

DEPARTAMENT DE MEDICINA

ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIJOS DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
PORTADORES DEL ALELO 4 DE LA APOLIPOPROTEÍNA
E.

MARÍA DEL CARMEN BADÍA PICAZO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de febrer de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Josep Redón Mas
- Dr. José Miguel Láinez Andrés
- Dra. Coral Sanfeliu Pujol
- Dr. Jordi Pérez Tur
- Dr. Juan José Zarranz Imirizaldu

Va ser dirigida per:

Dr. José Viña

Dra. Ana Lloret

Dra. María Dolores Alonso

©Copyright: Servei de Publicacions
María del Carmen Badía Picazo

Dipòsit legal: V-1060-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7796-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

TÍTULO:

**ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIJOS DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PORTADORES DEL ALELO ϵ 4 DE
LA APOLIPOPROTEÍNA E.**

TESIS DOCTORAL

AUTOR: M. CARMEN BADÍA PICAZO

DIRECTORES:

-DR. JOSÉ VIÑA

-DRA. M DOLORES ALONSO

-DRA. ANA LLORET

Valencia, julio 2009



Prof. D. José viña Ribes, Catedrático del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, Dra. María Dolores Alonso Salvador, Médico Adjunto del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Dra. Ana Lloret Alcañiz, profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Doña Mari Carmen Badía Picazo, Licenciada en Medicina por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada: **"ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIJOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PORTADORES DEL ALELO $\epsilon 4$ DE LA APOLIPOPROTEÍNA E"** para la obtención del título de doctora.

Y para que así conste en acta a los efectos oportunos, firman la presente,

Valencia 2 de julio de 2009

Prof. José Viña

Dra. M Dolores Alonso

Dra. Ana Lloret

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis por haber hecho posible este trabajo. En primer lugar al Dr. José Viña por permitirme formar parte de su equipo, por su apoyo incondicional y por todos los consejos que me ha brindado. A la Dra. Ana Lloret por hacer de mi la investigadora que ahora soy y por su amistad. Y finalmente, y no por eso menos importante, a la Dra. Dolores Alonso, por sus magníficas ideas, su intuición, su cariño y sobre todo su apoyo en los momentos malos.

Gracias a todos los miembros del laboratorio de Fisiología por toda la ayuda que me habéis ofrecido, en especial a Nancy y Jelena, porque sin vosotras esta tesis tampoco hubiera sido posible.

Gracias también a mi familia y a Eugenio, mi compañero y gran apoyo moral todo este tiempo, por toda su paciencia y cariño.

A todos ellos gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE:

<u>I. INTRODUCCIÓN:</u>	1
1.- Introducción a la Enfermedad de Alzheimer	3
2.- Epidemiología de la EA	5
3.- Clínica y diagnóstico	7
3.1 Cuadro clínico	7
3.2 Criterios diagnósticos	12
4.- Etiología y patogenia	15
4.1 Factores de riesgo	15
4.2 Anatomía patológica	18
4.2.1 Lesiones macroscópicas	18
4.2.2 Lesiones microscópicas	19
4.2.3 Neurotransmisores	23
4.3 Alzheimer genéticamente determinado	24
4.4 Proteólisis de la APP	26
4.5. Hipótesis etiológicas: la “cascada del amiloide”	28
4.6 Otras hipótesis: la hiperfosforilación de la proteína tau	31
5.- Estrés oxidativo y la Enfermedad de Alzheimer	36
5.1 Radicales libres	36

5.2 Teoría del estrés oxidativo	37
5.3. Indicadores de estrés oxidativo	39
5.4. Antioxidantes	41
5.5. Estrés oxidativo en la EA	44
6.- Apoptosis en la EA.	47
7.- Apolipoproteína E y su relación con la EA	54
8.- Inflamación y EA	58
9.- Marcadores periféricos de la EA y detección precoz	59
10.- Sinopsis	61
ANEXO 1: GDS de Reisbert	63
<u>II. OBJETIVOS</u>	67
<u>III. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	73
1.-Sujetos	75
1.1 Sujetos jóvenes	75
1.1.1 Criterios de exclusión	76
1.1.2 Visita clínica	77
1.2 Sujetos con EA	78
2.- Test cognitivos	79
2.1 Test de memoria verbal de Rey	79

2.2 Test de Stroop	79
3.- Aparatos y reactivos	81
3.1 Aparatos	81
3.2 Reactivos	84
4.- Determinación de glutatión	85
4.1 Determinación de glutatión total	85
4.1.1 Fundamento	85
4.1.2 Obtención de las muestras y conservación	86
4.1.3 Derivatización de la muestra	87
4.1.4 Técnica cromatográfica	88
4.1.5 Cálculos	89
4.2 Determinación del patrón de glutatión reducido	90
4.2.1 Fundamento	90
4.2.2. Procedimiento	90
4.2.3. Cálculos	91
4.3. Determinación del patrón de glutatión oxidado	92
4.3.1 Fundamento	92
4.3.2 Procedimiento	93
4.3.3 Cálculos	93
4.4 Determinación del glutatión oxidado (GSSG)	94
4.4.1 Fundamento	94

4.4.2 Obtención de las muestras	95
4.4.3 Derivatización	95
4.4.4 Técnica cromatográfica	96
4.4.5 Cálculos	97
5.-Análisis de las isoformas comunes de ApoE.	97
5.1 Amplificación	98
5.2 Digestión del DNA y separación de los fragmentos.	99
6.- Péptido Aβ y su preparación.	101
7.- Aislamiento de linfocitos.	101
8.-Citometría de flujo	102
9.-Estudio en microscopio confocal	104
10.- PCR enzimas antioxidantes y relacionadas con tau	105
11.- Estudio de la expresión de calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3β mediante electroforesis y western blotting.	107
11.1 Visualización	109
12.- Método ELISA	110
13.-Preparación de la muestra para medir TNFα	111
14.- Análisis estadístico.	112
ANEXO 1: encuesta de recogida de datos	114
ANEXO 2: escala de depresión de Hamilton	117

ANEXO 3: tabla puntuación test de Stroop	123
<u>IV.RESULTADOS</u>	125
1.- Descripción de la muestra	127
2.- Resultados sobre cognición	131
2.1 Quejas subjetivas de memoria	131
2.2 Test Neuropsicológicos	133
2.2.1 Test de Stroop	133
2.2.2 Test de memoria de Rey	138
3.- ApoE y relación con la depresión	144
4.- Resultados analíticos	145
4.1 Colesterol	145
4.2 Hemograma y metabolismo férrico	146
4.2.1 Hemograma	146
4.2.2 Metabolismo férrico	146
4.3 Zinc y cobre	147
5.- ApoE y estrés oxidativo	155
5.1 Glutación	155
5.1.1 Glutación basal	155
5.1.2 Glutación tras incubación con A β	160
5.2 Enzimas antioxidantes	166

5.3 Peróxidos	169
6.- ApoE y muerte celular	170
6.1 Caspasas	170
6.2 Muerte celular	171
7.- ApoE y alteración mitocondrial	173
7.1 Mitocondrias de plaquetas	173
7.2 Mitocondrias de linfocitos	173
7.3 Liberación de citocromo C	174
8.- ApoE y enzimas relacionadas con la fosforilización de la proteína tau.	177
9.- Enzimas antioxidantes y enzimas relacionados con tau en sujetos con Enfermedad de Alzheimer.	180
10.- ApoE y marcadores de inflamación.	183
<u>V. DISCUSIÓN</u>	186
1.- Genotipo ApoE y cognición	187
1.1 Quejas subjetivas de memoria.	187
1.2 Test Neuropsicológicos	188
1.2.1 Técnicas de imagen	189
2.- Genotipo ApoE y síndrome depresivo	191
3.- Genotipo ApoE y resultados analíticos	193
3.1 Colesterol	193

3.2 Hemograma y metabolismo férrico	195
3.3 Zinc y cobre	196
4.- Genotipo ApoE y estrés oxidativo	197
4.1 Glutación	197
4.2 Enzimas antioxidantes	200
4.3 Enzimas antioxidantes en la EA	203
4.4 ApoE y peróxidos	203
5.- ApoE y muerte celular.	205
6. ApoE y alteración mitocondrial	207
7.-ApoE y marcadores de inflamación	209
8.- ApoE y enzimas relacionadas con tau	210
9.- Efecto del péptido Aβ en nuestra muestra	216
<u>VI. CONCLUSIONES</u>	220
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	226

ABREVIATURAS:

A β : proteína beta-amiloide

ADN: ácido desoxirribonucleico

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora del amiloide

ARN: ácido ribonucleico

BPDS: ácido batofenantrolinedisulfuro

BSA: albúmina de suero bobino

CAT: catalasa.

CHES: ácido 2-N-ciclohexamilo

Cu: cobre

DCFH-DA: diclorofluorescin-diacetato

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association

EA: Enfermedad de Alzheimer

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GCL: glutamato cistein ligasa

GCLC: unidad catalítica de la glutamato cistein ligasa

GCLM: unidad moduladora de la glutamato cistein ligasa

GDS: Escala global de deterioro de Reisberg

GPx: Glutación peroxidasa

GSK3: Glucógeno sintasa kinasa 3

GSH: glutación reducido (glutación sulfhidrilo)

GSSG: glutación oxidado (glutación disulfuro)

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento.

IST: índice de saturación de la transferrina

JC-1: 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodido

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido

MDA: malondialdehido

NADPH: nicotinamida adenin-dinucleótidos

NEM: N-etilmaleimida

Neb: Tris EDTA acetato de sodio

NINCDS-ADRDA: Criterios de diagnóstico de la EA por la «United Status National Institute for Communicative Disorders and Stroke» y «The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association»

PBS: tampón fosfato salino

PCA: ácido perclórico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PKR: protein-kinasa dependiente de RNA

PMM: potencial de membrana mitocondrial.

RCAN 1: proteína reguladora de la calcineurina

RNM: resonancia nuclear magnética

SOD: Superóxido dismutasa.

SOD-Mn: superóxido dismutasa-manganeso

SOD-Cu/Zn: Superóxido dismutasa- cobre/zinc

TAC: tomografía axial computarizada

TEB: Tris borato EDTA

TR: transcripción reversa

Tris: 2-amino-2(hidroximetil)-1'3-propanodiol

Zn: zinc

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN:

1.-Introducción a la Enfermedad de Alzheimer

El término demencia describe un síndrome clínico adquirido, crónico y progresivo caracterizado por deterioro cognitivo, incapacidad para realizar las actividades de la vida diaria y alteraciones neuropsiquiátricas. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia primaria (60%), seguida por la demencia vascular (20%) y la demencia por Cuerpos de Lewy (15%).

La EA fue descrita en 1907 por el Dr. Alois Alzheimer (Alzheimer A, 1907) y se caracteriza por un proceso neurodegenerativo relacionado con la edad, que causa pérdida progresiva de las funciones mentales superiores, fundamentalmente la memoria seguido de la capacidad lingüística, praxica y gnósica. A nivel conductual los pacientes desarrollan trastornos del humor como depresión, ansiedad y trastornos psicóticos. Pueden presentar también, según el estado evolutivo, episodios de agitación y de pérdida de actividad e iniciativa. El paciente progresa a un estado de mutismo e inmovilidad pudiendo llegar a una total desconexión con el medio e incapaz de controlar sus funciones fisiológicas más

simples. La supervivencia media es de 8 años con gran variabilidad entre los pacientes (Alberca R y López-Pousa S, 2002). Es la causa más común de demencia en los ancianos (Gálvez-Vargas R y cols., 2000) constituyendo el 50-70% de las mismas (Ferri CP y cols., 2005). Su prevalencia, en aumento a causa del envejecimiento de la población, la convierte en un problema socio-sanitario y económico para los países desarrollados.

En los últimos años se ha avanzado mucho en la comprensión de los fenómenos que suceden a nivel neuronal en esta enfermedad, aunque aún se está lejos de conocer la causa que la produce. Se sabe que existe una forma familiar, que supone un pequeño porcentaje de los casos (5-10%) y que se caracteriza por un inicio más precoz, y una forma esporádica más tardía, que es la más frecuente. También conocemos que existen diversos factores de riesgo tanto genéticos (como el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E), como ambientales. Neuropatológicamente sabemos que existen lesiones intraneuronales (ovillos neurofibrilares) y extraneuronales (placas seniles), y cada vez comprendemos mejor el papel de fenómenos como el estrés oxidativo, la inflamación, alteraciones mitocondriales, etc. en la etiopatogenia de esta enfermedad. También sabemos que

las lesiones cerebrales preceden en el tiempo a los primeros síntomas clínicos (Schmitt FA y cols., 2000) por lo que gran parte de los esfuerzos en la actualidad se centran en encontrar marcadores precoces de la enfermedad.

Posteriormente vamos a describir con más detalle los aspectos aquí comentados.

2.- Epidemiología de la EA

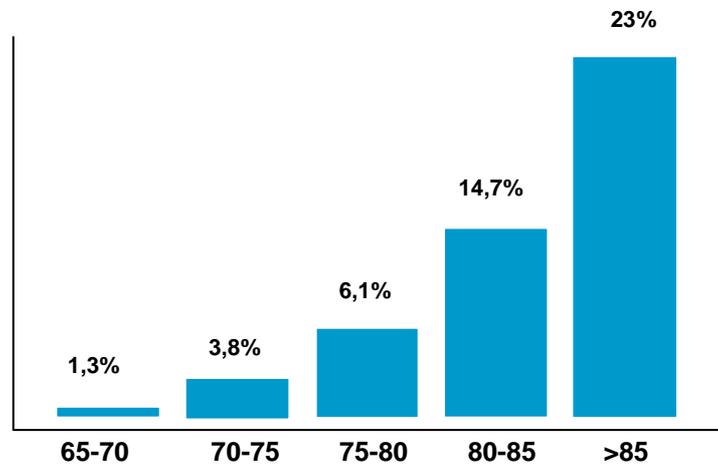
El aumento de la esperanza de vida de la población en las últimas décadas, sobre todo en los países desarrollados, ha asociado un aumento paralelo de las enfermedades ligadas a la edad. Dentro de éstas, las demencias son las que mayor preocupación despiertan debido a que son la primera causa de incapacidad y muerte en las personas mayores y provocan unos gastos sanitarios desproporcionados (Boada M y cols., 1999; Newcomer RJ y cols., 2005). La EA está considerada como la principal causa de demencia y, según los últimos datos de la “Alzheimer’s Association”, es la sexta causa de muerte en Estados Unidos, la quinta entre las personas mayores de 65 años (Alzheimer’s Association, 2009). Los últimos

datos hablan de que actualmente existen más de 5 millones de personas afectadas de EA en Estados Unidos (Alzheimer's Association, 2008), siendo la prevalencia del 5-10% en los mayores de 64 años, y se espera que este número se cuadruplicue en los próximos 50 años. En España existen entre 640.000 y 770.000 casos, siendo la prevalencia algo mayor en el norte y el oeste (Bermejo-Pareja F, 2007).

