

Procedimientos, técnicas y comunicaciones en medicina molecular y bioética

Medicina molecular

"Non multum sed multa et nos mutamur"

Enfermedad de Alzheimer: entidad de interacciones multimoleculares complejas

Cor. M.C. Mario Castañeda Morales

«Resistir la vejez es nuestra obligación, para compensar sus defectos. Luchar contra ella como luchamos contra las enfermedades. Mucha mayor atención se le debe a la mente y al alma porque ellas, como las lámparas, disminuyen su luz con el tiempo a menos que las sigamos alimentando con aceite. La actividad intelectual alimenta y eleva la mente. El viejo retiene sus facultades mentales si su interés y dedicación continúan. La estulticia senil es de los débiles en voluntad.» Cicerón, 2º Siglo a. de C.

La demencia comúnmente llamada senil (de *senium* viejo y ya reconocida por Pitágoras, 7º Siglo a. de C.) tiene varias causas¹ y la de tipo enfermedad de Alzheimer (EA) es la más frecuente. La enfermedad,² con periodos de estasis e inicio insidioso, es progresiva y muestra una variedad de deterioros en el intelecto y la memoria como recuerdo de nombres, citas o conversaciones, colocación de objetos en su lugar, repetición de palabras, espontaneidad, iniciativa, razonamiento, juicio, comprensión (identificación de lo esencial en un relato o evento), desorientación en tiempo y en espacio, lenguaje y relaciones visuo-espaciales; siendo el aprendizaje y la retención de información nueva uno de los déficits más tempranos y significativos. Un 10-15% cursa con Parkinsonismo. La memoria de plazo largo empieza luego a disminuir, hay fallas en operaciones aritméticas, se desarrollan ideas falsas, actitudes de sospecha, alucinaciones, escaso lenguaje con significado, apatía y se desconoce a familiares cercanos. Todo ello llega a incidir profundamente sobre el autocuidado y las funciones sociales del individuo afectado. A nivel de manejo y de manera general, la EA puede dividirse en 3 fases de límites imprecisos y donde la aparición y progresión de los síntomas varían de caso a caso: a) síntomas leves con pérdida de memoria, confusión, desconocimiento del sitio geográfico de residencia, problemas en las tareas rutinarias y cambios en la personalidad y en el juicio, b) síntomas moderados con dificultades en peinarse, bañarse y alimentarse, ansiedad, sospechas, agitación, modificaciones del sueño, caminar de un lado a otro y dificultad para reconocer amigos y familiares, y c) síntomas severos con pérdidas de lenguaje, apetito,

peso corporal y control de esfínteres con dependencia total sobre otras personas. Se le ha dividido en la forma temprana (menor de 60-65 años de edad) con un fuerte componente genético y en la forma tardía (mayor de 60-65 años) con casos familiares y no familiares. La neuropatología incluye: a) atrofia de cortezas frontal y temporal (especialmente el hipocampo), b) pérdida selectiva (aunque no exclusiva) de neuronas colinérgicas centrales y del receptor colinérgico, c) amiloidosis cerebrovascular, d) depósitos de amiloide β ($A\beta$) en el parénquima que forma tanto placas difusas como neuríticas (también llamadas seniles) con núcleo congofílico, e) marañas neurofibrilares (NFT) intraneuronales con *tau* (varias isoformas), amiloide P sérico, apolipoproteína E (ApoE), ubiquitina (Ub) y α sinucleína (en hipocampo), f) neuritis distróficas (teñibles con antiUb y con anti*tau* fosforilada), g) pérdida de sinapsis, h) anomalías en membranas y del sistema endo-lisosomal y recientemente, i) placas teñidas con un anticuerpo monoclonal contra NFT (AMY) que no reconoce *tau* ni $A\beta$ y que ocurren junto con las placas neuríticas.³ Los depósitos del amiloide vascular y el del parénquima muestran propiedades semejantes entre sí y también a las de los que se presentan en otras amiloidosis como las relacionadas a la proteína prión y a la amiloidosis sistémica con la formación de agregados insolubles integrados por monómeros proteicos en conformación secundaria beta que tienden a polimerizar en ultraestructuras fibrilares y se asocian con varias proteínas. Las placas neuríticas de EA contienen, entre otros, componente amiloide del suero, proteoglicanos, apolipoproteínas E, A1 y J, α 1-antiquimotripsina, presenilina 1 (PS1), fragmento peptídico NACP (el componente no $A\beta$ del amiloide de EA, también amiloidogénico y derivado de la α -sinucleína implicada en Parkinson). Regiones cerebrales y tipos celulares específicos son afectados mientras que otras áreas y otras células permanecen libres de patología; característica que podría estar relacionada a la evolución diferencial del cerebro a lo largo de la filogenia.⁴ Con tiempo suficiente, sin embargo, el daño progresa hacia los componentes inicialmente resistentes. Esta dependencia del tiempo se observa también, por

ejemplo, en esclerosis lateral amiotrófica (con mutaciones en la dismutasa del superóxido en el 20% de los casos familiares) donde los músculos extraoculares no son afectados pero, cuando la vida del paciente se prolonga, se llega a desarrollar diplopía. La regionalidad en EA puede también deberse al tipo de lesiones. Las células granulares del giro dentado del hipocampo se han considerado como libres de patología pero presentan menor arborización y desarrollo de neuritas,⁵ lo cual demuestra una patología más extensa. En cuanto al significado relativo al papel de las placas neuríticas en la patogenia de EA, estos cambios no están específicamente relacionados con la presencia de las placas en la capa molecular adyacente.

El diagnóstico clínico, posible o probable, de la EA alcanza una precisión del 80-90% al usar los criterios del National Institute of Neurology and Communicative Disorders and Stroke y de la Alzheimer's Disease and Related Disorders Association⁶ y su severidad clínica es evaluada por el examen mental mínimo⁷ y la escala clínica de demencia.⁸ La pérdida de memoria de plazo corto es el dato clínico más importante. Esta memoria de datos recientes es evaluada por pruebas de recuerdo posterior, en general después de 30 min.⁹⁻¹¹ Aunque los marcadores neuropatológicos son a) de gran utilidad en la diferenciación de demencias y b) el foco de atención de las teorías etiopatogénicas obligan, por otra parte, a que el diagnóstico definitivo sea necesariamente invasivo. En tanto que este requerimiento permanece sólido (con sus problemas inherentes de localización y profusión de lesiones), la clínica se ha tornado más incisiva.

