® Taq ADN polimerasa a 5U/ μL , 1 μL c/u de cebador sentido y antisentido a 20 μM , 1 μL de ADN a 100 o $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 14 μL de agua inyectable estéril. El PCR buffer, MgCl_2 y Platinum® Taq ADN polimerasa son marca Invitrogen™ con código de catálogo 10966-034. Se utilizó un termociclador Tprofessional de Biometra® con el siguiente programa: 1) 96°C por 5 minutos, 2) 35 ciclos de 96°C por 40 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 1 minuto, 3) 72°C por 10 minutos y 4) 4°C en tiempo de reposo. Los productos amplificados se corrieron a 65 Volts por 1.5 horas en geles de agarosa al 1.2% para comprobar la especificidad y eficiencia de la amplificación.

5. Secuenciación por electroforesis capilar.

En tubos para PCR se añadieron 5 μL de producto amplificado más 2 μL de ExoSAP-IT® de Affymetrix (cat. 78200) y se colocó en el termociclador 15 minutos a 37°C y 15 minutos a 80°C. Posteriormente se preparó la reacción de secuencia a 10 μL de la siguiente forma: 2 μL de BigDye® Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, 0.5 μL de BigDye® Terminator v3.1, 0.64 μL de cebador (sentido o antisentido), 1.4 μL de producto amplificado post-ExoSAP y 5.46 μL de agua inyectable estéril. Después se introdujo la reacción al termociclador bajo el siguiente programa: 1) 94°C por 2 minutos, 2) 25 ciclos de 94°C por 13 segundos, 50°C por 10 segundos y 60°C por 2 minutos y 3) 4°C en tiempo de reposo. Una vez terminado, se añadieron 12.38 μL de SAM y 2.5 μL de BigDye® XTerminator por tubo y se colocaron en agitación a 3000 rpm por 40 minutos. Luego se centrifugó cada tubo a 1200 rcf por 3 minutos y se tomaron 20 μL de sobrenadante para finalmente depositarlo en la placa de secuenciación de 96 pozos. Las secuencias se obtuvieron por electroforesis capilar en un equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer a una temperatura de secuencia de 50°C, tiempo de inyección de 35 segundos y tiempo de corrida de 50 minutos. Cada secuencia se analizó mediante el software CLC Main Workbench 7.6.2 de Qiagen®.

6. Genotipificación de APOE

En tubos low profile se agregaron 2 μL de ADN a 10 ng/ μL y 3.5 μL de mix de PCR que contiene: 2.5 μL de qPCR Master Mix (KappaBiosystems; número de catálogo Kk4701), 0.25 μL de sonda Taqman® (Sonda 1: rs7412 y sonda 2: rs429358; ambas con número de catálogo 4351379) y 0.75 μL de agua inyectable estéril. Se utilizó un termociclador CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler de Bio Rad® con el siguiente programa: 1) 95°C por 10 minutos. 2) 92°C por 15 segundos y 3) 60°C por 90 segundos.

RESULTADOS

1. Identificación de mutaciones en *PSEN1*, *PSEN2* o *APP*.

1.1 Diseño de cebadores para amplificación específica.

Juego de cebadores para *PSEN1*

PCR	Exón	Dirección	Secuencia	Tamaño	Tm	%GC	Producto
1	5.3	Sentido	CCATTAACACTGACCTAGGGCT	22	59.49	50	196
		Antisentido	CTCATGCTCACCTTATAGCACC	22	58.6	50	
16	8.2	Sentido	CTTCGTTAATTCCTCCCTACCACCC	24	60.68	50	256
		Antisentido	CCATAGTTACATGTGCTTCAGTTCC	25	59.93	44	
2	7.2	Sentido	TGGGAGCCATCACATTATTCTAAAT	25	58.39	36	303
		Antisentido	CCATATACTGAAATCACAGCCAAGAT	26	59.29	38.46	
3	11.3	Sentido	CAGCAGCATCTACAGTTAAGACTC	24	59.2	45.83	345
		Antisentido	CAATTAATATGGCTACGAAACAGGC	25	58.86	40	
9	10.3	Sentido	CAAACAATTCAGGATTCTGCCCTC	24	60.38	45.83	383
		Antisentido	CATACTTCTCTGGGTCTTCACC	24	60.62	50	
10	12.2	Sentido	TGTGAATGTGTGTCTTTCCCATCT	24	60.45	41.67	442
		Antisentido	CTCAAATCTGGTAGTTTCTGCACC	24	59.85	45.83	
11	4.3	Sentido	CTCATAGTGACGGGTCTGTTGTT	23	60.31	47.83	492
		Antisentido	CTCAACTGCTCCTGACCATCAC	22	60.93	54.55	
4	6.3	Sentido	TTTAAGGGTTGTGGGACCTGT	22	59.75	45.45	565
		Antisentido	TTCTCTTGACAGACTAGATCCAC	24	57.73	41.67	
5	9.4	Sentido	CATACTTTGTGTGTCCAGTGCTT	23	59.43	43.48	642
		Antisentido	CTCAGTATACACATCAGCACATCTC	25	59.08	44	

Tabla 2: Cebadores elegidos para la amplificación de los exones 4 a 12 de *PSEN1*.

Juego de cebadores para *PSEN2* y *APP*

PCR	Exón	Dirección	Secuencia	Tamaño	Tm	%GC	Producto
17	6.3	Sentido	CTTGTGATCGTGCAATTTCTGTT	23	58.46	39.13	168
		Antisentido	CTCATGCCCATGTCCACTTGT	21	60.62	52.38	
6	12.2	Sentido	CTAGACCATGACTCACAGCTCC	22	59.9	54.55	235
		Antisentido	CATGTCCCTCAGATGTAGAGCT	22	59.04	50	
7	5.1	Sentido	CCTAGCAGGTCCAGAATCACTC	22	59.9	54.55	316
		Antisentido	TTCTAAAGGCGGCTGTTTCAC	21	59.12	47.62	
12	16.4	Sentido	CCTTACTTTCAGGTTCCCTTACC	24	58.99	45.83	404
		Antisentido	CTAGCACAGGATGAACCAGAGTT	23	60.06	47.83	
13	7.3	Sentido	TGGTAAACTGCTAGGCTGTAATGC	24	61.16	45.83	479
		Antisentido	CACCAGGAGTGTCCAGAAATAGT	24	60.26	45.83	
14	4.3	Sentido	CTTCATCCAGCTCCAAATCTTCTC	24	59.42	45.83	536
		Antisentido	TTCATCCCTGCTCTTTACCGC	21	60.41	52.38	
15	17.6	Sentido	TTCCCACCACTACCAAATGTTC	23	61.25	47.83	643
		Antisentido	TAACCCAAGCATCATGGAAGCAC	23	61.44	47.83	

Tabla 3: Cebadores elegidos para la amplificación de los exones 4 a 7 y 12 de *PSEN2* y 16 y 17 de *APP*.

Para la amplificación específica de los exones en los que se han reportado mutaciones causantes de EAF, se diseñaron 16 pares de cebadores complementarios a las secuencias intrónicas flanqueantes de cada exón. Se buscó que las temperaturas de fusión (Tm) de cada par no difirieran en más de 2 grados centígrados entre sí y entre los demás pares. Cada par de cebadores fue evaluado con el programa Primer Blast, con lo que se comprobó que cada par fuera específico para la secuencia de interés.

1.1.1 Evaluación de la integridad y calidad del ADN.

Con el fin de comprobar que el ADN genómico extraído fuera adecuado para la amplificación por PCR, se corrieron 2 µL de cada muestra en gels de

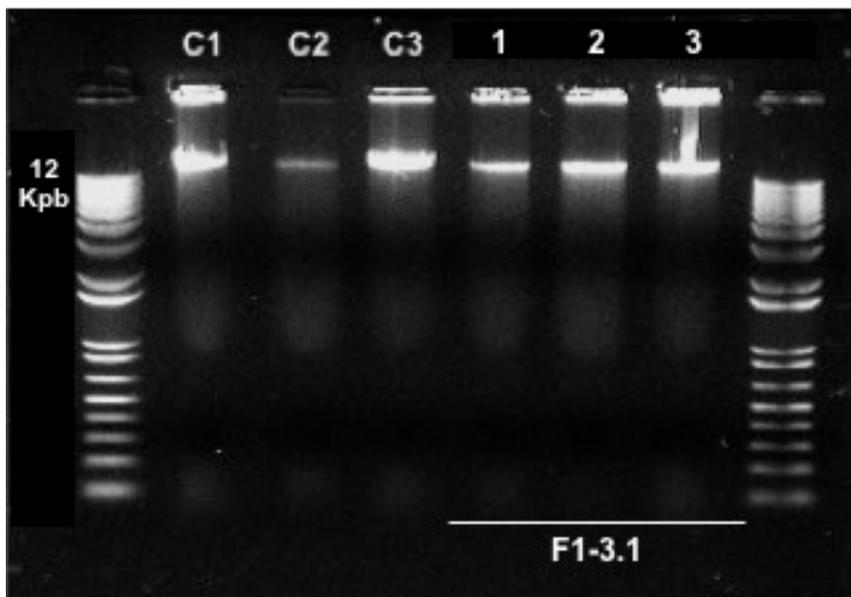


Figura 8: Integridad del ADN genómico leucocitario. Los carriles C1, C2 y C3 corresponden al ADN extraído de tres sujetos sanos. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a tres muestras diferentes del sujeto F1-3.1.

