



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Caracterización clínica y molecular de la mutación A431E del gen *PSEN1* en una familia mexicana con presentación atípica de la Enfermedad de Alzheimer Familiar.”

T E S I S

Que presenta

M. EN C. ROSALÍA ALEJANDRINA SANTOS MANDUJANO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

TUTOR:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por haberme otorgado la beca de doctorado N° 425721 y la beca de movilidad para estancias en el extranjero sin las cuales este trabajo no hubiera podido realizarse.

También agradezco a mi tutor de tesis, el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por brindarme su confianza y apoyo para llevar a cabo este proyecto en su laboratorio y, sobretodo, por otorgarme libertad creativa lo que, sin duda, fue mi mayor enseñanza.

Un agradecimiento especial y mi total admiración a la Dra. Lucía Chávez Gutiérrez por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación e inspirarme con su ejemplo.

Mi más sincero agradecimiento a los técnicos y auxiliares de investigación por su incansable labor dentro del laboratorio. Particularmente a María del Pilar Figueroa Corona, Julio César Ramírez Gómez y Sam Lismont.

Gracias a mis amigos y compañeros de Biomedicina Molecular y del VIB: Alfredo Montes, Carolina Moreno, Dieter Petit, Dora Vélez, Eduardo Patiño, Elizabeth Hill, Erika González, Estefanía Gutiérrez, Laura Gómez, Maria Szaruga, Matthias Koch, Mónica Mendoza, Samuel Galán y Sandra Chánez. Llevo su amistad en el corazón.

Gracias infinitas a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo incondicional y su presencia constante en mi vida. Los amo.

Mi mayor agradecimiento es para mis pacientes, la familia "B.O.", por su valiosa cooperación a lo largo de estos cuatro años. Nada se hubiera logrado sin ustedes.

Esta tesis se la dedico a mis dos grandes amores, Alicia y Alejandrina, por siempre creer en mí y levantarme en los momentos más difíciles.

Por ustedes, todo.

CONTENIDO

- RESUMEN 1
- ABSTRACT 2
- INTRODUCCIÓN 3 - 22
- 1. La Enfermedad de Alzheimer. 3
 - 1.1. Definición y epidemiología de la demencia. 3
 - 1.2. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer. 5
 - 1.2.1. Cuadro clínico. 6
 - 1.2.2. Diagnóstico. 7
 - 1.2.3. Patología cerebral y estadificación de Braak. 10
- 2. La Enfermedad de Alzheimer Familiar. 12
 - 2.1. Diferencias y similitudes entre la EAE y la EAF. 12
 - 2.2. Características genéticas de la EAF. 14
 - 2.3. Mecanismos moleculares elementales en la patogénesis de la EAF. 16
 - 2.3.1. Vías de procesamiento de la APP. 16
 - 2.3.2. La Hipótesis de la Cascada Amiloide. 18
- ANTECEDENTES 23 - 30
- 3. La Enfermedad de Alzheimer Familiar causada por mutaciones en *PSEN1*. 23
 - 3.1. Presenilina 1 y el complejo γ -secretasa. 23
 - 3.1.1. Dinámica y actividad catalítica de PS1. 24
 - 3.2. Efecto de las mutaciones de *PSEN1* en la actividad catalítica de GSEC. 27
 - 3.3. Fenotipos alternativos causados por mutaciones en *PSEN1*. 29
- ANTECEDENTES DIRECTOS 31 - 33
- 4. La mutación A431E (Jalisco) de *PSEN1*. 31
 - 4.1. Cronología de datos clínicos y experimentales sobre la mutación A431E. 31
- JUSTIFICACIÓN 34
- HIPÓTESIS 34
- OBJETIVOS GENERALES Y OBJETIVOS PARTICULARES 35
- ESQUEMA DE TRABAJO. 36

- MATERIAL Y MÉTODOS 37 - 48
 1. Selección de sujetos y obtención del consentimiento informado. 37
 2. Obtención de muestras sanguíneas. 37
 3. Extracción de ADN leucocitario por el método de "salting-out". 38
 4. Amplificación del exón 12 del gen *PSEN1* por medio de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR). 39
 5. Reacción de secuencia y secuenciación por método de Sanger. 40
 6. Evaluación cognitiva de los sujetos portadores de la mutación A431E. 40
 7. Evaluación de la función olfatoria. 40
 8. Estudio de imagen por resonancia magnética. 41
 9. Toma de muestra por exfoliación de epitelio nasal para obtención de células precursoras neuronales del epitelio olfatorio. 41
 10. Generación de cultivos primarios de fibroblastos humanos con la mutación A431E. 44
 11. Generación de líneas celulares con mutaciones de *PSEN1* a partir de fibroblastos embrionarios de ratón *double knock-out* PS1/PS2. 44
 12. Cuantificación de péptidos a β por el método de ELISA. 45
 13. Determinación de la expresión celular de GSEC por Western-Blot. 46
 14. Generación de GSEC recombinante a partir de células de insecto. 46
 15. Análisis estadístico. 48

- RESULTADOS. 49 - 64
 1. Búsqueda de portadores de la mutación A431E de *PSEN1*. 49
 - 1.1. Identificación de portadores sintomáticos y asintomáticos de la mutación A431E. 50
 2. Caracterización clínica de los sujetos portadores de la mutación A431E. 50
 - 2.1. Caso 1 [Paciente sintomático (PS)]. 51
 - 2.2. Caso 2 [Paciente presintomática (PPS)]. 53
 3. Estudio por RM de los portadores de la mutación A431E. 54
 4. Caracterización bioquímica de la función enzimática de GSEC con la mutación A431E. 58
 - 4.1. Determinación de la actividad catalítica de GSEC en fibroblastos humanos que expresan la mutación A431E. 58
 - 4.2. Determinación de la actividad catalítica de GSEC en fibroblastos embrionarios de ratón que expresan la mutación A431E o la mutación A431V. 59
 - 4.3. Efectos de la mutación A431E sobre la expresión de GSEC. 61
 - 4.4. Comparación de los perfiles catalíticos de GSEC entre mutaciones causales de PE y mutaciones no asociadas a trastornos motores. 62
 - 4.5. Cuantificación de la generación de AICD por GSEC con la mutación A431E. 63

- CONCLUSIONES 65 - 66

- DISCUSIÓN 67 - 71

- PERSPECTIVAS 72

- BIBLIOGRAFÍA 73 - 82

- APÉNDICES 83 - 93
 - 1. Formato de aprobación y registro del proyecto por el COBISH. 83
 - 2. Cuestionarios de tamizaje cognitivo MMSE y MoCA en español. 84 - 86
 - 3. Hojas de respuesta de la prueba de identificación de olores. 87 - 91
 - 4. Reportes volumétricos de VolBrain. 92 - 93
 - Reporte de sujeto III-4 (PS). 92
 - Reporte de sujeto III-8 (PPS). 93

RESUMEN

Las mutaciones del gen Presenilina 1 son la causa más común de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF). Estas mutaciones generan demencia que puede o no estar acompañada de otras alteraciones neurológicas importantes como lo son las enfermedades motoras. Una de las mutaciones más frecuentes de la EAF, la A431E del gen *PSEN1*, induce paraparesis espástica (PE) en algunos de sus portadores, aunque aún se desconoce el efecto que ejerce sobre la actividad catalítica de γ -secretasa (GSEC) y su asociación con su fenotipo particular. En nuestro estudio caracterizamos dos portadores de mutación A431E, uno sintomático y otro presintomático, pertenecientes a una familia mexicana con antecedentes de PE en todos sus miembros afectados. La evaluación cognitiva y neurológica del paciente sintomático demostró que éste padecía una demencia atípica no amnésica. Además, ambos pacientes mostraron una disfunción olfatoria significativa y alteraciones en la agudeza visual. En A través de la evaluación por resonancia magnética, ambos exhibieron atrofia restringida a áreas cerebrales parieto-occipitales correspondientes a un Síndrome de Benson y un hipocampo de tamaño normal para su edad. Así mismo, encontramos varios cambios patológicos asociados a la materia blanca periventricular, subcortical y profunda que correlacionaron anatómica y temporalmente con su estadio clínico. En ensayos celulares con fibroblastos humanos y fibroblastos embrionarios de ratón, se demostró la alteración de la actividad carboxipeptidasa-like de GSEC, favoreciendo la producción de A β 43 en las células con la mutación A431E. También se comprobó que este péptido altamente neurotóxico es producido en mayores cantidades por algunas mutaciones asociadas al fenotipo de PE y no en aquellas que causan un cuadro demencial típico, introduciendo la posibilidad de que exista una correlación entre A β 43 y el fenotipo motor. Finalmente, a través de ensayos de termoactividad de GSEC *in vitro*, determinamos la actividad endopeptidasa bajo el efecto de la mutación A431E, detectando la disminución en la producción de AICD que se correlacionó con la edad de inicio de PE de los sujetos afectados. En conclusión, la mutación A431E genera un cuadro atípico demencial acompañado de síntomas motores cuya correlación con la presencia y localización de lesiones de la materia blanca cerebral sugiere un origen no neuronal. Aunado a la sobreproducción del péptido A β 43 y a la alteración de la actividad endopeptidasa de GSEC, es probable que la mutación A431E de *PSEN1* muestre un efecto sinérgico patológico responsable del fenotipo particular de sus portadores.

ABSTRACT

Presenilin 1 gene mutations are the most common cause of Familial Alzheimer's Disease (FAD). These mutations generate dementia that may or may not be accompanied by other important neurological alterations such as motor diseases. One of the most frequent mutations of FAD, the A431E of the *PSEN1* gene, induces spastic paraparesis (SP) in many of its carriers. Its effect on the catalytic activity of γ -secretase (GSEC) and its association with the shown phenotype is still unknown. In our study we characterized two A431E mutation carriers, one symptomatic and one presymptomatic, belonging to a Mexican family with a history of SP in all of its affected members. The cognitive and neurological evaluation of the symptomatic patient showed signs of an atypical non-amnesic dementia. Moreover, we found significant olfactory dysfunction and visual capacity impairment in both symptomatic and pre-symptomatic patients. Through magnetic resonance imaging, we found significant cerebral atrophy restricted to parieto-occipital areas and a normal-sized hippocampus, corresponding to Benson's Syndrome. Likewise, we found several pathological changes associated with periventricular, subcortical and deep white matter that correlated anatomically and temporarily with their clinical stage. Through *in vitro* cell assays using mutated human fibroblasts and transgenic mouse embryonic fibroblasts, we demonstrated the alteration of the carboxypeptidase-like activity of GSEC, that favored the production of A β 43 peptide. This highly neurotoxic peptide was also over produced by some other FAD mutations associated with SP and not in those that cause typical dementia, introducing the possibility of a correlation between A β 43 and the motor phenotype. Finally, through *in vitro* GSEC thermoactivity assays, we determined the endopeptidase activity under the effect of the A431E mutation, detecting a decrease in the AICD production that correlated with the age of onset of SP of the affected subjects. In conclusion, the A431E mutation generates an atypical dementia picture accompanied by motor symptoms whose correlation with the presence and location of white matter lesions suggests a non-neuronal origin. In addition to the overproduction of the A β 43 peptide and the alteration of the endopeptidase activity of GSEC, the A431E mutation of *PSEN1* is likely to show a pathological synergistic effect responsible for the particular phenotype of its carriers.

INTRODUCCIÓN

1. La Enfermedad de Alzheimer.

1.1. Definición y epidemiología de la demencia.

La demencia es un síndrome incapacitante que conlleva a la pérdida progresiva e irreversible de las funciones cognitivas. Según cifras obtenidas a través del Estudio de la Carga Global de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo (Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors), en 2016, 43.8 millones de personas padecían demencia en el mundo.¹ Adicionalmente, se calculó una incidencia global anual de 9.9 millones de personas, equivalentes a un nuevo caso cada 3 segundos.² (Figura 1) Debido al alarmante crecimiento epidemiológico

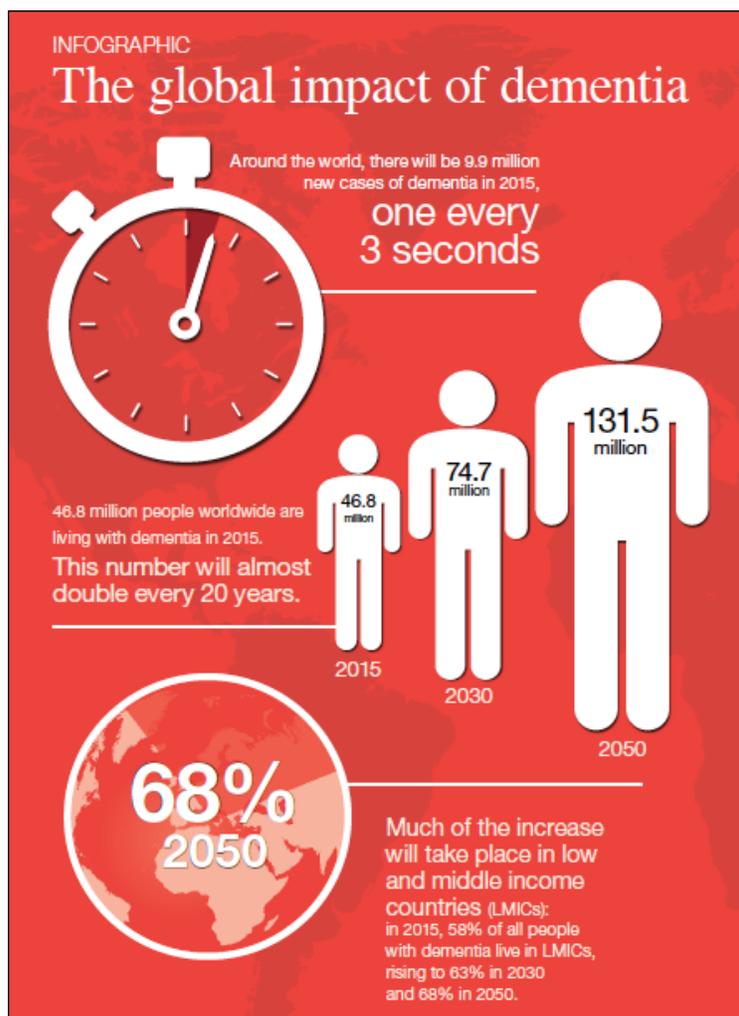


Figura 1. Infografía del impacto global de la demencia publicada por la Organización Internacional de Alzheimer como parte del documento “World Alzheimer Report 2015”.

de la demencia y al fuerte impacto socioeconómico que ello implica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como una prioridad de salud pública en su reporte homónimo del 2013.³ En el mismo, se incluyó un “Plan de Acción Mundial Sobre la Respuesta de Salud Pública a la Demencia 2017-2025” cuyo principal objetivo es mejorar las condiciones de vida de los pacientes, cuidadores y familiares para reducir el impacto de la enfermedad sobre ellos mismos y las comunidades o países a los que pertenecen. (Figura 2)

En México, de acuerdo con los resultados de dos estudios independientes realizados en la primera década del siglo XXI, se estimó una prevalencia de demencia de entre el 7.9% al 8.6% entre el total

de adultos mayores de 60 años.⁴ (Figura 2) A raíz del pronunciamiento de la OMS y en conformidad con los acuerdos alcanzados durante la Cumbre de Líderes Mundiales del G8 en 2013, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en conjunto con la Federación Mexicana de Alzheimer, la Secretaría de Salud y otras instituciones mexicanas, formularon el “Plan de Acción Alzheimer y Otras Demencias” (PAAOD) en 2014.⁵ Este documento plantea diversas estrategias para, entre otras cosas, mejorar el panorama de la atención médica en torno a los pacientes con demencia en México. No obstante, en 2016, la Organización Internacional de la Enfermedad de Alzheimer (ADI, por sus siglas en inglés) reportó las deficiencias del Sistema Nacional de Salud con respecto a la detección y manejo adecuados de dichos pacientes.⁶ En ese sentido, la ADI resaltó la importancia de la capacitación a los médicos de primer nivel de atención dado que la mayoría de ellos, con relación a la creencia popular, considera a la demencia como una consecuencia normal del envejecimiento (i.e. demencia senil) y no como la manifestación de una enfermedad neurológica mayor. Así mismo, instó al cumplimiento inaplazable de los planes y objetivos establecidos en el PAAOD con el fin de solucionar éstos y otros problemas incluidos en el mismo reporte.

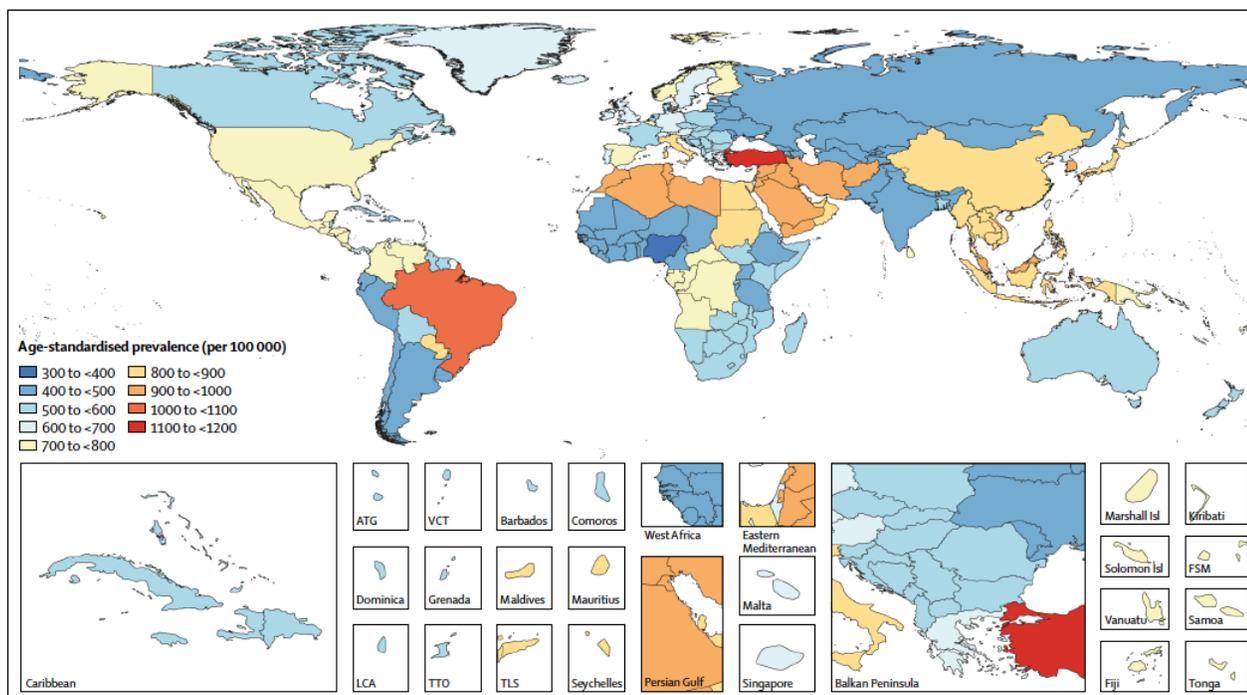


Figura 2. Prevalencia global de demencia estandarizada por edad, por cada 100,000 habitantes. México presenta una prevalencia de 700 a <800 casos.

Cabe mencionar que de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), casi el 50% de la población mexicana se encuentra afiliada al Sistema de Protección Social en Salud del Seguro Popular (SPSS), el cual no incluye a ninguna enfermedad causante de demencia en su “Catálogo Universal de Servicios de Salud” (CAUSES).^{7,8} En

consecuencia, un gran sector de la población en riesgo de demencia, particularmente los adultos mayores de bajos recursos, se encuentra totalmente desprotegido por el Sistema Nacional de Salud. Bajo estas circunstancias, la *invisibilización** de los pacientes con demencia en México conlleva a la subestimación de dicho padecimiento en términos epidemiológicos, económicos y sociales y a la transgresión de los objetivos de la Ley General de Salud†, del PAAOD y de los acuerdos internacionales encabezados por la OMS.

1.2. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer.

La principal causa de demencia en el mundo (60 al 80% de los casos totales) es la Enfermedad de Alzheimer (EA).⁹ La EA es un trastorno neurológico caracterizado principalmente por la pérdida de la memoria reciente y definido por la presencia de dos lesiones cerebrales patognomónicas; las placas amiloides (también conocidas como placas seniles) y las marañas u ovillos neurofibrilares. Dichas lesiones son producto de la agregación patológica de dos proteínas, amiloide beta ($A\beta$) y Tau, halladas principalmente en la neocorteza.⁴ (Figura 3)

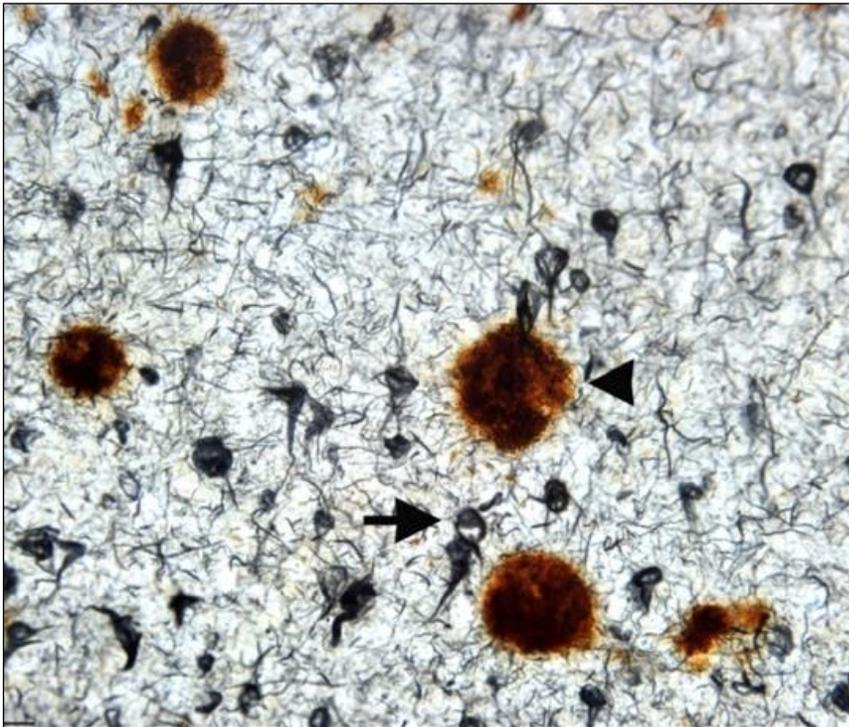


Figura 3. Tinción por inmunohistoquímica de tejido proveniente de la corteza entorrinal de un paciente con Enfermedad de Alzheimer. Las cabezas de flecha señalan a las placas amiloides y las flechas a las marañas neurofibrilares.

* Invisibilización: En las ciencias sociales corresponde a la serie de mecanismos culturales que lleva a omitir la presencia de determinado grupo social.

† Artículo 6º, secciones I y III de la Ley General de Salud.

En general, la EA es un proceso neurodegenerativo que altera la intercomunicación sináptica de las neuronas corticales a través de diversos mecanismos neurotóxicos e inflamatorios como lo son la pérdida de dendritas, la gliosis, la retracción axonal y la propia muerte neuronal, entre otros. Este proceso comienza décadas antes de que el sujeto manifieste algún signo o síntoma y, por lo tanto, su diagnóstico clínico se realiza de forma tardía con respecto al proceso patológico.¹⁰

1.2.1. Cuadro clínico.

La EA es la principal causa de síndrome demencial y, por ende, se caracteriza por la alteración de varias funciones cognitivas.¹¹ Tales funciones son:

• La memoria,
• El juicio,
• La orientación,
• El cálculo,
• El lenguaje,

• La atención,
• Las gnosias,
• Las praxias,
• Las funciones ejecutivas y
• Las habilidades visuoespaciales.

Sin duda una de las funciones cognitivas más afectadas en los pacientes con EA es la memoria. Esto se debe al daño considerable que ocasiona dicha patología en el hipocampo, cuya función más conocida es la formación de la memoria declarativa o episódica. La memoria declarativa es aquella que permite evocar recuerdos específicos de forma consciente. Cuando ésta se deteriora, el paciente experimenta una amnesia anterógrada, volviéndolo incapaz de memorizar acontecimientos recientes a largo plazo. De esta forma, los sujetos con EA no pueden recordar experiencias personales vividas recientemente ni son capaces de guardar información general nueva de su entorno.

Por otra parte, es común que el paciente padezca desorientación espacial, haciéndolo susceptible a extraviarse, inclusive en lugares que haya visitado con frecuencia en el pasado. Además, presenta dificultades para realizar cálculos matemáticos sencillos (sumas y restas), para vestirse o calzarse en el orden adecuado y a menudo parece tomar decisiones no razonadas o carentes de “sentido común”.

Cabe mencionar que el inicio sintomatológico normalmente es de carácter insidioso y la progresión clínica se da de forma gradual, sin embargo, una vez que aparecen los signos y síntomas de deterioro neurocognitivo, éstos son irreversibles. El empeoramiento sintomatológico conlleva a la incapacidad del sujeto para realizar sus actividades básicas de la vida diaria (comer, asearse, vestirse, alimentarse, trasladarse, etc.) volviéndolo eventualmente dependiente de un cuidador. (Figura 4)



Figura 4. Actividades básicas de la vida diaria.

Así mismo, los pacientes con EA pueden presentar otras alteraciones neurológicas no cognitivas relacionadas al daño extendido a otras estructuras craneales del sistema nervioso central (SNC), como lo son crisis convulsivas, ataxia, parkinsonismo o síndromes motores (ver más adelante). No obstante, dichas manifestaciones clínicas se consideran atípicas al no presentarse de forma constante en todos los pacientes.

1.2.2. Diagnóstico.

Para evaluar íntegramente el desempeño cognitivo de un individuo se requiere de un compendio de pruebas escritas, orales y físicas que son aplicadas e interpretadas por el médico especialista en neurología o psiquiatría. Sin embargo, como se mencionó al principio de este texto, la detección oportuna de sujetos con demencia debe poder realizarse desde el primer contacto por el médico general. Para ello existe una batería de herramientas de tamizaje cognitivo presentadas en forma de cuestionarios breves y de aplicación sencilla.¹² La prueba más conocida es el Mini-Mental State Examination[†] (MMSE) la cual evalúa funciones como la orientación temporal y espacial, la memoria inmediata y diferida, la atención, el cálculo, el lenguaje y la

^{*} A excepción de algunos pacientes con antecedentes de delirium (o síndrome confusional agudo) y aquéllos con Enfermedad de Alzheimer Familiar.

[†] Ver anexo 1.

percepción visuo-espacial.¹³ Su puntaje máximo es de 30 aciertos y el punto de corte para la detección de personas con disfunción cognitiva es de 23. Sin embargo, el MMSE posee algunas limitaciones con respecto al estado premórbido de la persona evaluada que deben ser consideradas al momento de su aplicación, por ejemplo:

- La escolaridad.[‡]
- El coeficiente intelectual.
- La presencia de enfermedades concomitantes que agraven el estado cognitivo (depresión, hipotiroidismo, desnutrición, toxicomanías, etc.)
- La disminución de la agudeza visual o la presencia de sordera.

Aunque el MMSE sea considerado el *gold standard* para la evaluación del paciente con sospecha de demencia, actualmente existen otras pruebas de cribado que han demostrado mayor sensibilidad y especificidad para detectar cambios menores presentes en etapas tempranas del deterioro cognitivo leve, como son el Montreal Cognitive Assessment (MoCA)¹⁴, el Addenbrooke's Cognitive Examination III (ACE-III)¹⁵, el Rowland Universal Dementia Assessment Scale (RUDAS)¹⁶ y el Mini-CogTM¹⁷, por mencionar algunos. En general, dichos exámenes se consideran más adecuados para evaluar y detectar las áreas cognitivas afectadas con el fin de perfilar el estado mental del paciente y otorgar una impresión diagnóstica, es decir, tipificar la demencia de forma clínica.¹⁸

Es de suma importancia saber que, aunque existan perfiles cognitivos que se asocian más a la demencia tipo Alzheimer, una proporción significativa de pacientes manifiesta síntomas atribuibles a otros tipos de demencia. Tal comportamiento se explica a razón de la presencia simultánea de más de una enfermedad neurodegenerativa en el individuo, conocida como demencia mixta. Aproximadamente 50% de los cerebros obtenidos de pacientes con demencia presentan características patológicas de dos o más enfermedades demenciales, siendo la combinación de Alzheimer-Vascular la demencia mixta con mayor frecuencia.¹⁹⁻²¹

Dado que el síndrome demencial en el paciente con EA tiene un rango moderado de variabilidad en cuanto a su forma de presentación y puede solaparse con otras causas de demencia, la evaluación de las capacidades neurocognitivas debe correlacionarse con otras características clínicas antes de otorgar un diagnóstico. Así lo establecen las normas internacionales para el diagnóstico de la EA, las cuales son definidas por tres organismos: la Asociación Americana de Psiquiatría a través de la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos

[‡] Existen adaptaciones al español del MMSE para personas analfabetas que son útiles en determinados casos, aunque no se ha comprobado su sensibilidad y especificidad en poblaciones hispanohablantes latinoamericanas.

Mentales (DSM-V, por sus siglas en inglés)²² y el Instituto Nacional del Envejecimiento (NIA, por sus siglas en inglés) en conjunto con grupos de trabajo de la Asociación de Alzheimer, a través de la revisión y actualización de los criterios NINCDS-ADRDA de 1984.^{23,24} (Tabla 1)

Tomando en cuenta que el síndrome demencial se manifiesta en el paciente una vez que ya hay muerte neuronal en la corteza y/o hipocampo, queda claro que toda clasificación diagnóstica, por más temprana que se realice, identifica a los pacientes en una etapa irreversible de su enfermedad. Dicho esto, no es de extrañar que todo tratamiento médico actual para la EA sea únicamente paliativo. Por otra parte, el diagnóstico de EA comprobada por fisiopatología se reserva a aquellos sujetos con evidencia de cambios histológicos asociados a la patología de EA[§], verificada por autopsia.²⁵ Esta comprobación histológica sirve fundamentalmente como dato epidemiológico o para el uso de tejidos para la investigación científica.

	CRITERIOS DE LA NINCDS - ADRDA	CRITERIOS DEL DSM -V
	<input type="checkbox"/> Se cumplan los criterios de demencia.	<input type="checkbox"/> Se cumplan los criterios de un trastorno neurocognitivo mayor o leve. <input type="checkbox"/> Presenta un inicio insidioso y una progresión gradual del trastorno en uno o más dominios cognitivos (en el trastorno neurocognitivo mayor tienen que estar afectados por lo menos dos dominios).
Probable EA	Tiene las siguientes características: A. Inicio insidioso. B. Historia clara de empeoramiento de la cognición. C. Los déficits cognitivos iniciales y más destacados son: a. Presentación amnésica: es la presentación sindrómica más común de la demencia por EA b. Presentaciones no amnésicas: <input type="checkbox"/> Presentación de lenguaje <input type="checkbox"/> Presentación visoespacial <input type="checkbox"/> Disfunción Ejecutiva Aumenta el nivel de certeza cuando: A. Probable demencia por EA con disminución documentada B. Demencia probable por ES en un portador de una mutación genética causante por EA (APP, PSEN1 ó PSEN2)	Tiene las siguientes características: A. Evidencias de una mutación genética causante de la enfermedad de Alzheimer en los antecedentes familiares o en pruebas genéticas B. Aparecen los tres siguientes: a. Evidencias claras de un declive de la memoria y del aprendizaje, y por lo menos de otro dominio cognitivo b. Declive progresivo, gradual y constante de la capacidad cognitiva sin mesetas prolongadas. c. Sin evidencias de una etiología mixta
Posible EA	Tiene las siguientes características: 1. Curso Atípico <input type="checkbox"/> Aparición repentina de deterioro cognitivo <input type="checkbox"/> Demuestra detalles históricos insuficientes <input type="checkbox"/> Documentación cognitiva objetiva de deterioro progresivo 2. Presentación etiológicamente mixta	Si no cumple con ninguno de los criterios de probable EA

Tabla 1. Tabla comparativa de los criterios diagnósticos de Enfermedad de Alzheimer establecidos por la NINCDS-ADRA y el DSM-V.