Después de infructuosos intentos basados en la cuantificación (por área o por volumen) de hemisferios cerebrales, lóbulos frontales (la corteza prefrontal selecciona y mantiene información conductualmente relevante, es decir, guarda temporalmente y manipula dicha información, la llamada memoria de trabajo, en coordinación con la corteza de asociación posterior), lóbulos parietales, amígdalas, distancia interuncal, y dado que el hipocampo derecho produce¹² el mapa cognitivo del mundo exterior (¿dónde estoy, dónde quiero ir y cómo voy?) y el izquierdo mantiene los caminos particulares intentados previamente a través de la memoria esporádica, que, de manera más general, los hipocampos y las cortezas ento- y perirrinales, codifican, consolidan y guardan a plazo corto datos recientemente adquiridos,¹³ que estas áreas cerebrales son las primeras en mostrar la patología de EA y que, además, estas mismas áreas permanecen prácticamente indemnes tanto en el envejecimiento no patológico como en el controversial grupo (entidad independiente, pre-EA, o envejecimiento normal) de sujetos con «olvido benigno» (AAMI, Age-Associated Memory Impairment), la cuantificación de estas áreas ha sido de gran interés. Recientemente, la volumetría de las cortezas entorrina y pararrina y del hipocampo por resonancia magnética, documentando una pérdida de un 40% en EA, ha podido: a) separar individuos con EA moderada de viejos sanos (donde el número de neuronas en estas áreas permanece casi constante de los 60 a los 90 años) y de aquellos con AAMI con una sensibilidad y es-

pecificidad de un 90% y b) mostrar una correlación positiva entre la disminución del volumen y el grado de demencia.¹⁴ Por lo tanto, la EA sigue sin parecer ser una «enfermedad relacionada con el envejecimiento» y sólo es una relacionada con la edad⁴ (su prevalencia es de un 10% hacia los 65-70 años, un 30% hacia los 85, pero sólo un 40% a los 100); además, los niveles de expresión de la proteína precursora de amiloide (APP) y PSI permanecen sin cambio de los 40 a los 90 años de edad. Y AAMI, no un paso intermedio forzoso (algunos llegan a desarrollar EA) entre el supuesto continuo de envejecimiento y EA. El dato de volumetría no es, sin embargo, específico de EA sino de demencia; como la que ocurre, por ejemplo, en el síndrome de Down, en la vascular, en esquizofrenia (cuando hay déficit de memoria) y en Parkinson donde la afección del lóbulo temporal es mayor de lo inicialmente pensado.

¿Puede la clínica ir más allá? ¡Sí, cuando se intenta, aunque no siempre! Dos desarrollos independientes, la imagenología cerebral y los polimorfismos génicos de susceptibilidad están haciendo incursiones interesantes. En un estudio prospectivo¹⁵ se reclutaron voluntarios mentalmente sanos, se les tipificó en ApoE y las imágenes PET de los homocigotos para el alelo épsilon 4 de ApoE (edad media 55 años) fueron comparadas con las de a) los sin alelo $\epsilon 4$ (extraídos del mismo grupo y comparables en sexo, educación y edad), y b) pacientes con EA probable (edad media 64 años y previamente comparados con sanos de edad media 64 años).

Se encontró que el metabolismo de la glucosa disminuyó en regiones específicas en los sanos homocigotos $\epsilon 4$ (4/4) en relación con los sanos sin el alelo 4. Las zonas hipometabólicas (bilaterales) de los 4/4 cayeron dentro de las zonas (aunque más amplias) afectadas en los de EA (prefrontal, temporal, parietal y cíngulo parietal). Dado que el inicio clínico de EA en individuos 4/4 alcanza una proporción del 50% hacia los 70 años, con un rango de 60-80 años,¹⁶ se puede inferir que ¡los datos de la utilización de glucosa se presentaron unos 15-20 años antes de las primicias demenciales y unos 30 años antes de los datos de autopsia! Aquí se presenta una pregunta obligada: ¿es el hipometabolismo de glucosa causa de la EA? La extensión de las repeticiones CAG en las secuencias de DNA de genes específicos (en Huntington, Kennedy y otras ataxias, y de CTG en distrofia muscular miotónica) producen péptidos poliglutaminados (polar zippers) con gran tendencia a la oligomerización. Estos péptidos (huntingtina entre ellos) son tóxicos y enlazan (entre otras) glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa¹⁷ disminuyendo la utilización de glucosa. Pero el hipometabolismo así causado produce esos cuadros clínicos diferentes.

¿Es la EA una enfermedad mitocondrial? El metabolismo energético de la mitocondria (esta eubacteria, productora inicial de H_2 , endosimbionte de una probable hospedera arqueobacteriana autotrófica dependiente de H_2 y cuya resultante simbiosis irreversible parece haber dado lugar a nosotros los eucariontes;¹⁸ para discusión reciente) ha empezado a ser estudiado en varias enfermedades neurodege-

nerativas. Ocurren mutaciones somáticas del DNA mitocondrial (mtDNA) con la edad y algunas fueron detectadas en los genes de las subunidades 1 y 2 de la citocromo c oxidasa (CO) que parecieron segregarse con EA. Reportes posteriores no comprobaron dicha cosegregación y los genes resultaron ser pseudogenes nucleares que se separaron de los mitocondriales hace unos 0.8 millones de años (mutaciones en CO1 se encuentran en la enfermedad de neurona motora y en CO3 producen miopatía y mioglobulinuria). El número mitocondrial por célula podría disminuir en los grupos neuronales afectados o la fluctuación en heteroplasmia celular (células con mitocondrias sanas y defectuosas en su DNA) ser mayor en esos grupos neuronales. La exploración de la actividad del factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA), de origen nuclear y que regula los niveles de mtDNA y por lo tanto de mitocondrias funcionales,¹⁹ podría entonces ser interesante por la posibilidad de que ese hipometabolismo fuese debido a una causa primaria de origen nuclear.

Datos *in vitro* muestran que la citotoxicidad del H_2O_2 es mayor en células con ApoE $\epsilon 4$ que en aquellas con el $\epsilon 2$.²⁰ Sin embargo, el $\epsilon 4$ no presenta asociación con Parkinson donde los radicales libres juegan un papel importante;⁴ aunque sí con la variante cuerpos de Lewy de la EA lo cual también indica que esta última no es un Parkinson. O por último, a nivel anatómico, la temprana distorsión microvascular cerebral (arteriolas tortuosas con pérdida del plexo neural y protusiones saculares) podría ser la causa primaria del hipometabolismo y estar relacionada a ApoE4; y a nivel molecular, podría existir resistencia neuronal a la insulina ya que ésta previene la hiperfosforilación de *tau* al disminuir la glicógenosintasa-cinasa-3.

Otro dato de disfunción cerebral temprana proviene de ratones transgénicos dobles para los genes mutados de APP y de PS1. Dichos ratones desarrollan, a edades tempranas (12-16 semanas), aumento de A β 42/43 cerebral y después (26-32 semanas) placas neuríticas en corteza e hipocampo. Las pruebas conductuales sensibles a disfunción del hipocampo (hiperactividad y alternación reducida en un laberinto Y simétrico) fueron positivas desde las 12-14 semanas.²¹ Estos datos de humanos y de roedores restan importancia a las placas seniles extracelulares como desencadenantes de la neurodegeneración. Además, en la variedad demencia senil predominante en NFT no se forman placas y en la típica, la correlación entre el grado de demencia y el número de placas es pobre; la cual, es mejor con NFT, los que también correlacionan con la apraxia construccional, la de vestirse y la ideomotora.