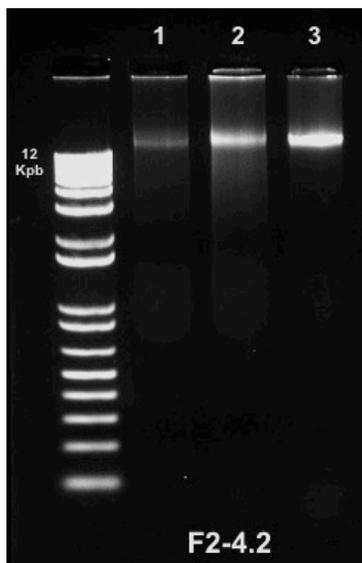


Figura 9: Integridad del ADN genómico del sujeto F2-4.2. Cada carril corresponde a una muestra distinta del mismo sujeto.

agarosa al 1.2%. En éstos se pudieron observar bandas bien definidas por encima del límite superior del marcador de 12 Kpb y la ausencia de barrido en los carriles por debajo de ésta, lo que demostró que el ADN estaba íntegro y sin datos sugerentes de degradación. (Figura 8)

Para identificar la cantidad y pureza del ADN extraído se analizó cada muestra por espectrofotometría. Se seleccionaron las muestras con un índice 260/280 de entre 1.8 a 2.0 por lo que se realizaron diluciones de 50 ng/μL y de 1 ng/μL a partir de las muestras C1, F1-3.1(1) y F2-4.2(3) (Tabla 4).

Muestra	Concentración	Unidad	260/280	260/230
C1	442.5	ng/μl	2.04	1.94
C2	135.3	ng/μl	1.96	2.06
C3	320.7	ng/μl	1.93	2.19
F1-3.1(1)	336.2	ng/μl	2	1.99
F1-3.1(2)	340.9	ng/μl	1.99	1.99
F1-3.1(3)	431.5	ng/μl	1.92	2.21
F2-4.2(1)	79	ng/μl	1.64	-
F2-4.2(2)	118.8	ng/μl	1.72	-
F2-4.2(3)	150	ng/μl	1.85	-

Tabla 4: Análisis por espectrofotometría del ADN extraído.

1.2 Amplificación de *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*.

Una vez evaluada la integridad y calidad del ADN, se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada exón de manera individual, utilizando el ADN del sujeto control C1. Para este propósito se modificaron las temperaturas de fusión, la concentración de MgCl₂ y el tiempo de extensión. (Tabla 4)

Gen	PCR	Exón	*F	TE	MgCl₂ mM
PSEN1	1	5	60	40	1
PSEN1	2	7	60	60	5
PSEN1	3	11	60	40	1
PSEN1	4	6	61	60	1
PSEN1	5	9	61	75	2
PSEN2	6	12	61	40	3
PSEN2	7	5	59	40	2
PSEN1	9	10	60	40	1
PSEN1	10	12	60	60	4
PSEN1	11	4	60	60	4
APP	12	16	59	40	1
PSEN2	13	7	60	60	5
PSEN2	14	4	60	60	5
APP	15	17	61	90	1
PSEN1	16	8	61	30	5
PSEN2	17	6	61	30	5

Tabla 5: Condiciones óptimas de amplificación para cada exón.

Para comprobar la especificidad y eficiencia de la amplificación hasta alcanzar las condiciones estándar, se corrió cada producto amplificado en geles de agarosa al 1.2%. Una vez que se observó una banda única, nítida y del tamaño esperado para todas las reacciones, se consideró que se habían

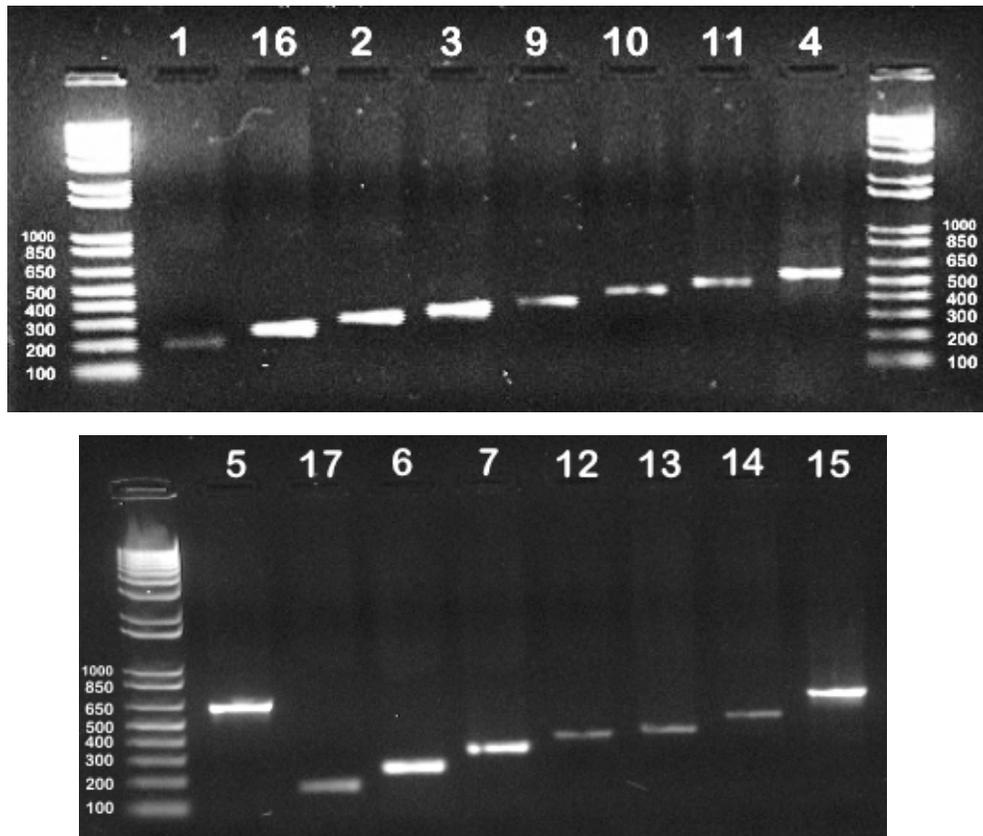


Figura 10: Exones de PSEN1, PSEN2 y APP amplificados de F1-3.1. Los números por encima de cada carril indican el número de PCR (ver tablas 2 y 3).

alcanzado las condiciones óptimas de amplificación específica para cada exón. Posteriormente estas condiciones fueron utilizadas para la amplificación de los exones a partir del ADN de F1-3.1 y los productos fueron analizados individualmente por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. (Figura 9)

1.3 Búsqueda de mutaciones de FAD por secuenciación.

Para optimizar el proceso de detección de mutaciones en las familias con diagnóstico presuntivo de EAF, se eligió al integrante con más probabilidades de portar una mutación en cada una. Esto se determinó mediante el cuadro clínico, excluyéndose aquéllos asintomáticos y/o que sobrepasaran la edad de inicio de los síntomas por más de 5 años (ver metodología). Es así que se eligió al sujeto F1-3.1 y al sujeto F2-4.2 como representante de cada familia. Ya que *PSEN1* contiene el 80% de las mutaciones causantes de EAF reportadas, se dio prioridad a su secuenciación. Con el objetivo de identificar cambios en la secuencia consenso de *PSEN1*, se realizaron dos reacciones de secuencia, una sentido y otra antisentido, por cada exón. Los datos obtenidos se analizaron de forma individual y en comparación con la secuencia consenso utilizando un software de análisis de secuencias.