La incidencia muestra tasas entre 10 y 15 nuevos casos cada mil personas al año para la aparición de cualquier forma de demencia y entre 5-8 para la aparición de la EA (Bermejo-Pareja F y cols., 2008).

La prevalencia aumenta con la edad duplicándose cada 5 años a partir de los 60 años de edad (Figura 1), siendo del 1% entre los 60-65, del 4,3% a los 75 y del 28,5% a los 90 años (Launer LI y cols., 1999).

FIGURA 1. Aumento de la prevalencia de la EA con la edad.



3.- Clínica y diagnóstico

3.1 Cuadro clínico:

Distinguimos dos formas de EA según la edad de inicio de la sintomatología:

-Una forma temprana o de inicio precoz de la EA de herencia autosómica dominante; comienza antes de los 65 años de edad y constituye el 5 al 10% de todos los casos.

-Una forma tardía que aparece después de los 65 años de edad y que es en su mayor parte esporádica, representa entre el 90 y 95% de todos los casos.

Como norma general, el debut de la enfermedad suelen ser fallos de memoria episódica, en relación con el predominio y precocidad de las lesiones a nivel temporal mesial. Este fallo de memoria en los estadios iniciales no va a repercutir en la funcionalidad del sujeto y esta fase es la que denominamos “deterioro cognitivo ligero” (Tabla 1). Este estadio es un reto para el profesional que va a tener que distinguir si se encuentra ante fallos normales del anciano o ante los síntomas prodrómicos de una demencia. Posteriormente se van añadiendo fallos ejecutivos, de lenguaje y visuoespaciales hasta llegar al síndrome clínico típico afaso-apraxo-agnósico que irá progresando hasta la desintegración total de las funciones mentales (Alberca R y López-Pousa S, 2002).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE DETERIORO COGNITIVO LIGERO	
1-	Queja de pérdida de memoria corroborada por un informador
2-	Función cognoscitiva general normal
3-	No existe alteración significativa de las actividades de la vida diaria.
4-	Afectación de la memoria: la puntuación en test de memoria inferior a 1.5 d.e. por debajo de la media de los controles
5-	No cumple los criterios DSM IV ni NINCDS-ADRDA para EA

Tabla 1. Criterios diagnósticos para el deterioro cognitivo ligero (Petersen RC y cols., 2001)

El déficit de memoria o amnesia dificulta el aprendizaje de nuevos conceptos o tareas e imposibilita retener lo aprendido, lo que lleva al sujeto a repetir preguntas y a no recordar datos recientes fundamentales para su actividad diaria, mientras que el recuerdo de los hechos antiguos está mejor conservado. La afectación del lenguaje más frecuente encontrada en estos pacientes es la de una afasia anómica fluente, en la cual el sujeto tiene dificultad para encontrar las palabras pero la sintaxis se conserva. Existe de forma precoz una desorientación temporal mientras que la desorientación espacial aparece más tardíamente. El deterioro de las capacidades

visuoespaciales y el desconocimiento del déficit cognitivo por parte del paciente (anosognosia) son síntomas comunes (Alberca R y López-Pousa S, 2002).

Además de síntomas cognitivos es muy frecuente la aparición de síntomas conductuales (Saz P y cols., 2009): cambios de personalidad, entre los que la apatía es la más frecuente, aunque también puede existir irritabilidad, suspicacia, etc.; trastornos del humor como depresión y ansiedad, muy frecuentes al inicio del proceso; trastornos psicóticos y agitación. Como norma general, la depresión y ansiedad son más comunes en los estadios iniciales y la agitación y psicosis son características de las fases avanzadas. Estos síntomas conductuales son de gran importancia ya que son la causa de la mayoría de ingresos en instituciones de los pacientes por claudicación familiar (Gaugler JE y cols., 2009). Además el tratamiento con antipsicóticos se asocia a una mayor velocidad del deterioro cognitivo y a un aumento de mortalidad (Schneider LS y cols., 2006).

Según el déficit cognitivo existente, los trastornos conductuales y la afectación en la funcionalidad del sujeto, existen

distintos estadios que se pueden estratificar con diferentes escalas clínicas como la Escala Global de Deterioro de Reisberg (GDS) (Reisberg B y cols., 1982. Anexo 1):

-Deterioro cognitivo ligero (GDS 2-3): fallos leves sin afectación en la capacidad funcional, puede existir depresión o ansiedad.

-Demencia grado leve (GDS 4): fallos en actividades complejas como manejo del dinero, cocinar...

-Demencia grado moderado (GDS 5-6): existe afectación de la capacidad para llevar a cabo actividades instrumentales y básicas de la vida diaria, alteraciones conductuales más importantes (ideas delirantes, agitación, insomnio, depresión...)

-Demencia grado severo (GDS 7): precisan supervisión constante, alteración de esfínteres, alteraciones conductuales graves y frecuentes.

3.2 Criterios diagnósticos:

El diagnóstico es fundamentalmente clínico y de exclusión de otras enfermedades que puedan simular una demencia, por lo que es fundamental realizar una analítica completa para descartar alteraciones tiroideas, déficit de vitamina B12 y ácido fólico. También será necesario realizar serologías para descartar neuroúlús y una prueba de imagen cerebral, como la tomografía axial computarizada (TAC) o la resonancia nuclear magnética (RNM) para descartar lesiones ocupantes de espacio, hidrocefalia normopresiva, lesiones vasculares... Además la RNM nos puede ayudar aportando datos indirectos como la existencia de atrofia de los hipocampos o un patrón de atrofia cortical parieto-temporal (Henneman WJ y cols., 2009; Desikan RS y cols., 2008). También deberemos tener en cuenta que una depresión en las personas ancianas puede simular una demencia, situación algo compleja ya que la EA puede asociar síntomas depresivos sobre todo al inicio de la enfermedad (Amieva H y cols., 2008).

Los criterios diagnósticos utilizados para determinar la existencia de demencia tipo Alzheimer son los expuestos en la cuarta

edición del «Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association» (DSM-IV) (Moser M, 1994) y requiere el desarrollo de múltiples deficiencias cognitivas:

- Deterioro de memoria
- Al menos una alteración cognitiva:
 - afasia
 - apraxia
 - agnosia
 - alteración en funciones ejecutivas
- Deterioro en la esfera social u ocupacional y un deterioro de un nivel previo de la actividad habitual.
- Inicio gradual y un deterioro cognitivo progresivo.
- Ausencia de otras condiciones que causen fallos progresivos de memoria y cognitivas o que se conocen como una causa de demencia.
- Las alteraciones no se desarrollan durante el curso del delirio.
- El trastorno no está asociado a otra enfermedad neuropsiquiátrica.

No existen criterios de consenso universal para el diagnóstico de la EA. Sin embargo la mayoría de profesionales han aceptado los criterios establecidos por «United Status National Institute for Communicative Disorders and Stroke» y «The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association» (NINCDS-ADRDA) (Mckhann G y cols., 1984; Tierney MC y cols., 1988). Los criterios de NINCDS-ADRDA son similares a los de la tercera edición del DSM (American Psychiatric Association, 1987), con la excepción de que no se requiere un deterioro en la actividad funcional diaria para el diagnóstico. El informe define demencia como la disminución de memoria y otras funciones cognitivas comparadas al nivel previo de función del paciente, determinado por anormalidades observadas en examen clínico y pruebas neuropsicológicas.

Pueden ayudar o apoyar al diagnóstico pruebas más funcionales que nos van a hablar del metabolismo de las distintas áreas cerebrales como son el SPECT y el PET cerebral, que medirán la cantidad de flujo sanguíneo o el consumo de glucosa respectivamente, siendo sugestivo de EA un patrón de hipocaptación parieto-temporal (Waragai M y cols., 2008; Langbaum JB y cols., 2009).

En casos seleccionados se pueden realizar análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) en los que encontraremos aumento de la proteína tau junto con disminución de la proteína beta-amiloide 42 (A β) (Andreasen N y cols., 2001)

La seguridad diagnóstica continúa dependiendo de la confirmación neuropatológica de las lesiones características de la EA (placas seniles y ovillos neurofibrilares) de amplia distribución (Hyman BY y Trojanowski JK, 1997).

4.- Etiología y patogenia.

4.1 Factores de riesgo:

Actualmente se desconoce la etiología exacta de la EA. Gracias a estudios epidemiológicos conocemos algunos factores de riesgo que pueden influir, entre los cuales la edad y los antecedentes familiares de demencia son los más fuertemente asociados a la EA (Zavaloni M y van Reekum R, 2006). Actualmente se tiende a considerar a la EA como una enfermedad multifactorial en la que

influirán tanto factores genéticos como ambientales (Zawia NH y cols., 2009).

-Factores genéticos: Conocemos mutaciones genéticas determinantes, responsables de la EA familiar o de inicio precoz y mutaciones predisponentes, que se comportan como un factor de susceptibilidad para padecer la enfermedad y que se comentarán más adelante. El tener un familiar de primer grado afectado es uno de los mayores factores de riesgo. Alrededor de un 40% de los sujetos con EA tienen un antecedente familiar de demencia, que alcanza el 50% si los afectados son muy longevos (85-90 años). Existe un mayor riesgo de padecer demencia (entre dos y siete veces) entre los familiares de los afectados con EA, sobre todo, en casos con comienzo antes de los 70 años (Goldman JS y cols., 2004).

-Factores fisiológicos: Se dan estimaciones de prevalencia de EA mayores entre las mujeres que entre los hombres (2:1), aunque probablemente esto pueda deberse más a una mayor expectativa de vida que a factores de riesgo específicos relacionados con el sexo (Hebert LE y cols., 2001). Por el contrario, se ha demostrado que los estrógenos poseen una capacidad protectora en las mujeres

premenopáusicas, ya que los estrógenos influyen sobre las enzimas colinérgicas y el factor de crecimiento neuronal y, además, actúan como antioxidantes (Kolsch H y Rao ML, 2002).

La influencia de los factores de riesgo vascular ha sido estudiada ampliamente y parece existir mayor riesgo de EA en los sujetos con hipertensión arterial, diabetes Mellitus o lesiones vasculares cerebrales (Stampfer MJ, 2006; Lithell H y cols., 2003).

-Factores ambientales: factores adicionales que pueden tener un papel en la patogenia de la EA incluyen agentes infecciosos no identificados, edad de los padres, pacientes que recibieron circulación extracorpórea, trauma craneal (Fleminger S y cols., 2003), disfunción tiroidea, adicción al tabaco, educación (Zavaloni M y van Reekum R, 2006) y exposición al aluminio. Estudios epidemiológicos y clínicos de estos factores demostraron datos muy contradictorios, y su papel continúa siendo un tema de debate.

4.2 Anatomía patológica:

Las lesiones patológicas cerebrales más importantes son los ovillos neurofibrilares o degeneración neurofibrilar, a nivel intracelular, y las placas seniles a nivel extracelular (Hardy J, 2006).

4.2.1 Lesiones macroscópicas:

Encontramos atrofia generalmente simétrica y difusa de los giros cerebrales que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral (existe una correlación negativa entre el peso del encéfalo y el tiempo de evolución de la enfermedad). La atrofia afecta con mayor frecuencia a los lóbulos temporales, pero también afecta a los lóbulos frontales, parietales u occipitales. Secciones a través de los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular. Los ganglios basales, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y el tronco cerebral no muestran anomalías notables (Thompson PM y cols., 2003).

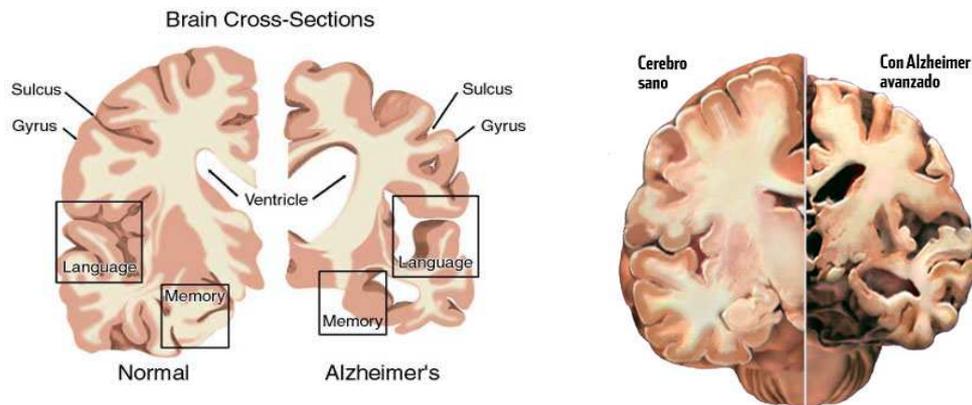


Figura 2. Cambios macroscópicos cerebrales en la EA.

4.2.2 Lesiones microscópicas:

La composición de la degeneración neurofibrilar u ovillos neurofibrilares es compleja, está constituida por filamentos helicoidales dobles, los cuales están compuestos fundamentalmente por la proteína tau y neurofilamentos anormalmente fosforilados que corresponden a proteínas que forman parte del citoesqueleto neuronal normal (Cruz-Sánchez FF, 2000). Esta proteína tau en condiciones normales forma puentes entre los microtúbulos y estabiliza la tubulina, pero en su forma hiperfosforilada es muy insoluble y conduce a un ensamblaje y desensamblaje alterado de los

microtúbulos dando lugar a una alteración del transporte axonal, y consecuentemente a una disfunción y degeneración axonal. Los acúmulos de filamentos helicoidales dobles bloquean el transporte de organelas y proteínas en el citoplasma neuronal, en los axones y dendritas. Otros componentes de los ovillos neurofibrilares son la proteína Alz-50, neurofilamentos fosforilados, proteínas asociadas a microtúbulos, péptido A β , vicentina, actina y ubiquitina. Las regiones con más afectación son hipocampo, corteza entorrinal, neocórtex, complejo amigdalino y núcleos del prosencéfalo basal (Duyckaerts C y cols., 2009).

Las placas seniles son lesiones del neuropilo de forma esferoidal y de 20-100 μ m de diámetro, están constituidas por una zona central de amiloide rodeada de neuritas distróficas y de algunas células gliales. Las neuritas distróficas son prolongaciones de distintas neuronas que confluyen en una misma placa. El componente fundamental del amiloide cerebral es el péptido beta-amiloide (A β), que procede de la proteína precursora del amiloide (APP). Otros componentes son mucopolisacáridos, α 1-antitripsina, inmunoglobulinas, factores del complemento, fibrinógeno, apolipoproteína E (ApoE), presenilinas, aluminio y sílice. Las placas se

encuentran repartidas por todo el encéfalo, predominando en hipocampo, corteza entorrinal y neocórtex (Duyckaerts C y cols., 2009; Braak H y Braak E, 1990).