La EA, todavía un rompecabezas inmerso en una bruma de misterio a pesar del aumento de sus reportes científicos de unos 500 a unos 1,400 por año en los últimos 10 años, presenta una etiología genética compleja con varios genes involucrados y cuyos mecanismos de interacción no se encuentran bien definidos. Y mucho menos en relación con factores ambientales. Los genes hasta ahora identificados parecen ser sólo un 50% de la etiología genética total. Los

casos familiares de inicio temprano con mutaciones autosómicas dominantes en APP, PS1 y PS2 representan sólo un 1-2% de los casos totales, y de esta fracción, el 30-50% son causados por sitios en las presenilinas 1 y 2 (la mutación en APP es <1%). Recientemente se confirmó²² la cosegregación, en 17q21, de *tau* mutada (transición de G a A en el intrón siguiente al exón 10, sitio donador en la edición, con producción de isoformas de 4 dominios de enlace a microtúbulos) en la taupatía familiar con demencia (perteneciente a las demencias fronto-temporales con NFT también en glía) y, como buen candidato, en la parálisis supranuclear progresiva y en el complejo de la demencia de Guam.

Esto indica que *tau* anormal es capaz de inducir neurodegeneración y que debe tenerse en cuenta para EA. El alelo $\epsilon 4$ de la ApoE (ApoE4) es un gen modificador: aumenta el riesgo de EA, disminuye la edad de presentación con cada dosis de alelo en la curva de distribución de la EA en los casos con los otros alelos y está asociado tanto con casos tempranos esporádicos como con casos tardíos esporádicos o familiares.

Sin embargo, ApoE4 no es necesario ni suficiente para que un individuo desarrolle EA (una pequeña fracción de los 4/4 permanece sin demencia y con un alelo hasta un 30 y 60%, en mujeres y hombres respectivamente, no la presenta) y el plateau de prevalencia (85-100 años) es independiente de ApoE4. ApoE2, por el contrario, disminuye este riesgo; aunque lo aumenta para complicaciones de la angiopatía amiloide cerebral.²³ Por lo tanto, la gran mayoría de los casos de EA carecen de factores etiogénicos conocidos. Otros dos sitios génicos se han reportado pero su contribución cuantitativa es desconocida. En EA tardía existe un sitio cromosomal de asociación en la región centromérica del cromosoma 12 y en la cual se encuentra también el gen para el receptor LRP-1 (Low-density lipoprotein receptor-Related Protein-1). Este es el receptor neuronal principal para ApoE pero se encuentra a unos 10 cM de la región de interés.²⁴ Dos reportes recientes, uno en favor y otro en contra (*vide infra*) dejan este sitio en suspenso. La bleomicina hidrolasa (BH), cuya única función conocida es la inactivación de la droga protegiendo así de la complicación de fibrosis pulmonar fatal, es similar a la familia papaina de cisteína proteasas que parece estar implicada en la generación de péptidos amiloidogénicos. Su gen (17q11.2) presenta un polimorfismo en la posición 1450 (A o G) que produce una sustitución conservadora.

La frecuencia del genotipo G/G es mayor en los casos de EA esporádica que no son ApoE4 y el riesgo de EA es de unas 3-4 veces. Su papel en EA es desconocido aunque pudiera afectar la actividad enzimática o sólo cosegregar con otro sitio importante en EA.²⁵ El *cuadro 1* presenta un resumen de genes involucrados en EA (hay datos iniciales de cosegregación en Xq25, con α -2 macroglobulina, A2M, y LRP; *vide infra*).

El gen de la APP (21q21.2-q22.1) contiene unos 20 exones y da lugar a varios RNA mensajeros por procesamiento alternos (pero ninguno de ellos produce A β directamen-

Cuadro 1.

Presentación clínica	Cromosoma	Gen
Inicio temprano y familiar	21	APP
	14	PS1
	1	PS2
Inicio temprano esporádico y tardío esporádico y familiar	19	APOE
(y mutaciones no identificadas)	17	BH ¿TAU?
(y mutaciones no identificadas)	12	LRP, A2M
sin enlace a regiones cromosomales conocidas)	X	?
	Otros	?

te). La proteína APP existe en varias isoformas de tamaño y 3-4 de ellas son las más comunes. Las de 751 y 770 aminoácidos (aa) se producen en tejidos neurales y no neurales; la de 695 aa es la mayoritaria en neuronas donde se transporta en ambos sentidos. Su estructura contiene varios dominios transmembranales (semejante a la de los receptores de superficie celular) pero su papel en fisiología celular no está bien entendido. Su sobreexpresión en ratones aumenta el número de sinapsis corticales. Los nulos para ella se desarrollan bien pero ya como adultos presentan menor peso, locomoción disminuida, anormalidades motoras en extremidades y gliosis reactiva difusa sin neurodegeneración. Protege contra la privación de glucosa y contra aa excitotóxicos. Podría aumentar la adhesión celular a la matriz extracelular (a través de laminina), la proliferación celular y mediar el crecimiento de neuritas en respuesta al NGF. Su papel en patogénesis deriva, de manera fundamental, de su asociación a EA cuando se encuentra mutada o sobreexpresada (en Down) y de la neurotoxicidad del A β .

Dicha toxicidad es mayor con el péptido 1-42/43 que con el 1-40 y parece depender del estado de agregación pues la neurodegeneración (morfológica) ocurre alrededor de las placas compactas neuríticas que contienen A β fibrilar (además de astrogliosis y microglía reactiva) y no alrededor de las placas difusas (que ocurren en EA y cerebros de normales donde también hay depósitos difusos y amorfos de A β similares a los que se encuentran en etapas tempranas de Down).

La microinyección de A β fibrilar en el cerebro de rata adulta produce degeneración al igual que su adición a cultivos neuronales por lo que la neuropatología no puede limitarse a las placas en sí y de hecho, los cambios neurodegenerativos no siempre coinciden con la distribución topográfica de las placas. Las fibrillas se forman por la adopción de la conformación plegada β iniciada por aumento en la concentración de A β (el 142/43 es más agregable) y facilitada por ApoE, aluminio, zinc y radicales libres. La amilina (el péptido asociado de diabetes) es tóxica para las células pancreáticas en su forma fibrilar al igual que la proteína prión es neurotóxica y amiloidogénica en su conformación secundaria β . Estos 3 péptidos forman entonces parte de un cuadro más general de conformeros patógenos o péptidos conformopáticos. Las mutaciones de APP (con aumento en la generación de A β) ocurren en unos 4 sitios: a) cerca del

extremo C-terminal del A β (porción intramembranal del APP), b) en los 2 aa adyacentes al extremo N-terminal del Ab (porción extracelular del APP), c) dentro de la secuencia del A β en el residuo 22 y de glutámico a glutamina (inicio de la porción extracelular del APP) y d) en el residuo 21 de alanina a glicina. Las dos primeras mutaciones causan EA temprana.

Ratones transgénicos con sobreexpresión de estas mutaciones desarrollan, además de pérdida difusa de dendritas y sinapsis, placas neuríticas con gliosis reactiva en corteza e hipocampo hacia los 5 meses de edad (longevidad normal de 1.5-2 años) con un patrón regional semejante al de EA a pesar de que la expresión de la APP mutada se realiza en todo el cerebro. Aquí no se observan NFT pero esto parece ser consecuencia de la especificidad de especie pues, hasta ahora, el borrego es el único no humano que las desarrolla. La tercera mutación produce un cuadro de hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis en vasos y parénquima cerebrales (no congofílica en el segundo sitio) del tipo holandés (HCHWA-D) que es la forma autosómica dominante de la angiopatía amiloide cerebral.