Algunas secuencias se obtuvieron en un solo sentido, como es el caso del exón 7 del que se consiguió una lectura con el cebador sentido, pero el

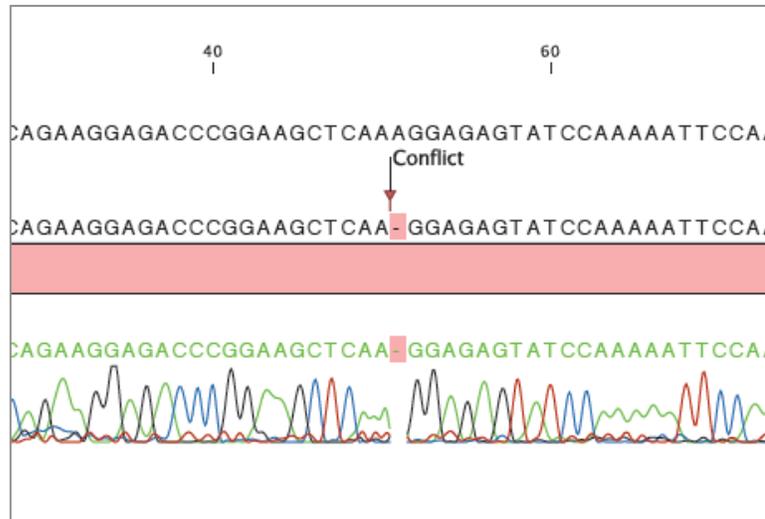


Figura 11: Fragmento de la secuencia del exón 9 de F1-3.1. En la posición 51 del exón se marca la ausencia de una adenina en comparación con la secuencia consenso.

antisentido no cumplió el mínimo de calidad para poder interpretarse adecuadamente. Por otra parte, el exón 5 se consiguió secuenciar en ambos sentidos, sin embargo no se logró leer el exón entero por lo que no puede

descartarse la presencia de una mutación en tal región (Apéndice 3). Sin embargo, al secuenciar el exón 9 se evidenció la presencia de una delección (A/-) en la posición 51 de las secuencias sentido y antisentido, por lo que es probable de que se trate de una mutación, aunque ésta debe comprobarse por repetición del ensayo (Figura 10).

Debido a que no se lograron estandarizar las condiciones de secuenciación por electroforesis capilar, no se continuó analizando al sujeto F2-4.2.

2. Genotipificación de APOE en población abierta.

Para determinar la presencia de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, se realizaron reacciones de PCR tiempo real a partir de ADN obtenido de 150 mujeres y 150 hombres de origen mexicano mestizo. Las frecuencias genotípicas se muestran en la Tabla 6. Se pudo constatar una prevalencia mayor del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ abarcando un total del 78%. El genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ fue el segundo más frecuente con 14.7%, seguido por $\epsilon 2/\epsilon 3$ con un 4.7%.

Genotipo de APOE	Mujeres	Hombres	Total	% del Total
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	1	1	0.3
$\epsilon 2/\epsilon 3$	7	7	14	4.7
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1	2	3	1
$\epsilon 3/\epsilon 3$	117	120	237	79
$\epsilon 3/\epsilon 4$	24	20	44	14.7
$\epsilon 4/\epsilon 4$	1	0	1	0.3
Total	150	150	300	100

Tabla 6: Frecuencias genotípicas de APOE en hombres y mujeres.

DISCUSIÓN

La genética subyacente en la Enfermedad de Alzheimer es un factor escasamente estudiado debido a que el concepto general de ésta como una enfermedad multifactorial pocas veces considera al tipo Familiar por tratarse de un padecimiento autosómico dominante con muy pocos casos reportados en el mundo. Sin embargo, cabe destacar que el primer caso reportado de EA por el Dr. Alois Alzheimer en 1907 y del cual se describieron las lesiones cerebrales patognomónicas que definen a la EA, se trató de un caso de EAF. Esto pudo comprobarse años después con la llegada de técnicas moleculares que permitieron identificar una mutación en *PSEN1*, publicado por Müller y colaboradores en 2012.⁵⁸

A partir del descubrimiento de los genes implicados en la génesis de la EAF, específicamente de *APP* y *PSEN1*, varios grupos se dedicaron a generar modelos transgénicos en ratones que les permitieran estudiar la fisiopatogenia de la enfermedad in vivo. En 1995 Games y colaboradores se valieron de la sobreexpresión del gen *APP* generando un transgén que contenía cuarenta copias de éste y aunque observó la formación de placas amiloides, neuritas dendríticas y defectos en el desempeño cognitivo del ratón, todos ellos dependientes de la edad, la acumulación del péptido fue diferente en cuanto a topología cerebral.⁵⁹ De la misma forma, Holcomb y colaboradores en 1998 crearon un modelo transgénico para *PSEN1* que se valió de la mutación simultánea de este gen y la sobreexpresión de *APP*, ya que la forma mutante de *PSEN1* por sí sola no generó placas amiloides.⁶⁰ Es evidente que la sobreexpresión de *APP* aunada a la expresión de mutaciones identificadas en familias con EAF en *PSEN1* y *PSEN2* ha permitido que estos modelos transgénicos sigan en uso en el estudio de la enfermedad, sin embargo, hacen uso de diversos mecanismos genéticos para la replicación de la enfermedad en el ratón que distan mucho de lo fisiológico en el ser humano. Por otro lado, el uso de células precursoras

para el estudio de la demencia es una alternativa que ha demostrado resultados interesantes que pudieran contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la EA. En 2011, Yagi y colaboradores generaron un modelo in vitro de células precursoras neuronales portadoras de mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2*.⁶¹ Las neuronas generadas a partir de esas precursoras demostraron tener una tasa elevada de producción de β A-42 y β A-40, además de un índice β A-42/ β A-40 aumentado. A partir de entonces una gran proporción de grupos de estudios se ha enfocado en desarrollar modelos in vitro de células precursoras para la investigación de los mecanismos subyacentes a la patología de EA.

En el presente estudio uno de nuestros objetivos fue encontrar mutaciones causantes de EAF, de manera que al identificar a familias portadoras, se pudiera tener una fuente de células naturalmente mutadas que pudieran utilizarse en estudios in vitro posteriores. Dado que no se alcanzaron las condiciones óptimas de secuenciación en todos los genes, no pudimos encontrar mutaciones relacionadas con la enfermedad. Aún así, la delección en la posición 51 del exón 9 de *PSEN1* que se identificó en dos lecturas distintas abre la posibilidad de que se trate de una mutación relacionada con la enfermedad en esta familia. Actualmente se han descrito para la EAF seis distintas mutaciones que generan un splicing alternativo y resultan en la delección completa del exón 9, pero la mayoría de éstas suceden dentro del intrón 8. (Tabla 7) Debido a que en nuestro trabajo nos valimos de la amplificación de los exones a partir de ADN genómico, no nos sería posible observar una delección de este tipo. Es así que, además de ser necesario repetir el ensayo de secuenciación para este exón, en caso de persistir la ausencia de esta base tendremos que recurrir a la amplificación del gen a partir de ARN y comprobar que forma parte del transcrito de este gen. Además, al recorrer el marco de lectura, esta delección puede dar lugar a un codón de paro prematuro que altere la traducción y genere una proteína distinta.

En cuanto a la genotipificación de *APOE* en este estudio pudimos comprobar una frecuencia genotípica similar a las reportadas en población latinoamericana. Ya que estos estudios de prevalencia se han realizado en comunidades latinas residentes de Estados Unidos, nuestro estudio constituye el primer reporte de la prevalencia genotípica de *APOE* en población mestiza mexicana en relación a la Enfermedad de Alzheimer. La importancia de conocer esta prevalencia radica en la identificación de sujetos en riesgo de padecer EA en la edad adulta. Estas personas podrían incluirse en bases de datos a nivel nacional que permitieran llevar un control adecuado de su salud a largo plazo, introduciendo medidas de prevención básica. Así mismo, estos sujetos podrían considerarse para estudios prospectivos enfocados en dilucidar los mecanismos exactos por los cuales *APOE* modula la presentación fenotípica de la EA.

Recientemente, a partir de estudios GWAS realizados por el grupo de investigación de Li en y de Abraham en 2008^{62,63}, se confirmó la asociación de una región en desequilibrio de ligamiento que comprende a los genes *APOE* y *TOMM40*, gen que codifica para una subunidad del complejo translocasa de la membrana externa mitocondrial (Tom40) que forma un poro esencial para el transporte de proteínas al interior de este organelo. El locus de riesgo putativo en este gen abarca una región contenida en el intrón 6 que corresponde a un tracto polyT (denominado locus 523) que es polimórfico con respecto al número de residuos de timina en su secuencia. Los alelos denominados L (long) y VL (very long) de ≥ 20 T y ≥ 30 T respectivamente están asociados con edades más tempranas de presentación clínica de SAD en portadores del genotipo *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 4$. Así mismo, otros estudios han demostrado una asociación entre el alelo S (short) de < 20 T y una edad de inicio sintomatológico anticipada en pacientes con SAD y *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$.