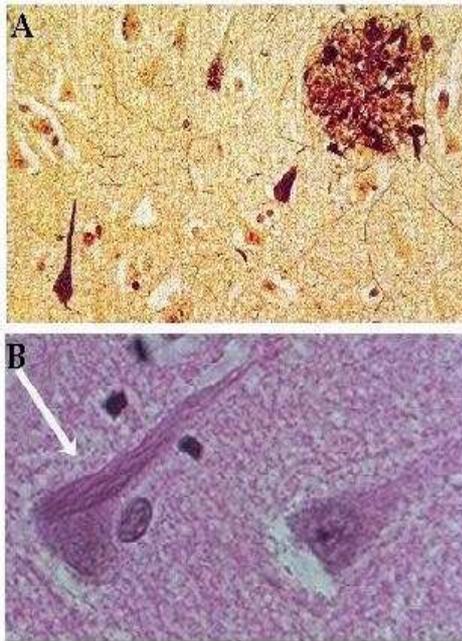


Figura 3. Lesiones microscópicas de la EA

A: placa senil.

B: ovillo neurofibrilar

También encontramos otro tipo de lesiones como angiopatía amiloide, degeneración granulovacuolar y cuerpos de Hirano, junto con pérdida neuronal, pérdida de sinapsis y atrofia cerebral. La

atrofia predomina en la corteza entorrinal y parahipocampal, seguidas de las cortezas frontal, temporal inferior, parietal y occipital.

Estas lesiones se encuentran en mayor número inicialmente en hipocampo y amígdala (Duyckaerts C y cols., 2009) y posteriormente en las regiones de asociación de la corteza cerebral y en el lóbulo temporal medial. El hipocampo y la corteza del lóbulo temporal están casi siempre afectados y muestran un patrón topográfico del progreso que fue utilizado para definir varias etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA (Braak H y Braak E, 1991 y 1999):

-Estadíos transentorrinos: Estadio I: afectación de las células de proyección específica de la región transentorrinal, en las profundidades del surco rinal. Estadio II: numerosos ovillos neurofibrilares y hilos del neuropilo en la región transentorrinal, y algunos adicionales en la región entorrinal.

-Estadíos límbicos III y IV: importante destrucción de las capas entorrinales responsables de la transmisión de información entre la neocorteza y el hipocampo. En el estadio IV el proceso de destrucción se difunde desde la región entorrinal hacia la amígdala, el hipocampo

y especialmente hacia las áreas de asociación de la neocorteza temporal basal.

-Estadíos neocorticales V y VI: destrucción severa de las áreas asociativas neocorticales, dejando solamente poco o nada afectados a los campos motores primarios, las áreas sensoriales primarias y sus regiones circundantes, que finalmente también se afectan en el estadio VI.

4.2.3 Neurotransmisores

Lo más característico es el descenso en la actividad colinérgica en el cerebro de los sujetos con EA. La reducción en acetilcolintransferasa es el doble de la pérdida neuronal esperada en la corteza. Las terminales colinérgicas presinápticas están particularmente afectadas (Mufson EJ y cols., 2008). También están afectadas las neuronas de proyección que producen transmisores monoamina, y neuronas corticales que producen glutamato, GABA, somatostatina, neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, sustancia P, y otros neuromoduladores. Existe una reducción en la actividad de neurotransmisor en los sistemas serotoninérgico,

noradrenérgico y dopaminérgico (Liu Y y cols., 2008). No hay una correlación entre el grado de demencia y las anormalidades del sistema transmisor monoaminérgico. También se ha hallado reducciones en receptores muscarínicos en el hipocampo y receptores de GABA en el núcleo caudado (Rissman RA y cols., 2007).

4.3 Alzheimer genéticamente determinado:

Pese a que cada vez conocemos más sobre esta enfermedad la etiología exacta sigue siendo un misterio. Sabemos que existe una forma esporádica de la enfermedad que aparece en edades tardías y una forma familiar de aparición más temprana y que constituyen el 10% del total de casos de EA. En estas familias la enfermedad se transmite con patrón autosómico dominante y la mayoría de ellas presenta mutaciones en los tres genes localizados en los cromosomas 21, 14 y 1 (Hardy JA y cols., 1989; Schellenberg GD y cols., 1992; Rogaev EI y cols., 1995).

Tabla 2. Genes implicados en la EA familiar

CROMOSOMA	GEN	PROTEINA	EDAD INICIO
21		Proteína precursora del amiloide	48-55
14	S182	Presenilina 1	35-55
1	STM-2	Presenilina 2	54

También en el Síndrome de Down, en el cual existe una trisomía del cromosoma 21, encontramos una presentación patológica similar y el desarrollo de la enfermedad. Además de estas mutaciones existen otros genes que actuarían como factor de riesgo para padecer la enfermedad, tanto la forma esporádica como la familiar, como ser portador del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E y del que hablaremos más extensamente en otro apartado.

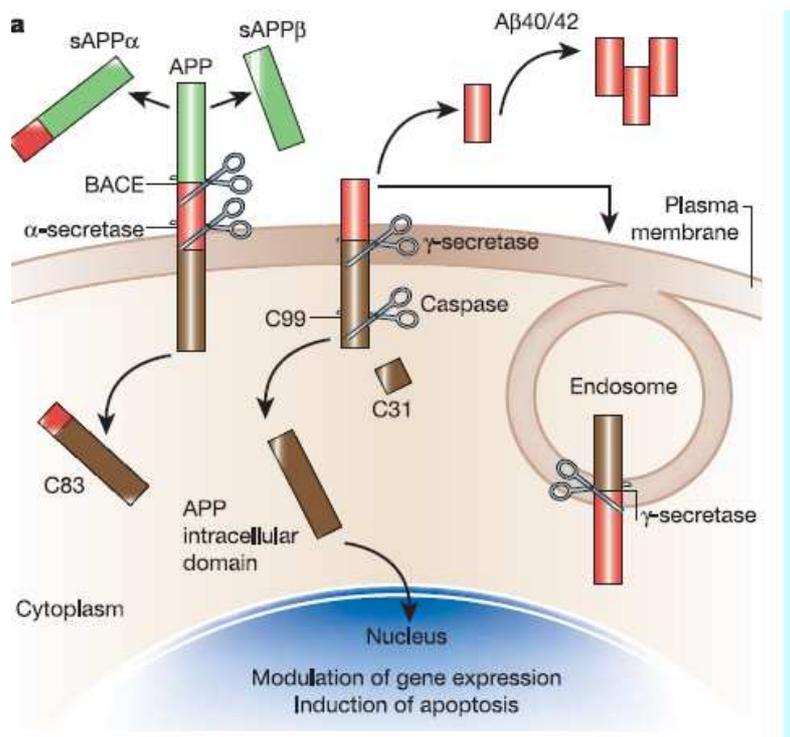
4.4 Proteólisis de la APP:

La proteína precursora del amiloide (APP) es una glicoproteína de membrana de entre 665 y 770 aminoácidos que contiene un extremo amino-termina, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un extremo intracitoplásmico. Su función en el organismo no es bien conocida, pero se piensa que puede intervenir en funciones de adhesión celular, regulación de membranas basales y actuación de citokinas, así como lugares de unión a zinc y a cobre, pudiendo tener propiedades antioxidantes y de protección frente a tóxicos externos; también se piensa que tiene un papel importante en la maduración del sistema nervioso central, la reparación y la plasticidad sináptica (Panegyres PK, 2001; Hoe HS y cols., 2009). Dicha proteína es metabolizada por las secretasas (α , β , γ) (Figura 4). La proteólisis por la α -secretasa daría como producto sustancias solubles (vía no amiloidótica) (Hoey SE y cols., 2009) mientras que la proteólisis por la β -secretasa seguida de la γ -secretasa da lugar al péptido $A\beta$ (vía amiloidótica) (Jorgensen AB y cols., 2009). Dicho péptido contiene en condiciones normales 40 aminoácidos, pero una pequeña parte de ellos tienen dos aminoácidos extra. Es esta isoforma de 42 aminoácidos la que

precipitaría en las placas seniles. La γ -secretasa es un complejo de 4 moléculas cuya parte efectora es la presenilina.

Cualquiera de las 3 mutaciones comentadas actuaría alterando el proceso de proteólisis de la proteína precursora del amiloide por las secretasas causando la hiperproducción de proteína $A\beta$ de 42 aminoácidos.

Figura 4. Proteólisis de la APP (Nature 2004; Vol. 430)



4.5. Hipótesis etiológicas: la “cascada del amiloide”

El hecho de que el péptido A β sea el mayor componente de las placas seniles y el conocer que sujetos con mutaciones de la APP desarrollaban la enfermedad así como los sujetos con Síndrome de Down fueron las claves para desarrollar la hipótesis de la cascada del amiloide, hipótesis vigente en la actualidad (Figura 5). Se considera que el depósito de A β es causa de la neurotoxicidad que produce pérdida sináptica y muerte neuronal. Esta creencia se basa en estudios *in vitro* donde la adicción de A β fibrilar producía neurotoxicidad (Lorenzo A y cols., 2000) o alteración en la función mitocondrial (Fang F y Liu GT, 2009) o en la homeostasis del calcio. El mecanismo por el cual el péptido A β resulta tóxico para la célula, la causa de la formación de los ovillos neurofibrilares, si las placas seniles son la causa inicial o la consecuencia final del proceso o el porqué de la alteración del metabolismo amiloideo en la EA esporádica son preguntas todavía sin respuesta.

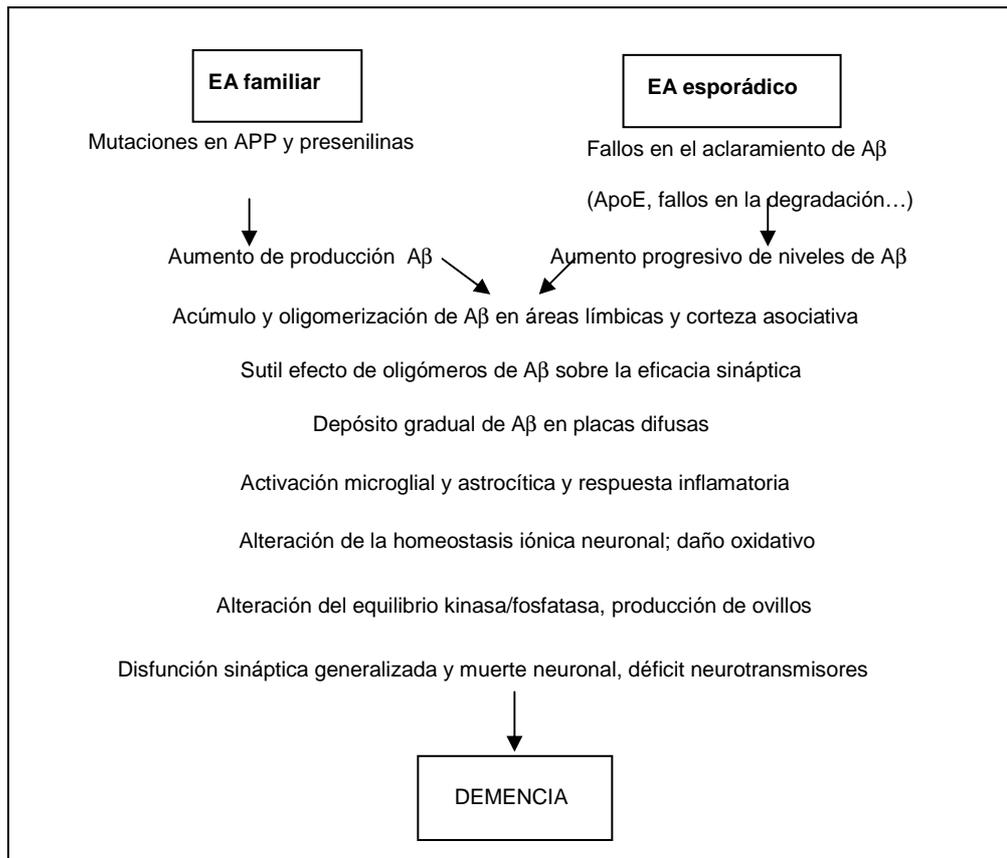
Hallazgos recientes muestran que el péptido A β también puede encontrarse en el espacio intracelular en cantidades que resultan tóxicas para la célula. Estos estudios demuestran una

acumulación intracelular previa al depósito extracelular en forma de oligómeros o prefibrillas, lo cual ha hecho que cada vez sea mayor el número de investigadores que postulan que el péptido también ejerce su efecto tóxico desde el interior (Wirhth O y cols., 2004). El mecanismo por el cual el péptido A β resulta tóxico en el interior de la célula no está claro hasta el momento, aunque hay evidencias de que podría producir muerte neuronal por apoptosis (Ankarcrona M y Winblad B, 2005). Parece que la mitocondria juega un papel importante en este sentido, ya que se ha visto que las mitocondrias cerebrales de enfermos de EA presentan alteraciones que no se demuestran en los individuos control. Experimentos del grupo de Viña y cols. han demostrado que el péptido A β induce un aumento de la producción de radicales libres en mitocondrias aisladas y que además, induce la agregación mitocondrial y la salida de citocromo C de la mitocondria, ambas señales apoptogénicas (Lloret A y cols., 2008). Estos hallazgos están en consonancia con resultados del grupo de la Dra. Oliveira que demuestran que la toxicidad del péptido A β requiere mitocondrias intactas y que la apoptosis asociada a la toxicidad del péptido A β requiere mitocondrias funcionales (Morais Cardoso S y cols., 2002). Además se ha comprobado que la toxicidad

del péptido sobre las mitocondrias se produce por su unión con la alcohol deshidrogenasa (Lustbader JW y cols., 2004) y que cuando se inhibe esta unión se suprime la apoptosis y la generación de radicales libres.

Existen muchas otras teorías sobre la etiopatogenia de esta enfermedad. Se postula que el estrés oxidativo y la inflamación pueden ser el paso inicial o intermedio hacia el daño neuronal. Otros grupos apoyan que el defecto inicial es la alteración de la proteína tau (Kwok JB y cols., 2008) ya que existen estudios que demuestran una correlación entre taupatía y clínica en la EA, correlación que no ocurre con las placas seniles (Nelson PT y cols., 2007).

Figura 5. Cascada del Amiloide.



4.6 Otras hipótesis: la hiperfosforilación de la proteína tau:

Existen diversas lagunas en la teoría del amiloide como por ejemplo que la EA asociada a mutaciones de la APP o presenilinas son una minoría y que la mayor parte de enfermos (EA esporádica) no

presentan dichas mutaciones. Es conocido que muchos ancianos tienen criterios anatomopatológicos de EA con gran cantidad de placas en el cerebro y que sin embargo clínicamente no presentaron deterioro cognitivo. Como hemos comentado con anterioridad, la gravedad clínica parece correlacionarse con la cantidad de ovillos neurofibrilares más que con la cantidad de placas. Además todavía queda por aclarar cómo el péptido A β produce la hiperfosforilación de la proteína tau. Es por esto que muchos autores intentan encontrar explicaciones etiopatogénicas alternativas que sustituyan o completen la hipótesis amiloidea. Entre estas líneas de investigación son cada vez más interesantes las que se centran en comprender cómo se produce la hiperfosforilación de la proteína tau y su posible relación con el depósito de A β . Cada vez se está avanzando más en este campo y son varias enzimas las que están en el punto de mira.

La Glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) es una kinasa que se encuentra implicada en gran variedad de procesos celulares como el metabolismo del glucógeno (Welsh GI y Proud CG, 1993), transcripción genética (Troussard AA y cols., 1999), apoptosis (Turenne GA y Price BD, 2001) y estabilidad del citoesqueleto (Anderton BH y cols., 2001). Estudios recientes ponen de manifiesto

que GSK3 interviene en la hiperfosforilación de la proteína tau (Asuni AA y cols., 2006), el deterioro cognitivo, el aumento de producción de A β (Phiel CJ y cols., 2003) y en la respuesta inflamatoria. También se relaciona con la disminución de síntesis de acetilcolina (Hoshi M y cols., 1996). Se ha encontrado GSK3 en las neuritas distróficas y en los ovillos neurofibrilares (Ishizawa T y cols., 2003), además de un aumento de su actividad en la corteza frontal de los sujetos con EA (Blalock EM y cols., 2004). A nivel periférico se ha encontrado un aumento de la expresión de este enzima en los linfocitos de sujetos con EA y deterioro cognitivo ligero (Hye A y cols., 2005). Todos estos hallazgos sugieren que la actividad de GSK3 se encuentra incrementada en la EA. Estudios recientes han relacionado la inhibición de GSK3 con la inducción de potenciación a largo plazo en ratones (Hooper C y cols., 2007). La potenciación a largo plazo es la sinaptogénesis que se produce en las neuronas como respuesta a un estímulo y que lleva asociado un aprendizaje; este fenómeno se considera la base de la memoria (Thompson SM y Mattison HA, 2009).

Se ha demostrado *in vitro* y en ratones transgénicos que GSK3 induce la hiperfosforilación de la proteína tau (Lucas JJ y cols., 2001).

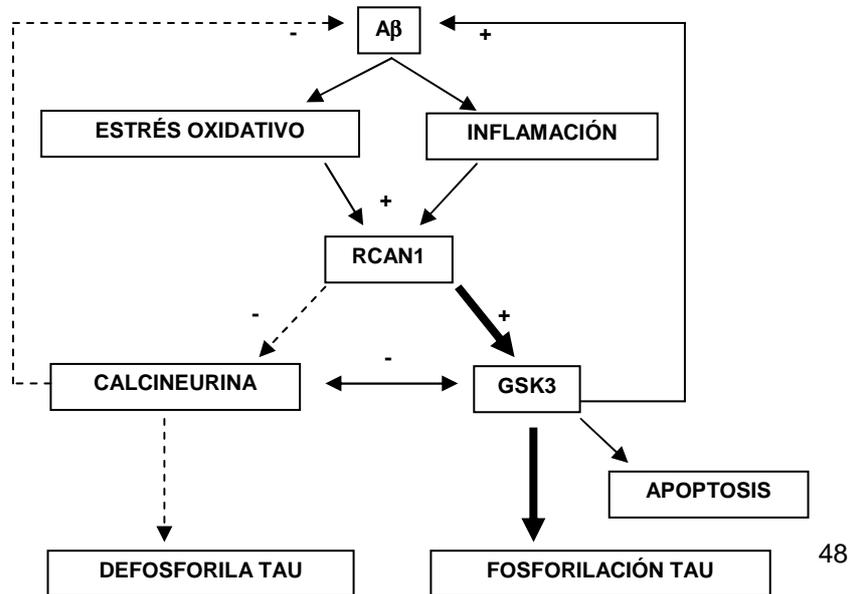
También existen estudios que demuestran que GSK3 aumenta la producción de A β (Adachi A y cols., 2009), así como también A β aumenta la actividad de GSK3 en cultivos neuronales (Alvarez G y cols., 1999).

Otra enzima muy estudiada en relación a la hiperfosforilación de la tau es la proteína reguladora de la calcineurina (RCAN 1). Esta enzima es la encargada de inhibir la calcineurina o proteína fosfatasa 2B (Kingsbury TJ y Cunningham KW, 2000), una fosfatasa dependiente de calcio muy abundante en el cerebro con acciones antagónicas a múltiples kinasas como la GSK3 en la regulación de la fosforilación/defosforilación de proteínas, entre ellas la proteína tau. Además RCAN1 es capaz de inducir a GSK3, por tanto la sobreexpresión de esta enzima aumentará la hiperfosforilación de tau al inhibir la calcineurina y estimular a GSK3 (Ermak G y cols., 2006). Otro dato importante es que el gen que codifica RCAN1 es un gen capaz de inducirse ante el estrés oxidativo (Leahy KP y cols., 1999), que sabemos que se encuentra aumentado en la EA. También es interesante que el gen que codifica RCAN1 se encuentra en el cromosoma 21, y que se ha relacionado con la enfermedad de Down (Rothermel B y cols., 2000). Se conoce que tanto la transcripción

genética como la cantidad de proteína están incrementadas en los cerebros con EA (Cook CN y cols., 2005) y además se sabe que la sobreexpresión de dicha enzima en cultivos neuronales produce agregación de microtúbulos y alteración sináptica (Ma H y cols., 2004).

Por tanto, con todos estos datos podemos hipotetizar que el depósito de A β , a través del aumento del estrés oxidativo, produciría una sobreexpresión de la proteína RCAN1 que inhibiría a calcineurina y activaría a GSK3, lo que daría como consecuencia la hiperfosforilación de la proteína tau (Figura 6)

Figura 6: Fosforilación de la proteína tau



5.- Estrés oxidativo y la Enfermedad de Alzheimer.

5.1 Radicales libres:

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Debido a su gran reactividad tiene una vida media del orden de milisegundos y se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades. En el medio biológico, los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Halliwell B, 1996; Sies H y De Groot H, 1993). Los radicales libres más importantes en biología humana son el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH \cdot) y el óxido nítrico (NO \cdot). Se les implica en muchos procesos patológicos como enfermedades neoplásicas (Kohchi C y cols., 2009), la diabetes (Desco MC y cols., 2002), la patología cardiovascular (Fearon IM y Faux SP, 2009), etc. así como en procesos neurodegenerativos como la EA (Gella A y cols., 2009). Además también están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Sastre J y cols., 2000) o el daño causado por el ejercicio agotador (Viña J y cols., 2000). Las especies

reactivas del oxígeno pueden tener un origen exógeno (dieta, humo del tabaco, contaminación, ozono, etc.) o endógeno. Algunas de ellas son reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras se generan in vivo con un fin determinado como en el caso de los fagocitos activados que producen O_2 y H_2O_2 . (Halliwell B, 1991)

5.2 Teoría del estrés oxidativo:

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes a favor de las primeras (Sies H, 1986). La formación de cierta cantidad de radicales libres es un proceso normal como producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular (Slater TF, 1984). Dichos radicales no son dañinos en condiciones normales ya que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes es superada por las agresiones oxidativas nos encontramos ante el estrés oxidativo.

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman KH, 1993) ya que un solo ataque por un radical libre produce una reacción en cadena que da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación como malondialdehído y 4-hidroxinonenal e hidrocarburos de cadena corta (Freeman BA y Crapo JD, 1982). Muchos de los aldehídos reaccionan rápidamente con los componentes celulares causando mutaciones en el DNA y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei B, 1994). La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento celular (Lippman RD, 1985).

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y por tanto a una pérdida o modificación de su función biológica (Stadman ER, 1992).

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar

antes de la reparación o cuando se repara de forma incorrecta tiene lugar una mutación (Breen AP y Murphy JA, 1995).

Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. Por ello se ha observado que diversos polisacáridos actúan como protectores celulares (Albertini R y cols., 1996). El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que da lugar a procesos degenerativos.

5.3. Indicadores de estrés oxidativo:

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, se ha intentado encontrar formas de medirlo. Entre los indicadores propuestos los más relevantes son el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) como indicador de daño oxidativo en el citosol, el malondialdehído (MDA) y el hidroxinonenal como indicadores de daño a los lípidos, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina como indicador de daño de ADN y grupos carbonilo en proteínas y 2-oxohistidina como daño en proteínas (Hageman HH y cols., 1992).

-Cociente GSSG/GSH: el glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina) es un tripéptido de gran importancia en la protección antioxidante de las células (Viña J, 1990). El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar a la forma disulfuro (GSSG). Por ello un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento del ratio GSSG/GSH (Sies H, 1986). La determinación de dicho gradiente tiene importantes problemas metodológicos ya que pequeñas oxidaciones de GSH suponen un aumento muy importante de GSSG. En el laboratorio del Dr. Viña se ha puesto a punto un método que evita estas oxidaciones de GSH (Asensi M y cols., 1994) y que serán comentadas en el apartado de Métodos.

-Malondialdehído (MDA) e hidroxinonenal: la degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de gran variedad de aldehídos, los más empleados para medir el daño oxidativo a lípidos son el MDA e hidroxinonenal. Existen descritos varios métodos para la medición de MDA siendo el más específico el que separa por

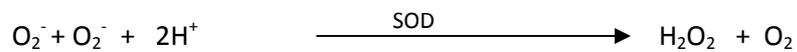
cromatografía líquida de alta resolución el MDA de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight JA y cols., 1988).

5.4. Antioxidantes:

El organismo posee una serie de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para neutralizar la acción de los radicales libres. Pueden actuar previniendo la formación de radicales libres o interceptando el ataque de los mismos, secuestrando metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas más estables, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de los radicales, facilitando la reparación o manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Como antioxidantes enzimáticos más importantes tenemos:

-Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno (McCord JM y Fridovich I, 1969):



Hay descritas cuatro formas diferentes de SOD (Fridovich I, 1974) según el grupo prostético metálico ligado al enzima: una que contiene cobre y zinc (Cu-Zn SOD) que se encuentra principalmente en el citosol y espacio intermembranoso mitocondrial. Otras dos SODs que contienen manganeso (Mn SOD) una de las cuales se encuentra en la matriz mitocondrial y el citosol (Weisger RA y Fridovich I, 1973; Fridovich I, 1986) y la otra aislada en bacterias (Vance PG y cols., 1972). El cuarto tipo contiene hierro y se ha encontrado en la bacteria E coli (Yost FJ y Fridovich I, 1973). Este enzima es una de las primeras líneas de defensa celular.

-Glutación peroxidasa: convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inocuas (Chance B y cols., 1979) utilizando el glutati3n reducido como dador de equivalentes reductores. La mayor parte de su actividad se encuentra en el citosol aunque tambi3n est3 presente en la matriz mitocondrial (Ketterer B, 1986).

-Catalasa: elimina peróxido de hidrógeno dando lugar a agua y ox3geno (Chance B y cols., 1979).



Este enzima se encuentra fundamentalmente en los peroxisomas y en menor medida en mitocondrias y citosol (Tolbert NE, 1981).

-Enzimas de síntesis del glutatión: Este metabolito se sintetiza en 2 reacciones dependientes de adenosina trifosfato (ATP). En la reacción de la γ -glutamil cisteil sintetasa (γ -GCS) se forma un dipéptido a partir del ácido glutámico y la cisteína, y en el segundo paso actúa la glutatión sintetasa (GS), la cual agrega glicina al dipéptido γ -glutamilcisteína (Meister A y Tate SS, 1976). La γ -glutamil cisteil sintetasa, o también glutamato cistein ligasa (GCL) es un enzima compuesto por una subunidad catalítica (GCLC) y otra moduladora (GCLM). La subunidad catalítica constituye la actividad enzimática mientras que la moduladora incrementa la eficiencia catalítica de la GCLC.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos tenemos:

-Glutatión: el sistema glutatión-glutatión peroxidasa-glutatión reductasa es uno de los principales mecanismos protectores de la célula frente al estrés oxidativo (Sies H, 1986). Además

interviene en la síntesis de ADN y de proteínas (Holmgren A, 1989; Ochoa S, 1983), detoxificación de xenobióticos (Orrenius S y Moldeus P, 1984), modulación de actividades enzimáticas (Pajares MA y cols., 1992), homeostasis del calcio (Bellomo C y cols., 1982) y regulación de la proliferación celular (Terradez P y cols., 1993).

-Otros: vitamina C, vitamina E, carotenoides, flavonoides...

5.5. Estrés oxidativo en la EA:

Numerosos estudios ponen de manifiesto que el estrés oxidativo se encuentra en estrecha relación con la EA. De hecho encontramos mayor daño oxidativo en ADN (Gabbita SP y cols., 2001; Mecocci P y cols., 1994; Duker NJ y cols., 2001), proteínas (Hensley K y cols., 1995; Butterfield DA y cols., 2001; Castegna A y cols., 2003) y lípidos (Pratico D y cols., 2002; Montine TJ y cols., 1999) en el cerebro de los pacientes con EA, especialmente en las zonas cerebrales con mayor cantidad de acumulo de A β .

En ratones transgénicos para el estudio de la EA se ha observado que la peroxidación lipídica precede a la formación de las

placas seniles (Pratico D y cols., 2001), lo que demuestra que el estrés oxidativo ocurre de forma muy precoz en la enfermedad. Hay estudios que demuestran aumento de MDA tanto en plasma como en eritrocitos (Polidori MC y Mecocci P, 2002; Bermejo P y cols., 1997), y se piensa que estas alteraciones ocurren en la fase presintomática de la enfermedad (Pratico D y cols., 2002; Greilberger J y cols., 2008). También se ha observado un aumento de proteínas oxidadas a nivel plasmático (Conrad CC y cols., 2000; Choi J y cols., 2002). Por tanto existe estrés oxidativo de forma muy precoz en estos sujetos y no sólo confinado al sistema nervioso central sino que también a nivel sistémico (Begni B y cols., 2004), lo que induce a pensar en la EA como una enfermedad sistémica en la cual las neuronas son las más perjudicadas debido a su especial susceptibilidad al estrés oxidativo y su falta de regeneración.

Se han encontrado modificaciones indicativas de estrés oxidativo asociadas tanto a ovillos como a placas, lo cual daría una explicación bioquímica a la insolubilidad de las lesiones patológicas ya que favorecerían los entrecruzamientos proteicos (Smith MA y cols., 1996). De hecho se ha comprobado que la agregación del

péptido A β se produce con mayor facilidad en un ambiente ácido (Dyrks T y cols., 1992).

El cerebro, y la neurona especialmente, parece ser particularmente vulnerable al ataque de los radicales libres por las siguientes razones:

- Su contenido en glutatión es bajo y es relativamente deficiente en enzimas antioxidantes (Cooper AJ y Kristal BS, 1997).
- Sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados susceptibles de sufrir peroxidación lipídica (Hazle JR y Williams EE, 1990).
- El metabolismo cerebral requiere cantidades importantes de oxígeno y determinadas zonas cerebrales son ricas en hierro.