[§] En conformidad con los criterios establecidos para el diagnóstico post-mórtem de EA (Hyman, 1997).

1.2.3. Patología cerebral y estadificación de Braak.

Si bien los criterios diagnósticos actuales aún consideran al estudio histopatológico post-mórtem de tejido cerebral como el único método confirmatorio de EA, la realización de necropsias en los individuos fallecidos por demencia está sujeta a la autorización legal de sus familiares y solo se realiza en circunstancias hospitalarias. En este escenario, es natural que los cambios patológicos encontrados en el cerebro de dichos individuos sean numerosos y reflejen primordialmente las consecuencias desencadenadas por la patología principal.²⁶ (Figura 5) El cerebro característico de un paciente con EA avanzado presenta las siguientes alteraciones:

A. Cambios macroscópicos:

- a. Atrofia cortical global y del hipocampo.
- b. Dilatación ventricular.
- c. Degeneración de la materia blanca.

B. Cambios microscópicos:

- a. Numerosas placas amiloides (extracelulares) y marañas neurofibrilares (intracelulares) en la neocorteza. Éstas se hallan distribuidas, de mayor a menor frecuencia, en los lóbulos temporales, parietales, frontal y occipital.
- b. Neuritas distróficas alrededor de las placas amiloides.
- c. Neuronas apoptóticas.
- d. Desmielinización axonal.
- e. Astrogliosis.
- f. Microglía activada.
- g. Infiltración monocítica perivascular.
- h. Degeneración vascular (capilares) y, en ocasiones, microhemorragias.

Por muchos años, para poder observar los cambios cerebrales tempranos en los pacientes con EA se han estudiado cerebros de sujetos diagnosticados con demencia en diferentes etapas clínicas de la enfermedad que fallecieron por causas ajenas a la EA. Actualmente, con la ayuda de nuevas técnicas de neuroimagen como el marcaje de A β cerebral con el compuesto Pittsburgh-B visualizado por PET-CT (PiB-PET-CT), es posible observar la formación de placas amiloides en pacientes vivos.^{27,28} No obstante, según las recomendaciones de la NIA para el diagnóstico del Alzheimer, estas pruebas solo deben usarse para la investigación científica y no como método diagnóstico.²⁴

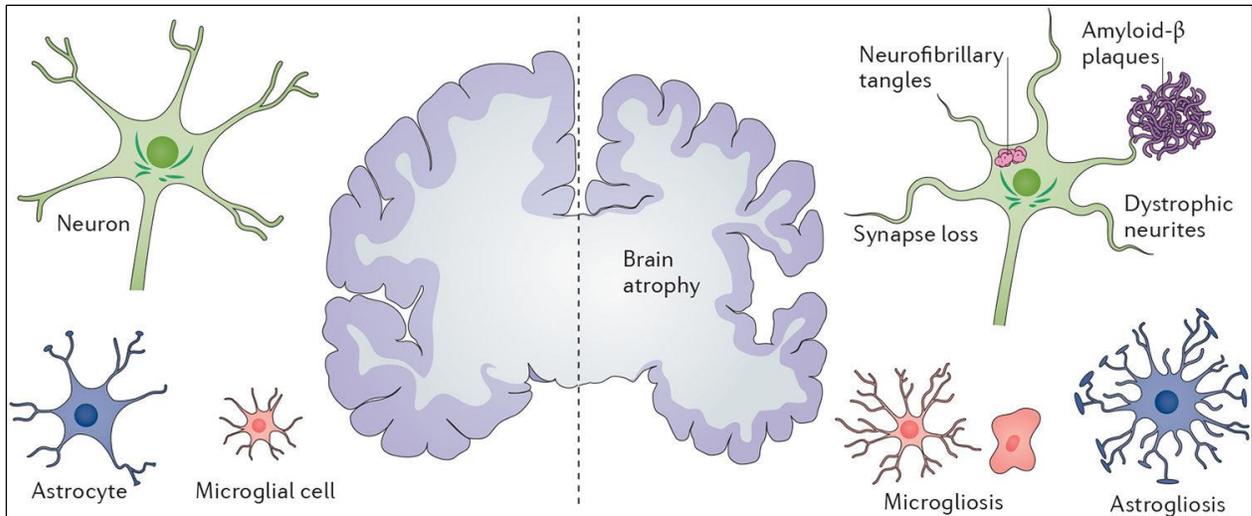


Figura 5. La Enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de atrofia cerebral asociada a la pérdida de sinapsis y neuronas. A nivel microscópico, además de la acumulación de $\text{a}\beta$ y pTau , también hay astrogliosis y microgliosis, que se refiere a la activación patológica de las células de la microglía y los astrocitos.

Lo anterior se debe, entre otras cosas, al hallazgo de placas amiloides en cerebros de sujetos sanos sin deterioro cognitivo. Aunque se ha demostrado que en los individuos con EA hay un mayor número de placas amiloides que en los sujetos sanos, estas diferencias no son tan claras en etapas más tempranas de la enfermedad. (Figura 6) Esto fue descrito en 1991 por los doctores Heiko y Eva Braak quienes, al estudiar cerebros de pacientes con demencia, encontraron que las placas amiloides se depositan en un patrón de distribución constante únicamente en etapas avanzadas de la EA, encontrando mayor variabilidad entre individuos en etapas tempranas e intermedias.²⁹

A diferencia de las placas amiloides, los doctores Braak encontraron que dos lesiones relacionadas a la agregación anormal de la proteína Tau hiperfosforilada (pTau) mostraban un patrón invariable de distribución cerebral que correlacionaba con la etapa de la EA en la que se encontraba el paciente al momento de fallecer. Estas lesiones son:

- **Marañas u ovillos neurofibrilares:** Inclusiones intracitoplasmáticas localizadas fundamentalmente en el soma neuronal.
- **Hilos del neurópilo:** Inclusiones filamentosas en dendritas.

En efecto, al demostrarse dicha correlación, se determinó que las lesiones causadas por la acumulación anormal de pTau servirían como una buena herramienta para la estadificación

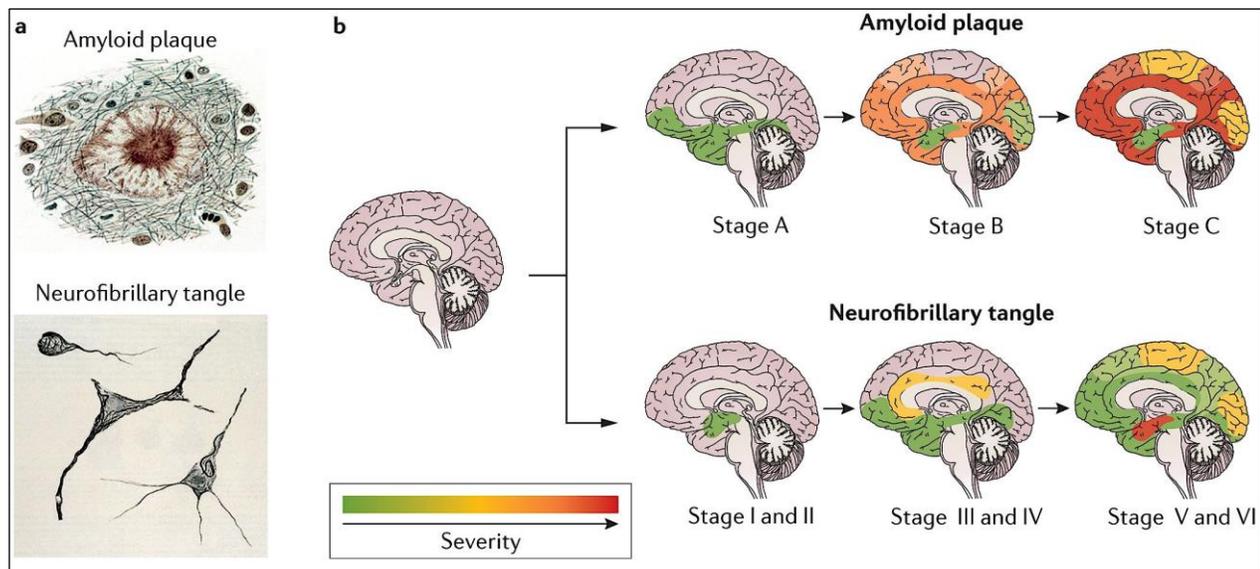


Figura 6. En casos típicos de EA, la deposición del $A\beta$ precede a la patología de Tau y a los cambios neuríticos, originándose en los lóbulos temporales y frontal, el hipocampo y el sistema límbico (fila superior). Con menor frecuencia, la enfermedad parece originarse en otras zonas del neocórtex (lóbulos parietales y occipital) y presenta mínimos cambios en el hipocampo. Las marañas neurofibrilares comienzan a depositarse en la zona medial de los lóbulos temporales y el hipocampo, para posteriormente extenderse a otras áreas de la neocórtex (fila inferior).

patológica de la EA, creándose así la escala de Braak. Actualmente, gracias a estudios histopatológicos más extensos y al uso de modelos transgénicos de la EA, se sabe que la velocidad de deposición de pTau en la neocórtex tiene una correlación directa con la progresión clínica en los pacientes, dando lugar al segundo paradigma más importante del estudio científico del Alzheimer: la patología derivada de la acumulación anormal de la proteína pTau en las neuronas corticales conlleva al desarrollo del síndrome demencial en la EA.³⁰

Sin embargo, a pesar de la innegable evidencia científica que existe a favor de la proteína pTau, también existen numerosos datos clínicos y experimentales que señalan al $A\beta$ como el factor desencadenante de la patología detrás de la demencia tipo Alzheimer.³¹ Ésta es la base del paradigma central de la EA llamado “La hipótesis de la cascada amiloide” y su argumento principal se centra en la etiopatogenia de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF).

2. La Enfermedad de Alzheimer Familiar.

2.1. Diferencias y similitudes entre la EAE y la EAF.

De acuerdo con su etiología, la EA se clasifica en dos subtipos: la Esporádica (EAE) de causas multifactoriales y la Familiar de origen hereditario. La EAE abarca el 99% de todos los casos de EA, haciéndola la más frecuente de las dos variantes.^{32,33} Aunque se conocen factores de riesgo específicos que contribuyen en diferente grado a la aparición de la EAE, ninguno de ellos es determinante de la enfermedad, es decir, la presencia única de cada factor no es suficiente para desencadenar la patología en el individuo. Por el contrario, la EAF es una enfermedad monogénica, por lo que basta presentar una de sus mutaciones asociadas para desencadenar el fenotipo. A pesar de representar menos del 1% de los casos totales, gracias a sus características genéticas y a las similitudes que guarda con la EAE, la EAF es el prototipo actual para el estudio de la patogénesis de la EA tanto en el paciente como a nivel experimental.³⁴

Clínicamente, ambos tipos de EA causan un síndrome demencial amnésico en la mayoría de los sujetos afectados y producen las mismas lesiones patognomónicas en el cerebro, como lo son la atrofia cortical generalizada, la degeneración del hipocampo y la acumulación de A β y pTau en forma de placas amiloides y marañas neurofibrilares. Sin embargo, existen también diferencias clínicas significativas entre la EAE y la EAF, las cuales son:

a. La edad promedio de inicio sintomatológico:

La mayoría de los pacientes con EAF debutan antes de los 60 años (rango entre 24 y 71 años). A estos pacientes se les clasifica dentro del grupo de Alzheimer de inicio temprano (EA-ITe), aunque no todos los pacientes con EA-ITe padecen EAF.³⁵

b. La severidad de la enfermedad:

El curso clínico de los pacientes con EAF es típicamente más severo, con una progresión más rápida de la enfermedad.³⁶ No obstante, aquellos con síndromes demenciales atípicos no amnésicos suelen presentar un deterioro cognitivo paulatino. De igual forma, los pacientes con demencia mixta o con EAE portadores de polimorfismos de riesgo** pueden presentar fenotipos más severos, reminiscentes a los vistos en la EAF.³⁷

c. La presencia de signos y síntomas no demenciales:

Aproximadamente 20% de las mutaciones de EAF reportadas causan algún padecimiento no relacionado con el estado cognitivo.^{38,39} Las alteraciones más frecuentes son las motoras, como las mioclonías y la paraparesis espástica. También es común encontrar pacientes con crisis epilépticas o padecimientos cerebelares como la ataxia.

** El polimorfismo de riesgo más importante en la EAE es APOE4. Confiere 2 veces más riesgo de padecer EA (que la población general) cuando se expresa en forma monoalélica y hasta 11 veces más cuando lo hace de forma bialélica.

d. El hallazgo de placas amiloides centro-difusas llamadas “placas de lana de algodón”:

Las placas de lana de algodón son agregados de A β que a la tinción se observan más claras en el centro y densas en la periferia. Éstas se han descrito únicamente en algunos pacientes con EAF y coexisten con las típicas placas amiloides, aunque presentan una distribución distinta en el cerebro.^{40,41} Se han asociado a la presencia de angiopatía amiloide cerebral (AAC), una enfermedad causada por la acumulación perivascular de A β .⁴²

En el mismo contexto clínico, las mutaciones de EAF generan fenotipos particulares que las diferencian entre sí. Dado que estas mutaciones afectan el funcionamiento normal de las proteínas en las que se encuentran, se asume que estas diferencias clínicas derivan de la alteración de alguna de dichas funciones. Sin embargo, las semejanzas que guardan la EAF y la EAE en torno al síndrome demencial que causan, sugiere que poseen uno o varios mecanismos patogénicos en común. Para descubrirlos, es primordial conocer las características genéticas de la EAF y su funcionamiento normal en el sujeto sano.

2.2. Características genéticas de la EAF.

La EAF es causada por mutaciones autosómico-dominantes en tres genes: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. La mayoría de estas mutaciones tienen penetrancia completa y por lo tanto segregan con el fenotipo.⁴³ Esto significa que todos los portadores manifestarán la enfermedad invariablemente durante su vida. Actualmente se han reportado más de 300 mutaciones, 11% en *APP*, 85% en *PSEN1* y 4% en *PSEN2*, las cuales se encuentran de forma heterocigota, a excepción de dos casos (ver más adelante).⁴⁴ Así mismo, aunque la mayoría de ellas corresponden a cambios puntuales, también se han reportado deleciones, inserciones y duplicaciones.

A continuación, se detallan las características principales de cada gen y las mutaciones que en ellos se presentan:

A. *APP*:

- a. Corresponde al gen de la proteína precursora de amiloide (APP) y, como lo indica su nombre, es la proteína de la cual se origina el A β .

- b. En el humano se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 21 (21q21.3).
- c. Se compone de 18 exones cuyo procesamiento por *splicing* alternativo genera 11 isoformas.
- d. Su expresión es ubicua, pero en el SNC únicamente se expresan tres isoformas: APP695, APP751 y APP770.
- e. Es el único gen donde se han reportado duplicaciones cromosómicas causantes de EAF. Algunas de éstas presentan penetrancia incompleta.⁴⁵
- f. El resto de las mutaciones puntuales se localizan únicamente en los exones 16 y 17 los que, al traducirse, corresponden a la región de la proteína que dará origen al A β .

B. PSEN1:

- a. Este gen codifica para la proteína presenilina 1 (PS1), una aspartato-proteasa que, en conjunto con otras tres proteínas, forma el complejo γ -secretasa (GSEC), responsable del procesamiento enzimático de la APP en A β .
- b. Se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 14 humano (14q23.4).
- c. Tiene 12 exones y 7 isoformas, de las cuales la más abundante es la de 467 aminoácidos.
- d. Todas las mutaciones de EAF reportadas en este gen se localizan dentro de los exones 4 a 12.

C. PSEN2:

- a. Se traduce en la proteína presenilina 2 (PS2), componente catalítico alternativo de la GSEC.
- b. Gen parálogo de *PSEN1*, con 67% de homología de secuencia.
- c. En el humano se halla codificado en el brazo corto del cromosoma 1 (1q42.13).
- d. Se conforma de 12 exones y posee 3 isoformas, de las cuales la más abundante es la de 448 aminoácidos.
- e. Es el único gen que posee mutaciones puntuales con penetrancia incompleta.⁴³
- f. Algunas de sus mutaciones causan un inicio sintomatológico tardío (EA-ITa).

La mayoría de las mutaciones de EAF reportadas se han encontrado en sujetos europeos, sin que esto signifique *per se* una predisposición por ancestría genética. Lo anterior se justifica en el hecho de que, en países en vías de desarrollo como los que conforman Latinoamérica o gran parte de África, no se realizan estudios genéticos confirmatorios en pacientes con fenotipo de EAF. No obstante, hasta el momento se conocen dos mutaciones de origen latinoamericano; la E280A (Paisa) y la A431E (Jalisco) en *PSEN1*.

Cabe señalar que aproximadamente en el 50% de los casos de demencia tipo Alzheimer con herencia autosómico dominante (EA-AD) no se encuentran mutaciones en ninguno de los tres genes principales de la EAF, además de desconocerse el defecto genético involucrado.³⁵ Sin embargo, recientemente se han reportado mutaciones en los genes *SORL1* y *NOTCH3* en familias con antecedentes de demencia tipo Alzheimer.^{46,47} Éstas, además, segregan con la enfermedad y tienen un patrón de herencia autosómico dominante.

2.3. Mecanismos moleculares elementales en la patogénesis de EAF.

Si bien la mitad de los casos de EA-AD tiene un origen desconocido, todos los pacientes con EA presentan características clínicas y patológicas muy similares. En particular, la sobreproducción de especies tóxicas de A β , su acumulación y la formación de placas amiloides, se presenta en ambos tipos de EA y, en el caso particular de la EAF, es una consecuencia producida por todas sus mutaciones causales conocidas. En la búsqueda de una teoría universal para la EA, es evidente que el primer camino por seguir era el de la investigación de los fenómenos que conllevan al desequilibrio del rol biológico del A β , comenzando por los procesos catalíticos que lo producen.

2.3.1. Vías de procesamiento de la APP.

La APP es una proteína transmembranal tipo I, de entre 695 y 770 aminoácidos, que cuenta con un extremo carboxilo-terminal intracelular corto y un amino-terminal extracelular largo.⁴⁸ Al igual que otras proteínas, es sintetizada en el retículo endoplásmico y se dirige a la membrana plasmática a través de la red trans-Golgi (RTG) por medio de vesículas. Aproximadamente 90% de APP permanece en un estado estable en la RTG y el 10% restante alcanza la membrana plasmática donde es sometida a una serie de procesos catalíticos.⁴⁹ Estos se clasifican,

dependiendo de su capacidad para generar $a\beta$ como su producto final, en vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas.^{††} (Figura 7)

La vía amiloidogénica clásica es la de β -secretasa o BACE1 y su contraparte, la vía no amiloidogénica de α -secretasa o ADAM10.⁵⁰ Sin embargo, en tiempos recientes se han descubierto más enzimas capaces de comenzar vías alternas de procesamiento de APP. Tales son: la vía de η -secretasa o de las metaloproteasas MT1, MT2, MT3 y MT5 y la vía de θ -secretasa o de BACE2.^{51,52} No obstante, las vías clásicas del procesamiento de APP suceden con mayor frecuencia que las otras y, por consiguiente, son las más conocidas.

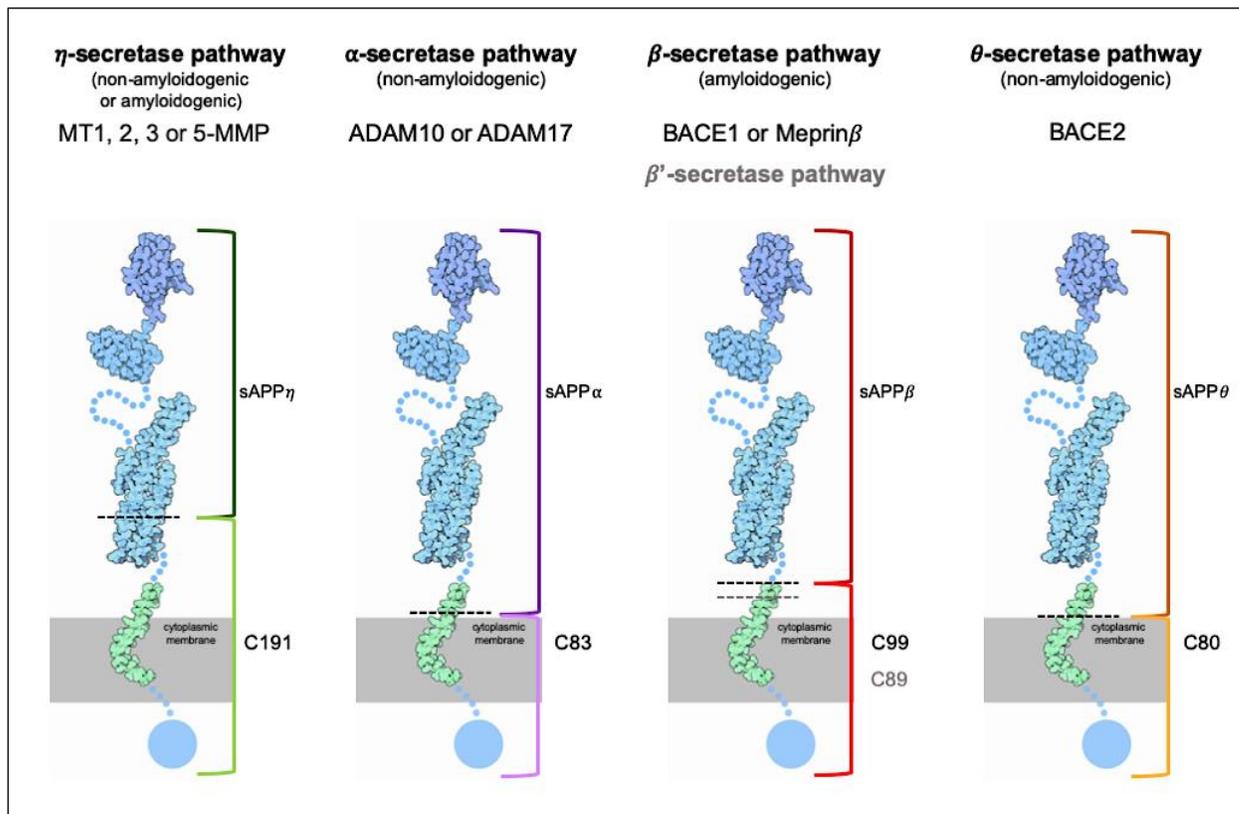


Figura 7. Vías de procesamiento de APP. El sitio de corte de cada enzima se indica con una línea punteada. Los fragmentos secretados de APP (sAPPx) varían en tamaño dependiendo de la vía por la que se procese. Así también, la porción C-terminal de APP (Cx) que quedará anclada a la membrana para ser posteriormente procesada por GSEC.

La vía no amiloidogénica inicia con ADAM10, aunque se ha comprobado la participación, a menor escala, de otras enzimas de la misma familia de “a disintegrin and metalloprotease”^{‡‡} como ADAM17, ADAM9 y ADAM19.⁵³ Esta vía comienza con un corte que libera el fragmento

^{††} Aunque son los términos correctos para dirigirse a estas vías, se está tratando de abandonar su uso debido a la connotación de patogenicidad que se le da a la vía amiloidogénica, siendo que ésta sucede de forma normal en el humano.

^{‡‡} ADAM es un acrónimo. El nombre completo de esta familia de proteínas se traduce al español como “una disintegrina y metaloproteasa”.

extracelular sAPP α , dejando el resto del péptido conocido como C83 adherido a la membrana. Posteriormente, este fragmento es procesado por la GSEC para generar un péptido denominado “dominio intracelular de APP” (AICD) y un péptido P3.

Por otra parte, la vía amiloidogénica por BACE1 inicia realizando un corte que libera al fragmento sAPP β y genera un péptido C99 que permanece anclado a la membrana celular. Dicho fragmento también es escindido por GSEC, pero además de generar AICD, libera al péptido A β . Así mismo, BACE1 es capaz de procesar a APP de forma alternativa a en un sitio de corte denominado β' (beta prima) con el cual generará un fragmento sAPP β' más largo y un péptido transmembranal C89.⁵⁴ Contrario a lo que podría pensarse, este C89 al ser cortado por GSEC también genera a β , pero este es 10 aminoácidos más corto por el extremo N-terminal. Por tal motivo se le conoce como a β N-terminal truncado y también se le ha identificado como parte de las placas amiloides.⁵⁵

La APP permanece en la membrana pocos minutos esperando a ser procesada. Cuando no lo logra, entonces es endocitada y toma cualquiera de los tres caminos siguientes: a) se dirige de nueva cuenta a la RTG, b) se degradada en la vía lisosomal o c) se procesa en las vesículas endocíticas a través de BACE1 y retorna a la membrana plasmática para ser cortada por GSEC.⁵⁶

Las vías clásicas amiloidogénica y no amiloidogénica compiten entre sí por su sustrato por lo que son mutuamente excluyentes. Suceden de forma normal en el individuo sano, sin embargo, en un estado de homeostasis, la vía no amiloidogénica es más frecuente que su contraparte. En los pacientes con EAE, ciertos polimorfismos en ADAM10 (p. ej. rs466433) y en BACE1 (p. ej. rs4938369) se han correlacionado con un mayor riesgo de padecer demencia.^{57,58} En general, estos polimorfismos causan un aumento en la producción de a β mediante el favorecimiento de la vía amiloidogénica, aunque en muchos no se ha comprobado su mecanismo bioquímico específico. En el caso de los pacientes con EAF, las mutaciones en APP (p. ej. E682K) alteran su procesamiento modificando la interacción entre ésta y las enzimas que la cortan.⁵⁹ Si bien, estas mutaciones pueden favorecer a una vía de procesamiento sobre otra, la mayoría de ellas en conjunto con las mutaciones de PS1 y PS2, modifican la actividad catalítica de GSEC.

2.3.2 La Hipótesis de la Cascada Amiloide.

Más allá de que *APP* fuera el primer gen causal descrito para la EAAD, su descubrimiento como el componente principal de las placas amiloides y la observación de que los pacientes con Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21 = 3x *APP*) desarrollan EA en su vejez, sentaron las bases para el desarrollo de la hipótesis de la cascada amiloide.⁶⁰ (Figura 8) Ésta fue propuesta

por John Hardy en 1991 y sostiene que la acumulación de especies tóxicas de A β es el fenómeno causal de la cascada de eventos que conlleva a la disfunción sináptica, la formación de marañas neurofibrilares intracelulares y la muerte neuronal en los pacientes con EA.⁶¹

Las evidencias científicas más sólidas en favor de ésta son:

- La mutación A673E de *APP* ha mostrado disminuir la producción de A β total y su acumulación. Ésta es la única mutación protectora identificada contra la EA.⁶²
- Aproximadamente 40% de los individuos caucásicos con EAE portan uno o dos alelos épsilon 4 del gen *APOE*.⁶³ Éstos han mostrado un aclaramiento de A β cerebral disminuido y un mayor número de placas amiloides.⁶⁴
- Los oligómeros de A β aislados de cerebros de pacientes con EA e inyectados por vía intraventricular a roedores, disminuyen la densidad sináptica y alteran su capacidad para memorizar.^{65,66}
- Los oligómeros de A β de 42 aminoácidos (A β 42) inducen la hiperfosforilación de tau y causan distrofia neurítica en neuronas de ratón *in vitro*. Este efecto no es observado si se agregan anticuerpos contra el a β de forma simultánea.⁶⁷
- Como se ha demostrado en estudios humanos para la búsqueda de biomarcadores, los niveles bajos de A β 42 en líquido cefalorraquídeo (LCR) y escaneos por PET-CT positivos a amiloide, suceden años antes de que se presenten otro tipo de cambios relacionados con la EA (pTau en LCR, atrofia cerebral y la demencia clínica).⁶⁸
- La sobreexpresión de *APP* en ratones conlleva a la formación de placas amiloides y en especies de *Drosophila* causa neurodegeneración.^{69,70}
- En algunos sujetos en etapas tempranas de la EA y con carga cerebral aumentada a β , la inmunización contra el péptido mejora su capacidad cognitiva.⁷¹

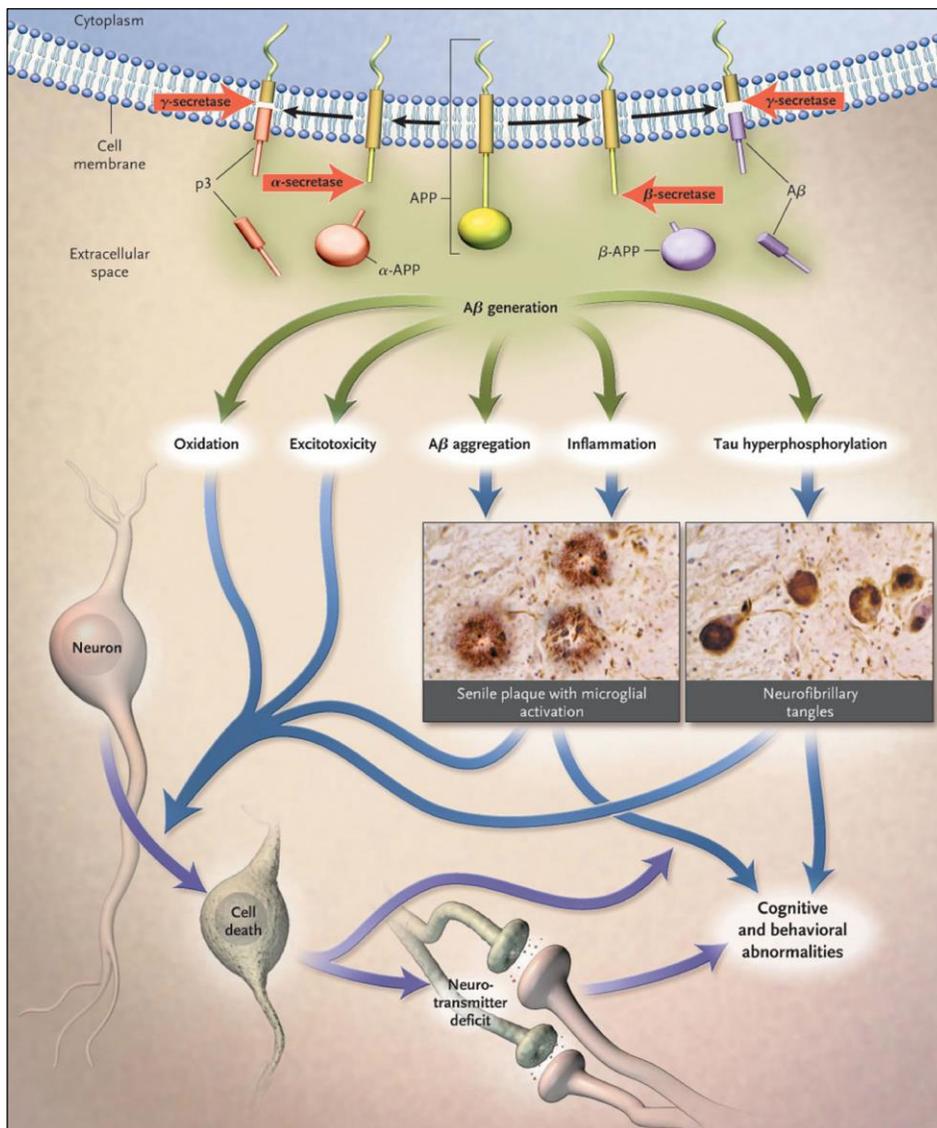


Figura 8. La hipótesis de la cascada amiloide.