La influencia de *TOMM40* sobre la edad de presentación de la EA es un fenómeno que se describió por primera vez hace no más de una década, por lo que existen pocos reportes epidemiológicos.⁶⁴ Un estudio realizado en la Universidad de Florida, Estados Unidos, reportó una frecuencia del alelo L de 10%, similar entre afro-americanos, caucásico-americanos e hispanos, siendo el alelo S el más prevalente (65%) seguido por el alelo VL con 25%. Al evaluar la relación entre los alelos de *TOMM40* y los alelos de *APOE*, se encontró que L está ligado principalmente a $\epsilon 4$ mientras que VL y S se relacionan más con $\epsilon 3$.

Ya que *TOMM40* es un gen relativamente nuevo en el contexto de la patología de EA, nuestro grupo se encuentra interesado en conocer su prevalencia en México y posteriormente poder realizar estudios moleculares que ayuden a dilucidar su relación con *APOE* en la patogenia de EA. Debido a que ahora contamos con una base de 300 muestras genotipificadas para *APOE*, se podrían realizar tales estudios en los mismos sujetos en un futuro próximo.

CONCLUSIONES

- La identificación de mutaciones en pacientes con sospecha de Enfermedad de Alzheimer Familiar en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* es imprescindible para poder otorgar un diagnóstico certero.
- La frecuencia alélica de *APOE* en población abierta mestiza es similar a la descrita entre hispánicos de origen latinoamericano-mexicano, con una prevalencia mayor del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$.

PERSPECTIVAS

- Estandarizar el ensayo de electroforesis capilar para la secuenciación eficiente de *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*.
- Rediseñar los cebadores para amplificar los exones 5 y 9 de *PSEN1* y 17 de *APP* para facilitar su secuenciación.
- Determinar el genotipo de *APOE* en los sujetos con sospecha de Enfermedad de Alzheimer Familiar.
- Obtener células precursoras neuronales a partir de las personas con mutaciones causantes de Enfermedad de Alzheimer Familiar para el estudio in vitro de mecanismos etiopatogénicos involucrados en esta enfermedad.
- Realizar la correlación clínica de los portadores mono y bialélicos de $\epsilon 4$ con datos cuantitativos y cualitativos de deterioro cognitivo no demencia y de Enfermedad de Alzheimer.
- Determinar las variantes del locus 523 del gen *TOMM40* en la misma muestra de población abierta para estudiar su relación con el genotipo de *APOE* y su influencia en la Enfermedad de Alzheimer en población mexicana.

APÉNDICES

I. Mutaciones causantes de EAF.

PSEN1						
	dbSNP	Codón	Proteína	Región	Familias	Edad de Inicio
1	rs63751141	TGC - TCC	C92S	Exón 4	2	56.4
2	rs63750599	CTC - CCC	L85P	Exón 4	1	26
3	rs63749824	GCC - GTC	A79V	Exón 4	8	61.2
4	rs63750307	ATCATG - xxxxxx	Δ183/M84	Exón 4	1	36
5	rs63749967	GTG - CTG	V82L	Exón 4	1	/
6	rs63750815	GTG - TTG	V89L	Exón 4	1	48.6
7	rs63750831	GTG - ATG	V94M	Exón 4	1	53
8	rs63750601	GTC - TTC	V96F	Exón 4	1	52.5
9	rs63750852	GTG - TTG	V97L	Exón 4	1	/
10	rs63750325	TTT - ATT	F105I	Exón 4	1	/
11		TTT - GTT	F105V	Exón 4	1	52
12	rs63750321	TTT - TTG	F105L	Exón 4	1	51
13	rs63751399	CTA - CAA	L113Q	Exón 4	1	33
14	rs63751399	CTA - CCA	L113P	Exón 4	1	42.4
15	rs63751475	Mutación en sitio consenso donador de splicing del Intrón 4 resultando en 3 transcritos distintos del exón 4, los últimos dos resultando en frame-shift y codón de paro prematuro.		Intrón 4	9	35.6
16	rs63749962	TAT - CAT	Y115H	Exón 5	3	38.5
17	rs63749962	TAT - GAT	Y115D	Exón 5	1	31
18	rs63750450	TAT - TGT	Y115C	Exón 5	4	44.2
19	rs63750730	ACC - AAC	T116N	Exón 5	4	37.5
20	rs63750730	ACC - ATC	T116I	Exón 5	2	45
21		CCA - GCA	P117A	Exón 5	2	30.9
22	rs63750550	CCA - TCA	P117S	Exón 5	1	31
23	rs63749805	CCA - CGA	P117R	Exón 5	2	36.1
24	rs63749805	CCA - CTA	P117L	Exón 5	2	31.6
25	rs63750800	GAA - AAA	E120K	Exón 5	2	44
26		GAA - GGA	E120G	Exón 5	1	39
27	rs63751272	GAA - GAC	E120D	Exón 5	3	46.4
28	rs63751272	GAA - GAT	E120D	Exón 5	1	45.7
29	rs63750378	GAG - AAG	E123L	Exón 5	1	59
30	rs63750353	AAT - GAT	N135D	Exón 5	1	/
31	rs63751278	AAT - AGT	N135S	Exón 5	2	33.4
32	rs41345849	GCT - GGT	A136G	Exón 5	1	/
33	rs63751037	ATG - GTG	M139V	Exón 5	9	40.7
34	rs63751106	ATG - AAG	M139K	Exón 5	1	37
35	rs63751106	ATG - ACG	M139T	Exón 5	3	46.2
36	rs63750522	ATG - ATA	M139I	Exón 5	1	/
37		ATG - ATC	M139I	Exón 5	1	36
38		ATT - GTT	I143V	Exón 5	1	54.2
39	rs63750322	ATT - TTT	I143F	Exón 5	1	55
40	rs63750004	ATT - AAT	I143N	Exón 5	1	/
41	rs63750004	ATT - ACT	I143T	Exón 5	8	34
42	rs63751071	ATT - ATG	I143M	Exón 5	1	50
43	rs63750306	ATG - CTG	M146L	Exón 5	14	40.1
44	rs63750306	ATG - GTG	M146V	Exón 5	4	37.7
45	rs63750306	ATG - TTG	M146L	Exón 5	2	38.9
46	rs63750391	ATG - ATA	M146I	Exón 5	2	46.7
47	rs63750391	ATG - ATC	M146I	Exón 5	1	42.7
48	rs63750391	ATG - ATT	M146I	Exón 5	1	/
49	rs63750907	ACT - ATT	T147I	Exón 5	1	/
50	rs63751441	CTG - GTG	L153V	Exón 5	4	35.3
51	rs63750588	TAT - AAT	Y154N	Exón 5	1	41
52	rs63751292	TAT - TGT	Y154C	Exón 5	1	41
53	rs63750631	TAC - TTTATATAC	K155FIY156	Exón 5	2	28