Existe evidencia de que el daño neuronal causado por el A β es mediado por radicales libres (Nelson VM y cols., 2009). Experimentos con cultivos neuronales a los que se añade A β demuestran que dicho péptido induce estrés oxidativo (Butterfield

DA y cols., 2002). También se ha demostrado que induce daño oxidativo del ADN mitocondrial (Zawia NH y cols., 2009) y que es capaz de desencadenar la muerte neuronal por apoptosis mediada por caspasa-3 y peróxido de hidrógeno (Vélez-Pardo C y cols., 2002). Además se conoce que el estrés oxidativo regula la producción de APP y A β (Frackowiak J y cols., 2009), indicando una relación feedback positiva entre el estrés oxidativo y los depósitos de A β . En ratones transgénicos de EA, con mutaciones en APP y en presenilina 1, se ha visto aumento del daño oxidativo (Smith MA y cols., 1998; LaFontaine MA y cols., 2002). Existen datos que confirman una menor concentración en sangre de antioxidantes en los pacientes con EA (Pope SK y cols., 2003), así como de menor actividad de enzimas antioxidantes (Casado A y cols., 2008).

6.- Apoptosis en la Enfermedad de Alzheimer.

La apoptosis es una forma de muerte celular fisiológica que se ha conservado evolutivamente y que tiene una gran importancia para el desarrollo tisular y su homeostasis, ya que regula el número de células presente en un tejido (Zimmermann KC y Bonzon C, 2001).

Sin embargo, tanto su defecto como su exceso pueden ser perjudiciales, estando implicada en enfermedades como el cáncer, síndromes de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Zimmermann KC y Bonzon C, 2001). El programa para la ejecución de la apoptosis se encuentra presente en virtualmente todas las células de los mamíferos y puede ser activado por estímulos tanto intracelulares como extracelulares (Ashkenazi A y Dixit VM, 1998; Green DR y Reed JC, 1998). Una vez activadas las vías que desencadenan el proceso apoptótico se ponen en marcha diferentes mecanismos bioquímicos (generación de especies oxidantes, activación de caspasas, liberación de moléculas pro-apoptóticas por parte de la mitocondria, cambios en la expresión de ciertos genes, aumento de la concentración intracelular de calcio) que inducen una serie de alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis. Los cambios morfológicos más tempranos incluyen la condensación del citoplasma (Lockshin RA y Beaulaton J, 1981) y la condensación del núcleo; posteriormente se produce la disgregación del núcleo en varios fragmentos (Wyllie AH y Kerr JF, 1980). A continuación la célula se fragmenta en varios cuerpos rodeados por membrana (cuerpos apoptóticos). De esta forma, no se produce

liberación del contenido intracelular al medio extracelular, evitándose una posible reacción inflamatoria (Sheridan JW y Bishop CJ, 1981). Finalmente los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas.

La llamada cascada de las caspasas es considerada como la principal vía de ejecución y control del programa apoptótico (Pop C y Salvesen GS, 2009). Las caspasas, cistein-proteasas específicas del aspartato, constituyen una familia de proteínas intracelulares en la que distinguimos dos subfamilias: caspasas que participan en reacciones inflamatorias y aquellas implicadas en el proceso apoptótico (Nicholson DW y Thornberry NA, 1997). Dentro de esta subfamilia se encuentran aquellas caspasas que participan en la inducción de otras caspasas y mecanismos apoptóticos, denominadas caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10), y aquellas que participan en la ejecución del programa apoptótico, denominadas caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7). La inducción de la apoptosis, tanto por una vía extrínseca como por una intrínseca, conlleva la activación de las caspasas iniciadoras. Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras, que son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la muerte celular

por apoptosis. En definitiva, las caspasas pueden ser consideradas moléculas transductoras de señales que comunican tanto los receptores de membrana como los eventos mitocondriales con los acontecimientos citosólicos y nucleares de la apoptosis.

De una manera general, puede hablarse de vías extrínsecas de iniciación de la apoptosis y de vías intrínsecas, atendiendo a los estímulos y mecanismos mediante los que se induce el proceso de muerte celular (Ashe PC y Berry MD, 2003). En la vía extrínseca la inducción a la apoptosis se produce como consecuencia de la acción de estímulos extracelulares, que pueden actuar de una manera inespecífica o específica, uniéndose en la membrana celular a determinados receptores denominados “receptores de muerte” (CD95 o Apo1/Fas) que interactúan con las caspasas de iniciación para activar el mecanismo de la apoptosis. En la vía intrínseca se inicia la apoptosis como consecuencia de una alteración en la homeostasis intracelular. En esta vía la mitocondria juega un papel importante, por lo que la vía intrínseca también se denomina vía mitocondrial de la apoptosis (Zimmermann KC y Bonzon C, 2001; Ashe PC y Berry MD, 2003). Ciertos estímulos que actúan sobre la mitocondria pueden desembocar en la liberación de moléculas que

cuando se encuentran en el citosol adquieren comportamiento proapoptótico (Kroemer G, 2003). Especialmente resulta interesante la liberación al citosol del citocromo C, ya que éste participa en la formación de una estructura citosólica denominada apoptosoma, formada por el propio citocromo C, la proteína Apaf-1, dATP y procaspasa-9. El apoptosoma es un potente activador de caspasas, de modo que puede considerarse que actúa como enlace entre las señales iniciadoras de apoptosis que actúan sobre la mitocondria y la cascada de las caspasas (Cain K y Bratton SB, 2002).

Un número creciente de publicaciones señalan que los radicales libres, especialmente aquéllos producidos en la mitocondria, participan activamente en los procesos de muerte celular actuando como inductores de la respuesta apoptótica al participar en la fase inductora de la misma (Fleury C y Mignotte B, 2002).

De un modo general, puede establecerse un modelo de apoptosis inducida por agentes oxidantes en el que al actuar éstos sobre la mitocondria y afectar a los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, promueven una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y una pérdida de control

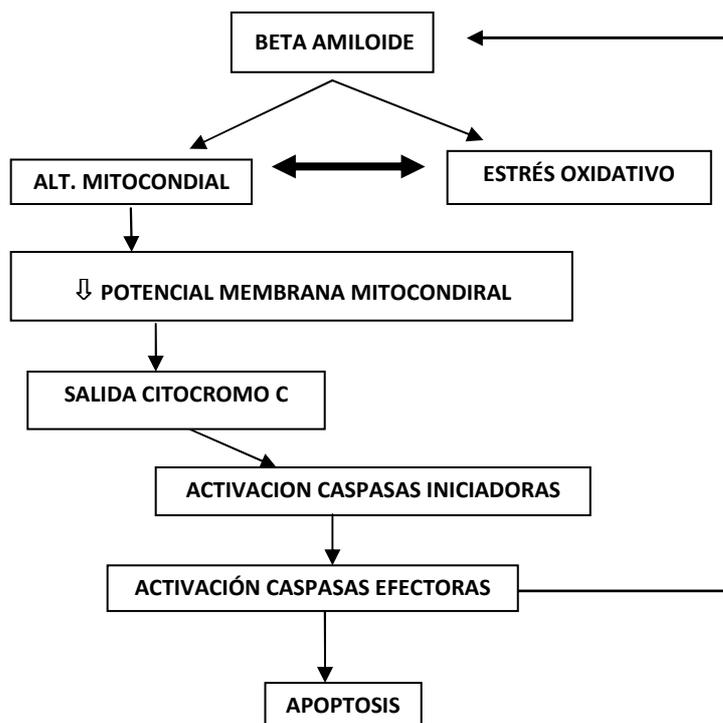
sobre los fenómenos de permeabilidad mitocondrial, lo que permite la salida al citosol de proteínas mitocondriales proapoptóticas, especialmente del citocromo C, que una vez en el citosol da lugar al apoptosoma, lo que se traduce en la activación de las caspasas (Fleury C y Mignotte B, 2002).

Se considera de forma general que la muerte neuronal en la EA se produce a través del mecanismo de la apoptosis. Esta apoptosis se produciría por la activación de la vía intrínseca o mitocondrial al producir el péptido A β un daño mitocondrial bien directamente o bien a través del aumento de radicales libres. La mitocondria liberaría sustancias proapoptóticas como el citocromo C que iniciaría la cascada de activación de las caspasas (Camins A y cols., 2008; Takuma K y cols., 2005).

El APP ha sido identificado como sustrato específico para la caspasa-3, lo cual fue demostrado in vitro al procesar células con APP, a las cuales le adicionaron caspasa-3. Se demostró que dichas células producían mayor cantidad de A β . Además, se ha comprobado las neuronas del cerebro de pacientes con EA, tienen niveles incrementados de caspasa-3, además de encontrarse APP y caspasa-3 en las placas seniles (Gervais FG y cols., 1999). Por tanto en la EA se

produciría activación de la apoptosis por alteración mitocondrial, producción de radicales libre, etc. Se activarían las caspasas iniciadoras y éstas a las efectoras, entre ellas la caspasa-3 la cual produciría la proteólisis del APP favoreciendo la producción de A β que de nuevo pondría en marcha el mecanismo de la apoptosis, creándose así un ciclo de auto perpetuación.

Figura 7. Apoptosis en la EA



7. - Apolipoproteína E y su relación con la EA.

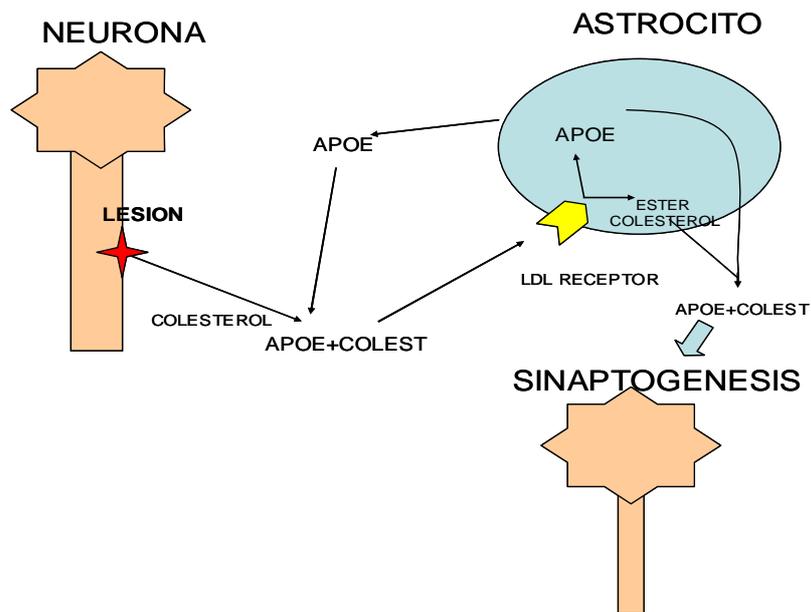
La apolipoproteína E (ApoE) es un polipéptido glicosilado de 36-37 kDa y 299 aminoácidos que forma parte de varias lipoproteínas como los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de alta densidad (Lehninger AL y cols., 1988). Lo podemos encontrar tanto en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo. Su gen, en el brazo largo del cromosoma 19, presenta 3 isoformas: ϵ_2 , 3 y 4 que dan lugar a 3 genotipos homocigotos (4/4, 3/3, 2/2) y tres heterocigotos (4/3, 4/2, 3/2). Las distintas isoformas se distinguen por presentar cambio de cistina a arginina en las localizaciones 112 y 158 (ϵ_2 : 112 cys-158 cys; ϵ_3 : 112cys-158arg; ϵ_4 112arg-158cys).

La ApoE juega un papel importante en el metabolismo lipídico facilitando el transporte de colesterol entre las células (Poirier J y cols., 1993). A nivel del sistema nervioso, la muerte neuronal y la degeneración axonal lleva consigo la liberación de gran cantidad de lípidos y colesterol provenientes de las membranas celulares y la mielina. Los astrocitos, en el sistema nervioso central, y los macrófagos, en el periférico, responden a dichos insultos

sintetizando y liberando ApoE (Brown MS y Goldstein JL, 1986) que capta estos lípidos y los introduce dentro de las células donde es almacenado y posteriormente utilizado para la regeneración celular en el sistema nervioso periférico o reinervación en el central (sinaptogénesis) (Ignatius MJ y cols., 1986; Poirier J y cols., 1994).

Experimentalmente se ha demostrado en ratones knock-out para ApoE que existe una pérdida de sinapsis y alteraciones dendríticas con la edad (Masliah E y cols., 1995).

Figura 8. ApoE en el sistema nervioso central.



Ser portador de alelo $\epsilon 4$ de la ApoE se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer EA tanto familiar como esporádica de inicio tardío (Poirier J y cols., 1996 y 1993; Saunders AM y cols., 1993; Corder EH y cols., 1995), siendo este riesgo mayor en los sujetos con dos alelos 4 que en los que solo son portadores de uno (Roses AD, 1996). Este hecho sugiere que una alteración en la homeostasis lipídica podría jugar un papel importante en la EA. Además el ser portador de dicho alelo se relaciona con un mayor acúmulo de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares en los cerebros de los sujetos con EA (Tiraboschi P y cols., 2004). También se ha visto que se asocia a peor puntuación en test cognitivos en ancianos no dementes (Packard CJ y cols., 2007; Wetter SR y cols., 2005).

Existen diversas hipótesis que intentan explicar dicha asociación, una de ellas sería que la ApoE 4 influiría en la agregación de $A\beta$, de hecho se ha objetivado que la ApoE estimula la agregación de $A\beta$ *in vitro* (Castano EM y cols., 1995), y se ha observado un mayor número de placas seniles en cerebros de sujetos con ApoE 4 (Corder EH y cols., 1995). Otra posible explicación sería que la ApoE tuviera propiedades antioxidantes y que la ApoE 4 sería una isoforma menos efectiva que las isoformas 2 y 3 (Miyata M y Smith JD, 1996).

También se sabe que la ApoE es vital para la producción de acetilcolina, neurotransmisor esencial para la función cognitiva, proporcionando los lípidos necesarios para su síntesis (Beffert U y cols., 1998), y se ha visto que su producción está significativamente reducida en los sujetos con EA que son portadores del alelo 4 de la ApoE (Soininen H y cols., 1995).

Los sujetos portadores del alelo 4 de la ApoE tendrían menor capacidad de sinaptogénesis haciendo a dicho cerebro más susceptible a las agresiones. También se ha demostrado que los ratones transgénicos deficientes en ApoE son más susceptibles a estrés oxidativo inducido por el péptido A β , a la activación de caspasas y a la disfunción mitocondrial (Keller JN y Lauderback CM, 2000).

En resumen, ser portador del alelo 4 de la ApoE constituye un factor de riesgo para padecer la EA bien ayudando a la causa etiológica a provocar su daño o bien dificultando la puesta en marcha de mecanismos protectores o reparadores (Mahley RW y cols., 2007).