Si bien existe evidencia suficiente para avalar la hipótesis de la cascada amiloide, también la hay para contradecirla, si acaso, en parte.⁷² Uno de los detractores más conocidos para dicha hipótesis proviene de los modelos transgénicos en roedores, en los cuales no ha sido posible reproducir fielmente la enfermedad. La primera observación en estos modelos fue que la sola presencia de una mutación en *APP*, *PSEN1* o *PSEN2* no produce placas amiloides ni desencadena el fenotipo en el ratón.⁷³ Además, al sobreexpresarse *APP*, se forman placas, pero no marañas neurofibrilares y no se manifiesta algún dato de neurodegeneración o de daño cognitivo.⁷⁴ Bajo este contexto, fue necesario introducir más de una mutación en distintos genes para generar cambios similares a los vistos en los pacientes con EA. Por ejemplo, el ratón triple transgénico 3xTg que contiene la mutación KM670/671NL (Sueca) de *APP*, la mutación M146V de *PS1* y la mutación P301L de *Tau* o el ratón quintuple transgénico 5xFAD que contiene las

mutaciones KM670/671NL, I716V (Florida) y V717I (Londres) de APP y las M146L y L286V de PS1.

En el humano, las principales evidencias en contra de la hipótesis de la cascada amiloide provienen de los protocolos experimentales para el tratamiento de la EA. Tal es el caso de los anticuerpos anti-A β como el célebre aducanumab, un anticuerpo monoclonal IgG1 humano con alta afinidad por un epítoto conformacional de A β . Dicho fármaco demostró resultados alentadores en cuanto a la reducción dosis dependiente del deterioro cognitivo medido por MMSE y la escala de clasificación de demencia clínica (CDR, por sus siglas en inglés).⁷⁵ No obstante, en marzo de 2019 se anunció la discontinuación en la fase 3 de sus estudios clínicos (ENGAGE y EMERGE) por no alcanzar las metas de eficacia trazadas.^{76,77}

Otro ejemplo es el solanezumab, un anticuerpo monoclonal IgG1 con afinidad por la parte media del monómero de A β , cuyo exiguo efecto en los pacientes con demencia moderada demostró su futilidad para el tratamiento de estos.⁷⁸ Cabe mencionar que el solanezumab había demostrado no solo disminuir sino revertir el declive cognitivo en el ratón transgénico de EA. Así mismo, el gantenerumab, un anticuerpo monoclonal IgG1 con afinidad subnanomolar para un epítoto conformacional de las fibrillas de A β , cuyas fases 2 y 3 (llamadas SCarlet RoAD y Marguerite RoAD trials) han sido interrumpidas por no superar la prueba de futilidad provisional a pesar de demostrar una reducción significativa de la carga de A β cerebral en el humano.⁷⁹ No obstante, tanto el solanezumab como el gantenerumab, se encuentran actualmente en pruebas de fase 3 supervisadas por la Red de Alzheimer Dominante Hereditario (DIAN, Dominantly Inherited Alzheimer Network) para determinar su eficacia en pacientes con EAF en fase asintomática.⁸⁰ Dichas pruebas, llamadas DIAN-TU, incluyen pacientes de países latinoamericanos como Colombia y planean incluir por primera vez a pacientes mexicanos.

Por otra parte, el uso de fármacos inhibidores de la vía amiloidogénica de BACE1 o GSEC ha demostrado provocar efectos deletéreos en humanos, a pesar de su relativa eficacia para disminuir la carga de a β cerebral. Tal es el caso del atabecestat, una molécula pequeña (small-molecule) que funciona como inhibidor no selectivo de BACE, cuyas pruebas clínicas fueron discontinuadas al observarse una elevación significativa de enzimas hepáticas y un paradójico empeoramiento cognitivo en los sujetos tratados.⁸¹ Esto se debe, en principio, por las funciones extra-amiloidogénicas de BACE1 y BACE2, como su participación en la mielinización en el SNC y periférico.⁸²⁻⁸⁴ Por esta razón, actualmente se busca probar inhibidores selectivos o semi-selectivos de BACE1, como lo es elenbecestat o umibecestat, cuya afinidad por BACE1 es mucho mayor a BACE2.⁸⁵ Sin embargo, en julio de 2019, se anunció la cancelación de las pruebas

GENERATION 1 y 2 debido al empeoramiento clínico y mayor atrofia cerebral mostrados en los sujetos tratados con umibecestat en comparación con aquellos que recibieron placebo.

En conclusión, la hipótesis de la cascada amiloide sigue siendo un referente importante en el estudio científico y clínico de los pacientes con EA. La evidencia experimental que la sostiene es insoslayable y ha contribuido en gran parte al conocimiento actual de la enfermedad. Sin embargo, es probable que dicha hipótesis requiera modificaciones considerables que permitan resolver las cuestiones que ésta ha fallado en responder. Para ello, el primer paso es reconocer el papel fisiológico de las proteínas involucradas en la patología de la EA y diseñar protocolos experimentales que permitan conocer dichas funciones en el contexto de salud y enfermedad.

ANTECEDENTES

3. Enfermedad de Alzheimer Familiar causada por mutaciones en *PSEN1*.

Como se mencionó en el apartado anterior, la mayoría de las mutaciones asociadas a la EAF se encuentran en el gen *PSEN1* que codifica para la proteína PS1.⁴⁴ Esta proteína es una enzima que se expresa en la membrana celular como parte del complejo GSEC. En el humano, su expresión es más alta en leucocitos, seguido por el sistema nervioso central y periférico. En el cerebro su expresión es primordialmente neuronal, no obstante, también se expresa en células de la glía.⁸⁶ Además de APP, se le conocen más de cien sustratos entre los que se encuentran proteínas indispensables para la organogénesis y el neurodesarrollo como Notch, neuregulina 1 (Nrg1) y el receptor tirosina cinasa 4 (ErbB4).⁸⁷ Por consiguiente, la pérdida total de su función es incompatible con la vida, como se demuestra en los modelos murinos doble *knockout* del gen *PSEN1*, los cuales presentan múltiples aberraciones en su desarrollo embrionario y mueren poco después de nacer.⁸⁸ Sin embargo, a pesar de ser una proteína imprescindible para una variedad de procesos biológicos, gran parte del conocimiento que se tiene de ésta proviene del estudio de la EA y su rol como la enzima productora de A β .

3.1 Presenilina 1 y el complejo γ -secretasa

Presenilina 1 es una hidrolasa de corte intramembranal (I-CliP, intramembrane-cleaving protease) de 52.6 KDa con nueve dominios transmembranales (DT1 a 9) y dos asas intracitoplasmáticas cuya función catalítica se lleva a cabo por dos residuos de aspartato (asp257 y asp385) localizados en los DT6 y DT7.⁸⁹ (Figura 9) Ésta se sintetiza como una proteína monomérica en el retículo endoplásmico y requiere de un proceso de autocatálisis endoproteolítica en el exón 9 (residuos 290 a 319) que la divide en dos partes heterodiméricas, el fragmento N-terminal (NTF) y el fragmento C-terminal (CTF), para poder activarse y realizar sus funciones catalíticas. Dentro de las vesículas de la RTG, PS1 se acopla a las proteínas presenilin enhanced 2 (PEN2), anterior pharinx-defective 1 (APH-1) y nicastrina (NCT) para formar el complejo GSEC, conservando una proporción estequiométrica de 1:1:1:1. (Figura 10) A pesar de que no se conocen con exactitud algunas de las funciones de estas proteínas, se sabe que APH-1 influye en la selectividad de GSEC por sus distintos sustratos⁹⁰, NCT participa en la estabilización de éste para su procesamiento⁹¹, y PEN2 promueve la endoproteólisis de activación

de PS1 y le confiere estabilidad a través de la interacción directa con sus dominios transmembranales⁹².

Al llegar a la membrana plasmática, el complejo GSEC se incrusta dentro de regiones ricas en colesterol llamadas balsas lipídicas.⁹³ Éstas permiten que GSEC se transporte con facilidad a lo largo de la membrana plasmática, mayormente fluida por su alta composición fosfolipídica, y se dirija al polo celular donde se requieran sus funciones. Además, este desplazamiento lo realiza en conjunto con otras de las enzimas asociadas a su actividad catalítica como lo son ADAM10 o BACE1.

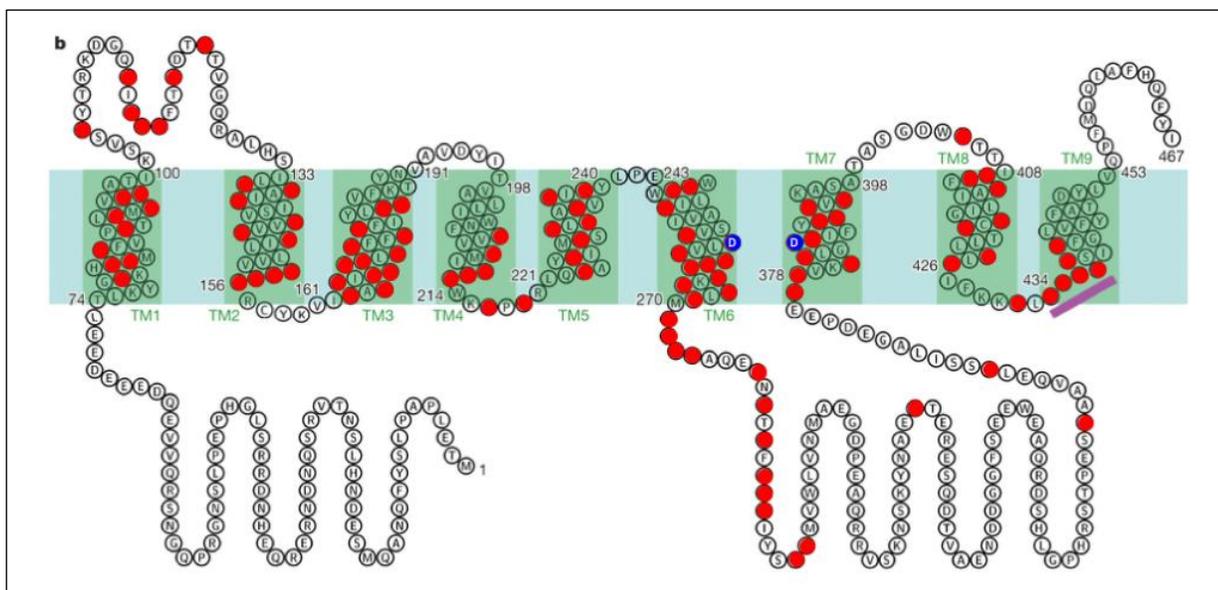


Figura 9. Secuencia y topología de Presenilina 1. En rojo se indican algunos de los aminoácidos en donde se han encontrado mutaciones puntuales causantes de EAF. En azul se muestran los residuos catalíticos de aspartato.

3.1.1. Dinámica y actividad catalítica de PS1.

Los DTs de PS1 poseen una gran flexibilidad y capacidad de movimiento a consecuencia de las interacciones químicas débiles mantenidas entre ellos mismos y la membrana lipídica.⁹⁴ Dicha flexibilidad les permite adoptar diferentes configuraciones espaciales que facilitan la entrada, posicionamiento y catálisis del sustrato en el bolso o poro catalítico (PC).⁹⁵ A través de ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés) y de criomicroscopía electrónica se observó la existencia de tres estados conformacionales de la GSEC en la membrana celular: abierta, semiabierta y cerrada.⁹⁶ (Figura 10) Tales configuraciones dependen de la posición de los DT2 y DT3 de PS1 y de su distancia en relación a los residuos asp257 y asp385, es decir, al sitio activo (SA) de GSEC. La configuración cerrada le corresponde a una GSEC inactiva con un diámetro de 11.6 Å en el SA y una distancia de 14 Å entre el SA y el

DT2. Al ser inactiva, la GSEC no es capaz de introducir sus sustratos al poro catalítico ni de procesarlos. Por el contrario, la GSEC abierta permite la entrada del sustrato, pero su actividad enzimática es deficiente debido a la amplia distancia entre los dos aspartatos del SA (i.e. 13.4 Å). Es así que la configuración semiabierta corresponde al estado ideal de GSEC para llevar a cabo sus funciones catalíticas. Esto se debe a que posee una distancia más adecuada del SA (i.e. 10.7 Å) y un área lo suficientemente amplia para colocar y sostener al sustrato dentro del PC.

Si bien aún no se comprueba que dichos estados transicionales existan en condiciones naturales en el humano, a decir de los datos obtenidos por criomicroscopía electrónica del complejo GSEC

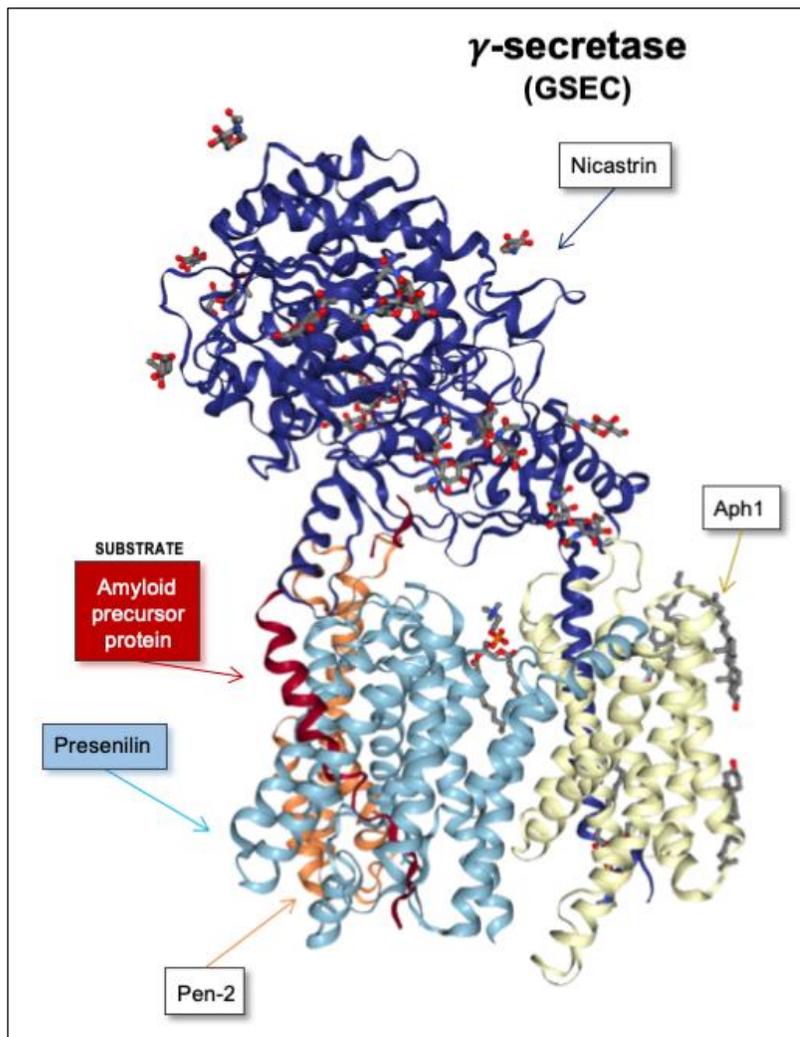


Figura 10. Estructura de GSEC al reconocer a APP obtenida por criomicroscopía electrónica. PDB ID: 6IYC.

en su estado libre de sustrato y en comparación con su estado asociado al péptido Notch-100, es evidente que la enzima sufre un reacomodo significativo de sus DTs para facilitar la interacción con sus sustratos.⁹¹ Este modelo dinámico de la actividad de GSEC no solo ayuda a entender el funcionamiento normal de la enzima, sino también los efectos causados por las mutaciones de EAF que se explicarán más adelante.

En su estado libre de sustrato, el PC se encuentra ocupado por una larga asa intracitoplásmica que solía conectar a DT6 y DT7 en la PS1 inactiva, que una vez libre y en su estado maduro funciona como un tapón que previene la entrada de sustratos por su lado citoplásmico. Una vez que el sustrato es reclutado hacia la GSEC^{§§}, los DT2 y DT3 se separan y permiten la entrada de éste al PC, el cual deberá estar vacío, excepto por el agua necesaria para la catálisis hidrolítica dentro del ambiente hidrofóbico de la membrana plasmática.⁹⁵ Al mismo tiempo, los DTs de los fragmentos NTF y CTF de PS1 se acomodan alrededor del sustrato, colocándose ambos aspartatos uno frente a otro y a cada lado de la cadena peptídica que cortarán. Este alineamiento paralelo de los aspartatos en el SA es indispensable para el procesamiento adecuado del sustrato. Por otra parte, en el sitio de entrada del sustrato, este último se ancla al borde extracelular de PS1 y se estabiliza a través de la formación de enlaces químicos (p. ej. puente disulfuro con la lisina 28 de APP-C99) con los residuos 241-242 de NCT.⁹⁷ Estas maniobras garantizan la permanencia del sustrato dentro del PC de GSEC durante su procesamiento enzimático y evitan su liberación prematura.

Una vez acomodado el sustrato dentro del PC, éste comienza a desenrollarse en su porción transmembranal más cercana al SA bajo la influencia de los DTs de PS1 que lo rodean. Este desenrollamiento revela los enlaces peptídicos escindibles del sustrato, dando pie a su hidrólisis.^{59,98} No obstante, la GSEC corta a sus sustratos a través de dos procesos catalíticos distintos: la actividad endopeptidasa y la actividad carboxipeptidasa-*like*.⁹⁹

La **actividad endopeptidasa**, también llamada corte épsilon ($-\epsilon$), es aquella que genera los dominios intracelulares (ICDs) cuya función es la regulación transcripcional de diversos genes.¹⁰⁰ Todos los sustratos conocidos de GSEC son procesados por el corte- ϵ . Por ejemplo, el péptido Notch 1, después de ser procesado por la enzima furina y alguna otra de la familia ADAM (p. ej. ADAM17), se convierte en el péptido llamado “truncación extracelular de Notch” (NEXT, por sus siglas en inglés) el cual es sustrato directo de GSEC y cuyo producto final es el dominio intracelular de Notch (NICD).¹⁰¹ Así mismo, este corte produce al péptido AICD a partir de APP-C99 y dependiendo del sitio donde realice el corte, generará AICD₄₉ o AICD₅₀ de 51 y 50 aminoácidos respectivamente.^{102,103} Posterior al corte- ϵ , los ICDs producidos son liberados hacia el citoplasma y posteriormente transportados hasta el núcleo celular.

^{§§} La presentación del sustrato con GSEC se lleva a cabo por medio de proteínas conocidas como factores reclutadores de sustrato de GSEC (γ -SSRFs por sus siglas en inglés). Éstas interactúan con sitios específicos de PS1, aunque no se sabe si su función es indispensable para el reclutamiento de todos los sustratos de dicha enzima.

La **actividad carboxipeptidasa-like**, conocida como corte gamma ($-\gamma$) se ha descrito únicamente para APP ya que no se ha encontrado otro sustrato que sea procesado por esta vía. Esta actividad es la responsable de generar a las diferentes especies del péptido A β (así como a p3 en la vía no amiloidogénica clásica) y sucede posterior al corte- ϵ . La actividad carboxipeptidasa-like de GSEC consiste en una serie de tres cortes- γ consecutivos que suceden cada tres o cuatro aminoácidos, por lo que se les llama cortes tri- o tetrapeptídicos.^{104,105} Dependiendo de la longitud del AICD que se haya generado por el corte- ϵ , el procesamiento comenzará con un péptido de 49 o 48 aminoácidos y continuará de la siguiente forma:



En sujetos sanos, los productos finales corresponden a las especies A β_{40} , A β_{38} y A β_{42} .¹⁰⁶ De éstos, aproximadamente el 70% le corresponden a A β_{40} , con lo que se deberá mantener una proporción de A $\beta_{40}/42$ de 10:1.¹⁰⁷ Todas las variedades de péptidos A β son liberadas al espacio extracelular aunque pueden internalizarse a la misma célula que los produjo a través de vesículas endocíticas.

Además de éstas, también pueden generarse otras especies de a β como lo son las formas n-terminal truncadas de las que se habló anteriormente. Éstas surgen a partir del procesamiento del péptido APP-C89 y de forma similar a la vía amiloidogénica clásica, genera especies cortas de A β_{40} (a β_{10-40}), A β_{38} (a β_{10-38}) y A β_{42} (a β_{10-42}) truncadas. Así mismo, mediante ensayos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-MS, por sus siglas en inglés) se han podido detectar especies más pequeñas de A β como A β_{37} o A β_{34} e inclusive formas menores a 20 aminoácidos (p.ej. A β_{16}). Las cantidades producidas de dichos péptidos no han podido determinarse con exactitud en el humano y en modelos animales son escasamente detectados. Más aún, se desconoce cuáles de éstos provienen del mismo procesamiento catalítico por GSEC o de la degradación hidrolítica del A β por medio de enzimas como neprilisina, la enzima convertidora de endotelina 1 o la enzima degradadora de insulina.

3.2 Efecto de las mutaciones de *PSEN1* en la actividad catalítica de GSEC.

Todas las mutaciones de EAF en *PSEN1* se encuentran repartidas casi uniformemente a lo largo de sus nueve DTs y de las dos asas intracitoplasmáticas, por lo que no existe un sitio preferencial o *hotspot* de mutaciones en dicho gen. Sin embargo, se ha observado que el efecto

de estas mutaciones sobre la función de la enzima depende del sitio en donde se halle dentro de ella.^{59,108} Esto es debido a que cada DT de PS1 participa, de manera individual o en conjunto con otros DTs, en determinadas funciones que afectan la eficiencia catalítica de GSEC, por ejemplo:

- La conservación de la estructura y flexibilidad de PS1.
- El mantenimiento de la superficie de contacto con el sustrato para la formación del complejo enzima-sustrato (E-S).
- La interacción con los otros componentes de GSEC.
- La maduración y activación de la enzima por medio de la autoendoproteólisis.

En el 2017, Szaruga y colaboradores publicaron un estudio sobre el efecto de las mutaciones de *PSEN1* sobre la producción de péptidos AICD y $a\beta$ en condiciones térmicas desestabilizantes.⁵⁹ A partir de la observación de que las mutaciones de EAF en *PSEN1*, independientemente de donde se hallen, causan la liberación preferencial de péptidos de $A\beta$ tóxicos como $A\beta_{42}$ y $A\beta_{43}$, ellos formularon la hipótesis de la desestabilización del complejo E-S. (Figura 11) Ésta asegura que la sustitución de aminoácidos generada por las mutaciones en *PSEN1* altera las fuerzas químicas existentes entre la enzima y su entorno lipídico, disminuyendo su flexibilidad y cambiando su configuración espacial. Esto, a su vez, modificaría la interacción física entre PS1 y su sustrato, volviéndola más laxa. En consecuencia, el sustrato se libera prematuramente antes de culminar su procesamiento, dando lugar a la producción de especies de $a\beta$ largas observada en los pacientes con EA.

Por medio de ensayos *in vitro* y de termoestabilidad, los autores demostraron que tanto la actividad carboxipeptidasa-like como la endopeptidasa de GSEC se ven afectadas por el fenómeno de desestabilización del complejo E-S. Es así que, además de la producción de $a\beta$ largos, algunas mutaciones disminuían la cantidad de ICDs liberados. Esto explicaría porqué mutaciones como L435F causan fenotipos doble *knockout* de Notch (muerte embrionaria) cuando son expresadas de forma homocigota en embriones de ratón.¹⁰⁹ (Figura 12) En el mismo contexto, mutaciones que no afecten significativamente la generación de ICDs como la E280A (Paisa), pueden expresarse de forma homocigota sin ser incompatibles con la vida.¹¹⁰

Cabe mencionar que en dicho artículo no se reportan deleciones causantes de EAF que, al eliminar fragmentos enteros de la PS1 (p. ej. Δ exón 9), pudieran precipitar otro mecanismo patogénico adicional al mencionado. Además, existen mutaciones como la V216F o la R278I que causan una reducción drástica de la actividad catalítica de GSEC debido a que impiden la autoendocatálisis de PS1 y la consecuente formación de los fragmentos NTF y CTF que se requieren para el funcionamiento adecuado de la enzima.¹¹¹

De esta forma, podemos concluir que hasta el momento se conocen dos consecuencias de las mutaciones de EAF en *PSEN1*:

- a) La producción preferencial de péptidos largos de A β .
- b) La disminución de la actividad catalítica de PS1.
 - a. Disminución de la actividad endopeptidasa.
 - b. Disminución de ambas actividades catalíticas por inhibición de la endoproteólisis de PS1.

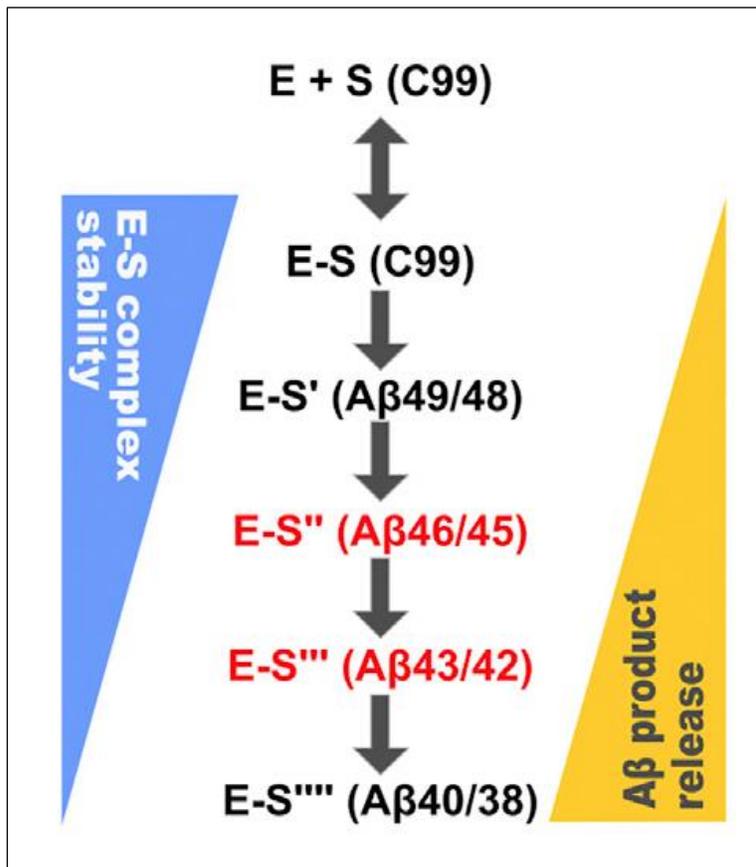


Figura 11. Modelo de desestabilización del complejo GSEC-sustrato. Conforme se procesa a APP-C99, éste pierde estabilidad dentro de GSEC, facilitándose su liberación. En presencia de mutaciones de EAF, la estabilidad del complejo GSEC-C99 es menor, liberando fragmentos largos de a β de forma prematura.

3.3 Fenotipos alternativos causados por mutaciones en *PSEN1*.

Si bien la mayoría de las mutaciones asociadas a la EAF causan un síndrome demencial amnésico, algunas de ellas propician la aparición de signos y síntomas alternativos. Por ejemplo, los sujetos portadores de la mutación E693Q (Holandesa) de *APP* presentan hemorragias subaracnoideas severas que resultan ser la causa de muerte de estos pacientes.¹¹² De la misma forma hay fenotipos que se presentan con mayor frecuencia o de forma exclusiva en pacientes con mutaciones en *PSEN1*.

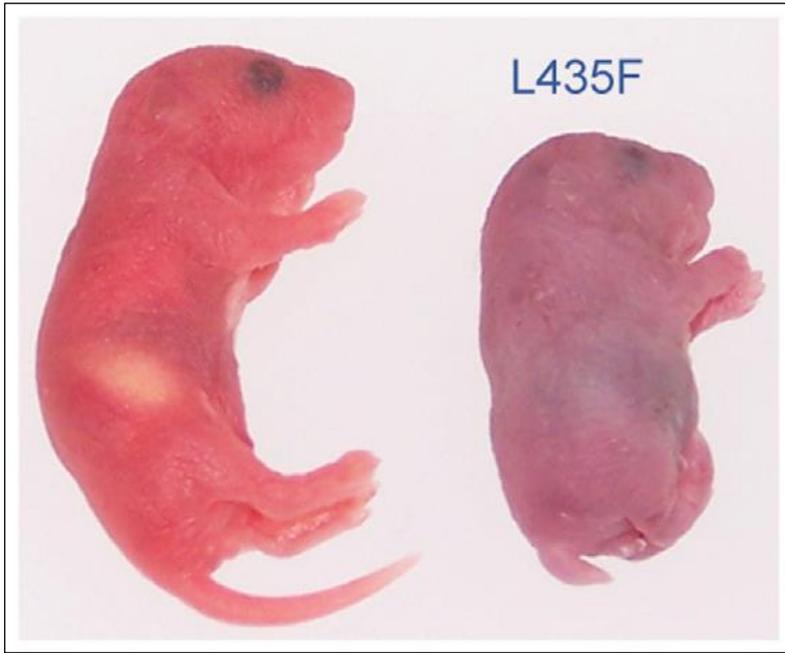


Figura 12. Ratones transgénicos neonatos que expresaban *PSEN1* wild-type (izquierda) y doble knock-in de la mutación L435F (derecha).

Aproximadamente 15% de las mutaciones en *PSEN1* causan algún trastorno motor.^{39,113} Entre ellos se encuentran mioclonías, temblores (parkinsonismo), ataxia y paraparesis espástica. De éstos, las mioclonías y la PE se han observado únicamente en pacientes con mutaciones de EAF en PS1. Además, dichos sujetos frecuentemente presentan una evolución clínica distinta con respecto a los portadores de otras mutaciones en la misma proteína. Tal es el caso de los individuos que manifiestan síndromes demenciales no amnésicos con alteración de la cognición visuoespacial.¹¹⁴ A diferencia de la mayoría de los pacientes con EA, éstos no presentan atrofia del hipocampo pero sí una gran pérdida de tejido cerebral en los lóbulos parietales y occipital. A esto se le conoce como atrofia cortical posterior (ACP) y ésta, a su vez, se asocia a la presencia de microhemorragias cerebrales y AAC.^{115,116} No obstante, actualmente no se conoce la causa de estos fenotipos alternativos ni sus implicaciones terapéuticas.

Una de las posibles explicaciones a estos fenotipos alternativos es la disfunción de la actividad endopeptidasa de GSEC. Como se mencionó anteriormente, la GSEC tiene más de cien sustratos y todos ellos dependen del corte- ϵ para la generación de sus ICDs. Dentro de los muchos sustratos de GSEC, podemos encontrar a NRG1, la cual se encarga de la mielinización y remielinización de los axones en el SNP y SNC. Modelos transgénicos doble *knockout* de NRG1 tipo III han demostrado baja mielinización axonal y trastornos motores.^{117,118} En este mismo contexto, la proteína similar a la proteína amiloide 2 (APLP2) la cual es también sustrato de GSEC, a pesar de no conocerse bien sus funciones en el cerebro, causa un fenotipo parapléjico en los ratones doble *knockout* de esta proteína.¹¹⁹

ANTECEDENTES DIRECTOS

4. La mutación A431E (Jalisco) de *PSEN1*.

4.1. Cronología de datos clínicos y experimentales sobre la mutación A431E.

En el año 2006, Yescas y cols. publicaron el hallazgo de 9 familias, originarias del estado de Jalisco, portadoras de una mutación ubicada en el exón 12 del gen *PSEN1*. Se trataba de una sustitución de la alanina 431 de PS1, situada en el borde inferior citoplasmático entre el DT8 y DT9, por un ácido glutámico.¹²⁰ Aunque dicha mutación ya había sido reportada cinco años antes por Rogaeva y cols. ésta era la primera vez que se le describía asociada a un fenotipo demencial.¹²¹ Así mismo, se determinó que esta mutación tenía un efecto fundador, a decir de la presencia de un haplotipo en común (en dos regiones microsatelitales altamente polifórmicas) en todos los sujetos portadores y ausente en cien controles mexicanos no emparentados. De las 9 familias, 41 personas resultaron portadoras y 13 ya presentaban la enfermedad. De éstas, 11 manifestaban un síndrome demencial clásico por EA y 2 padecían trastornos motores del tipo de mioclonías y PE, respectivamente.