54	rs63749885	CAT - TAT	H163Y	Exón 6	1	54.2
55	rs63750590	CAT - CGT	H163R	Exón 6	15	45.6
56	rs63751010	TGG - GGG	W165G	Exón 6	1	35.8
57	rs63751484	TGG - TGC	W165C	Exón 6	1	/
58	rs63751458	CTT - xxx	ΔL166	Exón 6	1	38
59	rs63750265	CTT - CAT	L166H	Exón 6	1	30
60	rs63750265	CTT - CCT	L166P	Exón 6	1	24
61	rs63750265	CTT - CGT	L166R	Exón 6	1	38
62	rs63750879	ATTATA - ATA	ΔI168	Exón 6	1	52
63	rs63750418	TCA - CCA	S169P	Exón 6	1	33.3
64	rs63751210	TCA - TTA	S169L	Exón 6	2	30
65		TCATCT - TCT	ΔS169	Exón 6	1	44.8
66	rs63750577	TCT - TTT	S170F	Exón 6	3	27.9
67	rs63750963	CTA - CCA	L171P	Exón 6	2	38
68	rs63750299	TTG - TGG	L173W	Exón 6	1	26.5
69		TTG - TTC	L173F	Exón 6	1	43.5
70	rs63751144	CTG - ATG	L174M	Exón 6	2	54.5
71	rs63751025	CTG - CGG	L174R	Exón 6	1	48
72	rs63749911	TTT - CTT	F177L	Exón 6	2	/
73	rs63749806	TTT - TCT	F177S	Exón 6	1	/
74	rs63750155	TCA - CCA	S178P	Exón 6	2	/
75	rs63751068	GGG - GTG	G183V	Exón 6	1	51
76	rs63750311	GAA - GAC	E184D	Exón 7	2	42
77	rs63750569	GGT - AGT	G206S	Exón 7	3	37.5
78	rs63750082	GGT - GAT	G206D	Exón 7	1	/
79	rs63750082	GGT - GCT	G206A	Exón 7	18	54.2
80	rs63750082	GGT - GTT	G206V	Exón 7	1	33
81	rs63749880	GGA - AGA	G209R	Exón 7	1	49.6
82	rs63750053	GGA - GAA	G209E	Exón 7	1	/
83	rs63750053	GGA - GTA	G209V	Exón 7	1	41.3
84		TCC - TAC	S212Y	Exón 7	1	46.3
85	rs63750861	ATT - CTT	I213L	Exón 7	1	/
86	rs63750861	ATT - TTT	I213F	Exón 7	1	33
87	rs63751309	ATT - ACT	I213T	Exón 7	1	45
88		CAC - GAC	H214D	Exón 7	1	55
89	rs63751003	CAT - TAT	H214Y	Exón 7	1	/
90		GGT - CGT	G217R	Exón 7	1	45.3
91	rs63750444	GGT - GAT	G217D	Exón 7	2	40
92	rs63749987	CTT - TTT	L219F	Exón 7	1	/
93	rs63750761	CTT - CCT	L219P	Exón 7	1	50
94	rs63750009	CAG - CGG	Q222R	Exón 7	1	/
95	rs63751072	CAG - CAC	Q222H	Exón 7	1	39
96		CAG - CGG	Q223R	Exón 7	1	/
97	rs63750487	CTC - TTC	L226F	Exón 7	2	33.8
98	rs63749961	CTC - CGC	L226R	Exón 7	1	/
99	rs63749970	ATT - TTT	I229F	Exón 7	1	33
100	rs63749836	GCC - ACC	A231T	Exón 7	2	/
101	rs63750799	GCC - GTC	A231V	Exón 7	1	58
102	rs63751287	ATG - CTG	M233L	Exón 7	2	60
103	rs63751287	ATG - GTG	M233V	Exón 7	1	32
104	rs63751287	ATG - TTG	M233L	Exón 7	1	39
105	rs63751024	ATG - ACG	M233T	Exón 7	6	34.7
106	rs63751479	ATG - ATC	M233I	Exón 7	1	28
107	rs63751130	CTG - GTG	L235V	Exón 7	1	47
108	rs63749835	CTG - CCG	L235P	Exón 7	3	32.3
109	rs63750858	TTT - ATT	F237I	Exón 7	1	31
110	rs63750858	TTT - CTT	F237L	Exón 7	1	51
111		AAG - AAC	K239N	Exón 7	1	54
112	rs63750888	ACT - CCT	T245P	Exón 7	1	/
113	rs63750526	GCG - GAG	A246E	Exón 7	2	52.5
114		CTC - CGC	L248R	Exón 7	1	54
115	rs63750634	TTG - GTG	L250V	Exón 7	2	46.8
116	rs63751163	TTG - TCG	L250S	Exón 7	1	52.2
117	rs63751320	TAT - TCT	Y256S	Exón 7	1	27.5
118	rs63751420	GCT - GTT	A260V	Exón 8	3	37.1
119		GTT - CTT	V261L	Exón 8	1	40

120	rs63750964	GTT - TTT	V261F	Exón 8	5	36.3
121	rs63750248	TTG - TTC	L262F	Exón 8	1	50.3
122	rs63750543	TGT - CGT	C263R	Exón 8	1	50
123	rs63751102	TGT - TTT	C263F	Exón 8	2	64
124	rs63750301	CCG - CTG	P264L	Exón 8	11	47.3
125		GGT - AGT	G266S	Exón 8	2	40.8
126	rs63751229	CCA - TCA	P267S	Exón 8	1	35
127	rs63750779	CCA - CTA	P267L	Exón 8	1	56
128	rs63751019	CGT - GGT	R269G	Exón 8	2	49
129	rs63750900	CGT - CAT	R269H	Exón 8	4	55.1
130	rs63750886	CTG - GTG	L271V	Exón 8	1	49
131	rs63750680	GTT - GCT	V272A	Exón 8	2	32.9
132	rs63750772	GAA - GCA	E273A	Exón 8	1	63
133	rs63750284	ACA - AGA	T274R	Exón 8	1	/
134	rs63749891	AGA - AAA	R278K	Exón 8	1	44.6
135	rs63749891	AGA - ACA	R278T	Exón 8	1	37
136	rs63749891	AGA - ATA	R278I	Exón 8	1	49.5
137	rs63750524	AGA - AGC	R278S	Exón 8	1	42
138	rs63750231	GAA - GCA	E280A	Exón 8	12	47.4
139	rs63750231	GAA - GGA	E280G	Exón 8	6	44.8
140	rs63749937	CTT - GTT	L282V	Exón 8	1	44.3
141		CTT - TTT	L282F	Exón 8	1	51
142	rs63750050	CTT - CGT	L282R	Exón 8	2	43.4
143	rs63750324	CCA - TCA	P284S	Exón 8	1	38.3
144	rs63750863	CCA - CTA	P284L	Exón 8	1	32
145	rs63751139	GCT - GTT	A285V	Exón 8	2	50.5
146	rs63751235	CTC - GTC	L286V	Exón 8	2	47.5
147		CTC - CCC	L286P	Exón 8	1	39.6
148	Δ9	Delección de 5858 bp que contienen al exón 9 resultando en un salto dentro del marco de lectura del exón 9 y un cambio de aminoácido en el sitio de unión del exón 8 y 10.	S290C; ΔT291_S319	Exón 9	1	45.5
149	Δ9Finn	Delección de 4555 bp que contienen al exón 9 en un salto dentro del marco de lectura del exón 9 y un cambio de aminoácido en el sitio de unión entre el exón 8 y 10.	S290C; ΔT291_S319	Exón 9	2	47.1
150		Inserción de 18 nt TGGAATTTGTGCTGTTG en el intrón 8, entre los nucleótidos 22 y 23 río arriba del exón 9 resultando en salto del exón 9	S290C; ΔT291_S319	Exón 9	1	/
151	rs63750219	Mutación puntual en el sitio consenso aceptor del splicing del intrón 8 resultando en un salto dentro del marco de lectura del exón 9 y un cambio de aminoácido en el sitio de unión del exón 8 y 10.	S290C; ΔT291_S319	Exón 9	2	47.5
152	rs63750219	Mutación puntual en el sitio consenso aceptor del splicing del intrón 8 resultando en un salto dentro del marco de lectura del exón 9 y un cambio de aminoácido en el sitio de unión del exón 8 y 10.	S290C; ΔT291_S319	Exón 9	3	50
153	rs63750298	ACA - CCA Afecta splicing del exón 9 que conlleva a eliminarlo en 5% de los transcritos.	T291P; S290C; ΔT291_S319	Exón 9	1	33
154	rs63751174	CGA - CAA	R358Q	Exón 10	1	/
155		TCC - GCC	S365A	Exón 10	1	62.5
156	rs63751051	AGG - ATG	R377M	Exón 11	1	39
157	rs63750323	GGA - GAA	G378E	Exón 11	4	37.5
158	rs63750323	GGA - GTA	G378V	Exón 11	1	45
159	rs63750687	CTT - GTT	L381V	Exón 11	2	30.5
160	rs63750646	GGA - GCA	G384A	Exón 11	2	34.9
161	rs63749860	TTC - TCC	F386S	Exón 11	1	/
162	rs63750883	AGT - ATT	S390I	Exón 11	1	/
163	rs63751066	GTT - TTT	V391F	Exón 11	1	/
164	rs63751416	CTG -GTG	L392V	Exón 11	5	42.5
165	rs63750218	CTG - CCG	L392P	Exón 11	1	38.3
166	rs63750929	GGT - GTT	G394V	Exón 11	2	43
167	rs63751254	AAC - AGC	N405S	Exón 11	1	/

168	rs63750227	GCC - ACC	A409T	Exón 11	1	58
169	rs661	TGT - TAT	C410Y	Exón 11	3	49.9
170		GTA - ATA	V412I	Exón 11	1	37.5
171	rs63751316	TTG - TTT	L418F	Exón 12	1	/
172	rs63750802	CTT - CGT	L420R	Exón 12	1	38
173		CTC - GTC	L424F	Exón 12	1	/
174		CTC - TTC	L424F	Exón 12	1	58.5
175	rs63751032	CTC - CAC	L424H	Exón 12	2	39
176	rs63751032	CTC - CGC	L424R	Exón 12	1	30
177	rs63751223	GCC - CCC	A426P	Exón 12	1	46
178	rs63750083	GCA - GAA	A431E	Exón 12	34	40.5
179	rs63750083	GCA - GTA	A431V	Exón 12	1	47
180	rs63750528; rs63750341	GCT - TGT	A434C	Exón 12	2	30.3
181	rs63750001	CTT - TTT	L435F	Exón 12	1	/
182	rs63749925	CCA - TCA	P936S	Exón 12	1	47
183	rs28930977	CCA - CAA	P436Q	Exón 12	3	28.3
184		ATC - AGC	I439S	Exón 12	1	55
185	rs63750470	ACC - xxx	ΔT440	Exón 12	1	34.5
TOTAL					405	42.71