8.- Inflamación y EA.

Se piensa que la inflamación juega un rol muy importante en la patogenia de la enfermedad ya que en las placas seniles neuríticas se encuentra microglía activada (Vehmas AK y cols., 2003), factores del complemento e interleukinas que pueden interactuar con el A β , como se ha demostrado in vitro. Además se ha objetivado en estudios observacionales que las personas que toman antiinflamatorios crónicamente tienen menos prevalencia de EA que la población general (Breffner JCS y cols., 1994).

Las células gliales regulan la actividad neuronal ya que son parte fundamental en fenómenos de plasticidad neuronal, supervivencia de las neuronas, nutrición y regulación del crecimiento neuronal, detoxificación y regulación homeostática (Kriegstein A y Alvarez-Buylla A, 2009). Cuando se produce una lesión, la microglía se activa y sufre cambios morfológicos, sobreexpresa diferentes receptores y es capaz de migrar, proliferar y transformarse en formas específicas de microglía reactiva. Esta microglía activada puede cumplir una función beneficiosa o destructiva (Rogers J y cols., 2007), mediante la fagocitosis y la secreción de elevados niveles de citokinas, proteasas y otros factores. El depósito de la proteína A β

induce una respuesta inflamatoria local así como la activación de la microglía, mediante dos receptores microgliales: el receptor RAGE (Advanced glycation end products receptor) y el receptor SR (scavenger receptor). La microglía activada contribuye directamente al proceso lesivo neuronal por ser una gran fuente de radicales libres, contribuyendo a aumentar el estrés oxidativo y sus efectos neurodegenerativos.

9.- Marcadores periféricos de la EA y detección precoz.

No disponemos en la actualidad de ningún instrumento diagnóstico poco invasivo y con la sensibilidad, especificidad y valor predictivo adecuados para el diagnóstico de la EA, si exceptuamos la determinación de mutaciones genéticas en el reducido número de casos de EA de aparición precoz y herencia autosómica dominante, aunque gran parte de los esfuerzos actuales en el campo de la investigación de la EA están encaminados a la detección precoz de esta enfermedad. Los marcadores biológicos de mayor relevancia hoy en día son:

-Marcadores determinantes de la enfermedad: mutaciones del gen APP y presenilinas 1 y 2.

-Marcadores de susceptibilidad: ApoE.

-Marcadores fisiopatológicos en LCR: Proteína tau, A β , aspartatoaminotransferasa, determinación combinada tau/A β , determinación combinada tau/aspartato.

Cada vez son más los estudios encaminados a buscar marcadores de esta enfermedad en fluidos biológicos y en células periféricas como los leucocitos (Migliore L y cols., 2005) ya que suponen métodos no invasivos y de fácil reproducibilidad. Todos estos estudios van encaminados a conseguir marcadores periféricos de alteraciones en las fases presintomáticas de la enfermedad con el fin de investigar posibles terapias preventivas. En este sentido, diversos trabajos han demostrado que existe daño oxidativo no solo a nivel cerebral sino también de forma sistémica. Además se sabe que el daño oxidativo ocurre muy pronto, incluso antes de aparecer las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Cecchi C y cols., 2002) y que en sujetos presintomáticos somos capaces de hallar un mayor

estrés oxidativo y una mayor susceptibilidad a la acción del péptido A β (Cecchi C y cols., 2007).

Si somos capaces de realizar un diagnóstico más precoz de esta enfermedad, incluso si llegamos al diagnóstico de sujetos presintomáticos podríamos tomar medidas preventivas que serían más eficaces pues actuaríamos en un momento en el cual todavía no existe pérdida neuronal y en el que podemos contrarrestar el aumento de estrés oxidativo en estos sujetos y quizá retrasar así el inicio de aparición del cuadro clínico.

10.- Sinopsis.

-La EA es un proceso neurodegenerativo asociado a la edad.

-Se considera que el inicio de los síntomas de la enfermedad como el final del proceso, intuyéndose una fase presintomática de décadas de duración.

-Se considera al péptido A β , bien en su forma fibrilar extracelular, bien en su forma oligomérica intracelular, el precursor de la cascada que desencadena en la muerte neuronal.

-Se considera el estrés oxidativo parte fundamental en la patogenia de esta enfermedad.

-Ser portador del alelo 4 de la apolipoproteína E predispone a la EA probablemente a través de un aumento en el estrés oxidativo o una reducción de los mecanismos antioxidantes y reparadores.

-Se considera a la EA como una enfermedad sistémica y por tanto existirían biomarcadores a nivel periférico que nos ayudarían al diagnóstico y detección precoz.

ANEXO 1

Escala Global del Deterioro (GDS) (Reisberg y cols., 1982)

Esta escala gradúa la demencia de tipo Alzheimer en 7 estadios.

<i>Estadio</i>	<i>Déficit cognitivo</i>	<i>Características clínicas</i>
1	Inexistente	Normal
2	Muy leve	Olvidos subjetivos, pero con exploración normal
3	Leve	Dificultad en el trabajo, en la comunicación verbal o al recorrer lugares poco familiares; detectable por la familia; déficit sutil de memoria en la exploración
4	Moderado	Disminución de la capacidad para viajar, para contar o para recordar acontecimientos recientes
5	Moderadamente grave	Necesita ayuda para elegir la ropa; desorientación en tiempo o espacio; recuerda peor el nombre de sus nietos
6	Grave	Necesita supervisión para comer y asearse, posible incontinencia; desorientación en tiempo, espacio y posiblemente en identidad
7	Muy Grave	Pérdida importante de la capacidad verbal, incontinencia y rigidez motora

<p>GDS-1 (Ausencia de alteración cognitiva): -Ausencia de quejas subjetivas y de trastornos evidentes de memoria</p> <p>GDS-2 (Disminución cognitiva muy leve): -Quejas subjetivas de memoria, sobre todo en: a)Olvido de dónde ha colocado objetos familiares b)Olvido de nombres previamente bien conocidos -No hay evidencia objetiva de defectos de memoria en el examen clínico -No hay defectos objetivos en el trabajo o en situaciones sociales -Hay pleno conocimiento y valoración de la sintomatología</p> <p>GDS-3 (Defecto cognitivo leve): -Primeros defectos claros. Manifestaciones en una o más de estas áreas: a)El paciente puede haberse perdido en un lugar no familiar b)Los compañeros detectan rendimiento laboral pobre c)Personas más cercanas aprecian defectos en la evocación de palabras y nombres d)Al leer un párrafo de un libro retiene muy poco material e)Capacidad muy disminuida en el recuerdo de conocidos nuevos f)Perder o colocar en lugar erróneo un objeto de valor g)Hacerse evidente un defecto de concentración en la exploración clínica</p>	<p>GDS-5 (Defecto cognitivo moderado-grave): -El paciente no puede sobrevivir mucho tiempo sin alguna asistencia -No recuerda datos relevantes de su vida actual: dirección, teléfono, etc. -Es frecuente cierta desorientación en tiempo: fecha, día, etc. -Una persona con educación formal puede tener dificultad contando hacia atrás desde 40 de 4 en 4, o desde 20 de 2 en 2 -Mantiene el conocimiento de muchos de los hechos de mayor interés concernientes a sí mismo y a otros -Invariablemente sabe su nombre y generalmente el de su esposa e hijos -No requiere asistencia en el aseo ni en la comida, pero puede tener cierta dificultad en la elección de los vestidos adecuados</p> <p>GDS-6 (Defecto cognitivo grave): -Ocasionalmente puede olvidar el nombre de la esposa, de la que, por otra parte, depende totalmente para sobrevivir -Desconoce los acontecimientos y experiencias recientes de su vida -Mantiene cierto conocimiento de su vida pasada pero muy fragmentario -Generalmente desconoce su entorno, el año, la estación, etc. -Puede ser incapaz de contar hasta diez hacia atrás y a veces hacia delante -Requiere cierta asistencia en las</p>
--	---

<p>-Un defecto objetivo de memoria sólo se observa con entrevista intensiva</p> <p>-Aparece un decremento de los rendimientos en situaciones laborales o sociales exigentes</p> <p>-Los síntomas se acompañan de ansiedad discreta- moderada</p> <p>GDS-4 (Defecto cognitivo moderado):</p> <p>- Defectos claramente definidos en una entrevista clínica cuidadosa en las áreas siguientes:</p> <p>a)Conocimiento disminuido de los acontecimientos actuales y recientes</p> <p>b)El paciente puede presentar cierto déficit en el recuerdo de su historia personal</p> <p>c)Defecto de concentración puesto de manifiesto en la sustracción seriada de sietes</p> <p>d)Capacidad disminuida para viajes, finanzas, etc.</p> <p>-Frecuentemente no hay defectos en las áreas siguientes:</p> <p>a)Orientación en tiempo y persona</p> <p>b)Reconocimiento de personas y caras familiares</p> <p>c)Capacidad de desplazarse a lugares familiares</p> <p>-Incapacidad para realizar las tareas complejas</p> <p>-La negación es el mecanismo de defensa dominante</p> <p>-Disminución del afecto y abandono en las situaciones más exigentes</p>	<p>actividades cotidianas. Puede tener incontinencia o requerir ayuda para desplazarse, pero puede ir a lugares familiares</p> <p>-El ritmo diurno está frecuentemente alterado</p> <p>-Casi siempre recuerda su nombre</p> <p>-Frecuentemente sigue siendo incapaz de distinguir entre las personas familiares y no familiares de su entorno</p> <p>-Cambios emocionales y de personalidad bastante variables, como:</p> <p>a)Conducta delirante: puede acusar de impostora a su esposa, o hablar con personas inexistentes o con su imagen en el espejo</p> <p>b)Síntomas obsesivos como actividades repetitivas de limpieza</p> <p>c)Síntomas de ansiedad, agitación e incluso conducta violenta previamente inexistente</p> <p>d)Abulia cognitiva, pérdida de deseos, falta de elaboración de un pensamiento para determinar un curso de acción propositivo</p> <p>GDS-7 (Defecto cognitivo muy grave):</p> <p>- Pérdida progresiva de las capacidades verbales. Inicialmente se pueden verbalizar palabras y frases muy circunscritas; en las últimas frases no hay lenguaje, únicamente gruñidos</p> <p>-Incontinencia de orina. Requiere asistencia en el aseo y en la alimentación</p>
---	---

	<p>-Se van perdiendo las habilidades psicomotoras básicas como la deambulaci3n</p> <p>-El cerebro es incapaz de decir al cuerpo lo que hay que hacer.</p> <p>Frecuentemente aparecen signos y sntomas neurol3gicos generalizados y corticales</p>
--	---

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Nuestros experimentos están encaminados a conocer más sobre cómo puede influir el genotipo de la ApoE, uno de los factores de riesgo más conocidos para desarrollar EA, en la predisposición a padecer esta enfermedad. Para ello estudiaremos distintos parámetros en sujetos jóvenes y sanos hijos de pacientes con Enfermedad de Alzheimer y genotipo 4/4 de la ApoE frente a sujetos jóvenes y sanos con genotipo 3/3 de la ApoE y sin antecedentes familiares de demencia. Nuestros objetivos serán:

- 1.- Conocer si existen diferencias cognitivas entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE.
- 2.- Determinar mediante la historia clínica detallada si existen diferencias a nivel de antecedentes patológicos: síndrome depresivo, dislipemia, etc. entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE.

3.-Determinar si existen diferencias en distintos parámetros analíticos como el metabolismo lipídico, metabolismo férrico, niveles de cobre y zinc, entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE.

4.-Conocer si existen diferencias en distintos parámetros de estrés oxidativo en sangre periférica entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE.

5.-Conocer si existe una diferente susceptibilidad a las agresiones y en concreto a la toxicidad del péptido amiloide en los linfocitos aislados de sangre periférica entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE, medido por parámetros de estrés oxidativo, apoptosis y alteración mitocondrial.

6.-Estudiar si existen diferencias a nivel de biomarcadores de inflamación como es la producción de TNF α de linfocitos aislados tras estímulo antigénico entre los distintos grupos de sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE.

7.-Determinar si existe una diferente activación de enzimas antioxidantes y de enzimas relacionadas con la fosforilación de la proteína tau entre los distintos grupos de sujetos jóvenes según su genotipo ApoE.

8.- Determinar si existe una diferente activación de enzimas antioxidantes y de enzimas relacionadas con la fosforilación de la proteína tau entre sujetos con Enfermedad de Alzheimer portadores de al menos un alelo 4 de la ApoE en comparación con sujetos control no dementes de la misma edad y sexo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-Sujetos.

1.1 Sujetos jóvenes:

Se seleccionaron 54 sujetos, 33 casos y 21 controles. Los casos corresponden a sujetos jóvenes y sanos, hijos de pacientes con EA y genotipo 4/4 de la ApoE, diagnosticados en la consulta de Neurología del Hospital Clínico de Valencia por la Dra. Alonso, neuróloga especialista en demencias. Elegimos a dichos sujetos porque nos asegurábamos la presencia de al menos un alelo 4 de la ApoE y una mayor probabilidad de genotipo 4/4 que en el resto de la población. Los sujetos controles fueron personas sanas de similar edad que los casos, los cuales carecían de antecedentes familiares de EA. Todos los sujetos accedieron a participar en el estudio de forma voluntaria tras ser informados convenientemente sobre el mismo y tras firmar un consentimiento informado estándar.

En todo momento se respetaron los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, en la Declaración de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, así

como los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Este proyecto fue aceptado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia.

1.1.1 Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión que se aplicaron son:

- Situaciones que provocan un aumento del estrés oxidativo: enfermedades neoplásicas, Diabetes Mellitus, hipertensión arterial grave mal controlada, insuficiencia renal crónica grave, alcoholismo activo, menopausia, inflamación crónica, enfermedades autoinmunes o infección crónica.
- Ingesta de sustancias o fármacos antioxidantes.
- Edad menor de 20 años o mayor de 55 años.
- Inicio de la menopausia en el caso de las mujeres.
- No firmar el consentimiento informado.

1.1.2 Visita Clínica:

La visita clínica a los sujetos se realizó en los despachos de Neurología de Consultas Externas del Hospital Clínico de Valencia.

Se realizó una única visita médica donde se recogieron en un formulario (Anexo 1) los datos personales y demográficos de cada sujeto, situación laboral y nivel educacional, así como los antecedentes patológicos e ingesta de medicamentos y tóxicos. Se investigó situaciones de estrés y depresión, así como quejas subjetivas de memoria. A los sujetos que respondieron afirmativamente a la pregunta sobre depresión se les pasó el test de Hamilton (Williams JB, 1988) para determinar el diagnóstico y el grado de sintomatología depresiva (Anexo 2).