Sin embargo, el mismo año se reportaron 20 portadores adicionales provenientes de 15 familias, todas de origen mexicano pero en su mayoría residentes de Estados Unidos.¹²² A diferencia del reporte de Yescas, la proporción de sujetos con PE manifiesta era del 45%, no obstante, todos mostraron cierto grado de espasticidad muscular en las cuatro extremidades. Además de la alta prevalencia de anormalidades motoras, un reporte anterior mostró que algunas mujeres portadoras de la misma mutación presentaban síntomas asociados a un trastorno depresivo mayor, sin que se haya determinado la causa o su relación con la patología de base.¹²³ La edad promedio de inicio sintomatológico de los pacientes con la mutación A431E es de 39 años.

Posteriormente, en el año 2007, a través de estudios de imagen por resonancia magnética con tensores de difusión^{***} (DTI, por sus siglas en inglés) se analizaron 12 sujetos portadores pre-sintomáticos de tres mutaciones de EAF en *PSEN1* (G206A, L235V y A431E) y uno en *APP* (V717I), donde se observó una menor anisotropía fraccional^{†††} en las regiones del fórnix, las vías

*** Esta técnica de resonancia magnética se basa en la difusión del agua a lo largo de los axones neuronales y en las propiedades aislantes o hidrofóbicas de la mielina que los rodea. Uno de sus usos es determinar indirectamente la integridad de la materia blanca cerebral.

††† La anisotropía fraccional es un valor entre 0 y 1 que define el grado de difusión del agua en un espacio determinado. Un valor de 0 indica isotropía, es decir, que el agua se difunde en todas direcciones y sin restricciones. Un valor de 1 significa que la difusión del

perforantes bilaterales y la materia blanca del lóbulo frontal, en comparación con 8 sujetos no portadores.¹²⁴ Además, no se encontraron datos de atrofia cortical en ninguno de los individuos de ambos grupos. En resumen, se demostró que las personas portadoras de tales mutaciones presentaban anomalías en la materia blanca (mielina) desde la etapa pre-clínica.

Un año después, en el 2008, se reportó el análisis histopatológico de tejido cerebral proveniente de sujetos con EAE y portadores de 10 mutaciones (9 en PS1 y 1 en PS2) asociadas a EAF.⁴⁰ Como datos relevantes, se encontraron abundantes placas en lana de algodón (CWP) y marañas neurofibrilares en el cerebro de la única paciente con la mutación A431E, además de encontrar niveles más altos de A β 40 que de A β 42 (A β 42/40 <1) a diferencia de los cerebros de portadores de otras mutaciones y de los sujetos con EAE. Cabe mencionar que estos hallazgos fueron confirmados en un estudio posterior en 2013, además de encontrarse una baja expresión de la proteína sináptica neurexina (NRX).¹²⁵

En el año 2010, Portelius y cols. determinaron los perfiles de a β en LCR proveniente de 18 pacientes con EAE, 6 pacientes con depresión crónica, 7 portadores pre-sintomáticos de la mutación A431E y 17 controles a través de espectrometría de masas (MALDI-TOF).¹²⁶ Sus resultados demostraron que los portadores de la mutación A431E presentaban concentraciones bajas de los péptidos A β 37, A β 38 y A β 39 en comparación con el resto de los probandos, así como de A β 42 al igual que los pacientes con EAE. Ellos concluyeron que este perfil de A β en el LCR de los pacientes con la mutación A431E sugeriría un efecto de pérdida de función de la actividad enzimática de GSEC. Sin embargo, esta conclusión es debatible.

Posteriormente, en el año 2016, se realizó un estudio de RM simple y DTI, PiB-PET-CT y electrofisiología en pacientes portadores de la mutación A431E con síntomas de PE.¹²⁷ En esta ocasión, se les comparó con pacientes sin PE portadores de las mutaciones A431E, M146L, G206A, S212Y, I238M y R269H de PS1. Sorpresivamente, los pacientes pertenecientes a ambos grupos no presentaron diferencias significativas en cuanto al volumen cerebral, al número de microhemorragias intracerebrales o al rango de volumen estándar de captación de PiB. Esto último significa que los pacientes demostraron una carga similar de a β cerebral. Así mismo, en todos ellos se identificaron hiperintensidades de la materia blanca (WMH, por sus siglas en inglés), que son señales hiperintensas captadas a través de RM ponderada por recuperación inversa de atenuación de fluidos (FLAIR, por sus siglas en inglés). Éstas WMH se ubican en zonas de daño a la materia blanca por procesos inflamatorios o de desmielinización. No obstante,

agua se da en una sola dirección por encontrarse restringida al resto. En el caso de los axones neuronales, los valores normales pueden ir de 0.2 a 0.9 dependiendo del grado de mielinización que presente.

en los individuos con PE, la distribución de WMH fue más homogénea que en aquellos sin PE, indicando que las áreas de mielina dañada eran las mismas.

Finalmente, en 2019, se reportó el primer caso homocigoto de la mutación A431E.¹²⁸ El paciente manifestó un cuadro clínico similar al de los sujetos con PE reportados con esta mutación, sin embargo, también sufría de retraso psicomotor desde edad temprana, además de trastornos del sueño con pesadillas recurrentes. Su edad de inicio sintomatológico fue a los 28 años, por lo que se determinó que presentaba un fenómeno de anticipación.

JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Alzheimer Familiar es una afección mortal causada por mutaciones autosómicas dominantes en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*. A pesar de tener una baja incidencia, su estudio ha sido de gran relevancia para la comprensión de los mecanismos patogénicos generales detrás de la neurodegeneración en los pacientes con EA. La mutación A431E es, posiblemente, la segunda mutación de EAF más prevalente en el mundo y la única reportada en México, afectando a más de 40 familias en todo el país. Sin embargo, su fenotipo neurológico no se ha caracterizado adecuadamente y esto ha llevado a la interpretación sesgada de los datos clínicos obtenidos. Además, los mecanismos patogénicos que impulsan la neurodegeneración en ésta y otras paraparesis espásticas causadas por mutaciones en *PSEN1* aún se desconocen.

La determinación del efecto particular de la mutación A431E hacia la función catalítica de Presenilina 1/GSEC, proporcionaría evidencia científica importante para comprender su patogenia y su correlación con el fenotipo atípico exhibido por los portadores de mutaciones asociadas a PE y EAF.

HIPÓTESIS

La mutación A431E de *PSEN1* altera la función enzimática de GSEC, modificando el procesamiento de la proteína precursora amiloide.

El perfil bioquímico inducido por la mutación A431E de *PSEN1* puede correlacionarse con el fenotipo demostrado por sus portadores.

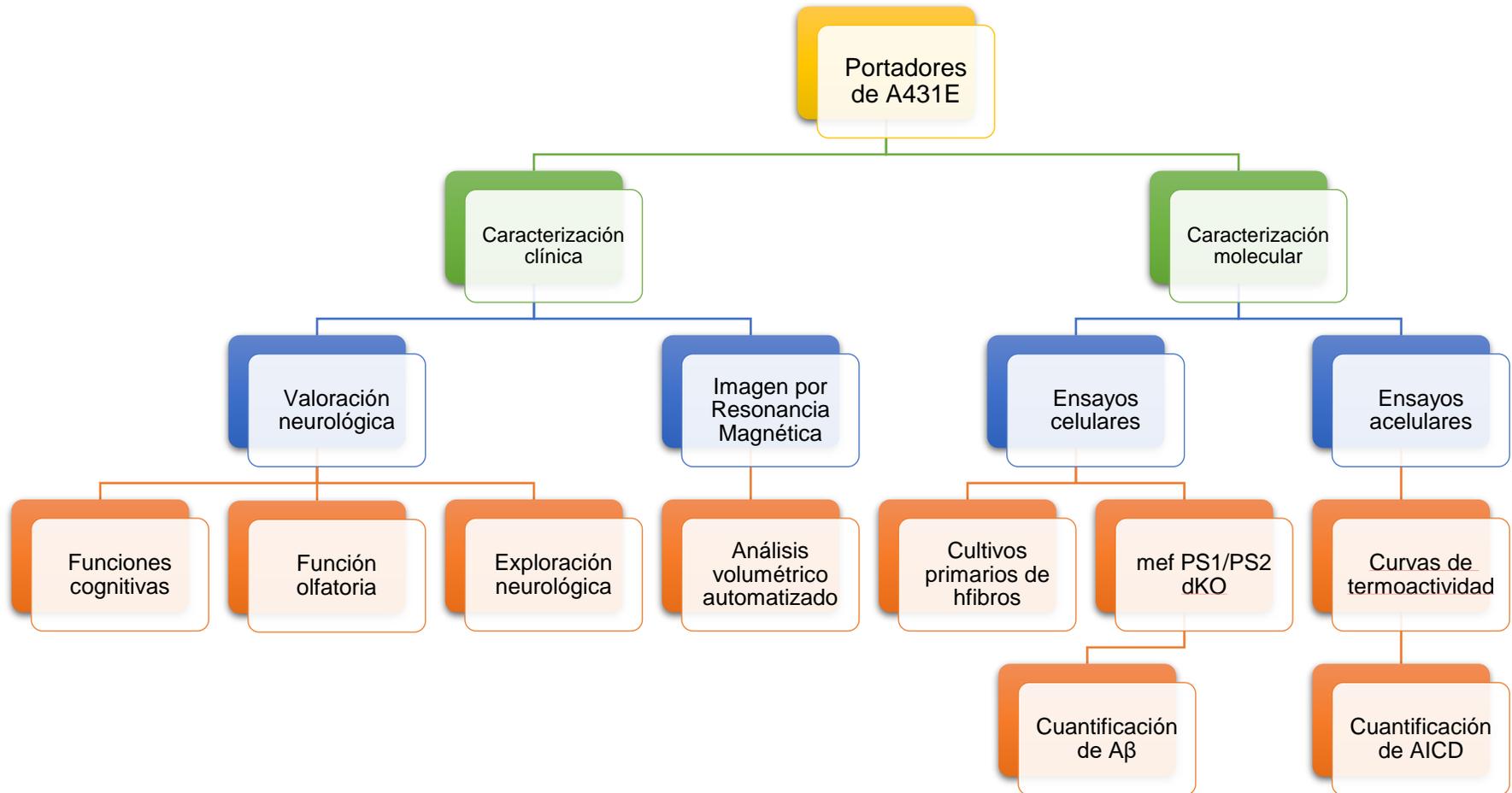
OBJETIVOS GENERALES

- Caracterizar el cuadro clínico de los portadores de la mutación A431E de *PSEN1* en las etapas pre-sintomáticas y sintomáticas de la enfermedad.
- Determinar la función enzimática de GSEC mutada en términos de su perfil de producción de los péptidos A β y AICD.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Perfil genético de la familia portadora de la mutación A431E.
2. Caracterización clínica de los portadores de la mutación A431E.
 - a. Historia clínica y compilación de registros médicos.
 - b. Valoración neurológica.
 - c. Aplicación de pruebas de función cognitiva.
 - d. Evaluación de la función olfatoria.
3. Estudio morfológico mediante Imagen por Resonancia Magnética.
 - a. Análisis cualitativo de estructuras intracraneales.
 - b. Mediciones volumétricas.
 - c. Identificación y medición de lesiones de la materia blanca.
4. Caracterización molecular de la GSEC mutada A431E.
 - a. Ensayos celulares.
 - i. Análisis del perfil de producción de péptidos A β .
 1. Cultivos primarios de fibroblastos humanos (hfibros).
 2. Fibroblastos embrionarios de ratón (mef) PS1 / PS2 *doble knockout*.
 - b. Ensayos acelulares.
 - i. Análisis de perfil de producción de péptidos AICD in vitro.
 1. Ensayos de termoactividad.
5. Propuesta de modelo patogénico.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de sujetos y obtención del consentimiento informado.

Este estudio se realizó en una familia mestiza de origen mexicano, residente de la Ciudad de México y con antecedentes heredo-familiares de enfermedad motora de origen desconocido. Posterior a la entrevista de primer contacto, se les convocó a una segunda entrevista para otorgarles información sobre:

- Los objetivos, procedimientos y resultados esperados de la investigación.
- Toma, manipulación y almacenamiento de muestras.
- Política de confidencialidad en el manejo de muestras, material genético y resultados.
- Entrega personal de reportes con información sobre el resultado de la secuenciación de ADN.

Posteriormente, conforme a los lineamientos del Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos (COBISH) del CINVESTAV, se entregó el formato de consentimiento informado a todos aquellos que de forma voluntaria manifestaron su deseo de participar en el protocolo de investigación.

Este proyecto fue avalado por el COBISH con el folio # 038/2016. (ver Apéndice 1)

2. Obtención de muestras sanguíneas.

Se tomaron dos muestras de sangre venosa periférica de 5 mL cada una por medio de una punción transcutánea hacia la vena cefálica del brazo izquierdo o derecho. Cada muestra se depositó en tubos BD Vacutainer® con EDTA K2 como factor anticoagulante y se etiquetó conforme al número de folio del consentimiento informado.

Posteriormente, cada tubo fue centrifugado (centrífuga refrigerada Eppendorf® 5804) a una temperatura de 4°C y a una velocidad de 5000 rpm por 15 minutos con el fin de separar las fases de la sangre en: plasma, fracción roja (eritrocitos) y capa leucocitaria intermedia o *buffy coat*. Esta última fue removida por medio de succión con una micropipeta (Thermo Scientific™ Finnpiptette™) con capacidad de volumen de 100 a 1000 µL utilizando puntas con filtro estériles. Finalmente, el *buffy coat* fue depositado en tubos de microcentrífuga cónicos de 1.5

mL estériles, etiquetados con su respectivo número de folio y almacenados a 4°C o en cama de hielo hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

3. Extracción de ADN leucocitario por el método de “Salting out”.

Lavado del botón leucocitario

A los tubos con muestra se les añadió un buffer casero de lisis de eritrocitos con una relación buffer/muestra de 3:1. Posteriormente fueron colocados en una mezcladora automática por 5 minutos a temperatura ambiente (t.a.) y se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto (rpm) por 1 minuto (microcentrífuga de mesa Eppendorf® MiniSpin®). Este proceso se repitió con cada tubo hasta que la muestra quedara libre de eritrocitos (se observa un botón blanco).

Lisis de leucocitos

Posteriormente, a cada tubo con muestra se le añadieron 600 µL de una solución casera de lisis nuclear y 10 µL de proteinasa K y se mezcló por pipeteo gentil 3x con la micropipeta de 1000 µL. Inmediatamente después, dichos tubos fueron colocados en un termobloque (Thermomixer Comfort para tubos de 1.5 mL Eppendorf®) a 60°C y a 800 rpm por 8 horas *over night* (o.n.).

Precipitación de proteínas

Al día siguiente, se añadió 150 µL de una solución de cloruro de potasio 3 M a cada muestra para después dejarse incubando a -20°C por 20 minutos. Después del tiempo de incubación, se centrifugó a 4°C y 11,000 rpm por 30 minutos en la microcentrífuga refrigerada (Microfuge® 22R de Beckman Coulter™). Con precaución de no levantar el botón al fondo del tubo, se retiró el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de 1.5 mL, desechándose el tubo viejo con los restos celulares. A partir de este momento, todas las muestras fueron mantenidas en hielo.

Precipitación y lavado del ADN

Inmediatamente después, se añadió un volumen (1:1) de isopropanol puro grado biología molecular (2-Propanol de Sigma-Aldrich®) y se incubó 1 hora a -20°C. Terminando el tiempo de incubación, se centrifugó 30 minutos en la microcentrífuga refrigerada a 11,000 rpm y a 4°C. Después se desechó el sobrenadante por inversión y se añadieron 500 µL de etanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich®) diluido al 70% con agua Milli-Q estéril. Cada botón de ADN fue lavado por medio de inversión manual del tubo que lo contenía 5x y vuelto a centrifugar, ahora a 8,000 rpm por 10 minutos a t.a. en la microcentrífuga de mesa. Al

terminar, se desechó el sobrenadante por medio de succión gentil con la micropipeta de 20 a 200 μL , cuidando de no tocar el botón de ADN y se eliminó el resto por evaporación, en el termobloque a 65°C por 5 minutos y con la tapa de cada tubo en posición semiabierta.

Hidratación del ADN

Una vez seco, el botón de ADN fue resuspendido en 100 μL de agua estéril libre de nucleasas por medio de pipeteo gentil con la micropipeta de 200 μL y almacenado a -20°C.

Para evaluar la integridad del ADN obtenido, se corrieron 5 μL de material genético + 5 μL de buffer de carga de azul de bromofenol, por una hora a 65V en un gel de agarosa al 1% pretratado con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de rayos UV. Se consideró un ADN íntegro al encontrar una banda nítida por encima del valor máximo del marcador de peso molecular (>10,000 pares de bases) sin datos de barrido en el carril (i.e., degradación del ADN por nucleasas). Así mismo, se cuantificó y se determinó la calidad del ADN mediante su análisis por espectrofotometría (NanoDrop 1000 de Thermo Scientific™), con una relación 260/280 entre 1.8 - 2.0 y 230/260 >1.5 como parámetros ideales.

Finalmente, se prepararon alícuotas con 50 μL de ADN a una concentración de 10 ng/ μL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4. Amplificación del exón 12 del gen *PSEN1* por medio de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR).

Se preparó cada reacción de PCR 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 (Invitrogen™ cat. 10966-034), 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 (sentido: TGTGAATGTGTGTCTTTCCCATCT; antisentido: CTCAAATCTGGTAGTTTCTGCACC), 1 μL de ADN a 10 ng/ μL y 14 μL de agua libre de nucleasas estéril.
- 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.
- El producto amplificado se corrió a 65 V por 1.5 h en geles de agarosa al 1.2% para comprobar la especificidad y eficiencia de la amplificación.

5. Reacción de secuencia y secuenciación por método de Sanger.

Las secuencias se obtuvieron por electroforesis capilar en un equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer a una temperatura 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. Evaluación cognitiva de los sujetos portadores de la mutación A431E.

Las funciones cognitivas de los sujetos portadores se evaluaron utilizando las versiones traducidas al español del Mini-Mental State Examination (MMSE), Montreal Cognitive Assessment (MoCA) y Clinical Dementia Rating Scale (CDR). Dichos cuestionarios fueron aplicados en días distintos, de manera individual y en condiciones de absoluta privacidad.

7. Evaluación de la función olfatoria.

La función olfatoria se determinó utilizando una versión adaptada para la población mexicana de la Prueba de Identificación de Olores de la Universidad de Pensilvania* (UPSIT, por sus siglas en inglés), en la que los olores desconocidos de la versión original fueron intercambiados por olores más comunes y reconocibles (ver Apéndice 3). La prueba cuenta con 40 preguntas y es de opción múltiple. Ésta no era aplicada si el sujeto padecía alguna enfermedad aguda de las vías aéreas superiores o alergias respiratorias activas ya que esto modificaría el resultado. El procedimiento que seguimos fue el siguiente:

- Se le entregó al paciente un paquete de hojas respuesta y se le explicó el procedimiento. De esta forma, se le indicó que debía identificar el olor más parecido al de la lista de opciones y en caso de no identificar el olor, se le otorgaría una segunda oportunidad para oler la muestra.
- En caso de no percibir ningún olor, debía especificarlo por escrito en la pregunta en turno y seleccionar una opción al azar. Ninguna pregunta podía quedar sin responder.
- Antes de comenzar la prueba, el paciente debía portar un antifaz para cubrir sus ojos y de esta forma concentrar su atención hacia su sentido del olfato. Una vez que estuviera listo para responder, se debía quitar el antifaz y escribir su respuesta.

* Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, Dann MS. University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope*. 1984 Feb;94(2 Pt 1):176-8.

Los resultados fueron graficados y comparados con la tabla de capacidad olfatoria por edad y género del UPSIT. Como control, se realizó la misma prueba en veinte individuos sanos de distintas edades (Figura 13).

<u>Criterios de Inclusión</u>	<u>Criterios de Exclusión</u>
✓ Mexicanos.	Ⓧ Antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas: demencia, depresión o Parkinson (≥ 3 generaciones).
✓ Grupo etario correspondiente.	Ⓧ Enfermedades crónico-degenerativas como diabetes e hipertensión arterial sistémica.
✓ Funciones cognitivas conservadas.	Ⓧ Rinitis alérgica, pólipos nasales o alguna otra enfermedad de vías respiratorias superiores.
✓ Normosmia referida.	Ⓧ Tabaquismo activo.
✓ Sin parentesco (consanguinidad) con los sujetos enfermos.	Ⓧ Consumo actual o previo de drogas inhaladas como solventes o cocaína.

Figura 13. Criterios de inclusión y de exclusión para la selección de sujetos control utilizados en las pruebas de función olfatoria.

8. Estudio de imagen por resonancia magnética.

Se obtuvieron imágenes de resonancia magnética en un escáner 3T GE Discovery MR750 (General Electric). El procesamiento, análisis y renderizado de imágenes 3D-FLAIR se realizó utilizando el software de visualización de imágenes Horos versión 3.3.4 (The Horos Project) y el software ITK-SNAP versión 3.6.0 (Universidad de Pensilvania). El análisis volumétrico de las estructuras cerebrales y las hiperintensidades de la materia blanca se realizó a través de los software de análisis VolBrain versión 1.0 y LesionBrain versión 1.0 a través de su interfaz en la web (<http://volbrain.upv.es/>).

9. Toma de muestra por exfoliación de epitelio nasal para obtención de células precursoras neuronales de epitelio olfatorio.

Con el fin de construir un banco de células precursoras neuronales, se les solicitó a los portadores de la mutación A431E de *PSEN1* y a sus familiares consanguíneos no portadores, la donación de una muestra de epitelio olfatorio. Nuevamente se les otorgó un consentimiento informado donde se les explicaron los objetivos de la toma de dicha muestra, el procedimiento

y los riesgos potenciales de éste. El protocolo utilizado es una modificación del método publicado por Benitez-King y colaboradores en el año 2011[†].

En breve:

- Al menos 2 hrs antes de la toma de muestra, se incubaron cajas P30 para cultivo celular con una solución 1:100 de poli-D-lisina (1.5 mL por caja) a 37°C en la incubadora húmeda (ESCO® CelCulture®) a 4.5% de CO₂.
- En un tubo Falcon de 50 mL (Corning® Cellgro®) se colocaron 2 mL de medio DMEM/F12 (Gibco™ cat.: 12500062) + suero fetal bovino al 5% + penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco™ cat.: 15140122) y se colocó dentro del baño de agua a 37°C 30 minutos antes de la toma de muestra.
- Para la exfoliación se utilizaron cepillos interdentes anchos marca GUM® Proxabrush® Go-Betweens® #3614FCW los cuales se rociaron con etanol al 70% y se colocaron bajo la luz UV dentro de la campana de flujo laminar (NUAIRE NU435-600) por 15 minutos.
- Al menos 5 minutos antes de la toma de muestra, se le pidió al paciente que se soplara la nariz con un pañuelo desechable hasta que ya no expulsara material mucoso. Posteriormente, si el paciente lo requería, se le aplicaba anestesia local superficial por medio de un spray nasal de lidocaína al 2% con epinefrina. Lo anterior se recomienda en pacientes hipersensibles con alta probabilidad de epistaxis por fricción.
- Para realizar la toma, se le pidió al paciente que se colocara de frente, con la espalda, cuello y cara rectas. Posteriormente se introdujo suavemente el cepillo hacia arriba, de forma vertical a través de la narina y hasta topar con el cornete medio (hasta hallar resistencia). Se giró el cepillo dos veces dentro de la nariz y se retiró cuidando no tocar la piel del paciente. Inmediatamente después se introdujo el cepillo interdental (de cabeza) dentro del tubo Falcon de 50 mL con medio pre-calentado, se tapó y transportó hacia la campana de flujo laminar en una gradilla.
- Una vez en el cuarto de cultivo, se retiró la solución de poli-D-lisina de las cajas P30 usando una pipeta Pasteur de vidrio estéril conectada a un sistema de aspiración al vacío. Después, se realizaron 2 lavados con 1.5 mL agua MilliQ estéril para retirar los restos de poli-D-lisina libres que hubiesen quedado en la caja de cultivo y retirando el agua por aspiración.
- Se enjuagó el cepillo interdental utilizando el mismo medio DMEM/F12 en el que se encontraba embebido y con una micropipeta de 1000 µL con el fin de separar el tejido de las cerdas, procurando que el medio sólo tocara la parte del cepillo y no el mango. Se

[†] Benítez-King G, Riquelme A, Ortíz-López L, et. al. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J Neurosci Methods*. 2011 Sep 30;201(1):35-45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.009.

mezcló la muestra por pipeteo 50x para separar adecuadamente las células y finalmente se colocó todo el volumen dentro de la caja P30 para después almacenarse dentro de la incubadora húmeda a 37°C y 4.5% de CO₂.

Al día siguiente, se observó la caja de cultivo bajo el microscopio en búsqueda de contaminación por hongos o bacterias. En caso de encontrarla, la muestra era desechada. El primer cambio de medio se realizó al tercer día posterior a la toma con el mismo medio DMEM/F12 suplementado mencionado anteriormente. Después del primer cambio, los consiguientes se realizaron cada segundo día.

Aproximadamente 15 días después (15±5 días), se observó el brote de células precursoras neuronales, de forma fusiforme. Éstas deberán distinguirse de las células epiteliales poliédricas que se adhieren al fondo de la caja de cultivo, pero son seleccionadas negativamente con cada cambio de medio (Figura 14).

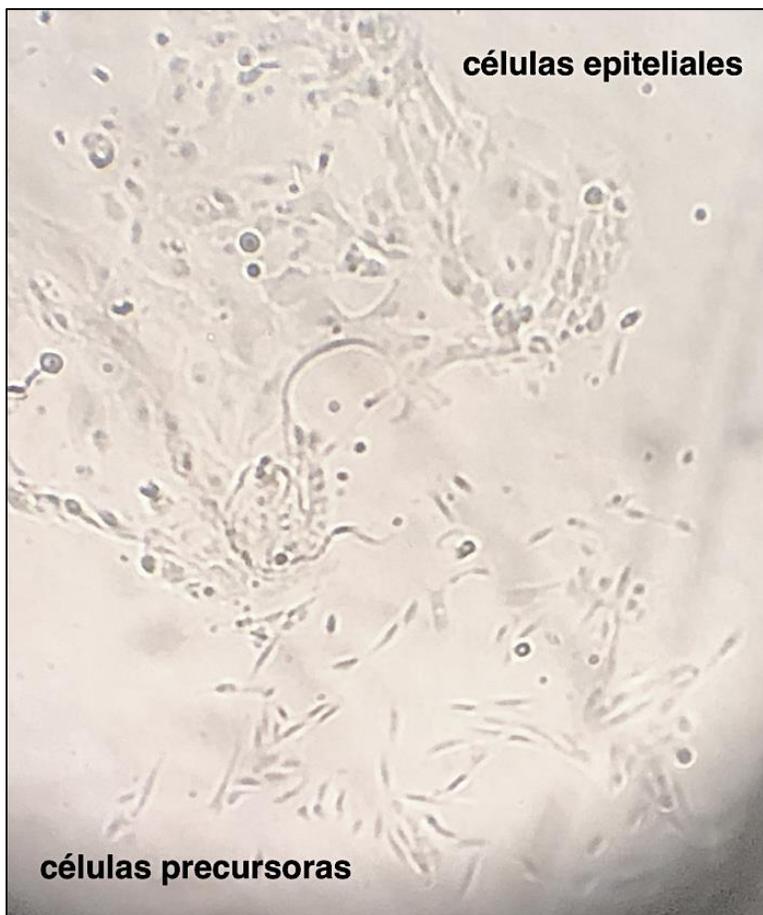


Figura 14. Imagen de microscopía óptica de campo claro de un cultivo primario de células de epitelio olfatorio a 8 días de la toma de muestra. Amplificación a 10x.

Al crecer la colonia de células precursoras, ésta se desprendió por tripsinización y se cultivó en cajas T25 (Thermo Scientific™ Nunc™ EasYFlask™ cat: 174951); nombrándose pase 1.

A partir del segundo pase se criopreservaron células en medio DMEM/F12 + suero fetal bovino al 5% + DMSO (Invitrogen™ cat: D12345) al 10%, manteniéndolas a -80°C al menos 24 horas antes de colocarlas dentro del tanque de nitrógeno (Thermo Scientific™ Locator 6) a -120°C.

10. Generación de cultivos primarios de fibroblastos humanos con la mutación A431E.

Se aislaron fibroblastos humanos de tres portadores de la mutación A431E y un control consanguíneo a través de biopsias de piel (Biopunch® de 5 mm) siguiendo un protocolo estándar descrito por Bustos-Arriaga[‡] y colaboradores en el año 2011. También se incluyeron en los análisis cuatro líneas primarias de fibroblastos humanos de individuos sanos como control. Todos los fibroblastos fueron cultivados en medio DMEM/F12 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific®) suplementado con 10% de suero fetal bovino y sin antibiótico.

a. Ensayos celulares de actividad enzimática de GSEC.

Para determinar la actividad de GSEC *in vitro*, se sembraron fibroblastos humanos en placas de 24 pozos a una densidad de 35,000 células por pozo. Menos de 24 horas después, las células fueron infectadas con 156 µL/pozo de un vector adenoviral (V6) que portaba la secuencia de ADN de APP-C99-3XFLAG incubándose durante 7 horas en 94 µL/pozo de medio bajo en suero (DMEM/F12 + suero fetal bovino al 0,2%) + bromuro de hexadimetrina (Polybrene de Sigma-Aldrich®) a una concentración de 1:1000, dentro de la incubadora húmeda a 37°C y 4.5% de CO₂. Siete horas después de la infección, se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 µL de medio bajo en suero, incubándose por 24 horas a 37 °C hasta la recolección de los sobrenadantes para la cuantificación de péptidos aβ.

11. Generación de líneas celulares con mutaciones de *PSEN1* a partir de fibroblastos embrionarios de ratón *double-knockout* PS1/PS2.

Las mutaciones puntuales A431E y A431V fueron introducidas en el plásmido pMSCV que contiene el ADNc del gen *PSEN1* humano a través de mutagénesis dirigida utilizando el kit QuikChange II XL (Agilent Technologies cat: 200522) y los siguientes cebadores:

- A431E:
 - Sentido: GCCATTTTCAAGAAAGAATTGCCAGCTCTTCC

[‡] Bustos-Arriaga J, García-Machorro J, León-Juárez M, et al. Activation of the Innate Immune Response against DENV in Normal Non-Transformed Human Fibroblasts. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Dec; 5(12): e1420. doi: 10.1371/journal.pntd.0001420

- Antisentido: GGAAGAGCTGGCAATTCTTTCTTGAAAATGGC
- A431V:
 - Sentido: TGGAAGAGCTGGCAATACTTTCTTGAAAATGGCAAGGA
 - Antisentido: TCCTTGCCATTTTCAAGAAAGTATTGCCAGCTCTTCCA

La reacción fue realizada en un termociclador T-100™ de Bio-Rad con el siguiente programa: 1) Un minuto a 95°C, 2) 50 segundos a 95°C, 3) 50 segundos a 60°C, 4) 8.5 minutos a 68°C, 18 ciclos del paso 2 al 4, 5) 7 minutos a 68°C y 6) tiempo de reposo a 12°C.

Al terminar la reacción se agregó 1 µL de la enzima de restricción Dpn1 para desintegrar la cadena interna del vector derivada de la reacción de mutagénesis. Posteriormente, el material genético fue utilizado para la transformación bacteriana de la cepa de E. coli ultracompetente XL10-Gold® (Stratagene®) de la cual se obtuvo un midi-prep utilizando el kit de purificación de ADN plasmídico marca Qiagen®. Este ADN se utilizó para la generación de retrovirus recombinantes a partir de la transfección de células HEK293-T con el kit TransIT®-LT1 (Mirus® cat: MIR2306) que es un sistema de expresión retroviral recombinante de replicación defectuosa. Los retrovirus fueron usados para la transducción de fibroblastos embrionarios de ratón *double knock-out* PS1/PS2 (Herreman et al., 2000). Después de 72 horas, se indujo la selección de las células con 5 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich®). Las nuevas líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM/F-12 + suero fetal bovino al 10% + 3 mg/ml de puromicina.