APP						
	dbSNP	Codón	Proteína	Región	Familias	Edad de Inicio
1	dupAPP[F229]	/	/	Duplicación APP, NCAM2, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA, CYR1, ADAMTS1, ADAMTS5.	1	54.7
2	dupAPP[F019]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA, CYR1, ADAMTS1, ADAMTS5, ZNF294, USP16, CCT8, BACH1.	1	45
3	dupAPP[F009]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA.	1	51.4
4	dupAPP[F037]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA.	1	54.5
5	dupAPP[F028]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA.	1	47.3

6	dupAPP	/	/	Duplicación de 0.55 Mb APP.	1	52.6
7	dupAPP[Swedish]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA.	1	52
8	dupAPP[Finnish]	/	/	Duplicación APP, MRPL39, JAM2, ATP5J, GABPA.	1	48.7
9	dupAPP[1104]	/	/	Duplicación de <0.7 Mb APP solamente.	2	53.5
10	rs63751263; rs63750445	AAGATG - AATCTG	K670N; M671L	Exón 16	1	55
11	rs63750064	GAC - AAC	D678N	Exón 16	1	61.3
12	Leuven APP	GAA - AAA	E682K	Exón 16	1	61
13	rs63750671	GCA - GGA	A692G	Exón 17	2	45.9
14	rs63750579	GAA - AAA	E693K	Exón 17	3	/
15	rs63750579	GAA - CAA	E693Q	Exón 17	4	/
16	rs63751039	GAA - GGA	E693G	Exón 17	2	59.7
17		GAA - xxx	ΔE693	Exón 17	2	44
18	rs63749810	GAT - AAT	D694N	Exón 17	2	62
19	rs63750921	CTC - GTC	L705V	Exón 17	1	64
20	rs63750066	GCG - ACG	A713T	Exón 17	5	67.4
21	rs63750643	ACA - GCA	T714A	Exón 17	3	50.2
22	rs63750973	ACA - ATA	T714I	Exón 17	3	36.3
23	rs63750734	GTG - ATG	V715M	Exón 17	2	47
24	rs63750868	GTG - GCG	V715A	Exón 17	3	45.3
25	rs63750399	ATC - GTC	I716V	Exón 17	1	53
26		ATC - TTC	I716F	Exón 17	1	31
27	rs63750851	ATC - ACC	I716T	Exón 17	1	36
28	rs63750264	GTC - ATC	V717I	Exón 17	30	53.2
29	rs63750264	GTC - CTC	V717L	Exón 17	5	43.7
30	rs63750264	GTC - TTC	V717F	Exón 17	3	41.2
31	rs63749964	GTC - GGC	V717G	Exón 17	2	/
32	rs63751122	CTG - CCG	L723P	Exón 17	1	56
33	rs63750151	AAG - AAC	K724N	Exón 17	1	55
TOTAL					90	50.93

PSEN2						
	dbSNP	Codón	Proteína	Región	Familias	Edad de Inicio
1	rs63750048	GCG - GTG	A85V	Exón 4	1	63.6
2	rs63749851	ACG - CCG	T122P	Exón 5	2	47.9
3	rs28936380	ACG - AGG	T122R	Exón 5	1	57.3
4	rs63750215	AAC - ATC	N141I	Exón 5	8	56.9
5	rs63750812	GTC - ATC	V148I	Exón 5	1	71
6		ATG - GTG	M174V	Exón 6	2	54
7		TCT - TGT	S175C	Exón 6	1	60.5
8		TAC - TGC	Y231C	Exón 7	1	58.5
9	rs63750880	CAG - CTG	Q228L	Exón 7	1	70
10	rs28936379	ATG - GTG	M239V	Exón 7	1	50
11	rs63749884	ATG - ATA	M239I	Exón 7	1	50.7
12	rs63750666	ACG - ATG	T430M	Exón 12	1	56.3
13	rs63750110	GAC - GCC	D439A	Exón 12	1	56
TOTAL					22	57.9

II. Imágenes de inmunofluorescencia de sujeto F1-2.3.

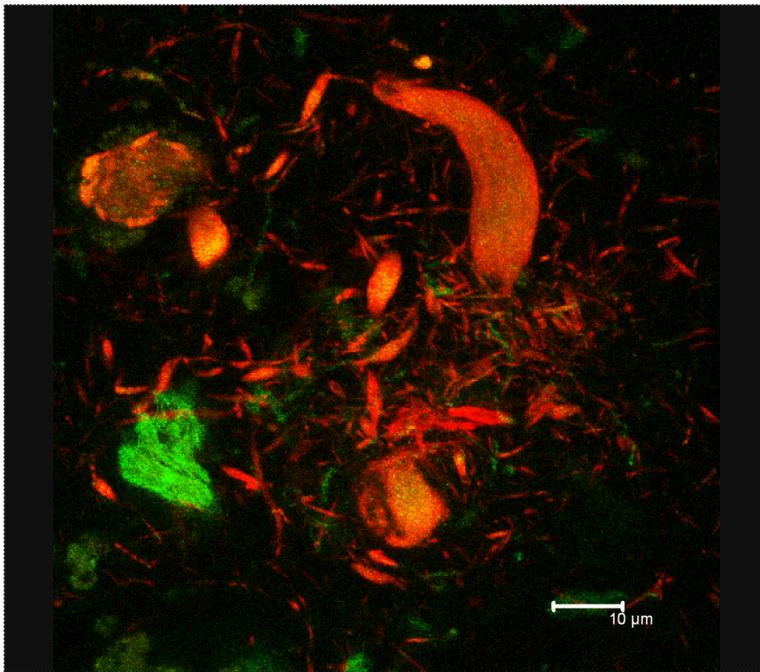


Figura 12:
Doble
inmunofluorescencia
contra P-Tau
(Serina 396 en
verde) y Tau (c3
en rojo) en corte
coronal de
hipocampo de
sujeto F1-2.3.
Acercamiento a
100x.

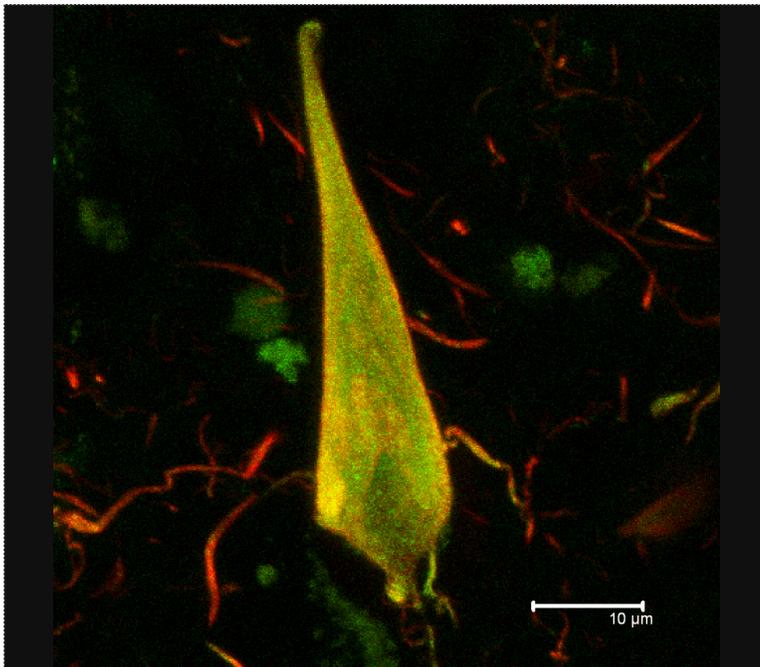
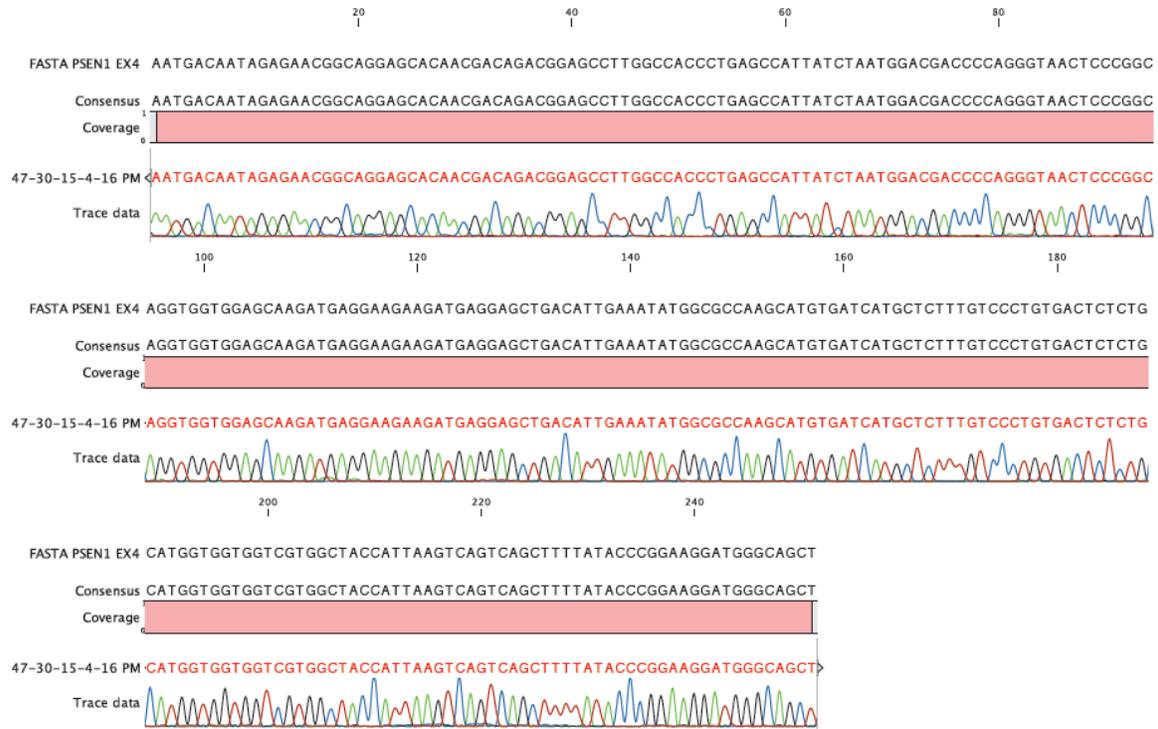