Y la cuarta, EA temprana ¡o *hemorragia cerebral*! En las dos últimas patologías, consideradas también como variantes vasculares de EA temprana, la amiloidosis vascular (en arteriolas de leptomeninges y corteza) es congofílica (como en las placas neuríticas de EA) y la del neuropilo forma placas difusas (neuríticas escasas), y las neuritas distróficas (reactivas a Ub) no contienen *tau* fosforilada que es característica de los NFT.

La APP tiene una pequeña porción del extremo C-terminal en situación intracelular y contiene al A β en su porción intramembranal e inicio de la extracelular. Es procesada en 3 sitios principales por actividades enzimáticas llamadas secretasas α , β y γ . La α (estimulada por la proteína cinasa C) rompe en el residuo 16 del A β (aunque también lo hace en leucina 17 y valina 18) que se encuentra en posición extracelular, genera la APP soluble e impide la formación del A β . La β rompe en el aspartato 1 del A β (porción extracelular de APP) y produce así el extremo N-terminal de este péptido (también corta en los residuos -3, -6, +4 y +11 aunque es más específica que la α). Y la γ en los residuos intramembranales valina 40 o alanina 42 (poco en el 43) generando el extremo C-terminal del A β cuyos últimos 11-15 aa fueron intramembranales.²⁶ Todos estos cortes suceden en APP normal y en ausencia de enfermedad (las concentraciones de A β soluble en líquido cefalorraquídeo son semejantes en casos y en controles). El A β 42 es generado en el retículo endoplásmico y el 40 en el compartimento ácido de la red del trans-Golgi (TGN) y después exportado a las vesículas post-TGN; es decir, el A β se forma de manera normal dentro de la célula y no es resultado de un procesamiento anormal. El corte intramembranal no requiere de lesión membranal y el mismo proceso sucede con la proteína 2 que enlaza la secuencia regulatoria de esteroides. La producción *in vitro* de A β 1-42 es unas 10 veces mayor cuando APP está mutada y esto parece ser la única diferencia; lo cual concuerda con la simple sobreexpresión

sión de APP normal en Down (donde se expresa más de lo esperado por la trisomía).

En HCHWA-D no se desarrolla demencia a pesar de que los enfermos alcanzan los 50-70 años (tiempo en que la demencia es obvia en EA familiar) y algunos llegan a los 80 años. Su A β mutado contiene mayor conformación secundaria tipo β (más fibrillogénico) que el normal y es tóxico para células musculares lisas de vasos sanguíneos. El predominante en los vasos es el 140. Las lesiones en parénquima cerebral son del tipo placa difusa a pesar de contener, mayoritariamente, el A β 1-42 y además mutado.²⁷ El cerebro del perro anciano presenta placas difusas con A β (secuencia canina igual a la humana) 1-42 y 17-42. El cerebelo de Down presenta extensos depósitos con placas difusas que nunca llegan a formar placas neuríticas y contienen A β 17-42. Además, las placas seniles de viejos no dementes están formadas por A β 42/43. ¿Cuál entonces es la causa de neurodegeneración y demencia? ¿Algo más que A β 1-42! La agregación del 1-40, generado en dominios del TGN resistentes a detergentes y con colesterol (Col) y gangliósidos (GI), puede empezar dentro de la célula pues su concentración ahí es mayor que afuera y tiene afinidad por Col y GI. La transposición al cerebro del epiplón (rico en actividad fagocitaria, en neurotransmisores y en promotores de crecimiento neural y vascular), produce vasos que penetran la interfase omento-cerebro con aumento del flujo sanguíneo cerebral y reduce la formación de placas seniles (aunque aparentemente no de NFT) y mejora los aspectos cognoscitivos;²⁸ lo cual pone de relieve el papel del componente vascular en EA y correlaciona con los riesgos de EA en hipertensión arterial, diabetes y tabaquismo.

Además de las mutaciones anteriores en el gen APP existe otro tipo de mutación, en las proteínas APP y Ub, que no se detecta en los genes respectivos. Los cerebros de EA esporádica de inicio temprano y tardío presentan (en las placas neuríticas, neuropilo y NFT) APP y Ub (proteína de 76 aa que señala a otras proteínas para su destrucción intracelular) truncadas en su extremo C-terminal. El gen APP presenta unos 7 motivos de secuencia GAGAG (3 en los exones 9 y 10 que contienen un probable dominio promotor del crecimiento). En general, genes que contienen secuencias repetidas dinucleotídicas y que son activamente transcritos producen mensajeros con deleciones (durante el proceso de transcripción o en la edición postranscripcional) de los 2 nucleótidos repetidos. La deleción GA (en exones 9 y 10) en APP y GT o CT en Ub explica la producción de esas proteínas truncadas. La deleción en Ub es más frecuente en Down que en EA y correlaciona con la mayor actividad de transcripción de APP en Down. Esta deleción elimina la glicina C-terminal de Ub requerida en el enlace a grupos amino libres (lisina) de proteínas por destruir y no hay poliubiquitinilación de proteínas en los NFT con la consecuente falta de la actividad hidrolasa de Ub ni presencia de epítopes del proteasoma 26S (el activo en proteólisis) en los NFT;²⁹ lo cual contribuye a explicar la acumulación anormal de proteínas

(fenómeno común de células añosas), además de la variante A2M2 en EA (*vide infra*). La inmunorreactividad intraneuronal a Ub también se detecta en la enfermedad de neurona motora y en esclerosis lateral amiotrófica.

Los genes PS1 (sitio S182 en 14q24.3) y PS2 (sitio STM2 en 1q42.1) derivan de la duplicación de un gen ancestral común y codifican proteínas con 8 dominios transmembranales con ambos extremos intracitoplásmicos. En ello presentan similitud a uno de los 4 tipos de receptores encontrados en células de mamíferos con 7 dominios transmembranales y activados por neurotransmisores (dopamina, serotonina, adrenalina, GABA) y hormonas (ACTH, TSH, LH, glucagón). Los otros 3 son las proteínas cinasas de tirosina con un solo dominio transmembranal, los canales iónicos abiertos por ligandos que no activan directamente caminos de señales posteriores sino que producen flujo iónico y los intracitoplásmicos activados por esteroides. Las mutaciones en PS1 son las más comunes con la manifestación más temprana de EA (28-60 años). Las de PS2 (también conocidas como la alemana del valle del Volga en Rusia) producen un inicio más tardío y más variable, hacia los 40-85 años.³⁰ Esta variabilidad de inicio y la penetración fuerte, pero no del 100%, hablan también en favor de otros factores, genéticos o ambientales, asociados a la neurodegeneración final. Las mutaciones, en ambos sitios (regularmente dentro o próximas a una región transmembranal), aumentan la producción de A β 1-42/43. En la gran mayoría de EA esporádica (un 95%) no hay aumento en la producción de 42/43 y el desarrollo de amiloidosis es entonces por otros factores que disminuyen la eliminación de A β o aumentan la fibrillogénesis. La deleción del exón 9 de PS1 es la mutación que más aumenta la producción de 42/43 y sin embargo la manifestación de EA no es la más temprana del resto de sus mutaciones. Ratones nulos para PS1 presentan anomalías en su desarrollo y la transfección de PS2 previene la apoptosis inducida por FAS. Ambas proteínas presentan identidad en su secuencia de aa con las SEL-12 (50%) y SPE-4 (25%) del gusano *Caenorhabditis elegans* y PS1 rescata la función de SEL-12 en mutantes. SEL-12 facilita la transmisión de señales que gobiernan el destino diferenciativo celular. SPE-4 se encuentra en una organela derivada del Golgi y juega un papel en espermatogénesis. Dado que estas 2 proteínas se localizan en el RE y en Golgi, las presenilinas estarían afectando el transporte y/o procesamiento de APP. La reinstalación de estrógenos en menopausia parece afectar favorablemente la incidencia y progresión de EA. Los estrógenos, en concentraciones fisiológicas, reducen la producción neuronal de A β y pudieran actuar en RE y/o TGN.³¹