Las demás líneas celulares mef con las mutaciones Y115H, Y154N, L166P, V261F, E280A y L381F fueron generadas siguiendo la misma metodología.

a. Ensayos celulares de actividad enzimática de GSEC.

Las líneas celulares mef con las distintas mutaciones de PS1 fueron transfectadas con 5 µg de pSG5 APP-C99-3XFLAG por cada 150,000 células mediante electroporación. Posteriormente, las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos con 400 µL de DMEM/F12 + 10% de suero fetal bovino a 37 °C. Menos de 24 horas después, se reemplazó el medio anterior con 400 µL de medio bajo en suero y se incubaron por 24 horas hasta la recolección del sobrenadante para la cuantificación de péptidos Aβ.

12. Cuantificación de péptidos Aβ por el método de ELISA.

Los niveles secretados de los péptidos A β 38, A β 40 y A β 42 se cuantificaron en placas de ELISA multi-spot MSD (Meso Scale Discovery®) de 96 pozos las cuales se venden recubiertas con anticuerpos anti A β 38, A β 40 y A β 42 (JRF AB038 para A β 1-38, JRF/cAb40/28 para A β 1-40, JRF/cAb42/26 para A β 1-42) siguiendo el protocolo descrito por Szaruga y colaboradores en el año 2015. Brevemente, las placas se bloquearon con 150 μ l/pozo de caseína al 0,1% en buffer PBS durante 1.5 horas (t.a.) y se enjuagaron 5 veces con 200 μ l/pozo de buffer de lavado (PBS + Tween-20 al 0,05%). Se tomaron 25 μ L de una solución mezcla de estándares (péptidos sintéticos A β 1-37, A β 1-38, A β 1-40 y A β 1-42 humanos) y 25 μ L de cada sobrenadante para posteriormente diluirse, de forma individual, en 25 μ L de buffer de bloqueo con anticuerpo de detección SULFO-TAG JRF/AbN/25 a una concentración de 1:4000. De la mezcla resultante se cargaron 50 μ L por pozo y se dejaron incubando o.n. a 4°C en rotación horizontal. Al día siguiente, las placas fueron enjuagadas 5 veces con buffer de lavado y después se añadieron 150 μ l/pozo de 2X MSD Reading Buffer T (Meso Scale Discovery®). Inmediatamente después, las placas llevadas al lector de placas MSD Sector Imager 6000 para cuantificarse.

Los niveles de A β 43 se cuantificaron usando un Kit de ELISA de alta sensibilidad IBL amyloid beta 1-43 (IBL International ref: RE59711) siguiendo las instrucciones del fabricante.

13. Determinación de la expresión celular de GSEC por Western Blot.

Los niveles de expresión de GSEC se determinaron a partir de la fracción membranal de las células mef y de proteínas totales de células precursoras neuronales del epitelio olfatorio. Dichas proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% a 70V por 1.5 horas y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ de GE Healthcare Life Sciences cat: RPN2020D) durante 2.5 horas a 400mA. Los anticuerpos utilizados para la identificación de cada componente de GSEC fueron los siguientes:

- Anti-PS1-NT (rata). Sigma-Aldrich® cat: MAB1563. 1:350
- Anti-PS1-loop a.a. 263-378 (ratón). Sigma-Aldrich® cat: MAB5232. 1:1000
- Anti-NCT (ratón). Sigma-Aldrich® cat: 5556. 1:1000
- Anti-APH1A (conejo). Abcam cat: ab19390. 1:4000

14. Generación de GSEC recombinante a partir de células de insecto.

La expresión y purificación de los complejos GSEC a partir de células de insecto Hi5 se realizó como lo describió anteriormente Szaruga y colaboradores en el año 2017, con modificaciones

menores. Brevemente, un vector de transferencia pAcAB4 (BD Biosciences) que contiene la secuencia de ADN de PS1 humana silvestre o mutada (A431E y A431V) + NCT-GFP + APH1A + PEN2 se cotransfectó con el plásmido flashBacGold™ (Oxford Expression Technologies) en células de insecto Sf9 para generar baculovirus. Estos baculovirus se usaron luego para infectar células de insecto Hi5 para la expresión del complejo GSEC completo. Ambas líneas celulares de insecto fueron cultivadas en suspensión y en agitación a 200rpm con medio Insect-XPRESS™ + factor surfactante Pluronic F-68 al 1% (Gibco®) a 28°C. Más tarde, estas células se lisaron en un buffer de CHAPSO al 2% (Sigma-Aldrich®) con inhibidores de proteasa (cOmplete™ de Roche SKU: 11697498001) y se realizó una purificación por afinidad usando un nanocuerpo anti-GFP acoplado a perlas de agarosa. Posteriormente, se añadió una proteasa PreScission (GenScript® cat: Z03092-100) fusionada a GST para escindir GFP de NCT y eluir la GSEC libre (sin GST). Finalmente, la proteasa se eliminó por inmunoafinidad usando perlas anti-GST. Para comprobar la pureza, integridad y concentración de las proteínas recombinantes generadas, dichas muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al

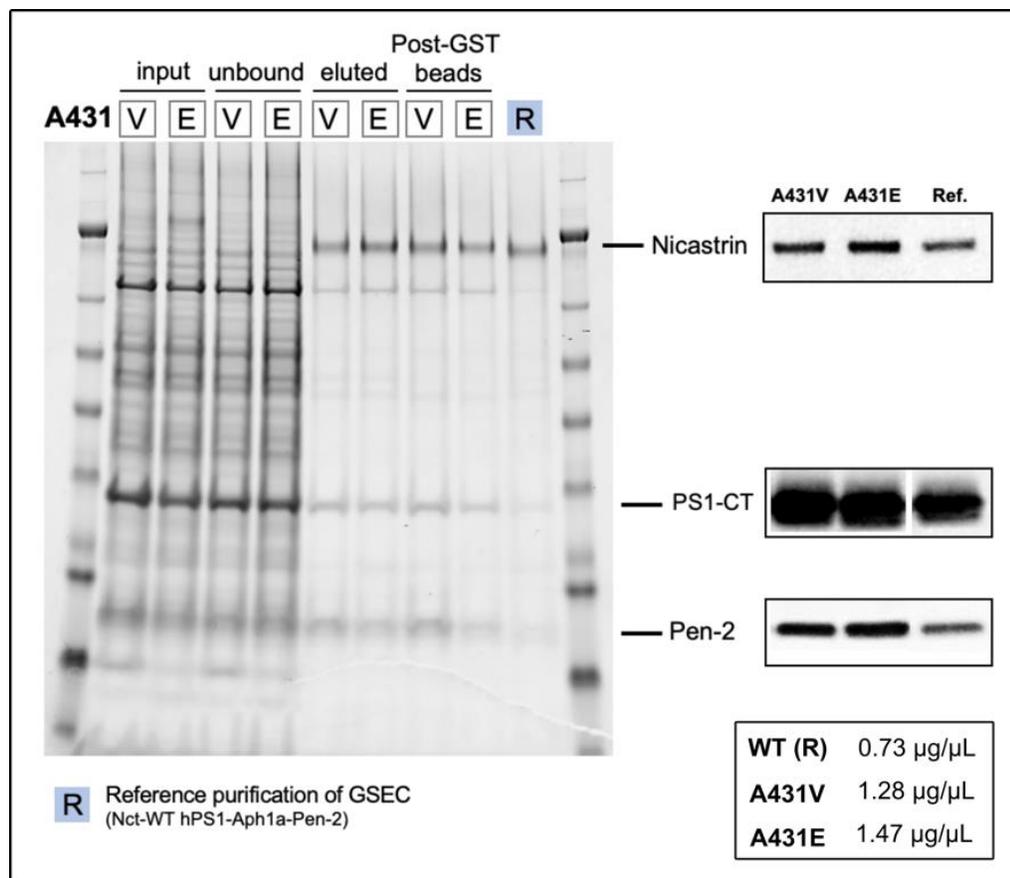


Figura 15. *Izquierda:* Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10% de los complejos GSEC recombinantes generados teñido con azul de coomasie. *Derecha:* Western-blot para la identificación de las proteínas Nicastrina, Presenilina 1 y Presenilin-enhancer 2. Debajo se indican las concentraciones de las proteínas obtenidas por cada 2 litros de células.

10% junto con la variante de GSEC PS1-WT-APH1A. Posteriormente, el gel fue teñido con azul de coomasie y transferido a una membrana de nitrocelulosa para Western-blot. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford.

a. Ensayos de termoestabilidad.

Las reacciones proteolíticas se realizaron utilizando complejos de GSEC PS1A431E o A431V/APH1A ~10 nM purificados y sustrato APP-C993-XFLAG recombinante purificado en 0.25% CHAPSO + 2.5% DMSO (o 10 mM InhX) + 0.1% Fosfatidilcolina + 150 mM NaCl + PIPES a 25 mM en un gradiente de temperatura entre 37°C a 65°C durante 20 minutos. Dicha mezcla (sin sustrato) y el sustrato por separado se incubaron a las temperaturas indicadas en el termociclador de gradiente durante 10 minutos. Después, el sustrato fue añadido a la mezcla de enzimas y la proteólisis continuó durante 20 min.

b. Cuantificación de péptidos AICD por Western Blot.

Los productos de la actividad endopeptidasa de GSEC (ICD-3XFLAG) generados en los ensayos proteolíticos se cuantificaron mediante SDS-PAGE western blot. Antes de mezclar las reacciones con el buffer de carga, éstas se mezclaron con un volumen de metanol-cloroformo (1:2) para eliminar moléculas hidrofóbicas (lípidos, sustrato y proteínas de membrana) y obtener solo la fracción acuosa que contiene los ICD. Los productos se analizaron mediante western immunoblot utilizando un anticuerpo anti-FLAG M2 y se cuantificaron mediante un escáner de imágenes infrarrojas Amersham Typhoon (GE Healthcare).

15. Análisis estadístico.

Todos los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 8. Las pruebas ANOVA y t-student se usaron para determinar la significancia estadística de los cambios entre los grupos vs. el control o vs. la mutación A431E.

RESULTADOS

1. Búsqueda de portadores de la mutación A431E de *PSEN1*.

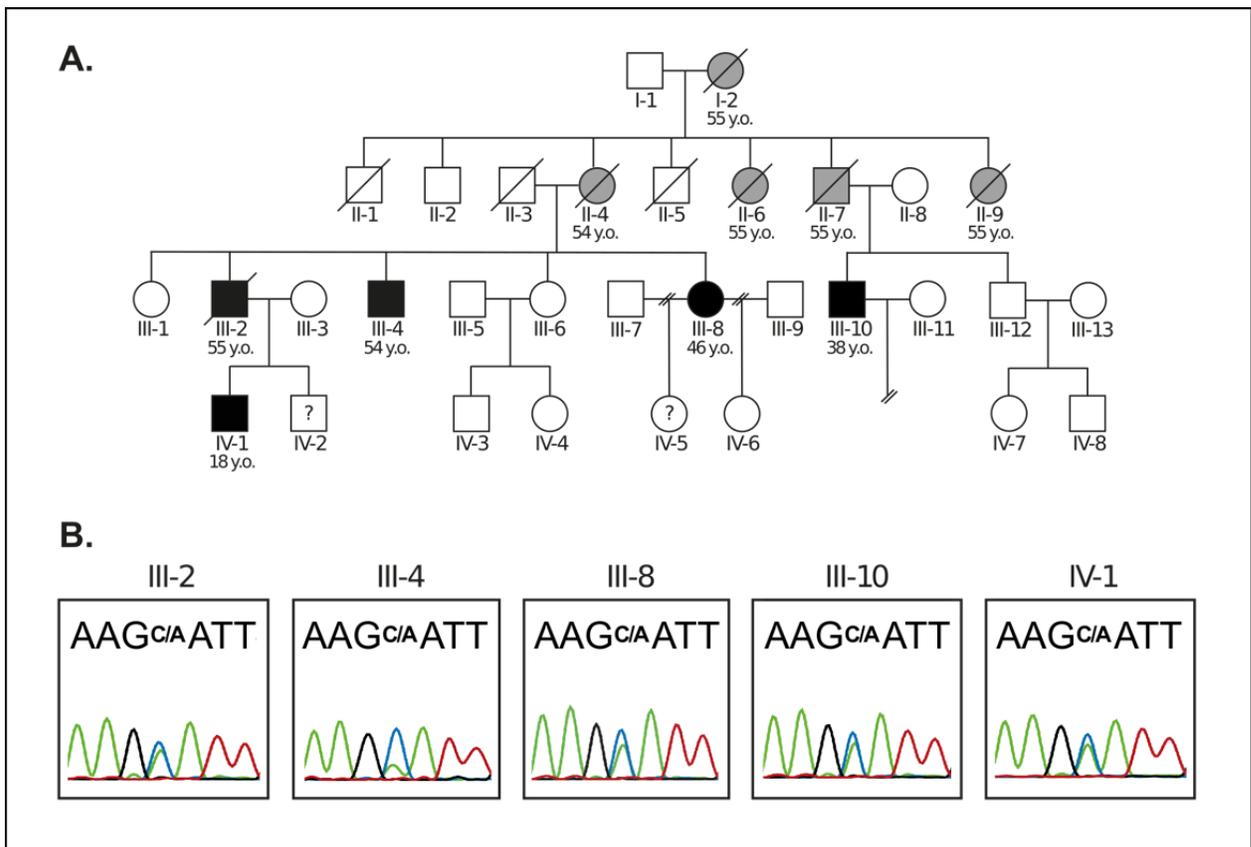


Figura 16. (A) Árbol genealógico de la familia en estudio. Los círculos corresponden a las mujeres y los cuadrados a los hombres. Las figuras cruzadas diagonalmente señalan a las personas fallecidas. Los sujetos coloreados en gris presentaron síntomas motores sin conocerse su genotipo. Los sujetos coloreados en negro resultaron portadores de la mutación A431E de *PSEN1*. Los individuos marcados con un signo de interrogación no accedieron a participar en el estudio. **(B)** Electroferogramas de los cinco sujetos portadores de la mutación A431E. La presencia de dos picos en la misma posición indica que la mutación se expresa de forma heterocigota.

Caso índice:

El sujeto de referencia (Figura 1, sujeto III-2) era un hombre de 54 años con antecedentes de debilidad progresiva de las extremidades inferiores con seis años de evolución, diagnosticada en su institución de seguridad social como enfermedad de la neurona motora superior de origen idiopático. Aunque no se evaluaron sus funciones cognitivas al momento, el paciente podía establecer y mantener una conversación coherente y se encontraba orientado en tiempo, persona y espacio. Como antecedentes heredo-familiares refirió que su madre (Figura 16A, sujeto II-4) murió a la edad de 55 años, después de padecer por cinco años una enfermedad motora de evolución similar a la que él mismo presentaba. Poco antes de morir, ella también manifestó signos de deterioro cognitivo, el cual se caracterizó por la presencia de prosopagnosia (es decir,

la incapacidad para reconocer rostros). Sus familiares refirieron la existencia de otros cinco individuos afectados en su familia (Figura 16A, sujetos I-2, II-4, II-6, II-7, II-9 y III-4) de los cuales sólo el sujeto III-4, hermano del caso índice, continuaba con vida. Así mismo, uno de sus tíos maternos, el sujeto II-7, fue diagnosticado con demencia tipo Alzheimer al someterse a un análisis por biopsia del lóbulo temporal realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Al fallecer, una parte del cerebro de este sujeto fue donado a la misma institución y otra al Banco Nacional de Cerebros del CINVESTAV (ID: A-08-29), no obstante, no se pudo obtener evidencia física de la existencia de este tejido y o de los resultados de su análisis histológico.

Debido a las características descritas, decidimos realizar un análisis genético de los tres genes causales de Enfermedad de Alzheimer Familiar, *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* mediante secuenciación del ADN obtenido del caso índice[§]. De esta forma identificamos un cambio de C a A en la posición c.1292 de la secuencia de ADNc de *PSEN1* que da como resultado la sustitución de Alanina 431 de *PSEN1* en un ácido glutámico (A431E), de forma heterocigota. Poco después de encontrar la mutación A431E, a la edad de 55 años, el sujeto III-2 murió de complicaciones derivadas de un síndrome de dificultad respiratoria aguda atribuido a un trastorno motor degenerativo.

1.1 Identificación de portadores sintomáticos y asintomáticos de la mutación A431E.

Dado que esta mutación ya había sido reportada como patogénica y se asociaba al fenotipo descrito por la familia, se determinó que ésta era la causa más probable de su enfermedad. Por lo tanto, una vez que se obtuvieron muestras sanguíneas del resto de los familiares pertenecientes a la 3ª y 4ª generación (a excepción de dos sujetos), se secuenció únicamente la región comprendida dentro del exón 12 de *PSEN1* donde se halla la mutación A431E. De esta manera pudimos identificar cuatro portadores más de dicha mutación, de los cuales sólo uno se encontraba sintomático. (Figura 16B).

2. Caracterización clínica de los sujetos portadores de la mutación A431E.

De los cuatro portadores identificados a través de la secuenciación del exón 12 de *PSEN1*, únicamente contamos con la participación voluntaria de dos de ellos. Esto debido a que el sujeto III-10 manifestó su deseo de no continuar en el proyecto de investigación y el sujeto IV-1 al ser menor de edad, requería de la autorización de su madre a quien no pudimos contactar en el

[§] La estandarización de la metodología utilizada para la secuenciación de los genes causales de EAF fue uno de los objetivos de mi tesis de maestría titulada "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." en el año 2015.

momento. No obstante, el sujeto III-10 aceptó que los datos recabados hasta el momento de su salida del protocolo fueran usados para los fines de la investigación.

Los dos portadores que continuaron en el proyecto fueron clasificados según la etapa clínica en la que se encontraban en: paciente sintomático y paciente pre-sintomático.

2.1 Caso 1 [Paciente sintomático (PS)]:

Se trata de un hombre de 54 años con antecedentes de enfermedad motora de cinco años de evolución (Figura 16A, sujeto III-4). Como antecedentes patológicos relevantes ha padecido disfemia** desde la infancia, sin referir la edad de inicio. Su padecimiento actual comenzó con la aparición repentina de debilidad bilateral de las extremidades inferiores, aunque con predominio izquierdo, y un empeoramiento consecutivo de la fluidez del habla. Meses después comenzó a presentar dificultad para comer y beber, aunque al interrogatorio directo negó que sus síntomas correspondieran a una disfagia†† y los correlacionó mejor con disnea‡‡. Así mismo, refirió un empeoramiento de la agudeza visual que no mejoraba con los cambios de prescripción de sus lentes. Sus estudios médicos incluyeron una RM de la médula espinal realizada a los 50 años sin que se reportaran hallazgos que sugirieran un daño a este nivel. En ese entonces se encontraba desempleado pero recibía una pensión por discapacidad. El diagnóstico dado por su seguro

MoCA			MMSE			CDR		
	III-4	III-8		III-4	III-8	III-10		III-4
Visuospatial/ executive	2/5	4/5	Orientation	7/10	10/10	9/10	Memory	0
Denomination	3/3	3/3	Registration	3/3	3/3	3/3	Orientation	0.5
Attention	3/6	5/6	Attention and calculation	0/5	5/5	3/5	Judgment and problem solving	0.5
Language	2/3	3/3	Recall	0/3	1/3	2/3	Community affairs	0.5
Abstraction	1/2	2/2	Language and repetition	5/5	4/5	5/5	Home and hobbies	0
Differed memory	2/5	3/5	Complex commands	3/4	4/4	4/4	Personal care	0
Orientation	3/6	6/6						
Total	16/30	26/30	Total	18/30	27/30	26/30	Overall	0.5

Figura 17. Puntajes obtenidos en las pruebas de función cognitiva.

** Tartamudez.

†† Dificultad para deglutir los alimentos o los líquidos. Puede originarse a nivel de la garganta (orofaringe) debido a dolor por procesos inflamatorios o a defectos en el movimiento de los músculos de la lengua, carrillos, etc. También puede originarse a nivel del esófago, siendo la causa más común la acalasia, que es la espasticidad del músculo liso del esófago de origen neurológico.

‡‡ Dificultad para respirar.

médico era el de síndrome de la neurona motora superior por probable esclerosis amiotrófica lateral.

A los 53 años, obtuvo un puntaje de 18/30 en el MMSE y 16/30 puntos en la prueba MoCA, lo que denotó un deterioro cognitivo que alcanzaba el puntaje necesario para considerarse una demencia (Figura 17). A pesar de esto, vivía solo y podía realizar todas las actividades básicas de la vida diaria^{§§} por su cuenta, excepto por la transferencia. Obtuvo una puntuación de 0,5 en la escala CDR y, por lo tanto, se clasificó como una demencia leve.

En el examen neurológico, el paciente exhibió una enfermedad típica de la neurona motora superior con espasticidad de las extremidades inferiores, hiperreflexia generalizada (++++) que no llegaba a ser clonus y signos alterados de Babinski, Chaddock, Bing y Gonda/Stranski. También mostró una reaparición de reflejos primitivos como el de prensión palmar, glabellar y hociqueo que indicaban alteración neurológica del lóbulo frontal. Así mismo, presentaba atrofia muscular en ambas piernas, antebrazos y espasticidad de los músculos del cuello, así como movimientos de amplexión y amplexación^{***} del tórax reducidos. Finalmente, se comprobó la preservación relativa de la fuerza muscular (+++/++++) en sus cuatro extremidades. La sensibilidad superficial y profunda se encontraban inalteradas, así como las funciones autonómicas.

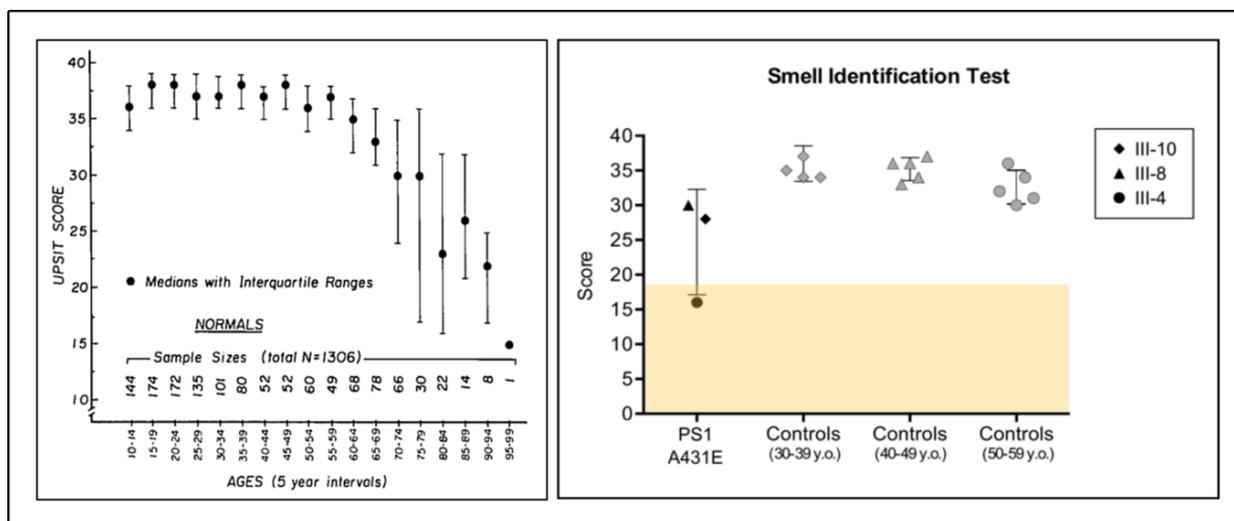


Figura 18. *Izquierda.* Gráfica de referencia de los puntajes obtenidos en la prueba de identificación de olores UPSIT ordenados por grupo etario. *Derecha.* Gráfica de los puntajes obtenidos por los sujetos portadores de la mutación A431E y sus respectivos controles en la prueba de identificación de olores. Un puntaje igual o menor a 19 es indicativo de anosmia.

^{§§} Son las actividades y conductas que realiza el ser humano adulto de forma independiente y como parte de una rutina básica diaria que le permite integrarse exitosamente a la sociedad, por ejemplo, asearse, cocinar, llamar por teléfono, vestirse, el control de esfínteres, etc.

^{***} Amplexión: Movimiento de expansión lateral de la caja torácica durante la inspiración. Amplexación: Movimiento de expansión anteroposterior de la caja torácica durante la inspiración. Su anomalía puede sugerir debilidad de los músculos respiratorios.

La función de los nervios craneales se mostró normal excepto por los nervios olfatorio y óptico. En la prueba de identificación de olores el paciente obtuvo un puntaje de 16/40, el cual, basándose en la tabla de puntuación del examen UPSIT, situaba al paciente en un estado de anosmia^{†††} (Figura 18). Aunque no se determinó la agudeza visual del paciente, él nos refirió que su principal molestia era la disminución de la visión en condiciones escotópicas^{‡‡‡}, es decir, nictalopía^{§§§}. Es por ello que decidimos realizar un estudio de fondo de ojo (i.e. fundoscopia) en el cual pudimos visualizar palidez y aplanamiento del disco óptico, así como borramiento del borde discal en sus porciones nasales. (Figura 19)

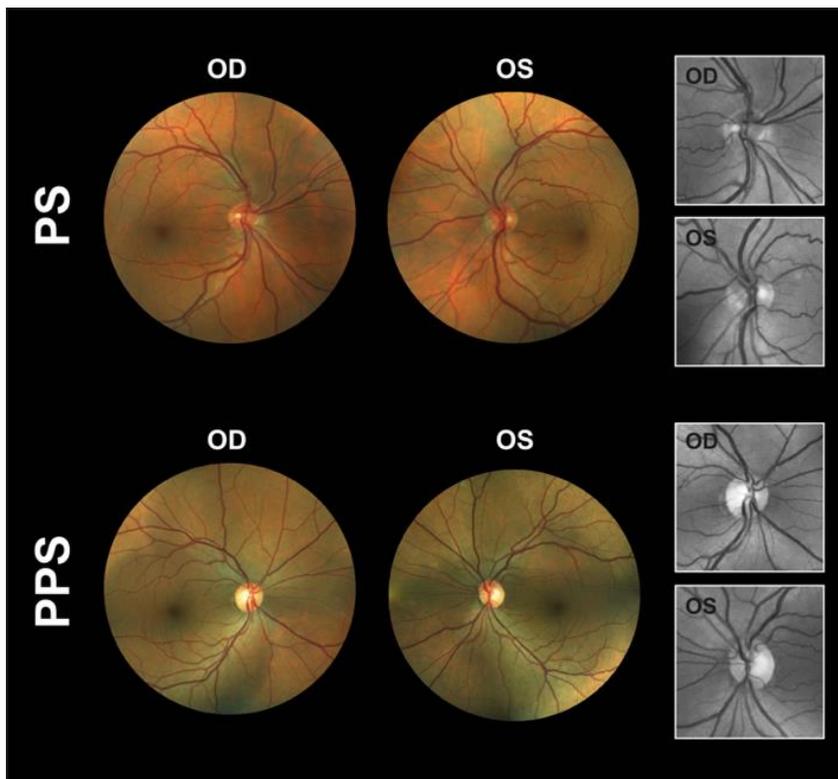


Figura 19. Imágenes de fondo de ojo del paciente sintomático (PS) y de la paciente pre-sintomática (PPS). A la derecha se muestra una amplificación del disco óptico utilizando un filtro en escala de grises para mejorar su visualización. OD: ojo derecho. OS: ojo izquierdo.

2.2 Caso 2 [Paciente pre-sintomática (PPS)]:

La paciente es una mujer de 46 años (Figura 16A, sujeto III-8) que se refería asintomática pero admitió experimentar una leve sensación de fatiga en ambas piernas, con predominio izquierdo. A los 45 años de edad, obtuvo un puntaje de 27/30 en el MMSE y 26/30 en la prueba MoCA, demostrando una función cognitiva normal. (Figura 17) En el examen físico, exhibió hiperreflexia generalizada (+++), quizás en menor medida que el PS, y una respuesta anormal pero incompleta a la estimulación de los reflejos patológicos de Babinski, Chaddock y Bing. A pesar de ello, podía

^{†††} Pérdida del sentido del olfato.

^{‡‡‡} Con baja iluminación ambiental, por ejemplo, dentro de una sala de cine.

^{§§§} Ceguera nocturna o dificultad de adaptación a la oscuridad.

caminar normalmente. Su tono muscular era normal en las cuatro extremidades y presentaba arcos de movimiento conservados. El resto de la exploración neurológica continuó sin datos patológicos, sin embargo, obtuvo una puntuación de 30/40 en la prueba de identificación de olores, que corresponde a una hiposmia leve en la escala de UPSIT. (Figura 18) Aunque llevaba menos de dos años usando anteojos, ella manifestó que su prescripción actual ya no le corregía la vista adecuadamente. A la exploración fundoscópica, encontramos palidez del nervio óptico como único dato anormal. (Figura 19)

3. Estudio por RM de los portadores de la mutación A431E.

Imagen ponderada en T1 – Morfología y volúmenes.

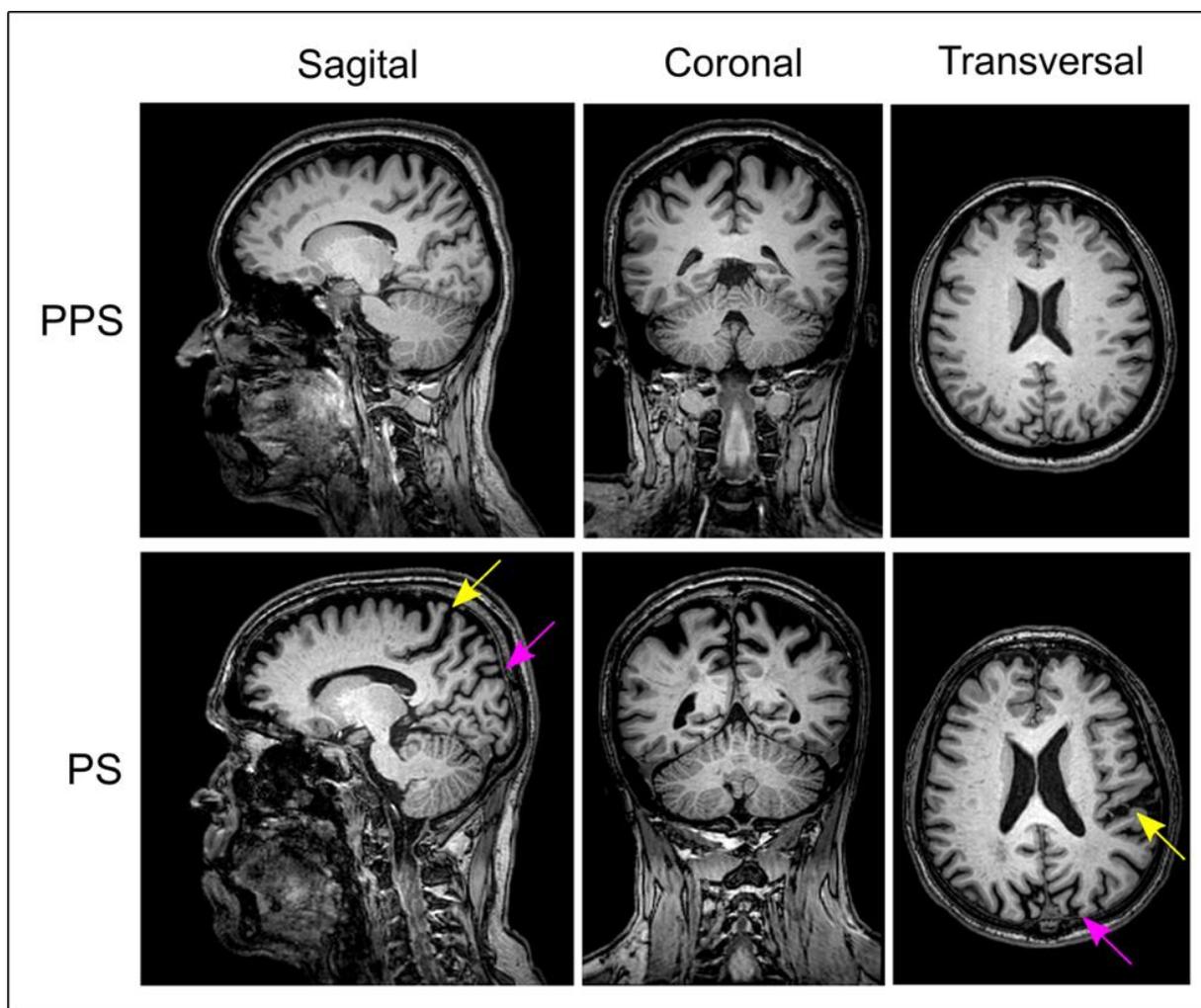


Figura 20. Imagen de RM ponderada en T1 donde se observan cambios atróficos relacionados con el Síndrome de Benson o atrofia cortical posterior. La flecha amarilla señala a la cisura del surco cingulado y la flecha rosa al surco parieto-occipital.