El personal de enfermería realizó la extracción sanguínea a los sujetos. Parte de la muestra se remitió al laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico de Valencia para realizar determinaciones de: hemograma, bioquímica básica, perfil lipídico, estudio de metabolismo del hierro, determinación de niveles de ApoE sérico, cobre y zinc. El resto de la muestra se utilizó para las determinaciones de estrés oxidativo e incubación con péptido A β en

el Departamento de Fisiología. También se realizó una pequeña batería de pruebas cognitivas para descartar deterioro cognitivo.

1.2 Sujetos con EA:

Reclutamos de la consulta de Neurología de la Dra. Alonso a 11 sujetos con diagnóstico de EA probable y genotipo ApoE 4 conocido, debiendo cumplir como criterios de inclusión: ser portador de al menos un alelo 4 de la ApoE, no presentar patologías concomitantes que pudieran alterar el status oxidativo (Diabetes Mellitus, HTA mal controlada, insuficiencia renal o hepatopatía severa, enfermedad neoplásica) y no ser consumidores de sustancias antioxidantes (vitamina E, acetil-cisteína, alopurinol, etc.). Todos los pacientes presentaban un estadio de la enfermedad leve-moderado.

Además reclutamos 9 sujetos de similar edad y mismos criterios de inclusión (exceptuando el genotipo de la ApoE) pero sin diagnóstico de demencia como controles.

Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado estándar y se realizó una extracción sanguínea por parte del personal de enfermería. Dicha muestra se remitió al departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina para determinación de PCR.

2.- Test Cognitivos.

2.1 Test de memoria verbal de Rey:

El test de memoria verbal de Rey es un test de memoria verbal de fijación-retención (Rey A, 1964). Consta de un listado de 15 palabras habituales que son leídas al paciente en 5 ocasiones. Tras cada lectura el paciente debe repetir todas las palabras que sea capaz de recordar. Se puntúa el número de palabras retenidas tras la primera lectura (memoria a corto plazo) así como la curva de aprendizaje conseguida en las lecturas consecutivas (aprendizaje). Pasados 20 minutos se vuelve a evaluar la cantidad de palabras que el sujeto es capaz de recordar recogiendo así la capacidad de retención (memoria a largo plazo).

2.2 Test de Stroop:

El “efecto de interferencia Stroop” se describe como el fenómeno de disminución en la velocidad de identificación de colores, fenómeno que se produce cuando el sujeto debe nombrar el color de la tinta con que están escritos los nombres de unos colores cuyo significado nunca coincide con el color con el que están escritos.

Esto ocurre porque el significado de la palabra interfiere en la tarea de nombrar el color de la tinta en que está escrita.

El test de Stroop (Stroop JR, 1935) sirve para establecer la propiedad inhibitoria atencional que nos permite el control de respuestas automáticas o naturales para llevar a cabo otras tareas menos espontáneas, siendo por tanto un buen test para valorar funciones del lóbulo frontal.

El test consta de tres páginas, cada una de las cuales contiene cinco columnas de 20 elementos. Cada uno de los elementos de la primera página es el nombre de los tres colores empleados en el test repetidos de manera aleatoria e impresos en tinta negra (rojo; verde; azul), se solicita al sujeto que lea la máxima cantidad de palabras posibles en 45 segundos (Versión Golden, Golden CJ, 1978). La segunda página está formada por cinco columnas de símbolos tipo "XXX" coloreados de manera aleatoria con los tres colores empleados en el test, se solicita al sujeto que nombre la máxima cantidad de colores que pueda en 45 segundos.

Finalmente, en la tercera página aparece de nuevo el nombre de los tres colores empleados en el test, pero impresos en tinta coloreada, de manera aleatoria y sin concordancia entre el nombre del color y el color de la tinta en que está impreso. El sujeto deberá nombrar los colores de la tinta de la palabra impresa siendo erróneo si lee la palabra impresa.

Se puntuará la cantidad de lecturas correctas en cada página y se evalúa según tabla de baremos por edad (Anexo 3). Una puntuación baja en la última página indicará alteraciones prefrontales. En este test influye tanto la edad como el grado de escolaridad (Henao E, 2000).

3.- Aparatos y reactivos.

3.1 Aparatos:

Todos los aparatos utilizados en los experimentos de esta tesis se encuentran ubicados en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, así como en la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM)

situada en la misma facultad. La infraestructura es la correspondiente al grupo de trabajo del Dr. José Viña y la Dra. Ana Lloret.

- Centrífugas: para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS. Para desecar las muestras para el posterior análisis de glutatión oxidado, se utilizó una centrífuga Speed Vac, modelo SC 110 Savant, con una bomba acoplada Telstar para realizar el vacío.
- Espectrofotómetro: se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.
- Balanzas: se utilizaron 2 balanzas: una de precisión marca SALTER, modelo HA-120M y una balanza SARTORIUS, modelo PT 1200.
- Agitador magnético: marca SELECTA, modelo Agimatic-S.
- Sistema de purificación de agua: marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de glutatión.

El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- 2 bombas marca WATERS modelo 510.
 - Un inyector PHARMACIA LKB, modelo 2157.
 - Detector UV WATERS, modelo 441, a longitud de onda constante de 365 nm.
 - Ordenador IBM XT modelo 286 con integrador y que controla el equipo.
 - Columna cromatográfica WATERS modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 X 0.46 cm y 5 μm de diámetro de partícula.
- Citómetro de flujo: marca COULTER modelo Epics Elite ESP.
 - Microscopio confocal: unidad de escaneo láser confocal Leica TCS-SP2.
 - Campana de flujo laminar vertical: Marca CULTAIR modelo B100.
 - Cubetas de electroforesis: Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.

- Cubetas de electrotransferencia: Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.
- Fuentes de alimentación para la electroforesis: Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.
- Cubetas de electrotransferencia en semiseco: Marca NOVEX System (Xcell Blot Module No. EI 9051)
- Sistema de Análisis de Imágenes: Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.
- Transiluminador ultravioleta: Marca Vilverlourmat, modelo TFX-35M.
- Dispositivo fotográfico: Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

3.2 Reactivos:

Los reactivos utilizados fueron PCA, BPDS, KOH, CHES, ácido indolacético, púrpura m-cresol, 1-fluor-dinitrobenceno, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, γ -glutamyl-glutamato, glutatión S-transferasa, etanol, metanol, NEM, tampón acético acetato, fosfato potásico, EDTA, tampón fosfato-sódico, amonio,

persulfato, nitrato de plata, TRIS-HCl, azul bromofenol, sileno cianol, glicerol, TEB, glicina, mercaptoetanol, TBS-T, ECL, peroxidasa de rábano, citrato.

Los reactivos se obtuvieron de las firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Fisher Scientific Company (USA), Pharmacia Biotech (USA), Intergen Company (USA), Cell Signalling Technology (USA) .

4.- Determinación de los valores de glutatión.

4.1 Determinación de los valores de glutatión total:

4.1.1 Fundamento:

El glutatión total se determina por H.P.L.C. (cromatografía líquida de alto rendimiento), siguiendo el método descrito por Reed y cols. (Reed DJ y cols., 1980). Este método se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade una concentración conocida de γ -glutamil glutamato, como patrón

interno, el cual nos va a permitir calcular la concentración de la sustancia problema de un modo más exacto.

Con esta técnica cromatográfica, se pueden determinar las concentraciones tanto de glutatión reducido (GSH) como de glutatión oxidado (GSSG) de una misma muestra. Sin embargo, el método de Reed y cols. no debe utilizarse para determinar el estado del glutatión, ya que la muestra sufre una autooxidación del GSH importante en el proceso de derivatización (Asensi M y cols., 1994). De este modo, parte del GSH se oxida a GSSG dando falsos positivos en los resultados. Sin embargo, sí que es un buen método para la determinación del glutatión total (GSH + (2XGSSG)).

4.1.2. Obtención de las muestras y conservación:

Se realiza una extracción sanguínea de sangre venosa de la que inmediatamente se pipetea 200 µl de sangre y se mezclan con 800µl de ácido perclórico (PCA) 7.25% y ácido batofenantrolinedisulfuro (BPDS) 1.25 mM. A continuación, se centrifuga a 15.000g durante 10 minutos a 4°C. De esta manera acidificamos la sangre y conseguimos un sobrenadante ácido, libre de

proteínas. Las muestras pueden ser conservadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

4.1.3. Derivatización de la muestra:

1. Se toman 200 μl de sobrenadante ácido y se le añade 20 μl de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA al 0.3%). Seguidamente añadimos 20 μl de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9.

2. La mezcla se lleva a pH 8.5 – 9 usando un tampón KOH 3 M y ácido 2-N-ciclohexamilo (CHES) 0.3 M y una vez alcanzado el pH adecuado, se incuba la muestra durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

3. Al acabar la incubación se añaden 400 μl de 1-fluor dinitrobenzeno al 1% en etanol absoluto y se mantiene a 4°C y en oscuridad durante 24 horas como mínimo. Llegado a este punto las muestras son estables a 4°C durante varias semanas.

4. Antes de preparar la dilución que será inyectada en el cromatógrafo, las muestras se centrifugan a 15.000g durante 5

minutos a 4°C. De ahí se toman 50 µl de sobrenadante a los que añadimos 270 µl de una mezcla metanol-agua en proporción 800:200.

4.1.4. Técnica cromatográfica:

Se inyectan 80 µl de la solución que contiene la muestra.

La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: es una solución de metanol al 80% en agua bidestilada.
- Eluyente B: es una solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elución de las sustancias que nos interesan se realiza aplicando un gradiente:

- La fase móvil se mantiene durante 5 minutos a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.
- Tras este tiempo, comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 minutos del cromatograma se alcanza un 99% de B y un 1% de A.

- Se mantienen estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 minutos, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto.
- Una vez eluido el último compuesto de interés, se procede al reequilibrado de la columna. Para ello, se alcanzan las condiciones iniciales (20% de B y 80 % de A) manteniéndose así durante 15 minutos.

4.1.5. Cálculos:

Las concentraciones de GSH y GSSG se calculan en el cromatograma basándose en una concentración conocida de patrón interno, que es añadida a cada muestra en el proceso de derivatización. El patrón interno utilizado es γ -glutamyl-glutamato, que previamente ha sido calibrado frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Tanto los patrones de GSH como los de GSSG se calibran previamente enzimáticamente, para conocer su concentración exacta. El GSH se calibra por medio de la reacción de la glutatión transferasa y el GSSG por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

El glutatión total lo expresamos como equivalentes de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG.

$$[\text{GSH}] = \text{Glutatión total} - (2 \times \text{GSSG})$$

4.2. Determinación del patrón de glutatión reducido:

4.2.1. Fundamento:

Hemos utilizado el método descrito por Brigelius (Brigelius R, 1983). Se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobeneno. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa. El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



4.2.2. Procedimiento:

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 825 μ l de fosfato potásico 0,1 M y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1mM, pH 7,0.
- 25-100 μ l del patrón de GSH disuelto en PCA 6% BPDS 1 mM.
- 10 μ l de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 10 mM en etanol al 100%.

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) (E1) y la reacción comienza añadiendo 10 μ l de una solución de glutatión S-transferasa 500 U/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa previamente durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas.

Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción (E2). La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

4.2.3. Cálculos:

Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión a 340 nm ($\epsilon = 9,6$

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Una vez hallada la concentración del patrón, se realiza una curva con distintas concentraciones de GSH y con la misma de patrón interno, con el fin de hallar el factor de respuesta o relación entre el γ -glutamil-glutamato (PI) y el GSH mediante la siguiente relación:

$$[\text{PATRÓN GSH}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSH}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

Por medio de esta relación podremos calcular posteriormente las concentraciones de analito que tendremos en nuestras muestras problema.

$$[\text{GSH PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSH PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

4.3. Determinación del patrón de glutatión oxidado:

4.3.1. Fundamento:

Se sigue la reducción dependiente de nicotinamida adeninodinucleótido (NADPH) (340 nm) del GSSG a GSH.



4.3.2. Procedimiento:

En una microcubeta se añaden:

- 500µl de tampón fosfato 0,2 M con EDTA 2 mM a pH 7,00.
- 50µl de NADPH 3 mM disuelto en Tris-HCl 10 mM, pH 7,00.
- 50µl de GSSG 20 mM disuelto en agua.
- 350µl de agua (hasta un volumen de 950 µl)

Se registra la disminución de absorbancia a 340 nm.

4.3.3. Cálculos:

Calculamos la concentración de GSSG por medio de la siguiente fórmula:

$$\Delta\text{OD}/\text{min} \times (\text{Vol. final de cubeta}(\text{ml})/\text{Vol. de muestra en cubeta}(\text{ml})) \times$$

x (1/6,22) x factor de dilución= U/ml muestra

Una vez hallada la concentración de patrón de GSSG, se determina el factor de respuesta o relación entre el GSSG y el patrón interno, por medio de una curva realizada con distintas concentraciones de GSSG y la misma de patrón interno. Con este dato podremos calcular posteriormente las concentraciones del analito en nuestras muestras.

$$[\text{PATRÓN GSSG}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSSG}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

$$[\text{GSSG PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSSG PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

4.4 Determinación del glutatión oxidado (GSSG):

4.4.1. Fundamento:

Para la determinación del GSSG se siguió el método cromatográfico descrito por Asensi y cols. (Asensi M y cols., 1994). Se basa en la separación cromatográfica de los dinitrobenzeno

derivados y posterior detección a 365 nm. Para que el GSH no sufra una autooxidación en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Este bloqueo hace que este método sea idóneo para evitar el aumento de concentración de GSSG por oxidación del GSH durante el procesado de la muestra.

4.4.2. Obtención de las muestras

Tras la extracción sanguínea de sangre venosa se pipetea inmediatamente 500 μ l de sangre y se mezclan con 500 μ l de PCA 12% BPDS 2 mM NEM 40 mM. Después de agitar vigorosamente, se centrifuga a 15.000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante ácido libre de proteínas se usará posteriormente para la determinación del GSSG. Las muestras pueden ser conservadas a una temperatura de -20° C hasta el momento de su análisis.

4.4.3. Derivatización

1. Se toman 200 μ l de sobrenadante ácido y se mezclan con 20 μ l de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA 0.3%) y 20 μ l de púrpura de m-cresol 0.2 mM como indicador de pH.

2. Se lleva la muestra a pH 8.5 – 9 añadiendo KOH 3M CHES 0.3M. El indicador de pH vira a color púrpura cuando lo alcanza.
3. Se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
4. Se toman 25µl de sobrenadante y se mezclan con 50µl de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto.
5. Se incuba la muestra 45 minutos en oscuridad y se deseca la disolución a vacío hasta 70 miliTorr.
6. Las muestras desecadas pueden conservarse durante meses a –20°C hasta el momento de su inyección en el HPLC.
7. Justo antes de la inyección en el cromatógrafo, las muestras se resuspenden en 200 µl del eluyente A.

4.4.4. Técnica cromatográfica:

Las muestras se procesan en el mismo aparato cromatográfico que el glutatión total. Las condiciones aplicadas en el ensayo son las mismas, siendo el gradiente de eluyentes, fase estacionaria, fase móvil y detección, idénticas que en el caso anterior.