Pacientes con mutaciones en PS2 desarrollan EA y sin embargo las placas cerebrales son escasas. Y, por otro lado, los depósitos amiloides son intensos en la vasculatura cerebral.³² Aunque la angiopatía amiloide podría causar pequeñas hemorragias y explicar así la demencia, los cerebros muestran escasa leucoencefalopatía y pocos microinfartos. ¿Amiloide fibrilar de placas neuríticas causante de neuro-

degeneración? Parece que no aquí; y no hay más remedio que recordar el factor vascular en EA. Pacientes con delección del exón 9 del RNAm (no causada por mutación en el sitio de edición) del gen PS1 presentan paraplejía y EA. Su cerebro muestra angiopatía amiloide (congoñfica y positiva a tioflavina S), NFT y numerosas placas. Pero estas placas son distintas a todas las anteriores. Son grandes, redondas (semejantes a bolas flojas de algodón), inmunorreactivas a A β pero sin el núcleo denso congoñfico y negativas a tioflavina S (marcadores de fibrillas amiloides), y con respuesta neurítica escasa.³³ Nuevamente, ¿demencia sin placas neuríticas! ¿Se requiere entonces de depósitos de A β fibrilar?

ApoE es una glicoproteína de 299 aa, con una masa de 34-35 kDa y codificada en 19q13.2 con 5 alelos (1 al 5), siendo los más comunes los 2, 3 y 4. Datos de epidemiología genética, en relación a su polimorfismo poblacional, la han puesto de relieve en unos 3 aspectos de la biomedicina. El primero, muy general, en cuanto a longevidad. Centenarios y personas de 20-70 años muestran frecuencias del alelo 4 de 5 y 11%, y del 2 de 13 y 7% (respectivamente). La probabilidad relativa (odds ratio) de ser centenario portando el alelo 4 es de sólo 0.4 pero de 2.0 cuando se tiene el 2; es decir, 5 veces menor con ϵ 4.³⁴ Ya más específicamente, este polimorfismo afecta la morbimortalidad coronaria y cerebral. Un 10-15% de la variación genética en los niveles de LDL-C de la población general puede ser explicado por este polimorfismo. ApoE4 está asociado a niveles altos de colesterol total (CT) y sus portadores responden bien a la dieta (hiper-o hipocolesterolémica); los individuos ApoE2 se comportan de manera contraria: menor CT y sus valores de LDL-C y ApoB varían poco con el aumento o disminución de la ingesta de grasa y colesterol (Col). De manera sucinta, la grasa (además de ser precursora) aumenta la absorción intestinal de Col, aumenta su flujo al hígado, se disminuye entonces la síntesis hepática de Col y la del receptor LDL (LDLR), aumenta la síntesis de ApoB y los niveles de LDL-C finalmente aumentan. Los individuos ApoE2 eliminan más Col por bilis y entonces la síntesis hepática de Col y ApoB disminuye. Pero un 5% de los homocigotos ApoE2 desarrollan hiperlipoproteíemia tipo III. La asociación de niveles altos de Col con ApoE4 está en relación directa al número y cantidad del alelo (4/4 > 4/3 > 3/3 > 3/2). Los orientales, con una frecuencia poblacional de ApoE4 de 0.08 presentan escasa enfermedad coronaria (EC) y junto con los griegos (0.06) forman los grupos con la menor frecuencia en el mundo; en los aborígenes australianos la frecuencia es de 0.39 y la EC es frecuente. La EC no está necesariamente asociada con niveles altos de CT; en la población menor de 40 años de edad con EC la frecuencia de 4/4 aumenta unas 16 veces y aumento similar se observa en la población que presenta reestenosis posangioplastia (independiente de niveles de lípidos). La población de Europa presenta una distribución de tipo lineal en la frecuencia de ApoE4 y el gradiente aumenta de sur a norte; y lo mismo sucede con la incidencia de EC y aterosclerosis carotídea.

La población española también presenta menor frecuencia de ApoE4 que la caucásica del norte europeo.³⁵ Este polimorfismo juega un papel de factor de confusión en la llamada «paradoja de la dieta mediterránea». ApoE es constituyente de VLDL, IDL, HDL (en ayuno) y de quilomicrones. Es ligando, en la región 130-150 de su secuencia primaria (ApoE2 muestra < 1% de enlace), del receptor de residuos de quilomicrones LRP y del LDLR que además éste último de enlazar ApoE es receptor de ApoB (receptor ApoB/E). En resumen, en cuanto a metabolismo lipídico (mayor información en ref. 4), ApoE3 participa tanto en el catabolismo de lipoproteínas ricas en triacilglicérols (VLDL y residuos) como en el transporte reverso de Col (de la célula hacia HDL) aumentando su salida de los depósitos en paredes arteriales (ratones nulos para ApoE desarrollan aterosclerosis); de esta manera, modifica los niveles de LDL-C del cual no es parte integrante.

ApoE es, hasta ahora, el polimorfismo de susceptibilidad más importante en la EA de inicio tardío que es también la más frecuente. De sus 3 alelos comunes, el 3 es el más prevalente, el 2 (el menos frecuente y el mutante anormal) parece proteger de EA, de demencia en Down, de angiopatía congoñfica y de demencia multiinfarto, y el 4 con efectos contrarios a los del 2 (como en cardiovascular). El homocigoto 4, encontrado en un 2% de la población caucásica, presenta EA con el inicio más temprano (media por abajo de los 70 años) y el heterocigoto 2/3 (en el 14% de los caucásicos) con el inicio más tardío (media hacia los 90 años). Las edades de inicio en los 3/3 y 2/4 son similares entre sí e intermedias a las dos anteriores (los datos para los 2/2 son intrascendentes por su escaso número). La frecuencia de estos alelos en controles caucásicos es de 16% para el 4, de 74% para el 3 y de 10% para el 2. En pacientes con EA las frecuencias son de 40% para el 4, 56% para el 3 (recordar que es el alelo mayoritario en la población general) y de 4% para el 2. Es decir, un solo polimorfismo génico, el de ApoE, resulta ser un determinante significativo (como gen de susceptibilidad) de una enfermedad compleja. El alelo 4 aumenta el riesgo relativo y disminuye la edad de inicio; además, podría ser el responsable de hasta la mitad de los componentes heredables de los casos de inicio tardío (pensados anteriormente como no genéticos). La frecuencia de ApoE4 se encuentra también enriquecida en las poblaciones de demencia vascular, Parkinsoniana, variante de cuerpos de Lewy y en la frontal.³⁶ Tanto en cardiovascular como en cerebrovascular, las características moleculares de estos alelos ayudan a entender sus efectos. La diferencia estructural reside en 2 aa en posiciones 112 y 158: el alelo 3 contiene cisteína (Cis) en 112 y arginina (Arg) en 158; el 4, Arg en 112 (cambio Cis112Arg) y Arg en 158; y el 2, Cis en 112 y Arg158Cis. O sea que, el alelo 3 contiene una Cis, el 4 cero y el 2 dos. Los cambios resultan trascendentes porque ApoE forma homodímeros (con puentes disulfuro a través de Cis) y heterodímeros con ApoA-II en las partículas HDL. ApoE3 es más funcional porque puede formar y desformar dichos puentes. ApoE4 los forma débilmente