La evaluación de las imágenes obtenidas en T1 reveló un patrón de atrofia restringido a áreas parietooccipitales con predominio relativo del hemisferio derecho en ambos pacientes (Figura 20). En el PS, el patrón de atrofia junto con los trastornos visuoespaciales y la enfermedad de la neurona motora superior son todos criterios diagnósticos del Síndrome de Benson o atrofia cortical posterior asociada a EA (PCA-AD, por sus siglas en inglés). Según la escala de Koedam que clasifica a la PCA-AD según su gravedad entre 0 a 3, el PS se encontraba en el estadio 2, debido al ensanchamiento visible de la cisura del giro cingulado y del surco parieto-occipital (Figura 20, flechas amarilla y rosa). En el caso de la PPS, la clasificamos en el estadio 1, debido principalmente a la pérdida de volumen en ambos lóbulos parietales. Otro hallazgo fue la dilatación de los ventrículos laterales (VL) en el PS que podría estar asociado con la pérdida de masa cerebral. Posteriormente, estimamos que el tamaño del hipocampo en ambos pacientes era normal según la escala visual de atrofia medial-temporal (MTA: 0 en la PPS y 1 en el PS) confirmándose después que su tamaño estaba dentro del rango de volumen esperado para su edad (Figura 21 y Apéndice 4). Así también, las cifras volumétricas de la materia gris (corteza cerebral), obtenidas a través de análisis computacional, fueron normales en ambos pacientes, no obstante, en el PS se identificó una reducción significativa de la materia blanca (mielina). Aunado a lo anterior, pudimos observar que en ambos sujetos existían numerosas señales hipointensas de <1 cm dentro de la materia blanca profunda y que en el plano sagital parecían seguir la trayectoria de las arterias perforantes, por lo que determinamos que se trataban de espacios de Virchow-Robin anormalmente ensanchados (Figura 22).

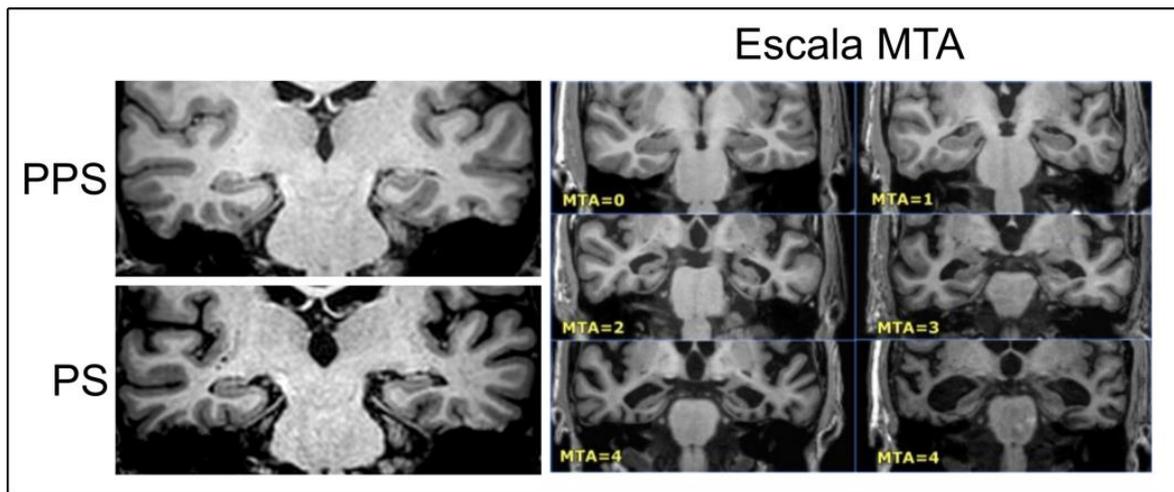


Figura 21. A la izquierda se muestra una proyección coronal del hipocampo de ambos pacientes. A la derecha se indica la escala visual de atrofia medial temporal.

Imagen ponderada por FLAIR – Lesiones de la materia blanca.

A través de la secuencia FLAIR detectamos varias WMH periventriculares, subcorticales y de la materia blanca profunda. A través del software de análisis de imágenes por resonancia magnética itk-SNAP, aplicamos un filtro artificial color rojo para poder distinguir claramente la morfología de dichas WMH. Así mismo, realizamos un análisis cuantitativo a través del software LesionBrain, para poder cuantificar el número de WMH y su volumen. Es así que logramos identificar 15 WMH en la PPS que se clasificaron en el nivel 1 de la escala de Fazekas por encontrarse aisladas y sin aparente formación de “puentes”. De forma contraria, el PS mostró 17 lesiones extensas que sí confluían alrededor de los VL, por lo que se le clasificó en el nivel 2 de Fazekas.

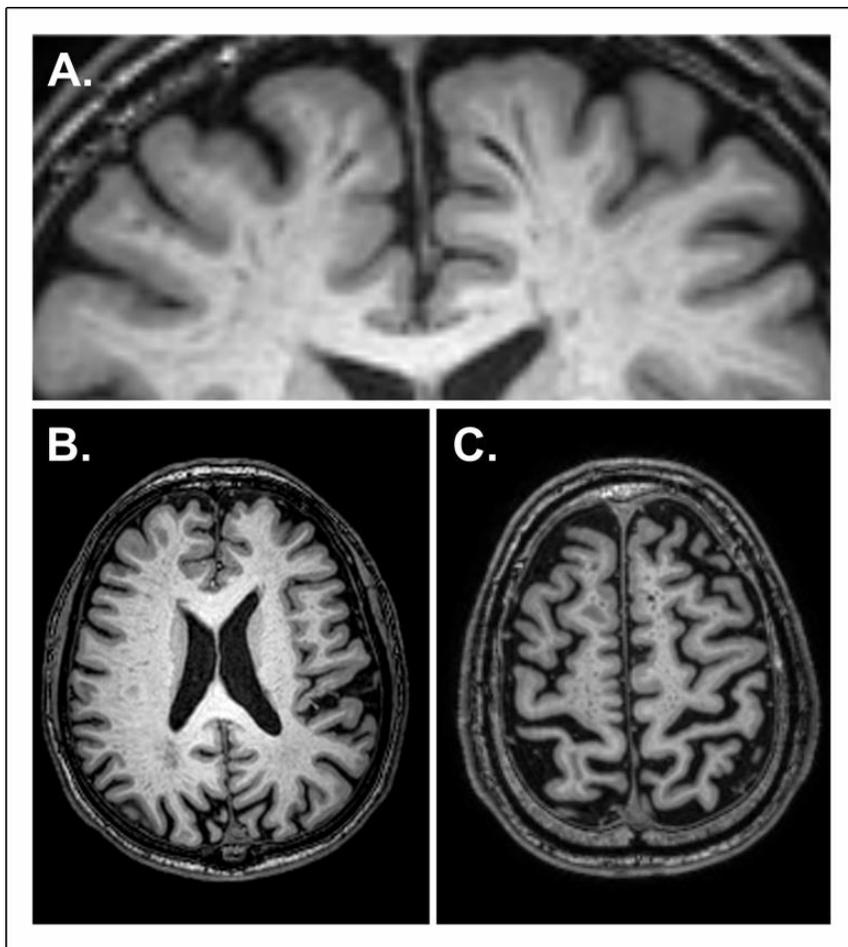


Figura 22. (A) Corte coronal del cerebro del PS donde se demuestra la presencia de numerosos espacios de Virchow-Robin ensanchados, localizados en ambos lóbulos parietales. **(B)** Corte axial donde se observa la amplia distribución de dichos espacios perivasculares dentro de la sustancia blanca cerebral y **(C)** en la corteza cerebral.

Si bien estas lesiones de la materia blanca se observaron fácilmente a través de las herramientas antes mencionadas, decidimos hacer una renderización 3D de dichas imágenes bidimensionales con el fin de hacer una correlación anatómica precisa de las WMH encontradas con las estructuras intracerebrales. De esta manera identificamos tres patrones diferentes de distribución de WMH en ambos pacientes. El primer patrón consistía en una línea delgada que corría a lo largo de la periferia de los VL. El segundo patrón se caracterizó por lesiones en forma de puntos gruesos que involucraban áreas más periféricas a los VL, como el cuerpo calloso (CC) y la radiación óptica en el lóbulo occipital. Finalmente, el tercero se observó como un patrón de “sal y pimienta” que

cubría áreas más amplias alcanzando el giro cingulado y la cápsula interna. Es así que, en la PPS pudimos identificar solo los dos primeros patrones de distribución de las WMH, mientras que en el PS encontramos los tres. Además, en el PS, el segundo patrón se encontró abundantemente dentro de todo el CC, en el lóbulo occipital que rodea los cuernos posteriores de los VL y cerca

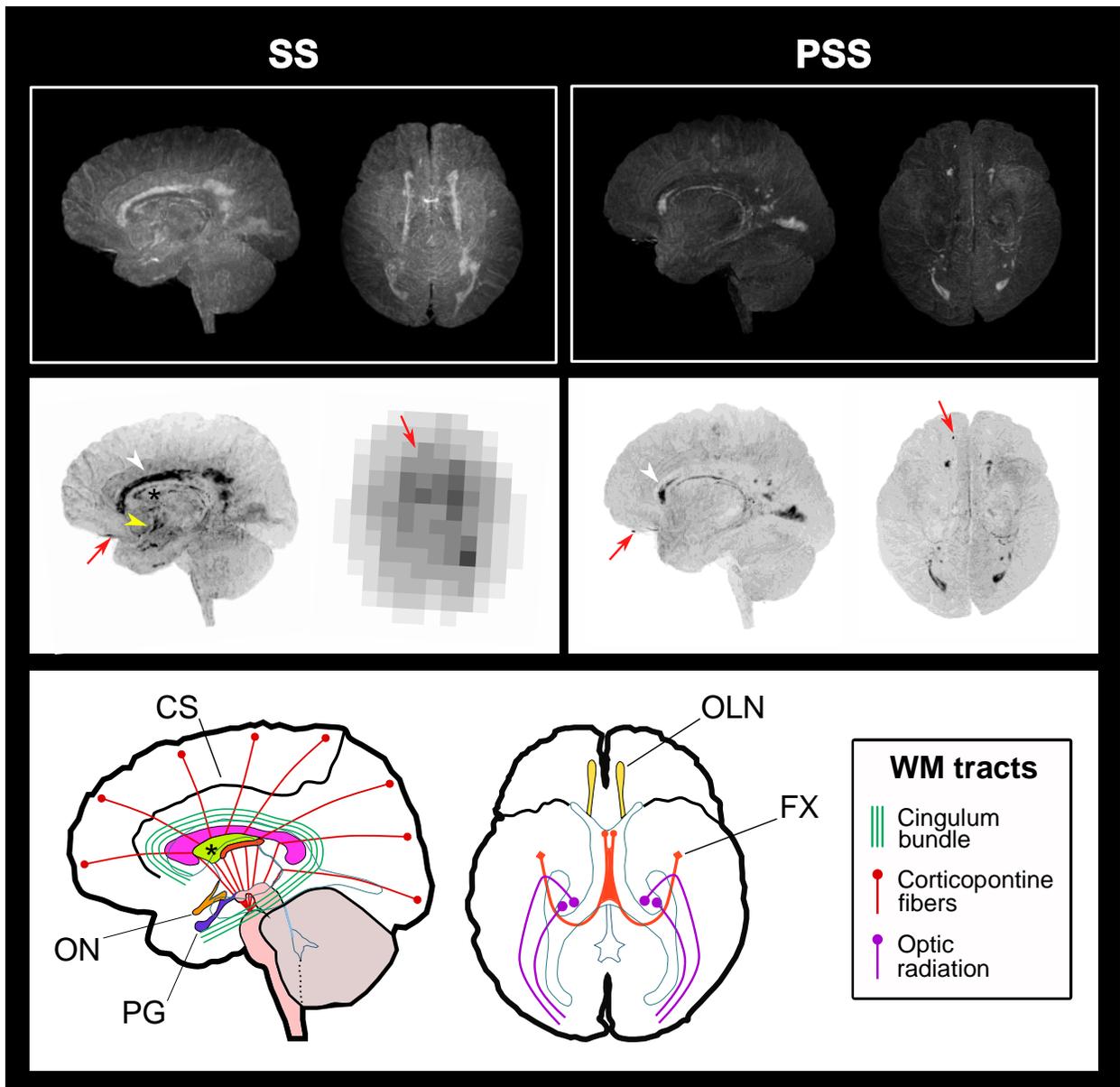


Figura 23. Localización de las hiperintensidades de la sustancia blanca vistas por RM ponderada por 3D-FLAIR. *Arriba.* Imágenes no modificadas de los cerebros del PS y PSS en proyecciones lateral izquierda y superior. *En medio.* Proyección inversa de las mismas imágenes para una mejor visualización de las lesiones de la sustancia blanca. La flecha roja señala la ubicación del nervio olfatorio. La cabeza de flecha blanca indica la zona con mayor afectación de la sustancia blanca, que corresponde al haz del cíngulo. La cabeza de flecha amarilla señala la posición del receso supraóptico. *Abajo.* Representación esquemática del cerebro y estructuras relevantes.

CS: Surco cingulado, FX: fórnix, OLN: nervio olfatorio, ON: nervio óptico, PG: hipófisis, PSS: paciente pre-sintomática, SS: paciente sintomático.

de la comisura anterior (CA). De forma particular, identificamos una señal intensa en el área anatómica del quiasma óptico (OC) (Figura 23, flecha roja). Por el contrario, todas estas WMH estaban ausentes en la PPS, a excepción de un área pequeña en el esplenio del CC y cerca de los cuernos posteriores de los VL.

Cabe mencionar que contábamos con el estudio de RM del sujeto III-10, el cual fue realizado en un laboratorio particular con un escáner de resonancia de 1.5 Tesla, es decir de menor resolución, además de no contar con una proyección en 3D. Sin embargo, pudimos identificar dos de las señales patológicas encontradas en el PS y la PPS, que son: los espacios VRS ensanchados en la sustancia blanca y la localización occipital de WMH. El sujeto tenía 36 años cuando se realizó el estudio y no presentaba datos de atrofia cortical.

4. Caracterización bioquímica de la función enzimática de GSEC con la mutación A431E.

4.1 Determinación de la actividad catalítica de GSEC en fibroblastos humanos que expresan la mutación A431E.

Para determinar el efecto que ejerce la mutación A431E sobre la actividad carboxipeptidasa-like de GSEC, evaluamos la producción de péptidos A β *in vitro*. Para este propósito, utilizamos fibroblastos derivados de la capa subcutánea de la piel del PS y cuatro controles sanos de edades similares y realizamos una transducción con un adenovirus recombinante (Ad9-CMV-APP) que contenía la secuencia de APP C99-3xFLAG, la cual es precursora directa de los péptidos A β . Pasadas 24 horas, cuantificamos las cantidades de péptidos A β producidos a través de ELISA. Como se muestra en la figura 24A, los fibroblastos del PS exhibieron un aumento discreto en la producción de A β 42, sin que éste llegara a sobrepasar los niveles de A β 40. A pesar de que las cantidades medidas de A β 40 en el PS también fueron mayores a las encontradas en los controles, la relación A β 42/40 demostró una diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.0204$) (Figura 24B). Así mismo, detectamos una alta concentración de A β 43 en el PS en completa oposición a los controles, cuyos niveles eran prácticamente cero (Figura 24A y D). Dado que ambas vías de procesamiento de APP C99 (A β 49 \rightarrow A β 40 y A β 48 \rightarrow A β 38) se vieron afectadas por la mutación, la reducción general de la procesividad por la actividad carboxipeptidasa-like de GSEC fue un resultado esperado (Fig. 24E). Además de demostrar que los cultivos primarios de fibroblastos humanos pueden usarse como un modelo *in vitro* confiable para la determinación del efecto de las mutaciones de EAF sobre la producción de péptidos A β , nuestros resultados demuestran que la mutación A431E

probablemente contribuye a la patogénesis neurodegenerativa de sus portadores a través de la producción elevada de A β 42 y A β 43, péptidos conocidos por sus propiedades neurotóxicas.

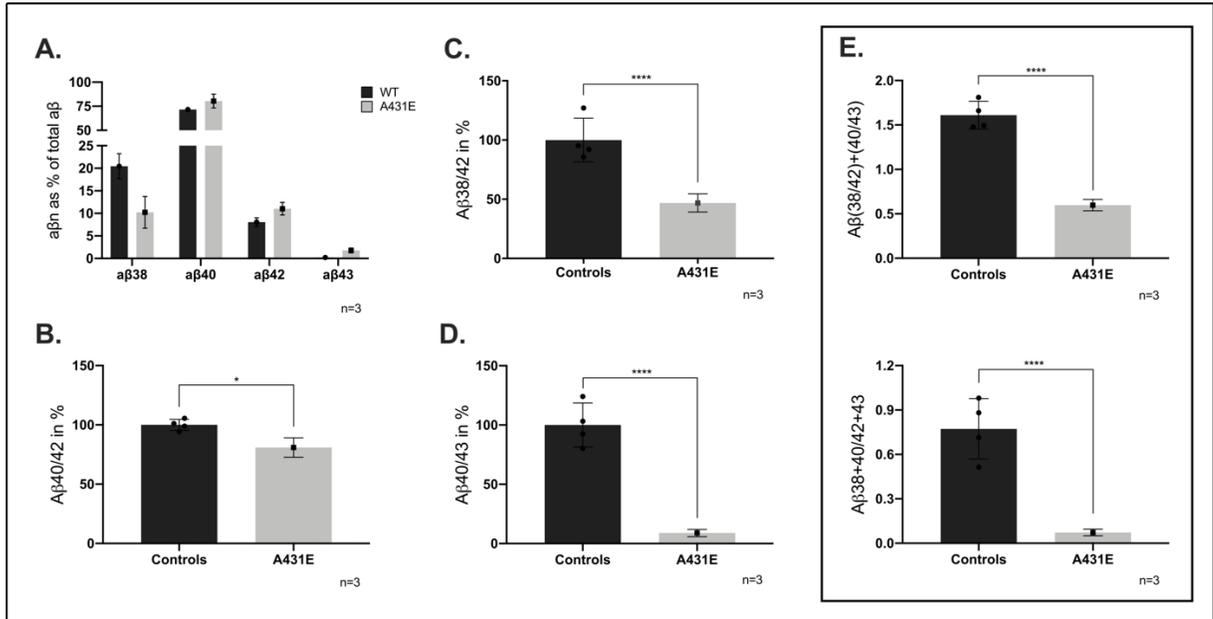


Figura 24. Cuantificación de los péptidos a β generados *in vitro* por fibroblastos humanos obtenidos del PS y sujetos control. **(A)** Perfiles de producción de las diferentes especies de a β expresados como porcentaje del total de péptidos cuantificados. **(B-D)** Las razones de a β 42/40, a β 38/42 y a β 40/43 se demostraron alteradas por la mutación A431E. **(E)** La procesividad total dada por la suma de los productos entre la suma de los sustratos así como por la suma de la procesividad individual de ambas vías (a β 38/42 y a β 40/43) demostró ser significativamente más baja en el paciente portador de la mutación A431E.

4.2 Determinación de la actividad catalítica de GSEC en fibroblastos embrionarios de ratón que expresan la mutación A431E o la mutación A431V.

En el año 2002, Matsushita y cols. reportaron una mutación de EAF distinta a la Jalisco en el residuo A431 de PS1. Aunque se le ha reportado con una edad de inicio sintomatológico similar a la A431E (44 años), la mutación A431V causa una demencia amnésica típica sin síntomas motores. Dadas estas diferencias fenotípicas entre ambas mutaciones, decidimos investigar cómo era la actividad carboxipeptidasa-like de GSEC en cada una para poder comparar sus perfiles de producción de a β . Para ello utilizamos células mef dKO-PS1/PS2 y rescatamos la expresión de PS1 con su variante humana mutada PS1-A431E o PS1-A431V así como un control que expresaba la forma silvestre de la proteína (PS1-WT) y cuantificamos el a β producido por cada una de ellas. En línea con los hallazgos anteriores, ambas mutaciones demostraron afectar la actividad carboxipeptidasa-like de GSEC al producir especies largas neurotóxicas de a β que no se hallaron en los cultivos de mef dKO-PS1-WT.

(Figura 25A) No obstante, aunque la función catalítica de GSEC con ambas mutaciones fue comparable, el impacto de la mutación A431E sobre las vías de procesamiento $A\beta_{49} \rightarrow A\beta_{40}$ y $A\beta_{48} \rightarrow A\beta_{38}$ *in vitro*, fue más significativo que su contraparte fenotípica A431V. (Figura 25C y D) Además, las proporciones alteradas de $A\beta_{38/42}$ y $A\beta_{40/43}$ causadas por la mutación A431E se debieron, principalmente, a dos circunstancias diferentes: la disminución drástica de la producción de $a\beta_{38}$ y la liberación prematura aumentada de $A\beta_{43}$. Curiosamente, las cantidades producidas de $A\beta_{42}$ y $a\beta_{40}$ fueron similares entre ambas mutaciones (Figura 25B), lo que sugiere la participación de un mecanismo alternativo (por ejemplo, la disminución de la vía de procesamiento $A\beta_{43} \rightarrow A\beta_{38}$) en la generación aumentada de $A\beta_{43}$ por encima de $A\beta_{38}$, sin alterar la producción de $A\beta_{40}$.

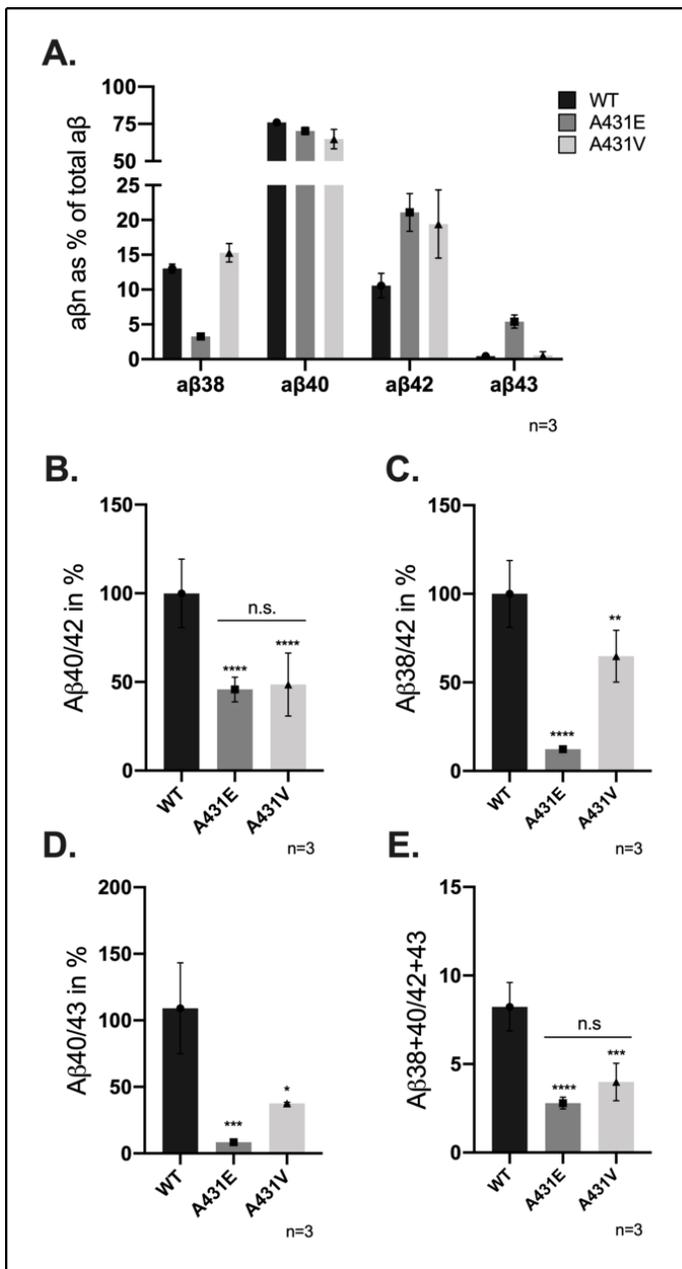


Figura 25. (A) Los perfiles de producción de las diferentes especies de $a\beta$ fueron similares entre ambas mutaciones de A431, excepto por la producción aumentada de $a\beta_{43}$ por la mutación A431E. **(B-D)** Las proporciones de $a\beta_{38/42}$ y $a\beta_{40/43}$ fueron afectadas con mayor severidad por la mutación A431E que A431V. **(E)** A pesar de ello, ambas mutaciones presentaron una disminución en la procesividad de APP-C99 estadísticamente comparable.

4.3 Efectos de la mutación A431E sobre la expresión de GSEC.

La mutación R278I de PS1 es una de las mutaciones causantes de EAF que afectan de forma agresiva la función catalítica de GSEC. Esto se debe, en parte, a que altera el proceso de autoendoproteólisis de PS1, por lo que disminuye drásticamente los niveles de GSEC activa en la célula. Paradójicamente, una de las especies de $A\beta$ más abundantemente producida por esta mutación es $A\beta_{43}$, precursor directo de $A\beta_{40}$. Debido a que encontramos grandes cantidades de $A\beta_{43}$ en los sobrenadantes de los fibroblastos humanos del PS y de los mef-dKO-PS1-A431E, decidimos comprobar si ésta también alteraba la activación y expresión de PS1 como la R278I. Para ello, realizamos un fraccionamiento celular de manera que sólo cuantificáramos los niveles de GSEC expresados en la membrana celular de las mef dKO-PS1-A431E. Como control incluimos membranas de mef dKO-PS1-A431V y de mef dKO-PS1-WT.

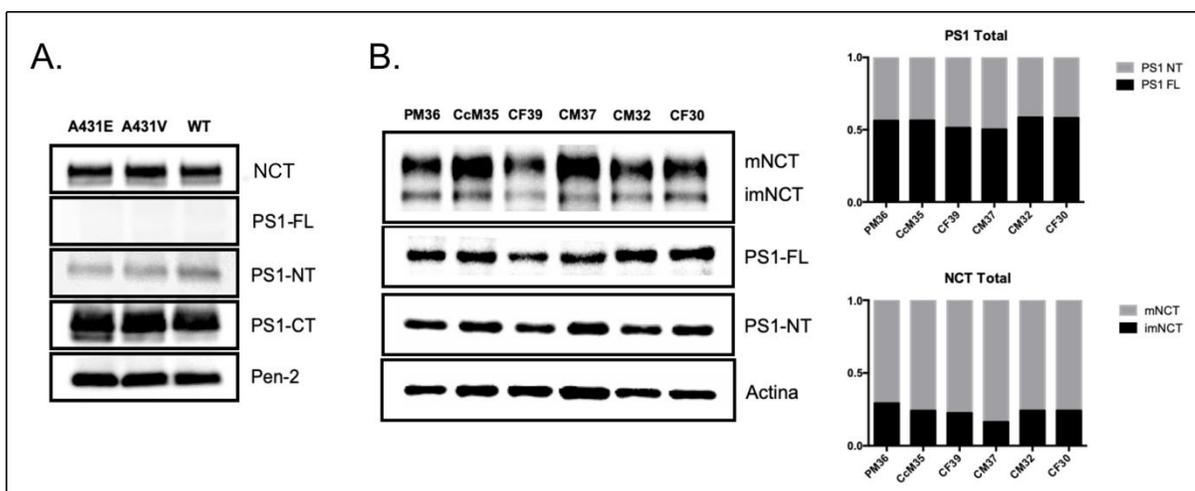


Figura 26. Expresión de las proteínas de GSEC en células mef-dKO y células del epitelio olfatorio. **(A)** La ausencia de señal en el peso esperado para la PS1 inmadura (full-length) demuestra que las mutaciones A431E y A431V no alteran el proceso de endoproteólisis de PS1. **(B)** La cuantificación de la intensidad relativa normalizada contra la actina demostró que no existen diferencias significativas en la expresión de las formas madura e inmadura de PS1 y NCT entre el portador de la mutación A431E (PM36) y sus controles consanguíneo (CcM35) y no consanguíneos (CMx).

Como se demuestra en la figura 26A la mutación A431E no altera la expresión de GSEC en la membrana plasmática, ya que se detectaron niveles similares de PS1 activa, PEN-2 y NCT en las tres líneas celulares. Por otra parte, utilizamos extractos totales de proteína derivados de células precursoras neuronales del sujeto III-10 y de cinco controles sanos de edad similar para conocer la proporción de PS1 inactiva (encontrada en retículo endoplásmico y Golgi) y PS1 activa (en la membrana celular) y de esta forma comprobar que la mutación A431E no altera su proceso autoendoproteolítico. Así también, determinamos los niveles de expresión

de NCT madura (O-glicosilada) e inmadura para reforzar nuestros resultados. Efectivamente, los niveles de expresión de ambas especies de PS1 y de NCT fueron comparables entre el sujeto portador y sus controles, demostrando que la mutación A431E no afecta la maduración del complejo GSEC ni su expresión en la célula. (Figura 26B)

4.4 Comparación de los perfiles catalíticos de GSEC entre mutaciones causantes de PE y mutaciones no asociadas a trastornos motores.

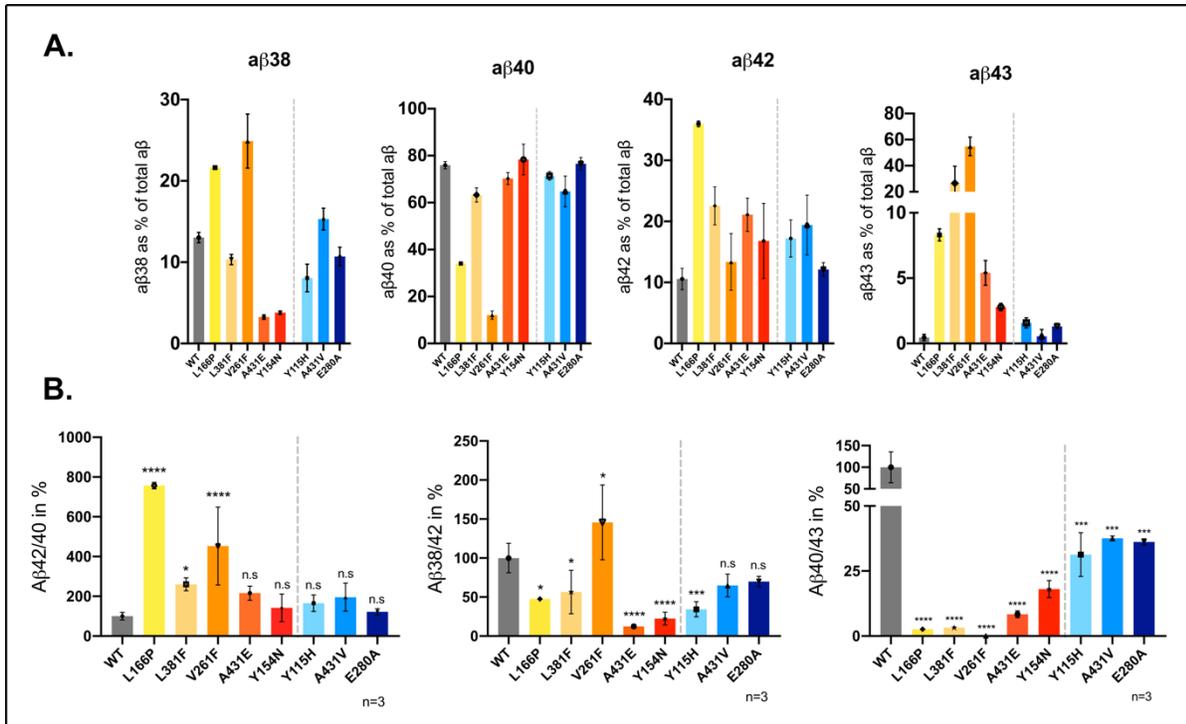


Figura 27. Generación de péptidos aβ por células portadoras de las mutaciones de PS1 asociadas al fenotipo de PE y su comparación con aquéllas causantes de demencia típica. **(A)** El perfil de producción de péptidos aβ es muy distinto para cada mutación, sin embargo se notó un incremento en la cantidad de aβ43 generado por las células con las mutaciones asociadas a PE. **(B)** De acuerdo al resultado anterior, la proporción aβ40/43 fue menor en las células asociadas al fenotipo motor.