Figura 13:
Lesión "en flama"
que corresponde a
una maraña
neurofibrilar,
encontrada en el
hipocampo de
sujeto F1-2.3. En
verde anticuerpo
contra P-Tau (Ser
396) y en rojo
anticuerpo contra
Tau (c3).
Acercamiento a
100x.

Exón 4

Antisentido



Exón 5:

Sentido

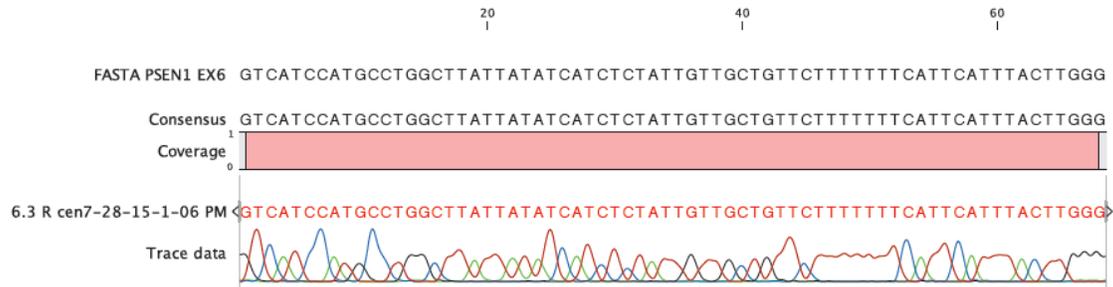


Antisentido



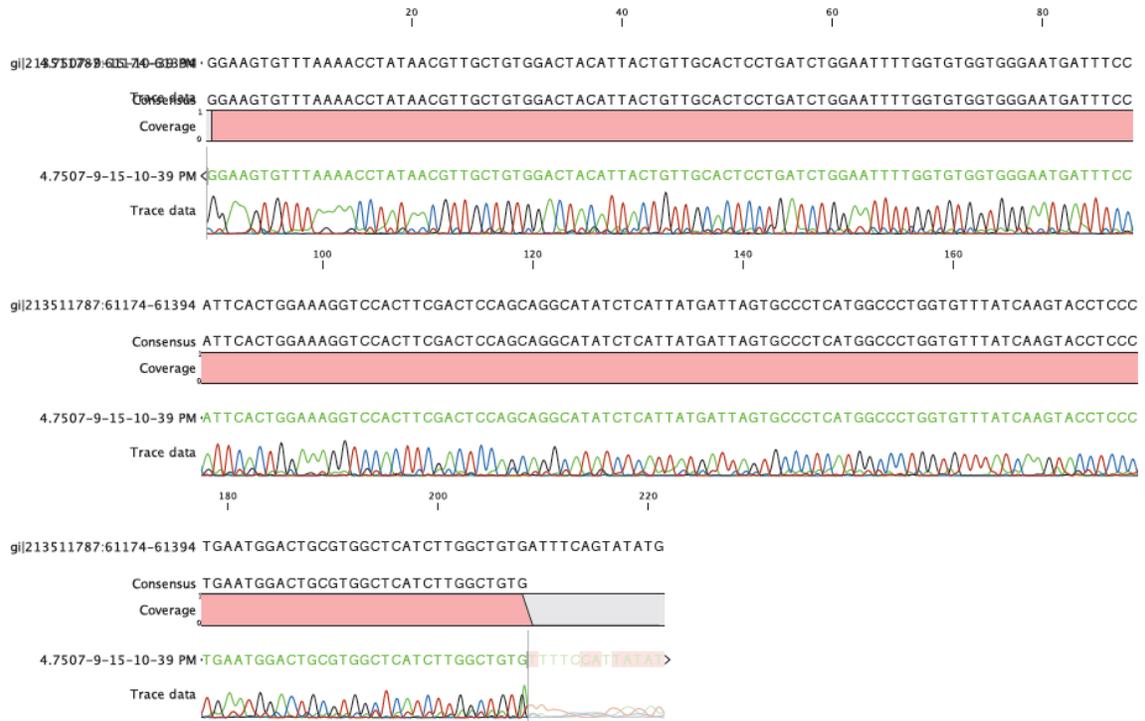
Exón 6:

Sentido



Exón 7:

Sentido



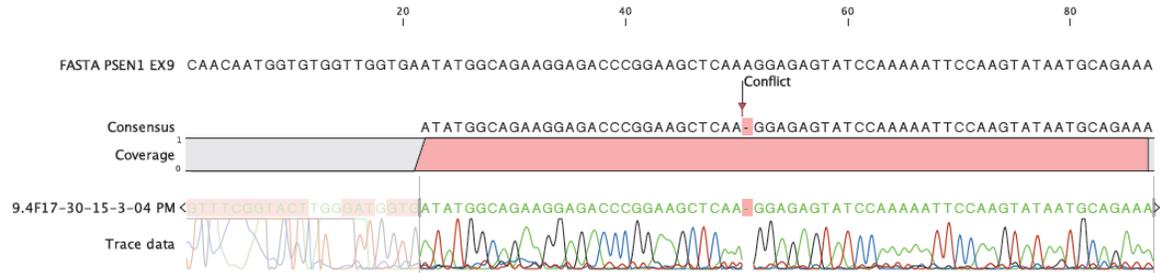
Exón 8:

Sentido

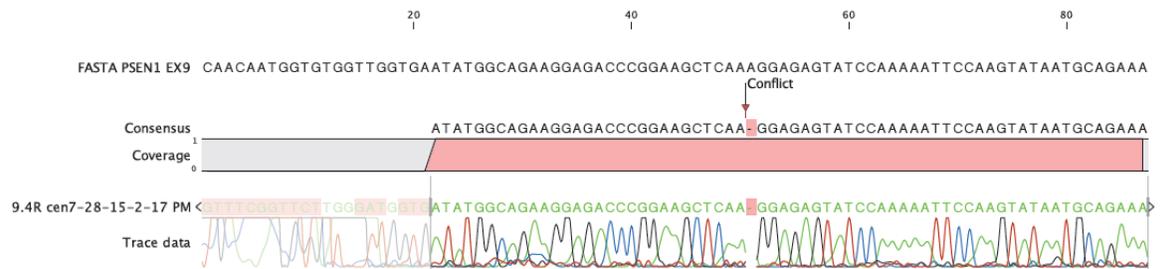


Exón 9:

Sentido



Antisentido



Exón 10:

Sentido



Exón 11:

Sentido



BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *Demencia: Una Prioridad de Salud Pública*. (2013).
2. Alzheimer's Disease International. *The Global Impact of Dementia 2013 – 2050 Policy Brief for Heads of Government*. (2013).
3. Bettens, K., Sleegers, K. & Van Broeckhoven, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **12**, 92–104 (2013).
4. Maruszak, A. & Thuret, S. Why looking at the whole hippocampus is not enough—a critical role for anteroposterior axis, subfield and activation analyses to enhance predictive value of hippocampal changes for Alzheimer's disease diagnosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 95 (2014).
5. Dubois, B. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* **13**, 614–29 (2014).
6. FINDER, V. H. & GLOCKSHUBER, R. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener. Dis.* **4**, 13–27 (2007).
7. Thinakaran, G. & Koo, E. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* **283**, 29615–9 (2008).
8. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (80-)*. **297**, 353–357 (2002).
9. Spires-Jones, T. & Hyman, B. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron* **82**, 756–71 (2014).
10. Chételat, G. *et al.* Relationship between atrophy and β -amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **67**, 317–324 (2010).
11. Jansen, W. J. *et al.* Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia. *Jama* **313**, 1924 (2015).
12. Nemirovsky, A., Shapiro, J., Baron, R., Kompaniets, A. & Monsonogo, A. Active A β vaccination fails to enhance amyloid clearance in a mouse model of Alzheimer's disease with A β 42-driven pathology. *J. Neuroimmunol.* **247**, 95–99 (2012).
13. Holmes, C. *et al.* Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**, 11–14 (2008).
14. Wang, Y., Zhang, G., Zhou, H., Barakat, A. & Querfurth, H. Opposite effects of low and high doses of A β 42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex. *PLoS One* **4**, (2009).

15. Bukanova, J. V., Sharonova, I. N. & Skrebitsky, V. G. Amyloid β peptide (25-35) in picomolar concentrations modulates the function of glycine receptors in rat hippocampal pyramidal neurons through interaction with extracellular site(s). *Brain Res.* **1558**, 1–10 (2014).
16. Puzzo, D. & Arancio, O. Amyloid- β Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **33**, (2013).
17. Haass, C. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring ...* **2**, a006270 (2012).
18. Barthet, G., Georgakopoulos, A. & Robakis, N. K. Cellular mechanisms of γ -secretase substrate selection, processing and toxicity. *Prog. Neurobiol.* **98**, 166–175 (2012).
19. Elad, N. *et al.* The dynamic conformational landscape of γ -secretase. *J. Cell Sci.* **128**, 589–598 (2014).
20. Mucke, L. & Selkoe, D. J. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006338 (2012).
21. Lazzari, C., Kipanyula, M. J., Agostini, M., Pozzan, T. & Fasolato, C. A β 42 oligomers selectively disrupt neuronal calcium release. *Neurobiol. Aging* **36**, 877–885 (2015).
22. Emmerling, M. R. Water-soluble A β (N-40, N-42) Oligomers in Normal and Alzheimer Disease Brains. *J. Biol. Chem.* **271**, 4077–4081 (1996).
23. Campion, D. *et al.* Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 664–670 (1999).
24. Cruts, M., Theuns, J. & Van Broeckhoven, C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum. Mutat.* **33**, 1340–1344 (2012).
25. Cohn-Hokke, P. E., Elting, M. W., Pijnenburg, Y. a L. & van Swieten, J. C. Genetics of dementia: Update and guidelines for the clinician. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **159 B**, 628–643 (2012).
26. Cruts, M. Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database. (2012). at <<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>>
27. Saura, C. a. *et al.* Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23–36 (2004).
28. Xia, D. *et al.* Presenilin-1 Knockin Mice Reveal Loss-of-Function Mechanism for Familial Alzheimer's Disease. *Neuron* **85**, 967–981 (2015).

29. McKhann, G. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **7**, 263–269 (2011).
30. Arnold, S. E. *et al.* Frequency and clinicopathological characteristics of presenilin 1 Gly206Ala mutation in puerto rican hispanics with dementia. *J. Alzheimer's Dis.* **33**, 1089–1095 (2013).
31. Devi, G. *et al.* Novel presenilin 1 mutations associated with early onset of dementia in a family with both early-onset and late-onset Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **57**, 1454–1457 (2000).
32. Kauwe, J. S. K. *et al.* Extreme cerebrospinal fluid amyloid β levels identify family with late-onset Alzheimer's disease presenilin 1 mutation. *Ann. Neurol.* **61**, 446–453 (2007).
33. Larner, a. J., Ray, P. S. & Doran, M. The R269H mutation in presenilin-1 presenting as late-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **252**, 173–176 (2007).
34. Kim, D. H. *et al.* Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* **545**, 185–93 (2014).
35. Shi, Y. *et al.* A Human Stem Cell Model of Early Alzheimer's Disease Pathology in Down Syndrome A Human Stem Cell Model of Early Alzheimer's Disease Pathology in Down Syndrome. **4**, (2012).
36. Bekris, L., Yu, C., Bird, T. & Tsuang, D. Genetics of Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* **23**, 213–227 (2010).
37. Jayadev, S. *et al.* Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain* **133**, 1143–1154 (2010).
38. Tomaino, C. *et al.* Presenilin 2 Ser130Leu mutation in a case of late-onset 'sporadic' Alzheimer's disease [3]. *J. Neurol.* **254**, 391–393 (2007).
39. Cruchaga, C. *et al.* Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
40. Yu, J.-T., Tan, L. & Hardy, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu. Rev. Neurosci.* **37**, 79–100 (2014).
41. Huang, Y. Roles of apolipoprotein E4 (ApoE4) in the pathogenesis of Alzheimer's disease: lessons from ApoE mouse models. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 924–32 (2011).
42. Melissa Campos, B.S., Steven D. Edland, and G. M. P. An Exploratory Study of APOE- ϵ 4 Genotype and Risk of Alzheimer's Disease in Mexican Hispanics. *J Am Geriatr Soc* **29**, 997–1003 (2012).

43. Poirier, J. *et al.* Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, S3–S10 (2014).
44. Castellano, J. M. *et al.* Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra57 (2011).
45. Yajima, R. *et al.* ApoE-isoform-dependent cellular uptake of amyloid- β is mediated by lipoprotein receptor LR11/SorLA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 482–488 (2015).
46. Moir, R. D. *et al.* Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A beta using physiological concentrations. *Biochemistry* **38**, 4595–603 (1999).
47. Stratman, N. C. *et al.* Isoform-specific interactions of human apolipoprotein E to an intermediate conformation of human Alzheimer amyloid-beta peptide. *Chem. Phys. Lipids* **137**, 52–61 (2005).
48. Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W. & Roses, A. D. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* (80-.). **261**, 921–923 (1993).
49. Michaelson, D. M. APOE ϵ 4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **10**, 861–868 (2014).
50. Ringman, J. M. *et al.* Genetic heterogeneity in Alzheimer disease and implications for treatment strategies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **14**, 499 (2014).
51. Raux, G. *et al.* Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J. Med. Genet.* **42**, 793–795 (2005).
52. Athan, E. S. *et al.* A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA* **286**, 2257–2263 (2001).
53. Martínez-Cortés, G. *et al.* Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *J. Hum. Genet.* **57**, 568–574 (2012).
54. Yescas, P. *et al.* Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families. *Neurogenetics* **7**, 195–200 (2006).
55. Murrell, J. *et al.* The A431E mutation in PSEN1 causing Familial Alzheimer's Disease originating in Jalisco State, Mexico: An additional fifteen families. *Neurogenetics* **7**, 277–279 (2006).
56. Villalpando-Berumen, J. M., Mejia-Arango, S., Aguilar-Salinas, C. A., Ordonez-Sanchez, M. L. & Gutierrez-Robledo, L. M. Apolipoprotein E epsilon4, Alzheimer's disease, and cognitive performance in elderly Mexican Mestizos. *J. Am. Geriatr. Soc.* **56**, 677–82 (2008).

57. Calderon-Garciduenas, L. *et al.* Decreases in Short Term Memory, IQ, and Altered Brain Metabolic Ratios in Urban Apolipoprotein epsilon4 Children Exposed to Air Pollution. *J. Alzheimers. Dis.* **45**, 757–770 (2015).
58. Müller, U., Winter, P. & Graeber, M. B. A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **12**, 129–30 (2013).
59. Games, D. *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523–527 (1995).
60. Holcomb, L. *et al.* Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* **4**, 97–100 (1998).
61. Yagi, T. *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* **20**, 4530–4539 (2011).
62. Hosford, D. *et al.* Candidate Single-Nucleotide Polymorphisms From a Genomewide Association Study of Alzheimer Disease. **65**, 45–53 (2008).
63. Abraham, R. *et al.* A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. *BMC Med. Genomics* **1**, 44 (2008).
64. Roses, a D. *et al.* A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* **10**, 375–384 (2010).