(otros factores adicionales en la dimerización) y ApoE2 los forma más establemente y se segrega en el dímero. ApoE es la lipoproteína más abundante en cerebro y éste es el segundo sitio de mayor síntesis. Se expresa en astrocitos y en microglía. En neuronas, *in vitro*, los datos varían; algunos grupos no detectan síntesis aunque sí la existencia del receptor LRP en estado funcional y otros la demuestran en el citoplasma junto con su RNAm. En EA se le encuentra en los NFT y en las placas. La proteína MAP *tau* enlaza y estabiliza los microtúbulos en los axones y las MAP-2c en las dendritas. La *tau* hiperfosforilada disminuye su asociación a microtúbulos y a ApoE. ApoE3 se asocia con *tau* no fosforilada más de lo que lo hace ApoE4. Esta menor asociación de la 4 quizá favorezca que la *tau* libre sea fosforilada más extensamente (y forme más NFT) puesto que el enlace ApoE3-*tau* resulta en menor fosforilación de *tau* y mayor asequibilidad a microtúbulos. ApoE3 aumenta el crecimiento de neuritas y la 4 lo disminuye. Aunque, *in vitro*, la hiperfosforilación de *tau* no resulta en formación de NFT ni de muerte neuronal. La vida es compleja. En cuanto a placas, ApoE4 enlaza mejor A β soluble, promueve la formación de fibrillas y su concentración en las placas es mayor (aun en los cerebros de personas sin demencia). ApoE3 se asocia mejor con, y facilita la acción de, CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) en el medio oxidante desencadenado por el depósito fibrilar; ApoE4 obstaculiza la recuperación de enfermos con infarto, hemorragia y lesiones craneales cerradas.³⁷ Independientemente de alelos, ApoE parece expresarse más en EA. Hay mayores concentraciones de su RNAm en cerebro y de la proteína en suero. En concordancia, el aumento de los niveles constitutivos de ApoE por una sustitución de T en la secuencia nucleotídica -491 del gen APOE por A en ambos cromosomas (no se ve efecto en el heterocigoto T/A) aumenta unas 4 veces el riesgo de EA tardía.³⁸ Así que no sólo se debe buscar polimorfismo.

El efecto del polimorfismo ApoE se puede observar en varios grupos étnicos. En una población Amish que presenta menor frecuencia de ApoE4 la prevalencia de EA es menor.³⁹ Situación semejante se ha reportado en una china.⁴⁰ ¿Otros factores de protección? En una población Cheroque la prevalencia de EA tardía parece disminuir con el número de genes indígenas (evaluado por el número de ancestros) con un 65% de los pacientes de EA (n = 26) presentando menos del 50% de ancestros indígenas y lo contrario en los controles sanos (n = 26), un 65% con más del 50% de ancestros. En ausencia de ApoE4 (n = 14) no se observa el «efecto indígena» de protección y en su presencia (n = 12) 9 enfermos presentaron menos del 50% de ancestros y 3 más del 50% de ancestros. Los autores⁴¹ se apoyan en el manejo estadístico para decir que existe una protección indígena independiente de ApoE4. Pero el número de pacientes y controles (estratificados en diferentes categorías) es tan pequeño que se requiere una relación étnica muy cercana o falta de criterio estadístico y biológico para estar de acuerdo con ellos. Un estudio prospectivo (5 años) y estadísticamente robusto se realizó en Nueva York donde se encontró, por una parte, la asociación de ApoE4

con EA ya conocida en caucásicos pero una menos fuerte en los grupos de negros norteamericanos y de «hispanos» (por el idioma, pues fueron negros caribeños en su mayoría) y, por la otra, una mayor incidencia de EA en negros e «hispanos» (4 y 2 veces más que los caucásicos participantes, respectivamente) en ausencia del alelo ApoE4. Esto último pone de relieve la existencia, ya sospechada, de otros factores de riesgo para EA tardía.⁴²

Con los datos anteriores de que la placa neurítica con núcleo congófilico no es un requisito para el desarrollo de demencia, de la correlación pobre entre estas placas y demencia, de los datos de las dos segundas mutaciones de APP, de las mutaciones en PS2, de la delección del exón 9 de PS1 y de la importancia del factor vascular, otros componentes de la neuropatología tipo Alzheimer deben conceptualmente ser revisados. Los datos de otras patologías apoyan esta actitud. Los cerebros de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (la cual no parece ser riesgo para EA) muestran placas seniles⁴³ y estos cambios son más frecuentes en los individuos ApoE4.⁴⁴ Los cerebros de demencia pugilística desarrollan NFT y placas difusas.⁴⁵ Los de individuos que mueren poco después de un trauma cerebral muestran depósitos difusos de amiloide en un 30% de los casos y ApoE4 está sobrerrepresentada en esta fracción.⁴⁶ En estos casos (además de EA) hay mayor producción de IL-1 y de la subunidad β de la proteína S100 de astrocitos (gen en 21q22.3 cerca del telómero). La IL-1, de microglía activada, induce la producción de ApoE, APP y β S100.⁴⁷ Esta última estimula la proliferación de astrocitos (de manera autocrina) y aumenta sus flujos de Ca. IL-1 forma parte de la respuesta de la fase aguda (dentro de horas) a la lesión craneana y en tejidos periféricos es fundamental en el proceso de inflamación y citólisis. La microglía (fagocitos mononucleares residentes) en el cerebro normal está altamente ramificada (estado de reposo) y al activarse, en respuesta a lesión nerviosa, retrae sus procesos celulares.⁴⁸ Además, posee el receptor LRP (también conocido como «scavenger» por ligar LDL oxidada y productos finales glicosados), el receptor CR3 de complemento, los HLA-A2 y DR y el CD4, y produce radicales libres, NO, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF. De esta manera integra, junto con astrocitos, la bien documentada reacción inflamatoria en EA y generalmente vista como una reacción secundaria a la formación de la placa. La microglía no reacciona con α 1-antiquimotripsina ni con ApoE. Pero reacciona al A β . De interés, es activada tanto por agregados 1-40 y 1-42 como por los monómeros. Es decir, no requiere ni de la conformación secundaria β ni de las fibrillas. Esto podría explicar la neurodegeneración en ausencia de placas neuríticas nucleadas. Pero, ¿es neurotóxica? El A β no lo es directamente (ni en presencia de astrogliá) pero la microglía, activada por A β , destruye neuronas. En condiciones *in vitro*, la neurotoxicidad de la microglía no parece ser debida a NO ni a citocinas sino quizá a una amina fenólica y, dado que la interacción con diferentes porciones del péptido A β es compleja en cuanto a la inducción de la respuesta neurotóxica, el mecanismo inmune parece seguir un camino indirecto.⁴⁹ El antígeno CD4 es también expresa-