A partir de la observación de que la principal diferencia entre las mutaciones A431E y A431V en la función carboxipeptidasa-like de GSEC fue la liberación incrementada de Aβ43, decidimos investigar si la producción elevada de este péptido podría ser una característica común de las mutaciones asociadas a PE. Para este propósito generamos líneas celulares a partir de mef dKO-PS1/PS2, siguiendo la misma metodología del ensayo anterior. Dichas líneas celulares expresaban una de las siguientes mutaciones asociadas a PE: Y154N, L166P, V261F, L381F y L381P. Así también, se generaron líneas mef con mutaciones de EAF causantes de síndromes demenciales amnésicos clásicos, las cuales fueron: Y115H y G280A. También incluimos a las mef dKO-PS1-A431E y mef dKO-PS1-A431V utilizadas en el

experimento anterior. La primera observación que hicimos fue que todas las mutaciones de analizadas poseían un perfil único de procesamiento de APP-C99 que modificaron las proporciones A β 38/42, A β 40/43 y A β 42/40 de forma independiente, en concordancia con la hipótesis cualitativa de la generación de péptidos a β causada por las mutaciones de EAF. (Figura 27) Aunque las mutaciones asociadas al fenotipo clásico de la EAF también produjeron A β 43 *in vitro*, en general, las cantidades de este péptido fueron significativamente menores en comparación con las mutaciones asociadas a PE. Este fenómeno fue más evidente al calcularse la proporción media de A β 40/43 la cual fue de 8.56% para el grupo de mutaciones de PE y 33.78% para el grupo de las mutaciones de EAF clásica; ambas normalizadas contra el WT.

4.5 Cuantificación de la generación de AICD por la GSEC con la mutación A431E.

Para caracterizar el efecto de la mutación A431E sobre la actividad endopeptidasa de GSEC realizamos ensayos de termoactividad *in vitro* utilizando proteína recombinante purificada de GSEC-PS1-WT, GSEC-PS1-A431E y GSEC-PS1-A431V, así como APP-C99-3xFLAG como sustrato. Además, basándonos en la actividad carboxipeptidasa-like de las mutaciones de EAF evaluadas en el ensayo anterior, seleccionamos a las mutaciones E280A y L166P como límites superior e inferior del rango de procesividad exhibido por GSEC mutada *in vitro*. Esto con el fin de generar una escala cualitativa artificial con la cual comparar a las mutaciones A431E y A431V. De esta forma, al cuantificar la generación de péptidos AICD de ambas mutaciones, pudimos comprobar que éstas alteraban la termoestabilidad de GSEC de manera similar a la mutación E280A, por lo que sus efectos sobre la actividad endopeptidasa se consideraron moderados (Fig. 28A). No obstante, al comparar las curvas de termoactividad entre A431E y A431V, esta última mostró una etapa de sobreactivación temprana antes de sufrir la caída en la producción de AICD. (Figura 28B) Dicha sobreactivación no se observó en la mutación A431E, por lo que podría considerarse un fenómeno diferencial entre ambas.

Dado que la T_m (temperatura a la cual la producción de AICD cae al 50% de la producción total alcanzada a 37°C) se ha correlacionado con la edad de inicio sintomatológico en diferentes mutaciones causantes de EAF, decidimos comprobar si esta relación se cumplía en la mutación A431E. Cabe aclarar que no existe una edad promedio de inicio reportada para la PE causada por esta mutación, sin embargo, decidimos utilizar la edad promedio de inicio de la PE de nuestros pacientes (i.e. 50 años). Sorprendentemente, el valor de T_m de la GSEC con la mutación A431E correlacionó con la edad promedio de aparición de la PE y no con la reportada por Yescas y cols. para la demencia (i.e. 40 años) (Fig. 28C). Por lo tanto, esto

sugiere que la disminución relativa de la actividad endopeptidasa causada por la mutación A431E podría estar contribuyendo particularmente en la patogénesis de la PE.

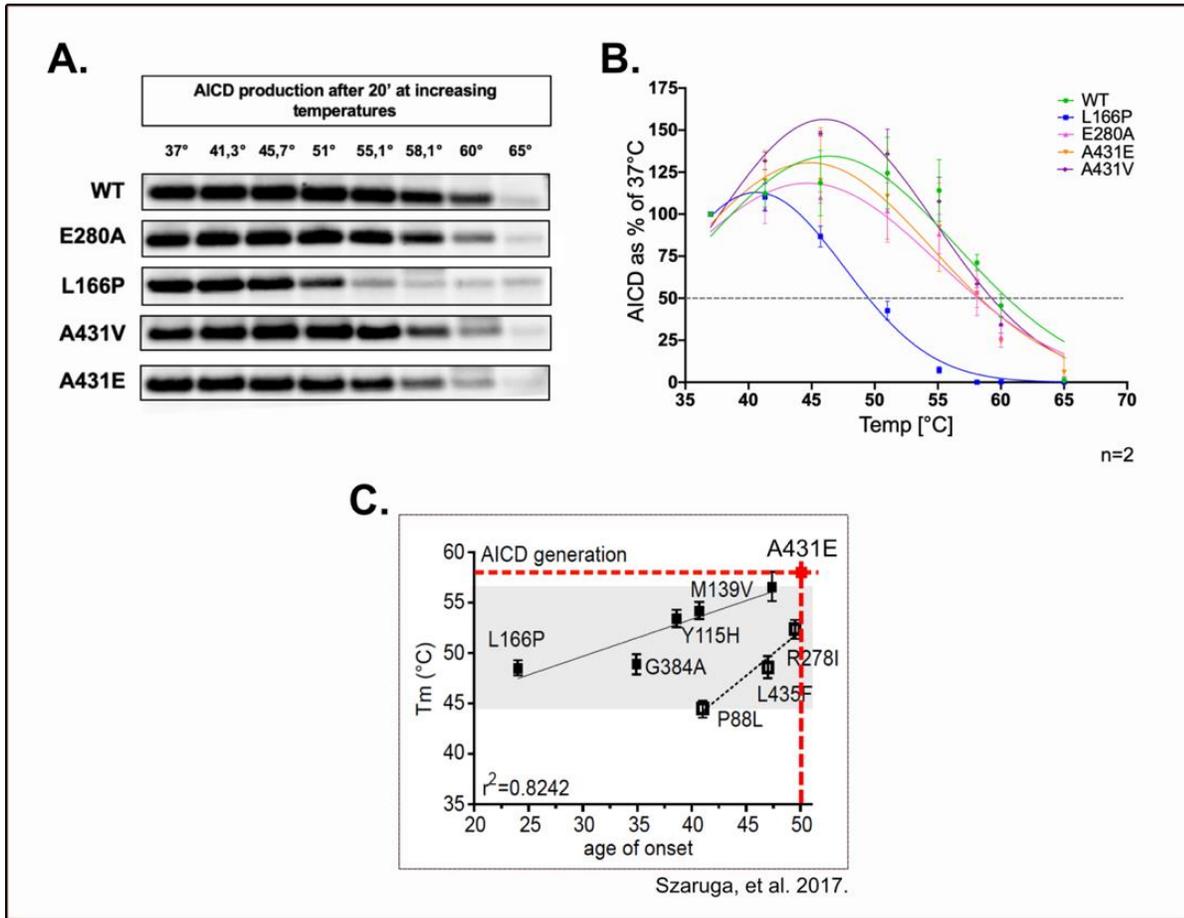


Figura 28. Cuantificación de AICD generada a partir de ensayos de termoestabilidad. **(A y B)** Las mutaciones A431E y A431V presentaron una procesividad similar a temperaturas crecientes, sin embargo, la mutación A431V causó una hiperactivación aguda de la GSEC. **(C)** La Tm calculada para la mutación A431E correlacionó directamente con la edad de inicio sintomatológico de la paraparesis espástica reportada para esta familia.

CONCLUSIONES

- El PS portador de la mutación A431E padecía un deterioro cognitivo leve del tipo no amnésico con alteraciones visuoespaciales y deficiencia olfatoria. Además, mostró signos típicos de un síndrome de la neurona motora superior que, aunado al hallazgo de atrofia parieto-occipital, corresponde a un Síndrome de Benson o Atrofia Cortical Posterior por Enfermedad de Alzheimer.
- La aparición progresiva de atrofia parieto-occipital en los pacientes portadores de la mutación A431E demuestra que este fenómeno patológico es un evento tardío en la enfermedad que, además, correlaciona con la presencia de PE.
- Las WMH fueron identificadas desde la etapa asintomática de la enfermedad y sin datos de atrofia (sujeto III-10) o en condiciones de hiperreflexia sin paraparesis (PPS). Lo anterior demuestra que el daño a la mielina es un evento patogénico temprano en la enfermedad.
- La localización anatómica de las WMH periventriculares coincide con la sintomatología no motora en el PS, como: la disfunción olfatoria (comisura anterior), la disminución de la capacidad visual (quiasma óptico) y las alteraciones cognitivas visuoespaciales (radiación óptica); y con las zonas de atrofia parieto-occipital (cuerpo caloso, cíngulo y cuernos posteriores de los ventrículos laterales).
- La expansión anatómica y temporal de las WMH periventriculares sucede de forma excéntrica a partir de los ventrículos laterales. Ya que la mielina más alejada a los ventrículos (p. ej. materia blanca profunda y materia blanca cerebelar), parece no afectarse, el daño a la mielina no es intrínseco (dismielinización).
- La persistencia y progresión temporal de las zonas de WMH sugiere que el proceso de remielinización axonal (una función de los oligodendrocitos) en la zona periventricular es insuficiente o defectuoso contra el factor nocivo causal del daño a la mielina.
- El hallazgo de VRS ensanchados en el sujeto asintomático III-10 sugiere que la alteración de la barrera hematoencefálica a nivel de las arterias perforantes cerebrales es también un evento temprano en la patología causada por la mutación A431E.
- La mutación A431E tiene un efecto moderado en la estabilidad del complejo GSEC/APP-C99, no obstante, ésta causa una disminución significativa de su procesividad *in vitro*.
- El péptido más abundante en los cultivos de fibroblastos humanos con la mutación A431E fue A β 40 seguido de A β 42; a pesar de esto, la razón A β 40/42 del portador en comparación con los controles sanos fue menos significativa que la de A β 40/43.

- Las mutaciones A431E y A431V incrementan la producción de A β 42 *in vitro*, no obstante, la mutación A431E disminuye significativamente la producción de A β 38, mientras que A431V mantiene niveles similares del mismo péptido comparado con el WT. Esto sugiere que las bajas cantidades de A β 38 vistas en los cultivos con la mutación A431E podrían derivar de la alteración de la vía alterna de A β 43→A β 38, contribuyendo a sobreproducción de A β 43 *in vitro*.
- Ambas mutaciones de A431 disminuyen la procesividad total de GSEC *in vitro* de forma significativa en comparación al WT, aunque no mostraron una diferencia estadística entre ellas.
- Las mutaciones de EAF que causan PE provocaron un aumento considerable del péptido A β 43 en comparación con las mutaciones de EAF típico, *in vitro*. Ningún otro péptido de A β cuantificado mostró una tendencia diferencial entre ambos tipos de mutaciones de EAF.
- La mutación A431E altera moderadamente la actividad endopeptidasa (ϵ -) de GSEC *in vitro*, mostrando una T_m similar a la mutación E280A (~58°C) y menor a la de A431V (~59°C) y WT (61°C).
- A pesar de mostrar una curva de termoestabilidad similar a A431V, la mutación A431E mostró un descenso más pronunciado en su actividad endopeptidasa *in vitro* y una producción de AICD 35% menor que A431V a los 45°C.
- La T_m estimada para la GSEC-PS1-A431E tuvo una correlación lineal con la edad de inicio sintomatológico de PE reportada por nosotros para esta familia y no con aquella reportada para el síndrome demencial en reportes previos.

DISCUSIÓN

La mutación A431E del gen *PSEN1* se describió por primera vez hace más de una década en once familias originarias del estado de Jalisco y en trece familias de los Estados Unidos de ascendencia mexicana. Su fenotipo se describió como una demencia amnésica de inicio temprano (~40 años) con una presentación variable de PE entre sus portadores. Para nuestro estudio, contamos con una familia originaria de la Ciudad de México en la cual identificamos cinco portadores de mutación A431E, dos de los cuales eran sintomáticos y de inicio sintomatológico asociado a un trastorno motor en los miembros pélvicos. Además, todos sus familiares afectados pertenecientes a las dos primeras generaciones en su árbol genealógico (Figura 1A, formas de color gris) debutaron con síntomas motores y padecieron deterioro cognitivo hasta la última etapa de la enfermedad, aproximadamente 5 años después del inicio sintomatológico. Hasta el momento, esta es la única familia de portadores de la mutación A431E que se haya reportado con tal consistencia en la aparición de trastornos motores entre sus miembros. Si bien no podemos explicar por qué la PE no se manifiesta con tanta frecuencia en las demás familias descritas con esta mutación, la presentación condicional de este trastorno podría atribuirse a plasticidad fenotípica. Debido al patrón de herencia autosómico dominante de las mutaciones de EAF, su penetrancia completa y el efecto fundador encontrado para la mutación A431E, creemos que es poco probable que la alta frecuencia de PE en esta familia se deba a la influencia de otras variantes genéticas de riesgo para la EA, como lo es APOE ϵ 4. Lo anterior también se sustenta en los resultados reportados para una cohorte de 126 individuos con mutaciones en *APP* (31 sujetos) y en *PSEN1* (95 sujetos) en los cuales no se halló correlación entre el genotipo de APOE y la edad de inicio sintomatológico, la presencia de demencia atípica y la incidencia de trastornos motores como mioclonías.

Aunque la aparición temprana de síntomas piramidales previos al síndrome demencial ya se ha observado en portadores de diferentes mutaciones de *PSEN1* asociadas a PE, como lo son Y154N, P88L y R278K, dicha presentación clínica no es común. Independientemente del orden en que se manifiesten estos trastornos, la mayoría de los pacientes con PE sufren síndromes demenciales atípicos caracterizados por alteraciones cognitivas visuoespaciales y un mayor tiempo de supervivencia en comparación con la mayoría de los portadores de otras mutaciones causales de EAF. En el PS, identificamos una demencia no amnésica muy leve que le permitía realizar la mayoría de sus actividades de la vida diaria por sí mismo. Es por ello que obtuvo un puntaje de 0.5 en la escala CDR, que es el puntaje más bajo reportado para los portadores de esta mutación. Teniendo en cuenta que el PS tenía 54 años cuando fue evaluado, es decir, un año menor que la edad media de muerte calculada para su familia (~55 años) y seis años mayor

que la reportada para los otros portadores de la mutación A431E (~48 años). De esta forma, podemos confirmar que la patología central en este paciente fue la PE y que a pesar de padecer un deterioro cognitivo, éste no era el motivo de su discapacidad.

Por otro lado, fue difícil determinar cuánta influencia tuvo la disminución de su capacidad visual en su desempeño en la parte escrita de las pruebas cognitivas que principalmente evalúan la cognición visuoespacial. Aunque no evaluamos agudeza visual de los pacientes, realizamos una fundoscopia retiniana donde encontramos un desvanecimiento moderado del borde del disco óptico en el PS y palidez del disco en la PPS que podría ser causada por patologías asociadas a desmielinización. De serlo, esto coincidiría con el hallazgo de una señal intensa en el quiasma óptico del PS en la resonancia magnética ponderada por FLAIR. (Figura 2C, flecha roja). Este tipo de imágenes se encuentran regularmente en pacientes con neuromielitis óptica (NMO), que es una enfermedad desmielinizante causada por autoanticuerpos contra el canal de agua acuaporina-4 (AQP-4) en la barrera hematoencefálica. No obstante, se necesitarían más pruebas para confirmar la existencia de un proceso desmielinizante del nervio óptico, como una prueba de potenciales visuales evocados.

Así mismo, identificamos varias WMH periventriculares en los sujetos PS y PPS las cuales están asociadas a cambios patológicos inflamatorios o de desmielinización. Esta observación concuerda con la alta prevalencia de WMH en pacientes de EAF portadores de mutaciones ligadas a PE halladas en la porción carboxilo terminal de PS1, posteriores al codón 200. Si bien ya se han identificado WMH occipitales en pacientes de EAF hasta 22 años antes de presentar síntomas de demencia o PE, la correlación clínica de dichas lesiones de la materia blanca y su papel dentro de la patología neurodegenerativa aún se encuentra en discusión. No obstante, consideramos que las WMH encontradas en nuestros pacientes coincidían anatómicamente con las estructuras cerebrales más probablemente asociadas a su estadio clínico. Por ejemplo, en el PS encontramos abundantes WMH a lo largo del cuerpo caloso, que es una estructura altamente mielinizada por la cual transitan varios tractos axonales provenientes de la corteza motora primaria y la corteza visual. Mientras tanto, en la PPS, el cuerpo caloso se encontró casi libre de WMH con la excepción de su porción anterior denominada genu o rodilla, cuya función es conectar las cortezas pre-frontales de ambos hemisferios cerebrales.

Además de la señal hiperintensa encontrada en el quiasma óptico del PS, también encontramos WMH en las proximidades de la comisura anterior, que es un tracto de materia blanca que contiene varias fibras nerviosas de ambos lóbulos temporales, incluido el tracto olfatorio. La disfunción olfatoria es un hallazgo frecuente entre los pacientes con deterioro cognitivo leve y

demencia tipo Alzheimer y se ha asociado principalmente con la presencia de tau (es decir, los ovillos neurofibrilares) y la consecuente neurodegeneración en diferentes niveles de la vía olfatoria. Sin embargo, esta condición también se ha reportado en otras enfermedades desmielinizantes como la NMO y la esclerosis múltiple (EM).

Dado que no todas las áreas mielinizadas del cerebro se vieron afectadas sino únicamente aquellas estrechamente relacionadas con los ventrículos laterales, creemos que estas lesiones de la materia blanca fueron causadas por un mecanismo patogénico primario que no es intrínseco a la mielina. Una posibilidad proviene del descubrimiento de numerosos VRS ensanchados en el sujeto III-10, la PPS y el PS, un efecto secundario a la disfunción de la barrera hematoencefálica. A través de dichos espacios se lleva a cabo el transporte de solutos desde el espacio subaracnoideo hacia el intersticio cerebral a través del llamado flujo paravascular. El agrandamiento de tales compartimentos sucede cuando el drenaje del líquido intersticial perivascular está impedido y está fuertemente asociado con la AAC. La AAC es la acumulación de péptidos de A β alrededor de las arterias cerebrales y a menudo se encuentra en coexistencia con WMH y la presencia de CWP. Más aún, estas características patogénicas ya se han reportado en otros portadores de la mutación A431E y en sujetos con mutaciones ligadas a PE. La supuesta correlación entre estos hallazgos patológicos y el desarrollo de las alteraciones motoras y cognitivas encontradas en los pacientes con la mutación A431E deberá verificarse mediante ensayos clínicos y experimentales.

Uno de los ensayos experimentales más indispensables para el estudio de los efectos de las mutaciones en la procesividad de GSEC es la cuantificación de péptidos A β *in vitro*. En nuestro estudio, utilizamos dos modelos celulares distintos a través de los cuales pudimos determinar el efecto en el procesamiento de APP-C99 causado por la mutación de PS1 A431E. Hasta hace unos años, la proporción A β 40/42 era considerada la más importante para predecir la patogenicidad relativa de las mutaciones causantes de EAF debido a la observación de la neurotoxicidad de A β 42 *in vitro* y que tanto en estos pacientes como en los afectados con EAE la relación entre el péptido A β 40 y A β 42 se encuentra alterada. No obstante, recientemente se ha comprobado que otras especies largas de A β , como A β 43, son inclusive más neurotóxicas que A β 42 y también forman parte de las placas amiloides. A través de ensayos *in vitro* utilizando fibroblastos provenientes del PS y comparando la actividad enzimática de GSEC con controles sanos, pudimos determinar que la razón A β 40/42 es modificada por la mutación A431E. Sin embargo, esta mutación también causó un aumento en la producción de A β 40 por encima del nivel observado en controles sanos. Esto correlaciona con el reporte de Maarouf y cols. en el 2008, en el que encontraron niveles altos de A β 40 y una relación A β 42/40 menor a 1 en el tejido

cerebral de una mujer portadora de la mutación A431E. Dicha sobreproducción de A β 40 no ha sido reportada para ninguna otra mutación de EAF en PS1, aunque se le ha encontrado como parte de los agregados amiloides perivasculares en la AAC. De hecho, se ha demostrado que A β 40 inhibe la proliferación de las células endoteliales vasculares *ex vivo*, es decir, impide la revascularización de las arterias cerebrales. Curiosamente, la sobreproducción de A β 40 fue vista únicamente en el modelo de fibroblastos humanos, que por naturaleza son heterocigotos para la mutación, y no en el modelo transgénico de mefs donde toda la PS1 expresada porta la mutación A431E. Una de las posibles explicaciones a esta paradoja es que en los fibroblastos humanos, la PS1 normal (sin mutación) es capaz de procesar al A β 43 liberado prematuramente por la PS1 mutada, generando A β 40. Dicha hipótesis justificaría el hallazgo de niveles más altos de A β 43 en el modelo celular de mefs, en donde no existe una PS1 silvestre.

Aunque la determinación cuantitativa de A β 43 no es un objetivo frecuente en los ensayos experimentales de EAF, ya se ha informado que algunas mutaciones en PS1 y APP generan cantidades significativas de este péptido. Curiosamente los sujetos afectados por dichas mutaciones presentan abundantes placas de lana de algodón en la evaluación post-mórtem. A pesar de que dichas placas en lana de algodón son vistas frecuentemente en pacientes con mutaciones de EAF asociadas a trastornos motores, éstas son habitualmente teñidas por métodos convencionales que identifican a los péptidos A β 40 y A β 42. No obstante, en un reporte de Miravalle y cols. en 2005, donde se analizaron muestras cerebrales de un individuo portador de la mutación V261F y otro con la mutación V261I, se determinó la composición de las placas en lana de algodón encontradas en los cerebros de dichos sujetos a través de microdissección con láser y espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis determinó que las principales especies de A β en dichas placas fueron A β 42 y A β 43, así como también sus formas N-truncadas A β 11-42 y A β 11-43. Cabe destacar que la mutación V261F está ligada al fenotipo de PE y fue analizada en nuestro ensayo con mefs transgénicos, donde se observó una gran cantidad de A β 43 y muy poco A β 40. Aunque la concurrencia de síntomas asociados a un trastorno motor y la producción elevada de A β 43 no se ha investigado formalmente, nuestros datos sugieren que dicha especie de A β podría tener un papel activo en la patogénesis de PE.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de placas en lana de algodón se ve frecuentemente acompañada de AAC en forma de acumulaciones perivasculares de A β y de VRS ensanchados. A pesar de que dichas lesiones perivasculares no han sido formalmente investigadas en asociación con la presencia de A β 43, es probable que éste también se acumule en tales regiones. Por ejemplo, la mutación de APP V717I (Londres) está asociada con la presencia de AAC y es también productora de cantidades significativas de A β 43 (datos

preliminares del laboratorio de la Dra. Chávez-Gutiérrez). Aunque la mutación V717I de APP no está asociada a PE, se sabe que causa numerosas microhemorragias intracerebrales que también han sido vistas en otras mutaciones de EAF asociadas a PE, como la A431E de *PSEN1*. Debido a ello, creemos que la patología vascular vista en los pacientes con la mutación A431E probablemente tenga origen en la acumulación de A β 43 perivascular. Si bien esto no explica su correlación con los síntomas motores en los pacientes, éste podría ser uno de los factores patogénicos que derivan en su enfermedad.

Finalmente, la demostración de la actividad endopeptidasa modificada por la mutación A431E sugiere que otros sustratos de GSEC podrían verse afectados por dicha alteración genética. Como se sabe, algunos de estos sustratos participan en procesos celulares indispensables para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso central. Tal es el caso de NRG1, quien es responsable de estimular la formación de mielina por los oligodendrocitos. Dado que nuestros pacientes demostraron datos clínicos de desmielinización, es probable que esta proteína tome parte en el proceso de reparación de las vainas de mielina dañadas. Si bien es cierto que el efecto nocivo de la mutación A431E sobre la actividad endopeptidasa *in vitro* fue leve, existe evidencia de que la estabilidad del complejo GSEC-sustrato es afectada de forma diferencial por cada mutación de EAF. No obstante, deberán realizarse ensayos experimentales que lo comprueben.

PERSPECTIVAS

- Realizar una evaluación cognitiva profunda en los pacientes portadores de la mutación A431E, con énfasis en las funciones cognitivas visuo-espaciales.
- Confirmar la presencia de desmielinización del nervio óptico mediante un examen de potenciales visuales evocados y determinar el estado físico del disco óptico mediante una tomografía de coherencia óptica.
- Analizar la tasa metabólica de las áreas cerebrales asociadas a las lesiones de la materia blanca mediante una tomografía por emisión de positrones y/o evaluar la acumulación de A β intracerebral mediante el uso del radionucleótido Florbetapir (^{18}F) o del compuesto B de Pittsburgh.
- Estudiar la composición del líquido cefalorraquídeo de los pacientes portadores de la mutación A431E por medio de espectrometría de masas y ELISA.
- Determinar la presencia de A β 43 *ex vivo* en cerebros humanos con la mutación A431E de *PSEN1* y otras asociadas al fenotipo de PE.
- Complementar los ensayos celulares con las células mef utilizando más mutaciones asociadas a demencia tipo Alzheimer típica para compararlas con las mutaciones de PE.
- Realizar ensayos de termoestabilidad *in vitro* utilizando otros sustratos conocidos de GSEC como lo son Notch, NRG1, Neurexina, etc. Dichos ensayos deberán realizarse con la proteína recombinante portadora de la mutación A431E y con otras asociadas al fenotipo de PE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nichols E, Szoekce CEI, Vollset SE, et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):88-106. doi:10.1016/S1474-4422(18)30403-4
2. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T, Prina M. *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends.*; 2015. doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x
3. World Health Organization. *Demencia: Una Prioridad de Salud Pública.* Washington D.C.; 2013. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98377/1/9789275318256_spa.pdf?ua=1.
4. Robledo L, Peña M, Rojas P, Martínez A. *La Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias Como Problema Nacional de Salud.*; 2017.
5. Gutiérrez-Robledo LM, Arrieta-Cruz I. *Plan de Acción Alzheimer y Otras Demencias, México 2014.*; 2014.
6. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. *World Alzheimer Report 2016: Improving Healthcare for People Living with Dementia - Coverage, Quality, and Costs Now and in the Future.*; 2016. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>.
7. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. *INEGI. Encuesta Intercensal 2015.*; 2016. <https://www.inegi.org.mx/programas/intercensal/2015/>.
8. Secretaría de Salud. *Cátalogo Universal de Servicios de Salud. CAUSES.*; 2018.
9. Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease. *Arch Med Res.* 2012;43(8):600-608. doi:10.1016/j.arcmed.2012.11.003
10. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2016;388:505-517. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1
11. Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's Disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2018;14(3):367-429.
12. Schogt B, Rewilak D. The Mental Status Examination. *Pract psychiatry long-term care home.* 2007:17-36.
13. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state." *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-198. doi:10.1016/0022-3956(75)90026-6
14. Davis DH, Creavin ST, Yip JL, Noel-Storr AH, Brayne C, Cullum S. Montreal Cognitive Assessment for the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(10). doi:10.1002/14651858.CD010775.pub2

15. Noone P. Addenbrooke's cognitive examination-III. *Occup Med (Chic Ill)*. 2015;65(5):418-420. doi:10.1093/occmed/kqv041
16. Komalasari R, Chang HC (Rita), Traynor V. A review of the Rowland Universal Dementia Assessment Scale. *Dementia*. 2019. doi:10.1177/1471301218820228
17. Seitz DP, Fage BA, Chan CC, et al. Mini-Cog for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias within a primary care setting. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2). doi:10.1002/14651858.CD011415
18. Ismail Z, Rajji TK, Shulman KI. Brief cognitive screening instruments: An update. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2010;25(2):111-120. doi:10.1002/gps.2306
19. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69(24):2197-2204. doi:10.1212/01.wnl.0000271090.28148.24
20. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2011;42(9):2672-2713. doi:10.1161/STR.0b013e3182299496
21. De Reuck J, Deramecourt V, Cordonnier C, et al. The incidence of post-mortem neurodegenerative and cerebrovascular pathology in mixed dementia. *J Neurol Sci*. 2016;366:164-166. doi:10.1016/j.jns.2016.05.021
22. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-V*. Fourth. Washington D.C.: American Psychiatric Publishing; 2014.
23. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939. doi:10.3233/JAD-122299
24. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, 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. *Alzheimer's Dement*. 2011;7(3):263-269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
25. Braak H, Coleman P, Dickson D, et al. Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4):S1-S2. doi:10.1016/S0197-4580(97)00057-2
26. C. Vickers J, Mitew S, Woodhouse A, et al. Defining the earliest pathological changes of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2015;13(3):281-287. doi:10.2174/1567205013666151218150322
27. Ruan Q, D'Onofrio G, Sancarlo D, Bao Z, Greco A, Yu Z. Potential neuroimaging

- biomarkers of pathologic brain changes in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease: A systematic review. *BMC Geriatr.* 2016;16(1):1-9. doi:10.1186/s12877-016-0281-7
28. Jagust W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018. doi:10.1038/s41583-018-0067-3
 29. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-259. doi:10.1007/BF00308809
 30. Thal DR, Holzer M, Rüb U, et al. Alzheimer-related τ -pathology in the perforant path target zone and in the hippocampal stratum oriens and radiatum correlates with onset and degree of dementia. *Exp Neurol.* 2000;163(1):98-110. doi:10.1006/exnr.2000.7380
 31. Lemere CA, Masliah E. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-B immunotherapy? *Nat Rev Neurol.* 2010;6(2):108-119. doi:10.1038/nrneurol.2009.219.Can
 32. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):664-670. doi:10.1086/302553
 33. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther.* 2011;2(6):1-13. doi:10.1186/alzrt59
 34. Lippa CF, Saunders AM, Smith TW, et al. Familial and sporadic Alzheimer's disease: Neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology.* 1996;46(2)(February):406-412. doi:10.1212/WNL.46.2.406
 35. Wingo TS, Lah JJ, Levey AI, Cutler DJ. Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2012;69(1):59-64. doi:10.1001/archneurol.2011.221
 36. Armstrong RA. Factors determining disease duration in Alzheimer's disease: A postmortem study of 103 cases using the Kaplan-Meier estimator and Cox regression. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/623487
 37. Chaudhury S, Patel T, Barber IS, et al. Polygenic risk score in postmortem diagnosed sporadic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2018;62:244.e1-244.e8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.035
 38. Seltzer B, Sherwin I. Comparison of Clinical Features in Early- and Late-Onset Primary Degenerative Dementia. *Arch Neurol.* 1983;40:143-146.
 39. Ryan NS, Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med.* 2010;4:99-112.
 40. Maarouf CL, Dausgs ID, Spina S, et al. Histopathological and molecular heterogeneity among individuals with dementia associated with Presenilin mutations. *Mol Neurodegener.* 2008;3(1):20. doi:10.1186/1750-1326-3-20