do en timocitos, en células T de tipo ayudador y en macrófagos donde interacciona con la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus HIV. Los enfermos de SIDA llegan a mostrar neurodegeneración cerebral. La muerte neuronal ocurre aun en ausencia de expresión viral local y parece ser debida a productos sistémicos derivados del HIV y/o productos del hospedero. Las infecciones oportunistas en ellos desencadenan a menudo la neurodegeneración. Ratones transgénicos para CD4 humano (no infectados) desarrollan daño neuronal por la activación de microglía cerebral en respuesta a un antígeno bacteriano presentado por vía intraperitoneal, modelo experimental usado para probar efectos de infección oportunista periférica.⁵⁰ ¿Factores ambientales en EA? Además, los enfermos de artritis reumatoide (AR) tratados con NSAIDs parecen tener menor riesgo a EA.⁵¹ El alelo HLA-A2 parece estar asociado con EA⁵² al igual que los HLA-DR1, 2 y 3 (en ausencia de ApoE4). Los DR4 y 6 parecen disminuir el riesgo.⁵³ La ciclooxygenasa 2, la inducible, implicada en Ca de colon y expresada por neuronas, astrocitos y microglía, aumenta la producción de radicales libres y de prostanoïdes inflamatorios (su inhibición reduce el daño en infarto cerebral), y está inducida en EA.⁵⁴ El modelo experimental de la activación de la microglía por A β existe ya en un ratón transgénico.⁵⁵ El DR4 está asociado a AR y puede ser entonces un factor de confusión en la interpretación del tratamiento de AR y EA. De todas maneras, estudios clínicos sobre el efecto de antiinflamatorios (algunos con mayor especificidad cerebral) en EA están en progreso. Pero, desgraciadamente, se debe tener calma pues la EA ha sabido expresar ya su desdén consuetudinario a varios apuestos y decididos pretendientes. Además, la inflamación puede ser el resultado de infección. *Chlamydia pneumoniae* está presente (en las zonas típicas de EA), es viable, se encuentra transcripcionalmente activa en cerebros de EA y parece no ser resultado de neumonía.⁵⁶ ¿Responsable de EA u oportunista? Causa infección respiratoria y meningoencefalitis. Está implicada en aterosclerosis. La prevalencia de sus anticuerpos en la población alcanza un pico a los 60-70 años con un valor del 70%. Escenario similar acontece con cuadros severos de depresión donde se encuentra infección cerebral por virus Borna y mejoría con el antiviral amantadina (también usado en Parkinson).

Lo anterior no quiere decir que el A β sea inconsecuente. El A β fibrilar es un factor central en la patogénesis de EA. Una de las fases iniciales importantes es la formación del agregado fibrilar que requiere de una «semilla» (como la que dispara la cristalización de NaCl en el vaso «de precipitado» de laboratorio) que puede ser el mismo A β insoluble u otra molécula como ApoE y/o componentes de la membrana basal (amiloides P, laminina, heparán sulfato). Otra, es la disminuida capacidad de la célula añosa (mencionada arriba) de remover proteínas señaladas para destrucción. En función de la edad, también existen cambios en los componentes de la membrana basal que inhiben la proteólisis del amiloide.⁵⁷ De relevancia, la microinyección de A β fibrilar en el cerebro de monos rhesus viejos produce, y no en el de jóvenes, pérdida neuronal, fosforilación de *tau* y activación

de la microglía,⁵⁸ es decir, el cuadro neuropatológico básico dependiente de edad de EA.

Recientemente se reportó una variante de la proteína α -2 macroglobulina (A2M), la A2M2, cuyo gen (en cromosoma 12) contiene una delección en el extremo 5' de la región de edición del exón 18 y presenta asociación con EA aumentando el riesgo unas 3-4 veces.⁵⁹ Su posición en el cromosoma 12 no corresponde a la región reportada anteriormente.²⁴ La proteína A2M es un inhibidor general de proteasas y, junto con ApoE y APP, es reconocida por LRP. El sitio génico de LRP se encuentra también asociado a EA,⁶⁰ al igual que A2M, ApoE y APP; la encrucijada se vuelve interesante. La A2M manifiesta 4 efectos relevantes para EA: a) a pesar de ser inhibidor para muchas proteasas, al combinarse con una serín proteasa *la activa* y ésta rompe A β , b) inhibe varias citocinas inflamatorias, c) previene la formación de fibrillas de A β , y d) forma un complejo con A β que es reconocido por LRP y el receptor lo interioriza a la célula donde el A β es degradado. Ideal, ¿verdad? La ApoE y la α -antitripsina inhiben la degradación de A β por el complejo A2M/proteasa y además, ApoE, cuando en exceso como en EA, puede competir con A2M (y con productos glicosados oxidados) por el A β en el receptor LRP. Junto con la mutación en Ub,²⁹ esto contribuiría a la acumulación de ApoE y de A β . Y la variante A2M2, alteraría los 4 efectos anteriores. El cromosoma 12 está resultando entonces ser importante para EA tardía pero la disección de las regiones y *loci* de interés presenta dificultades: un reporte reciente⁶¹ confirma la asociación anteriormente encontrada,²⁴ aunque amplía la zona génica, y otro (en el mismo número de JAMA) es incapaz de hacerlo.⁵⁹

Por último, ¿es recomendable ofrecer a la población un examen genético para EA? La respuesta va más allá de la obtención de un consentimiento informado. El examen tiene valor en situaciones de investigación pero su uso generalizado presenta multitud de problemas ante la ausencia de beneficios prácticos pues a la fecha no hay medicamento que pare o retarde la evolución de EA (estudios sobre estrógenos, NSAIDs y vitamina E están en progreso). De manera muy general, el examen diagnóstico o predictivo para: a) mutaciones penetrantes podría ser apropiado, como opción por discutir, para los miembros adultos de familias con claros patrones de transmisión autosómica dominante, b) ApoE sólo en situaciones de investigación, y c) infantes y embriones, de ninguna manera parece ser apropiado. El consejo genético profesional pre y posexamen, es esencial tanto para el paciente (si el estado clínico lo permite) como para los familiares tomando en cuenta los valores filosóficos personales y la exposición a información probabilística abstracta, no de certeza, sobre el riesgo de la enfermedad.