41. Ryan NS, Biessels GJ, Kim L, et al. Genetic determinants of white matter hyperintensities and amyloid angiopathy in familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015;36(12):3140-3151. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.026
42. Mann DMA, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, et al. Amyloid angiopathy and variability in amyloid β deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2165-2175. doi:10.1016/S0002-9440(10)64688-3
43. Pilotto A, Padovani A, Borroni B. Clinical, biological, and imaging features of monogenic Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:16-18. doi:10.1155/2013/689591
44. Cruts M. Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database. <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>. Published 2012.
45. Hooli B V., Mohapatra G, Mattheisen M, et al. Role of common and rare APP DNA sequence variants in Alzheimer disease. *Neurology*. 2012;78(16):1250-1257. doi:10.1212/WNL.0b013e3182515972
46. Thonberg H, Chiang HH, Lilius L, et al. Identification and description of three families with familial Alzheimer disease that segregate variants in the SORL1 gene. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):43. doi:10.1186/s40478-017-0441-9
47. Patel D, Mez J, Vardarajan BN, et al. Association of Rare Coding Mutations With Alzheimer Disease and Other Dementias Among Adults of European Ancestry. *JAMA Netw open*. 2019;2(3):e191350. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.1350
48. Müller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a006288
49. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Med*. 2010;12(1):1-12. doi:10.1007/s12017-009-8104-z
50. Haass C. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring ...* 2012;2(5):a006270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553493>. Accessed July 30, 2014.
51. Sun X, He G, Song W. BACE2, as a novel APP θ -secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J*. 2006;20(9):1369-1376. doi:10.1096/fj.05-5632com
52. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*. 2015;526(7573):443-447. doi:10.1038/nature14864
53. Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, et al. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*. 2010;30(14):4833-4844. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010
54. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid

- precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* (80-). 1999;286(5440):735-741. doi:10.1126/science.286.5440.735
55. Wildburger NC, Esparza TJ, Leduc RD, et al. Diversity of Amyloid-beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-9. doi:10.1038/s41598-017-10422-x
 56. Agostinho P, Pliássova A, Oliveira CR, Cunha RA. Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015;45(2):329-347. doi:10.3233/JAD-142730
 57. Lv H, Jia L, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2008;29(2):194-202. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.10.001
 58. Wang S, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate BACE1 expression are associated with sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2009;9999B(1):n/a-n/a. doi:10.1002/ajmg.b.30968
 59. Szaruga M, Munteanu B, Lismont S, et al. Alzheimer's-Causing Mutations Shift A β Length by Destabilizing γ -Secretase-A β n Interactions. *Cell*. 2017;170(3):443-456.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.07.004
 60. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608. doi:10.15252/emmm.201606210
 61. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12:383-388. doi:10.1016/0165-6147(91)90609-V
 62. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488(7409):96. doi:10.1038/nature11283
 63. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A meta-analysis. *J Am Med Assoc*. 1997;278(16):1349-1356.
 64. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*. 2011;3(89):89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156
 65. Nabeshima T, Nitta A. Memory Impairment and Neuronal Dysfunction Induced by β -Amyloid Protein in Rats. *Tohoku J Exp Med*. 1994;174(3):241-249. doi:10.1620/tjem.174.241
 66. Sharma S, Verma S, Kapoor M, Saini A, Nehru B. Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior. *Neurol Res*. 2016;38(9):838-850. doi:10.1080/01616412.2016.1209337

67. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(14):5819-5824. doi:10.1073/pnas.1017033108
68. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2012;367(9):795-804. doi:10.1056/NEJMoa1202753
69. Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med A J Transl Pers Med*. 2010;77(1):69-81. doi:10.1002/msj.20159
70. Prüßing K, Voigt A, Schulz JB. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2013;8(1). doi:10.1186/1750-1326-8-35
71. Sperling RA, Rentz DM, Johnson KA, et al. The A4 study: Stopping AD before symptoms begin? *Sci Transl Med*. 2014;6(228):4-6. doi:10.1126/scitranslmed.3007941
72. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*. 2015;18(6):794-799. doi:10.1038/nn.4017
73. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11). doi:10.1101/cshperspect.a006320
74. Kim J, Chakrabarty P, Hanna A, et al. Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice. *Mol Neurodegener*. 2013;8(1):1-12. doi:10.1186/1750-1326-8-15
75. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;537(7618):50-56. doi:10.1038/nature19323
76. 221AD301 Phase 3 Study of Aducanumab (BIIB037) in Early Alzheimer's Disease (ENGAGE). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02477800>.
77. 221AD302 Phase 3 Study of Aducanumab (BIIB037) in Early Alzheimer's Disease (EMERGE). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02484547>.
78. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014;370(4):311-321. doi:10.1056/NEJMoa1312889
79. Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, et al. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther*. 2017;9(1):1-15. doi:10.1186/s13195-017-0318-y
80. Panza F, Seripa D, Lozupone M, et al. The potential of solanezumab and gantenerumab to prevent Alzheimer's disease in people with inherited mutations that cause its early onset. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(1):25-35. doi:10.1080/14712598.2018.1389885
81. Henley D, Raghavan N, Sperling R, Aisen P, Raman R, Romano G. Preliminary Results of a Trial of Atabecestat in Preclinical Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*.

- 2019;380(15):1483-1485. doi:10.1056/NEJMc1813435
82. Bolkan BJ, Triphan T, Kretschmar D. β -Secretase Cleavage of the Fly Amyloid Precursor Protein Is Required for Glial Survival. *J Neurosci*. 2012;32(46):16181-16192. doi:10.1523/JNEUROSCI.0228-12.2012
 83. Hu X, Hou H, Bastian C, et al. BACE1 regulates the proliferation and cellular functions of Schwann cells. *Glia*. 2017;65(5):712-726. doi:10.1002/glia.23122
 84. Voytyuk I, Mueller SA, Herber J, et al. BACE2 distribution in major brain cell types and identification of novel substrates. *Life Sci Alliance*. 2018;1(1):1-14. doi:10.26508/lsa.201800026
 85. Panza F, Lozupone M, Solfrizzi V, et al. BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2018;18(11):847-857. doi:10.1080/14737175.2018.1531706
 86. McGeer PL, Kawamata T, McGeer EG. Localization and possible functions of presenilins in brain. *Rev Neurosci*. 1998;9(1):1-15.
 87. Haapasalo A, Kovacs DM. The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase. *J Alzheimer's Dis*. 2011;25(1):3-28. doi:10.3233/JAD-2011-101065
 88. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. Skeletal and CNS Defects in Presenilin-1-Deficient Mice. *Cell*. 1997;89(4):629-639. doi:10.1016/S0092-8674(00)80244-5
 89. Beel AJ, Sanders CR. Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(9):1311-1334. doi:10.1007/s00018-008-7462-2
 90. Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Kaether C, Ishiura S. Specific combinations of presenilins and Aph1s affect the substrate specificity and activity of γ -secretase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(4):1751-1757. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.018
 91. Yang G, Zhou R, Zhou Q, et al. Structural basis of Notch recognition by human γ -secretase. *Nature*. 2019;565(7738):192-197. doi:10.1038/s41586-018-0813-8
 92. Ahn K, Shelton CC, Tian Y, et al. Activation and intrinsic γ -secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21435-21440. doi:10.1073/pnas.1013246107
 93. Matsumura N, Takami M, Okochi M, et al. γ -secretase associated with lipid rafts: Multiple interactive pathways in the stepwise processing of β -carboxylterminal fragment. *J Biol Chem*. 2014;289(8):5109-5121. doi:10.1074/jbc.M113.510131
 94. Elad N, De Strooper B, Lismont S, et al. The dynamic conformational landscape of γ -secretase. *J Cell Sci*. 2014;128(3):589-598. doi:10.1242/jcs.164384
 95. Somavarapu AK, Kepp KP. The dynamic mechanism of presenilin-function: Sensitive gate dynamics and loop unplugging control protein access. *Neurobiol Dis*. 2016;89:147-156. doi:10.1016/j.nbd.2016.02.008

96. Somavarapu AK, Kepp KP. Membrane Dynamics of γ -Secretase Provides a Molecular Basis for β -Amyloid Binding and Processing. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(11):2424-2436. doi:10.1021/acscchemneuro.7b00208
97. Petit D, Hitzengerger M, Lismont S, et al. Extracellular interface between APP and Nicastrin regulates A β length and response to γ -secretase modulators. *EMBO J*. 2019;38(12):1-18. doi:10.15252/emboj.2019101494
98. Clemente N, Abdine A, Ubarretxena-Belandia I, Wang C. Coupled Transmembrane Substrate Docking and Helical Unwinding in Intramembrane Proteolysis of Amyloid Precursor Protein. *Sci Rep*. 2018;8(1):4-11. doi:10.1038/s41598-018-30015-6
99. Morishima-Kawashima M. Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the β -carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by γ -Secretase. *Front Physiol*. 2014;5(Nov):1-7. doi:10.3389/fphys.2014.00463
100. Cao X. A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science (80-)*. 2001;293(5527):115-120. doi:10.1126/science.1058783
101. Woo HN, Park JS, Gwon AR, Arumugam T V., Jo DG. Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(4):1093-1097. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.093
102. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, et al. Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*. 2001;2(9):835-841. doi:10.1093/embo-reports/kve180
103. Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, et al. Longer forms of amyloid β protein: Implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase. *J Neurosci*. 2005;25(2):436-445. doi:10.1523/JNEUROSCI.1575-04.2005
104. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, et al. γ -Secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J Neurosci*. 2009;29(41):13042-13052. doi:10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009
105. Bolduc DM, Montagna DR, Seghers MC, Wolfe MS, Selkoe DJ. The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of γ -Secretase. *Elife*. 2016;5(AUGUST):1-21. doi:10.7554/eLife.17578
106. Gearing M, Tigges J, Mori H, Mirra SS. A β 40 is a major form of β -amyloid in nonhuman primates. *Neurobiol Aging*. 1996;17(6):903-908. doi:10.1016/S0197-4580(96)00164-9
107. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*. 1992;359(6393):325-327. doi:10.1038/359325a0
108. Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, et al. The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012;31(10):2261-2274.

- doi:10.1038/emboj.2012.79
109. Xia D, Watanabe H, Wu B, et al. Presenilin-1 Knockin Mice Reveal Loss-of-Function Mechanism for Familial Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2015;85(5):967-981. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.010
 110. Kosik KS, Muñoz C, Lopez L, et al. Homozygosity of the autosomal dominant alzheimer disease presenilin 1 E280A mutation. *Neurology*. 2014;84(2):206-208.
 111. Szaruga M, Veugelen S, Benurwar M, et al. Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 2015;212(12):2003-2013. doi:10.1084/jem.20150892
 112. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science (80-)*. 1990;248(4959):1124-1126. doi:10.1126/science.2111584
 113. Vöglein J, Paumier K, Jucker M, et al. Clinical, pathophysiological and genetic features of motor symptoms in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*. 2019;142(5):1429-1440. doi:10.1093/brain/awz050
 114. Mendez MF, Lee AS, Joshi A, Shapira JS. Nonamnesic presentations of early-onset Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2012;27(6):413-420. doi:10.1177/1533317512454711
 115. Schott JM, Crutch SJ. Posterior cortical atrophy. *Lancet*. 2019;25(1):52-75. doi:10.1212/CON.0000000000000696
 116. Crutch SJ, Schott JM, Lehmann M, et al. Consensus classification of posterior cortical atrophy. *Alzheimer's Dement*. 2017;13(8):870-884. doi:10.1016/j.jalz.2017.01.014
 117. Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, et al. Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(2):506-513. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.074
 118. Willem M, Garratt AN, Novak B, et al. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science (80-)*. 2006;314(5799):664-666. doi:10.1126/science.1132341
 119. Wang P, Yang G, Mosier DR, et al. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *J Neurosci*. 2005;25(5):1219-1225. doi:10.1523/JNEUROSCI.4660-04.2005
 120. Yescas P, Huertas-Vazquez A, Villarreal-Molina MT, et al. Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families. *Neurogenetics*. 2006;7(3):195-200. doi:10.1007/s10048-006-0043-3
 121. Rogaeva E a., Fafel KC, Song YQ, et al. Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases 21 Novel mutations. *Neurology*. 2001;57(4):621-625. doi:10.1212/WNL.57.4.621

122. Murrell J, Ghetti B, Cochran E, et al. The A431E mutation in PSEN1 causing Familial Alzheimer's Disease originating in Jalisco State, Mexico: An additional fifteen families. *Neurogenetics*. 2006;7(4):277-279. doi:10.1007/s10048-006-0053-1
123. Ringman JM, Diaz-Olavarrieta ; C, Rodriguez ; Y, et al. *Neuropsychological Function in Nondemented Carriers of Presenilin-1 Mutations.*; 2005.
<http://n.neurology.org/content/neurology/65/4/552.full.pdf>. Accessed February 24, 2019.
124. Apostolova LG, Rodriguez Y, O'Neill J, et al. Diffusion tensor imaging in preclinical and presymptomatic carriers of familial Alzheimer's disease mutations. *Brain*. 2007;130(7):1767-1776. doi:10.1093/brain/awm102
125. Roher AE, Maarouf CL, Malek-ahmadi M, et al. Subjects harboring presenilin familial Alzheimer's disease mutations exhibit diverse white matter biochemistry alterations. *Am J Neurodegener Dis*. 2013;2(3):187-207.
126. Portelius E, Andreasson U, Ringman JM, et al. Distinct cerebrospinal fluid amyloid β peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E-associated familial Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2010;5(1):2. doi:10.1186/1750-1326-5-2
127. Soosman SK, Casado M, Coppola G, et al. Widespread white matter and conduction defects in PSEN1- related spastic paraparesis. *Neurobiol Aging*. 2016;47:201-209. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.030
128. Parker J, Mozaffar T, Messmore A, Deignan JL, Kimonis VE, Ringman JM. Homozygosity for the A431E mutation in PSEN1 presenting with a relatively aggressive phenotype. *Neurosci Lett*. 2019;699(January):195-198. doi:10.1016/j.neulet.2019.01.047

APÉNDICE 1



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS
(COBISH)-CINVESTAV**

Folio 038/2016

DICTAMEN

Director del Proyecto: Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

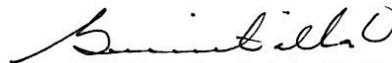
Departamento: Biomedicina Molecular

Título del Proyecto: "Caracterización de la función catalítica de presenilina 1 en células precursoras neurales del epitelio olfatorio de sujetos con enfermedad de Alzheimer familiar portadores de la mutación Ala431Glu de *PSEN1*".

El Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (COBISH), después de revisar la información de los instrumentos que utilizará para realizar su estudio y que sometió en esta fecha para su evaluación, dictamina:

Que el estudio "Caracterización de la función catalítica de presenilina 1 en células precursoras neurales del epitelio olfatorio de sujetos con enfermedad de Alzheimer familiar portadores de la mutación Ala431Glu de *PSEN1*" cumple con los lineamientos bioéticos establecidos para la investigación en seres humanos.

Se firma la presente a los 5 días del mes de Diciembre de 2016, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

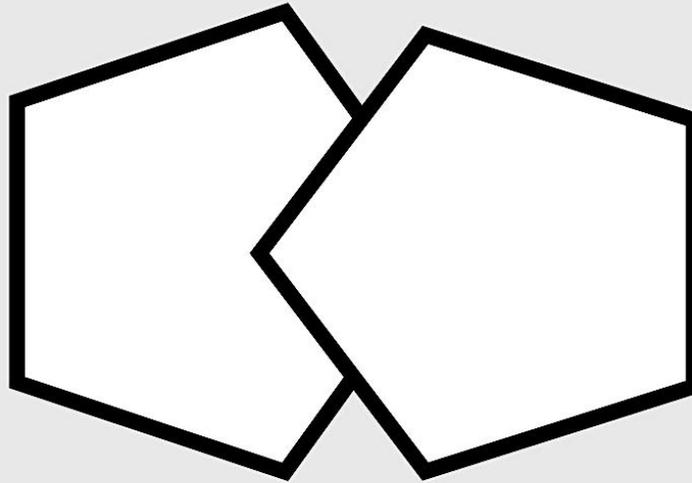

Dra. María Betzabet Quintanilla Vega
Presidenta del COBISH

c.c.p. Expediente

APÉNDICE 2

CUADRO 3. MINIMENTAL PARA PERSONAS CON 3 O MÁS AÑOS DE ESCOLARIDAD
(Antes de aplicar el cuestionario lea el instructivo correspondiente)

No.	ORIENTACIÓN		Puntaje
<i>¿Qué fecha es hoy?</i>			
1	Día		
2	Mes		
3	Año		
4	¿Qué día de la semana es?		
5	¿Qué hora es?		
6	¿En dónde estamos ahora?		
7	¿En qué piso o departamento estamos?		
8	¿Qué colonia es ésta?		
9	¿Qué ciudad es ésta?		
10	¿Qué país es éste?		
REGISTRO			
<i>Le voy a decir 3 objetos, cuando yo los termine quiero que por favor Usted los repita:</i>			
11	Papel		
12	Bicicleta		
13	Cuchara		
ATENCIÓN Y CÁLCULO			
<i>Le voy a pedir que reste de 7 en 7 a partir del 100.</i>			
14	93		
15	86		
16	79		
17	72		
18	65		
LENGUAJE			
<i>Le voy a dar algunas instrucciones. Por favor sígalas en el orden que se las voy a decir.</i>			
19	Tome este papel con la mano derecha		
20	Dóblelo por la mitad		
21	Y déjelo en el suelo		
22	Por favor, haga lo que dice aquí		
23	Quiero que por favor escriba una frase que diga en mensaje		
MEMORIA DIFERIDA			
<i>Dígame los tres objetos que le mencioné al principio.</i>			
24	Papel		
25	Bicicleta		
26	Cuchara		
27	Copie el dibujo tal como está (Ver el dibujo)		
28	Muestre un reloj y diga ¿Qué es esto?		
29	Muestre un lápiz y diga ¿Qué es esto?		
<i>Ahora le voy a decir una frase que tendrá que repetir después de mí. Solo la puedo decir una sola vez, así que ponga mucha atención.</i>			
30	Ni no, ni sí, ni pero		



PUNTAJE TOTAL

Si el paciente tiene 23 o menos puntos, tiene mayor probabilidad de tener demencia.

APÉNDICE 3

FRASCO #1 El olor se parece más a: 1. Chocolate [] 2. Incienso [] 3. Mostaza [] 4. Gasolina [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #4 El olor se parece más a: 1. Cebolla [] 2. Canela [] 3. Barniz [] 4. Sandía [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #7 El olor se parece más a: 1. Moka [] 2. Menta [] 3. Rosas [] 4. Barniz [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____
FRASCO #2 El olor se parece más a: 1. Pino [] 2. Talco de bebé [] 3. Anís [] 4. Limón [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #5 El olor se parece más a: 1. Chicle [] 2. Yerbabuena [] 3. Queso [] 4. Cigarro [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #8 El olor se parece más a: 1. Cereza [] 2. Vinagre [] 3. Naranja [] 4. Apio [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____
FRASCO #3 El olor se parece más a: 1. Cereza [] 2. Mandarina [] 3. Eucalipto [] 4. Cebolla [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #6 El olor se parece más a: 1. Chocolate [] 2. Piña Colada [] 3. Almendras dulces [] 4. Gasolina [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____	FRASCO #9 El olor se parece más a: 1. Yerbabuena [] 2. Sandía [] 3. Ajo [] 4. Moka [] <input type="radio"/> No percibí ningún olor. _____

FRASCO #10

El olor se parece más a:

1. Pino []
 2. Mango []
 3. Anís []
 4. Atún []

No percibí ningún olor.

FRASCO #11

El olor se parece más a:

1. Vainilla []
 2. Cereza []
 3. Cacahuete []
 4. Perejil []

No percibí ningún olor.

FRASCO #12

El olor se parece más a:

1. Menta []
 2. Orégano []
 3. Incienso []
 4. Naranja []

No percibí ningún olor.

FRASCO #13

El olor se parece más a:

1. Pegamento blanco []
 2. Talco de bebé []
 3. Almendras dulces []
 4. Coco []

No percibí ningún olor.

FRASCO #14

El olor se parece más a:

1. Uva []
 2. Anís []
 3. Chicle []
 4. Mandarina []

No percibí ningún olor.

FRASCO #15

El olor se parece más a:

1. Eucalipto []
 2. Talco de bebé []
 3. Mango []
 4. Cigarro []

No percibí ningún olor.

FRASCO #16

El olor se parece más a:

1. Piña colada []
 2. Menta []
 3. Sandía []
 4. Cebolla []

No percibí ningún olor.

FRASCO #17

El olor se parece más a:

1. Coco []
 2. Canela []
 3. Yerbabuena []
 4. Uva []

No percibí ningún olor.

FRASCO #18

El olor se parece más a:

1. Vinagre []
 2. Atún []
 3. Limón []
 4. Mandarina []

No percibí ningún olor.

FRASCO #19

El olor se parece más a:

1. Vainilla []
 2. Mango []
 3. Jabón []
 4. Queso []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #22

El olor se parece más a:

1. Rosas []
 2. Incienso []
 3. Almendras dulces []
 4. Perejil []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #25

El olor se parece más a:

1. Moka []
 2. Chicle []
 3. Barniz []
 4. Guayaba []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #20

El olor se parece más a:

1. Apio []
 2. Gasolina []
 3. Cigarro []
 4. Piña colada []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #23

El olor se parece más a:

1. Atún []
 2. Cacahuete []
 3. Mostaza []
 4. Naranja []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #26

El olor se parece más a:

1. Nuez []
 2. Gasolina []
 3. Manzanilla []
 4. Azufre []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #21

El olor se parece más a:

1. Eucalipto []
 2. Chocolate []
 3. Barniz []
 4. Salsa de Soya []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #24

El olor se parece más a:

1. Pino []
 2. Canela []
 3. Ajo []
 4. Pegamento blanco []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #27

El olor se parece más a:

1. Naranja []
 2. Canela []
 3. Chicle []
 4. Cacahuete []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #28

El olor se parece más a:

1. Nuez []
2. Cloro []
3. Manzanilla []
4. Apio []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #31

El olor se parece más a:

1. Cilantro []
2. Manzanilla []
3. Mostaza []
4. Pino []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #34

El olor se parece más a:

1. Jabón []
2. Cereza []
3. Rosas []
4. Guayaba []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #29

El olor se parece más a:

1. Limón []
2. Guayaba []
3. Ajo []
4. Vinagre []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #32

El olor se parece más a:

1. Mandarina []
2. Ajo []
3. Chocolate []
4. Incienso []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #35

El olor se parece más a:

1. Moka []
2. Uva []
3. Pegamento blanco []
4. Manzanilla []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #30

El olor se parece más a:

1. Nuez []
2. Gasolina []
3. Limón []
4. Mango []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #33

El olor se parece más a:

1. Menta []
2. Coco []
3. Cebolla []
4. Perejil []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #36

El olor se parece más a:

1. Sandía []
2. Yerbabuena []
3. Azufre []
4. Queso []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #37

El olor se parece más a:

- 1. Atún []
- 2. Apio []
- 3. Jabón []
- 4. Cebolla []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #40

El olor se parece más a:

- 1. Talco para bebé []
- 2. Mostaza []
- 3. Cigarro []
- 4. Vainilla []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #38

El olor se parece más a:

- 1. Eucalipto []
- 2. Nuez []
- 3. Anís []
- 4. Vinagre []

 No percibí ningún olor.

FRASCO #39

El olor se parece más a:

- 1. Pegamento blanco []
- 2. Azufre []
- 3. Piña colada []
- 4. Barniz []

 No percibí ningún olor.

volBrain Volumetry Report. version 1.0 release 04-03-2015

Patient ID	Sex	Age	Report Date
job69243	Male	54	14-Feb-2018

Tissue type	Volume (cm ³ /%)	Image information
White Matter (WM)	468.58 (31.30%) [31.79, 44.01]	Orientation radiological
Grey Matter (GM)	692.77 (46.28%) [40.86, 52.14]	Scale factor 0.81
Cerebro Spinal Fluid (CSF)	335.51 (22.41%) [10.29, 20.90]	SNR 36.13
Brain (WM + GM)	1161.35 (77.59%) [79.10, 89.71]	
Intracranial Cavity (IC)	1496.86 (100.00%)	

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asym.(%)
Cerebrum	1002.07 (66.94%) [68.28, 78.38]	501.88 (33.53%) [34.15, 39.35]	500.19 (33.42%) [34.09, 39.07]	0.3365 [-1.24, 2.15]

GM	WM	GM	WM	GM	WM
583.29 (38.97%) [34.46, 43.97]	418.78 (27.98%) [28.73, 39.51]	292.79 (19.56%) [17.24, 22.01]	209.09 (13.97%) [14.37, 19.88]	290.51 (19.41%) [17.21, 21.97]	209.69 (14.01%) [14.34, 19.64]

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asym.(%)
Cerebellum	136.07 (9.09%) [8.08, 10.63]	67.41 (4.50%) [4.01, 5.34]	68.66 (4.59%) [4.05, 5.32]	-1.8444 [-5.16, 4.63]

GM	WM	GM	WM	GM	WM
104.52 (6.98%) [5.63, 8.30]	31.55 (2.11%) [1.54, 3.25]	51.69 (3.45%) [2.75, 4.13]	15.72 (1.05%) [0.78, 1.68]	52.84 (3.53%) [2.86, 4.18]	15.83 (1.06%) [0.75, 1.57]

Brainstem	Total (cm ³ /%)
	23.24 (1.55%) [1.47, 1.97]

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asymmetry (%)
Lateral ventricles	20.01 (1.34%) [0.05, 2.48]	8.86 (0.59%) [0.00, 1.25]	11.15 (0.74%) [0.03, 1.28]	-22.9479 [-68.7192, 55.15]
Caudate	6.69 (0.45%) [0.37, 0.56]	3.45 (0.23%) [0.19, 0.28]	3.24 (0.22%) [0.18, 0.28]	6.1356 [-5.2900, 9.67]
Putamen	8.13 (0.54%) [0.44, 0.65]	4.01 (0.27%) [0.22, 0.32]	4.12 (0.28%) [0.22, 0.33]	-2.6906 [-7.4933, 5.02]
Thalamus	10.06 (0.67%) [0.64, 0.84]	4.87 (0.33%) [0.32, 0.42]	5.19 (0.35%) [0.32, 0.43]	-6.4776 [-8.8241, 5.46]
Globus Pallidus	2.32 (0.16%) [0.13, 0.20]	1.23 (0.08%) [0.06, 0.10]	1.10 (0.07%) [0.06, 0.10]	11.4445 [-11.4144, 13.28]
Hippocampus	7.92 (0.53%) [0.46, 0.64]	4.09 (0.27%) [0.23, 0.33]	3.82 (0.26%) [0.23, 0.32]	6.7793 [-8.9670, 13.05]
Amygdala	1.87 (0.12%) [0.09, 0.14]	0.93 (0.06%) [0.04, 0.07]	0.94 (0.06%) [0.05, 0.07]	-1.2153 [-16.4379, 18.59]
Accumbens	0.67 (0.04%) [0.03, 0.06]	0.33 (0.02%) [0.01, 0.03]	0.34 (0.02%) [0.01, 0.03]	-5.8111 [-40.4005, 13.02]

*All the volumes are presented in absolute value (measured in cm³) and in relative value (measured in relation to the ICV).

*The Asymmetry Index is calculated as the difference between right and left volumes divided by their mean (in percent).

*Values between brackets show expected limits (95%) of normalized volume in function of sex and age for each measure for reference purpose.

*Green and red values indicate that the volume is above or under the expected volume limits respectively.

volBrain Volumetry Report. version 1.0 release 04-03-2015

Patient ID	Sex	Age	Report Date
job69254	Female	46	14-Feb-2018

Tissue type	Volume (cm ³ /%)	Image information
White Matter (WM)	481.76 (37.38%) [31.56, 45.95]	Orientation radiological
Grey Matter (GM)	619.11 (48.04%) [42.95, 54.68]	Scale factor 0.71
Cerebro Spinal Fluid (CSF)	187.91 (14.58%) [7.74, 17.13]	SNR 48.80
Brain (WM + GM)	1100.87 (85.42%) [82.87, 92.26]	
Intracranial Cavity (IC)	1288.78 (100.00%)	

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asym.(%)
Cerebrum	949.65 (73.69%)	472.90 (36.69%)	476.75 (36.99%)	-0.8112
	[71.52, 80.33]	[35.79, 40.25]	[35.68, 40.13]	[-1.59, 2.18]

GM	WM	GM	WM	GM	WM
527.06 (40.90%)	422.59 (32.79%)	263.91 (20.48%)	208.99 (16.22%)	263.15 (20.42%)	213.60 (16.57%)
[36.13, 46.16]	[28.52, 41.04]	[18.06, 23.08]	[14.28, 20.61]	[18.06, 23.09]	[14.22, 20.44]

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asym.(%)
Cerebellum	126.59 (9.82%)	63.29 (4.91%)	63.30 (4.91%)	-0.0201
	[8.51, 11.25]	[4.24, 5.62]	[4.26, 5.65]	[-4.68, 3.70]

GM	WM	GM	WM	GM	WM
87.53 (6.79%)	39.06 (3.03%)	43.89 (3.41%)	19.40 (1.51%)	43.64 (3.39%)	19.66 (1.53%)
[5.98, 8.74]	[1.58, 3.47]	[2.93, 4.34]	[0.79, 1.79]	[3.03, 4.41]	[0.78, 1.68]

Brainstem	Total (cm ³ /%)
	24.65 (1.91%) [1.48, 2.05]

Structure	Total (cm ³ /%)	Right (cm ³ /%)	Left (cm ³ /%)	Asymmetry (%)
Lateral ventricles	9.32 (0.72%)	4.48 (0.35%)	4.84 (0.38%)	-7.5700
	[0.00, 1.97]	[0.00, 0.99]	[0.00, 1.03]	[-63.6850, 50.11]
Caudate	6.63 (0.51%)	3.31 (0.26%)	3.33 (0.26%)	-0.6596
	[0.41, 0.62]	[0.21, 0.31]	[0.20, 0.31]	[-7.7744, 10.64]
Putamen	7.66 (0.59%)	3.84 (0.30%)	3.82 (0.30%)	0.2948
	[0.49, 0.71]	[0.24, 0.35]	[0.25, 0.36]	[-6.9281, 4.83]
Thalamus	10.10 (0.78%)	4.96 (0.38%)	5.14 (0.40%)	-3.5921
	[0.71, 0.92]	[0.35, 0.46]	[0.35, 0.47]	[-7.7747, 4.24]
Globus Pallidus	1.84 (0.14%)	0.88 (0.07%)	0.96 (0.07%)	-9.4361
	[0.13, 0.21]	[0.06, 0.11]	[0.06, 0.11]	[-14.7737, 14.28]
Hippocampus	8.18 (0.63%)	4.26 (0.33%)	3.92 (0.30%)	8.3851
	[0.49, 0.66]	[0.25, 0.33]	[0.24, 0.33]	[-8.7799, 10.70]
Amygdala	1.70 (0.13%)	0.88 (0.07%)	0.82 (0.06%)	7.7210
	[0.09, 0.15]	[0.05, 0.07]	[0.05, 0.07]	[-13.7182, 17.87]
Accumbens	0.57 (0.04%)	0.25 (0.02%)	0.32 (0.02%)	-23.2210
	[0.03, 0.07]	[0.01, 0.03]	[0.02, 0.04]	[-37.9591, 12.76]

*All the volumes are presented in absolute value (measured in cm³) and in relative value (measured in relation to the ICV).

*The Asymmetry Index is calculated as the difference between right and left volumes divided by their mean (in percent).

*Values between brackets show expected limits (95%) of normalized volume in function of sex and age for each measure for reference purpose.

*Green and red values indicate that the volume is above or under the expected volume limits respectively.