Referencias

1. Lowe J, Spillantini MG. Non-Alzheimer degenerative disorders. *Brain Pathol* 1998; 8: 295-298.

2. Alzheimer A. A characteristic disease of the cerebral cortex. In: The early story of Alzheimer's disease. Bick K, Amaducci L, Pepeu G eds. Padua, Liviana 1986.
3. Schmidt ML, Lee VM-Y, Forman M, Chiu TS, Trojanowski JQ. Monoclonal antibodies to a 100-kd protein reveal abundant A β plaques throughout gray matter of Alzheimer's disease brains. *Am J Pathol* 1997; 151: 69-80.
4. Castañeda M. Envejecimiento: La última aventura. Fondo de Cultura Económica. México, DF. 1994.
5. Einstein G, Buranosky R, Crain BJ. Dendritic pathology of granule cells in AD is unrelated to neuritic plaques. *J Neurosci* 1994; 14: 5077-5088.
6. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
7. Folstein M, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-Mental State»: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatry Res* 1975; 12: 189-198.
8. Hughes C, Berg L, Danziger L, Cohen LA, Martin RL. A new clinical rating scale for staging dementia. *Br J Psychiatry* 1982; 140: 566-572.
9. Helkala E-L, Laulumaa V, Soininen H, Riekkinen PJ. Recall and recognition on memory in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann Neurol* 1988; 24: 214-217.
10. Millner WP, Hebben N, Kaplan E. The Boston process approach to neuropsychological assessment. In: Grant I, Adams KM eds, *Neuropsychological Assessment of Neuropsychiatric Disorders*. New York, Oxford University Press, 1986: 65-86.
11. Russell EW. A multiple scoring method for the assessment of complex memory functions. *J Cons Clin Psychology* 1975; 43: 800-809.
12. Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RSJ, Frith CD, O'Keefe J. Knowing where and getting there: A human navigation network. *Science* 1998; 280: 921-924.
13. Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science* 1991; 253: 1380-1386.
14. Juottonen K, Laakso MP, Insausti R, Lehtovirta R, Pitkanen A, Pastanen K. Volumes of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 1522 y 23-31.
15. Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med* 1996; 334: 752-758.
16. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset AD. *Nature Genet* 1994; 7: 180-184.
17. Koshy B, Matilla T, Burright EN. Spinocerebellar ataxia type 1 and spinobulbar atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1311-1318.
18. Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 1998; 392: 37-41.
19. Larsson N-G, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandosky M. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genet* 1998; 18: 231-236.
20. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta amyloid peptides. *Nature Genet* 1996; 14: 55-61.
21. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid and presenilin 1 transgenes. *Nature Med* 1998; 4: 97-100.
22. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto MR, Anderson L. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998; 43: 815-825. *Y Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 7737-7741.
23. Nicoll JAR, Burnett C, Love S, Graham DT. High frequency of lipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997; 41: 716-721.
24. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Roses AD, Haines JL. Complete genomic screen in late-onset familial AD. Evidence of a new locus on chromosome 12. *JAMA* 1997; 278: 1237-1241.
25. Montoya SE, Aston CE, DeKosky ST, Kamboh MI, Ferrel RE. Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genet* 1998; 18: 211-212.
26. Xu H, Sweeny D, Wang R, Thinakaran G, Lo ACY, Sisodia SS, Greengard P, Gandy S. Generation of Alzheimer beta amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3748-3752.
27. Castañón EM, Prelli F, Soto C, Beanis R, Matsubara E, Shoji M. The length of amyloid beta in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type. *J Biol Chem* 1996; 271: 32185-32191.
28. Goldsmith HS. Omental transposition to the brain for Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1997; 826: 323-336.
29. Van Leeuwen, de Kleijn DPV, van der Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans MAF, Sluijs JA. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 1998; 279: 242-247.
30. Hutton M, Hardy D. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1639-1646.
31. Xu H, Goras GK, Greenfield JP, Vincent S, Naslund J, Mazzarelli L. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta amyloid peptides. *Nature Med* 1998; 4: 447-451.
32. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volgan German family with Alzheimer's disease and a presenilin 2 mutation. *Ann Neurol* 1998; 43: 131-135.
33. Crook R, Verkkoniemi A, Pérez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H. A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nature Med* 1998; 4: 452-455.
34. Schachter F, Faure-Delane JL, Guenot F, Rouger H, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature Genet* 1994; 6: 29-32.
35. Muros M, Rodríguez-Ferrer C. Apo E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins in a Spanish population underexpressing ApoE4. *Atherosclerosis* 1996; 121: 13-21.
36. Helisalmi S, Linnaranta K, Lehtovirta M. Apolipoprotein E polymorphism in patients with different neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* 1996; 205: 61-64.
37. Gutman CR, Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Mathew WY. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci* 1997; 17: 6114-6121.
38. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk of Alzheimer's dementia. *Nature Genet* 1998; 18: 69-71.
39. Pericak-Vance MS, Johnson CC, Rimmer JB. Alzheimer's disease apolipoprotein 4 allele in an Amish population. *Ann Neurol* 1996; 39: 700-704.
40. Mak YT, Chiu H, Woo J, Kay R, Chan YS, Hui E. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese. *Neurology* 1996; 46: 146-149.
41. Rosenberger RN, Richter RW, Risser RC, Taubman K, Prado-Farmer I, Eballo E. Genetic factors for the development of Alzheimer's disease in the Cherokee Indian. *Arch Neurol* 1996; 53: 997-1000.
42. Tang M-X, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R. The APOE4 allele and the risk of Alzheimer's disease among African Americans, Whites, and Hispanics. *JAMA* 1998; 279: 751-755.
43. Mackenzie IRA, Milles LA. Senile plaques in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 504-510.
44. Gouras GK, Relkin NR, Sweeney D, Muñoz DG, Mackenzie IR, Gandy S. Increased Apo E4 in epilepsy with senile plaques. *Ann Neurol* 1997; 41: 402-404.
45. Roberts GW, Allsop D, Bruton CJ. The occult aftermath of boxing. *Neurol Neurosurg Psych* 1990; 53: 373-378.
46. Nicoll JAR, Roberts GW, Graham DS. Apolipoprotein E4 allele is associated with deposition of amyloid beta protein following head injury. *Nature Med* 1995; 1: 135-137.
47. Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldick LJ. *In vivo* and *in vitro* evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 761-766.

48. Río Horteaga P. Microglia. In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. Penfield W ed. New York, Hocker 1932: 481-584.
49. Giulian D, Haverkamp LJ, Yu JH, Karshin W, Tom D, Li J. Specific domains of beta amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J Neurosci* 1996; 16: 6021-6037.
50. Buttini M, Westland CE, Masliah E, Yafeh AM, Wyss-Coray T, Mucke L. Novel role of human CD4 molecule identified in neurodegeneration. *Nature Med* 1998; 4: 441-446.
51. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and antiinflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology* 1996; 47: 425-432.
52. Payami H, Schellenberg GD, Zarepari S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA. Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49: 512-518.
53. Currant M, Middleton D, Edwardson J, Perry R, McKeith I, Morris C. HLA-DR antigens associated with major genetic risk for late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997; 8: 1467-1469.
54. Oka A, Takashima S. Induction of cyclooxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurons and axons. *Neuroreport* 1997; 5: 11611-11614.
55. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 1998; 152: 307-317.
56. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998; 187: 23-42.
57. Lindhal B, Lindhal U. Amyloid-specific heparan sulfate from human liver and spleen. *J Biol Chem* 1997; 272: 26091-26094.
58. Geula C, Wu C-K, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to A β -protein neurotoxicity. *Nature Med* 1998; 4: 827-831.
59. Blacker D, Wilcox MA, Laird MN, Rodes L, Horvath SM, Go RCP. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genet* 1998; 19: 357-360.
60. Kang DE, Saito T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49: 56-61.
61. Rogaeva E, Pimkumar S, Song Y, Sorbi S, Brindle N, Paterson A. Evidence for an Alzheimer's disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *JAMA* 1998; 280: 614-618. Y 619-622.