4.4.5 Cálculos:

El cálculo de la concentración de glutatión oxidado en la muestra biológica, se realiza en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto al patrón interno.

5.-Análisis de las isoformas comunes de Apo E.

El análisis del genotipo de la ApoE se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La concentración de ADN se determina midiendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Una solución con 50 µg/ml de ADN proporciona una absorbancia de 1. Para determinar el grado de contaminación (con fenol o proteínas, por ejemplo) de la muestra, se mide la absorbancia a 280 nm. La relación de absorbancias 260/280 proporciona una estimación de la pureza de la preparación. Una relación menor a 1.8 indica la presencia de impurezas, y en este caso no es posible hacer una cuantificación exacta del ADN.

5.1. Amplificación:

Las reacciones de amplificación se harán en la siguiente mezcla preparada en lecho de hielo:

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	28.75 µL
Tampón ¹	5 µL
Solución Q	10 µL
dNTPs (2.5 µM)	2 µL
Oligo-5' (10 µM) ²	2 µL
Oligo-3' (10 µM) ²	2 µL
Taq (Hot start) ¹	0.25 µL

(1) Kit de Quiagen Hot start

(2) Diseñados por la Unidad de Medicina Molecular de FVIB

A 14 µL de esta solución se añade 1 µL de ADN a una concentración de 25 ng/µL.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94 Hot start	15'	1
94 Desnaturalización	30''	
64 Unión oligo≈hebra	30''	55
72 Síntesis	35''	
72 Síntesis	5'	1

Para verificar la PCR, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, cargando 3 μL del producto de PCR y 1 μL del tampón de carga, cuya composición es: 0.25% Azul de bromofenol; 0.25% Sileno cianol; 30% de glicerol y 1X TEB pH8 (Tris Borato EDTA). Las condiciones de la electroforesis son: tampón de electroforesis TEB 1X, 80V, de 30 a 60 min.

5.2 Digestión del DNA y separación de los fragmentos:

Preparar la siguiente mezcla (Biolabs System): H_2O 4.02 μL + Tampón Neb 4 (10X) 0.8 μL + BSA 0.08 μL + HhaI (20 U/ μL) 0.1 μL . Se prepara el volumen necesario según las muestras a analizar. Se

toman 5 μL de la mezcla y se añade 1 μL de la PCR; se cubre con una gota de aceite de inmersión (Sigma) para evitar que se evapore. Se incuba toda la noche a 37°C.

Los fragmentos de ADN se separan en gel de poliacrilamida al 14%. El gel lleva la siguiente composición:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida (29:1, 40%)	7.7 ml
TEB 10X	2.2 ml
Agua	12.1 ml
Amonio persulfato 10%	50 μL
TEMED	20 μL

Se deja polimerizar durante 30 minutos. Las condiciones de la electroforesis son: Tampón de electroforesis TEB 1X, 250 V, 1 hora.

El revelado de los geles se hizo mediante tinción con nitrato de plata, siguiendo el método descrito por Beidler y cols. (Beidler JL y cols., 1982).

6.- Péptido A β y su preparación.

El péptido beta amiloide (A β) 1-42 y su péptido control 42-1 (Sigma-Aldrich, España) fresco fue preparado en alícuotas tras disolverlo en tampón fosfato salino (PBS) a una concentración de 100 μ m.

Para obtener oligómeros se mantuvo el A β a 4°C durante 24 horas. Para obtener prefibrillas fue mantenido a temperatura ambiente durante 48 horas. Para obtener fibrillas maduras fue mantenido a 37°C durante 5 días (Tamagno E y cols., 2006).

Estas cuatro distintas preparaciones se utilizaron para incubar linfocitos aislados y sangre total a una concentración de 20 μ m durante 24 horas.

7.- Aislamiento de linfocitos.

Se utilizaron tubos BD Vacutainer CPT, que separan plasma, células blancas y eritrocitos. Se realiza una primera centrifugación a 3.000 rpm durante 20 minutos. Tras esta primera centrifugación la sangre queda separada en eritrocitos en la parte inferior, el plasma en la parte superior y un anillo formado por las células

mononucleares en la parte intermedia. Con ayuda de una pipeta extraemos, por un lado, alícuotas de plasma para distintas determinaciones, y por otro lado la capa de mononucleares. Una vez extraída la capa de células mononucleares se realizan dos lavados con PBS con centrifugación tras cada lavado a 1.300 rpm durante 10 minutos, y un último centrifugado sobre suero de ternera fetal 10 minutos para eliminar las plaquetas. Posteriormente las células mononucleares aisladas se incuban en placas petri estériles en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, España) con suero bobino fetal al 10% durante 24 horas. De esta manera los linfocitos permanecen flotando mientras que el resto de células mononucleares se pegan al fondo de la placa. Una vez aislados los linfocitos se procederá a su preparación según el destino experimental.

8.-Citometría de flujo.

Realizamos citometría de flujo en linfocitos y plaquetas para medir distintos parámetros mitocondriales. Los estudios de citometría de flujo se han llevado a cabo en un EPICS ELITE cell sorter (Coulter Electronics, Miami, FL), el cual se halla ubicado en la Unidad

central de Investigación de la Facultad de Medicina. Los fluorocromos se excitan con un láser de argón.

Las células se lavaron con PBS y se marcaron con 1.5 mM 5,5',6,6'- tetracloro - 1,1',3,3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodido (JC-1) (Molecular Probes). Las muestras marcadas se incubaron durante 30 minutos a 37°C protegidas de la luz. Se volvieron a lavar con PBS para eliminar el exceso de marcador previo a su análisis. JC-1 es un marcador catiónico que se acumula en la membrana mitocondrial cuando está intacta. Si el potencial de membrana es elevado emite fluorescencia en color rojo (590 nm) y a medida que se produce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial se produce una menor intensidad de la fluorescencia roja hacia una fluorescencia verde (525 nm).

Para el estudio de peróxidos utilizamos la sonda diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Molecular Probes). Esta sonda difunde en el interior celular y es desacetilada en el citoplasma por esterasas inespecíficas, quedando como producto diclorofluoresceína (DCFH), que no puede difundir al exterior de la célula. En presencia de peróxidos, el DCFH es oxidado a diclorofluoresceína (DCF),

compuesto que emite fluorescencia cuando es excitado a 488 nm. Los linfocitos fueron incubados con DCFH-DA durante 30 minutos a 37°C protegidas de la luz. Se volvieron a lavar con PBS para eliminar el exceso de marcador previo a su análisis.

También se ha medido tamaño y complejidad de morfología de las mitocondrias.

9.- Estudio en microscopía confocal.

Los estudios de microscopía confocal la realizamos con una unidad de barrido láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica SA, Mannheim) con un láser de argón y otro de neón-helio unido a un microscopio invertido de Leica DM1RB. Utilizamos placas Lab-Tek de la casa Nalge Nunk International tratadas con poly-L-lisina (Sigma Aldrich Quimica). Se coloca la poly-L-lisina 24 horas antes manteniendo las placas en estufa a 37°C. Posteriormente se realizan dos lavados con PBS y uno con RPMI previo a la siembra de los linfocitos. Usamos 60.000 linfocitos por pocillo que se incuban en 200µl de medio y 40µl de Aβ.

Los fluorocromos utilizados fueron: anexina V como marcador de apoptosis temprana ya que se une a la fosfatidilserina, molécula que es transportada a la cara externa de la membrana celular durante las

primeras fases de la apoptosis; yoduro de propidio como marcador de necrosis y apoptosis tardía, pues se une a las cadenas de ADN para lo cual precisa la ruptura de la membrana celular; Bibenzimida Hoechst 34580 como marcador nuclear ya que se une a la cromatina; marcador de caspasas 3-7. Todos los fluorocromos fueron proporcionados por la empresa Molecular Probes (Invitrogen Corporation).

La cuantificación de fluorescencia de los distintos fluorocromos la realizamos utilizando el Leica Confocal Software (LCS Lite Versión). Los resultados se expresan en porcentaje de células marcadas tras cuantificación y análisis de 200 linfocitos (4-6 campos) por sujeto.

10.- PCR de enzimas antioxidantes y enzimas relacionadas con tau.

El ARN se aisló de los linfocitos con el kit PARISTM Protein and RNA Isolation System (Ambion; Catalog nº #1921; Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para las reacciones de transcripción reversa (TR), 1 ug de ARN purificado se retro-transcribió utilizando random hexamers con el

HighCapacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, P/N: 4322171; Foster City, CA). Las condiciones de la TR fueron una incubación inicial a 25°C durante 10 minutos, seguida por la reacción de síntesis de cDNA a 37°C durante 120 min y un paso de inactivación final de 5 min a 95°C.

La medida de los niveles de mRNA se determinó mediante PCR cuantitativa con el ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los primers específicos utilizados fueron obtenidos de la empresa Qiagen (Applied Biosystems, P/N 4309155; Foster City, CA). Las condiciones de la PCR fueron 10 min a 95°C para activar el enzima, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95 °C; 1 min a 60°C. Los niveles de expresión de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se midieron en todas las muestras con el objetivo de normalizar la expresión de cada uno de los genes, la calidad del RNA y la eficiencia de la transcripción reversa. Cada muestra se analizó por triplicado y la expresión se calculó de acuerdo con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

11.-Estudio de la expresión de calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3 β mediante electroforesis y western blotting.

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE en condiciones desnaturizantes. En presencia de algunos compuestos químicos las proteínas pierden su estructura nativa. Tales compuestos, agentes desnaturizantes, producen el desplegamiento de la proteína que aparece así sin la organización tridimensional característica de su función biológica. La combinación de un detergente desnaturizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) es la que se utilizó.

Los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su masa molecular. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1,4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas.

Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme. La separación, por tanto, depende de un parámetro físico-químico, la masa molecular, que se puede calcular. Utilizando esta técnica se estudio la expresión calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3 β del citosol de linfocitos. Todas ellas se valoraron utilizando como referencia los niveles de tubulina.

Se cargaron 30 μg de proteína citoplasmática en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA) mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA).

El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 300 mAmperios, en tampón de

transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

11.1 Visualización:

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

3.- Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology).

4.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

5.-Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo preparado en burro, (Cell Signaling Technology). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (1:2000).

6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incubó 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT).

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software " Analysis 3".

12.- Método ELISA.

El ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima) es una técnica de ensayo inmunoenzimático que permite la detección tanto de antígenos como de anticuerpos (Engvall E y cols., 1971).

Se basa en la premisa de que un inmunoreactivo puede ser inmovilizado en una fase sólida y su reactivo recíproco puede unirse a una enzima; en ambos casos las sustancias retienen su actividad inmunológica donde la reacción inmunógeno-anticuerpo es monitorizada midiendo la actividad de una enzima.

El ELISA de Sándwich o de captura se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca.

Utilizamos la técnica de ELISA con kits comerciales para las determinaciones de Citocromo C y colesterol oxidado (Calbiochem) y de TNF α (Raybiotech).

13.-Preparación de la muestra para medir TNF α .

Este experimento se realizó según la técnica de la Dra. de la Fuente, catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad Complutense de Madrid (Arranz L y cols., 2009).

Incubamos 2 ml de sangre total en tubo con citrato con 400µl de Aβ durante 24 horas en agitación. Se utilizaron 3 tubos por paciente, uno con sangre sin Aβ como control y dos con Aβ 1-42 y Aβ42-1 cada uno. Posteriormente se extrae 500µl de sangre de cada tubo a un épendorf estéril y se le añade 500µl de medio RPMI sin glutamina y 10µl de lipopolisacárido (LPS) (Sigma Co.) a una concentración de 25µgr/ml. Estos épendorf permanecerán abiertos en estufa a 37°C durante 4 horas. Tras esto se centrifugan a 2.300 rpm a 4°C durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante que puede ser conservado a -80°C hasta su análisis.

14.- Análisis estadístico.

Las comparaciones de 2 medias en muestras paramétricas se realizaron mediante el test T de Student y en muestras no paramétricas se compararon con el test Mann-Whitney. Cuando la comparación de medias implica más de 2 se usaron el test ANOVA para muestras paramétricas y el test Kruskal-Wallis para las no paramétricas.

Las correlaciones simples en muestras paramétricas se realizaron por medio de la correlación de Pearson y en muestras no paramétricas con el test de Spearman. También se usaron modelos de regresión lineal simple y regresiones lineales múltiples en el caso de 2 ó más variables, respectivamente.

ANEXO 1. ENCUESTA DE RECOGIDA DE DATOS

CASO

CONTROL

NUMERO: _____

CUESTIONARIO

NOMBRE:

SEXO:

EDAD:

DATOS DEL PROGENITOR:

NOMBRE:

DIAGNÓSTICO:

EDAD DE INICIO:

ANTECEDENTES PERSONALES:

DIABETES MELLITUS

HTA: CONTROLADA GRAVE MAL CONTROLADA

INSUFICIENCIA RENAL : LEVE GRAVE

TABAQUISMO: ACTIVO EXFUMADOR. CIG/ DIA__

ALCOHOLISMO: ACTIVO EXBEBEDOR

ENFERMEDAD NEOPLÁSICA

MENOPAUSIA

- ENFERMEDAD DEGENERATIVA: ELA, ETC.
- ENFERMEDADES AUTOINMUNES
- SIDA
- HEPATITIS CRÓNICA ACTIVA
- DEPRESIÓN O SÍNDROME ANSIOSO
- OTROS:

MEDICACIÓN ACTUAL:

- VITAMINAS
- ALOPURINOL
- ESTATINAS
- OTROS:

NIVEL DE ESCOLARIZACIÓN: _____

HISTORIA LABORAL : tipo de trabajo, contacto con tóxicos.....

¿PRESENTA PROBLEMAS DE MEMORIA EN LA ACTUALIDAD?

TEST NEUROPSICOLÓGICOS:

- Test de memoria de Rey: MCP ___/
- APRENDIZ. ___/ ___/ ___/ ___/ MLP _____
- STROOP:
- Escala de Hamilton:

ANEXO 2. ESCALA DE DEPRESIÓN DE HAMILTON

Humor deprimido (tristeza, depresión, desamparo, inutilidad)

0 puntos - Ausente.

1 punto - Estas sensaciones se indican solo al ser preguntados.

2 puntos - Estas sensaciones se relatan oral y espontáneamente.

3 puntos - Sensaciones no comunicadas verbalmente, sino por la expresión facial, postura, voz o tendencia al llanto.

4 puntos - El paciente manifiesta estas sensaciones en su comunicación verbal y no verbal de forma espontánea.

Sensación de culpabilidad

0 puntos - Ausente.

1 punto - Se culpa a sí mismo, cree haber decepcionado a la gente.

2 puntos - Ideas de culpabilidad, o meditación sobre errores pasados o malas acciones.

3 puntos - La enfermedad actual es un castigo. Ideas delirantes de culpabilidad.

4 puntos - Oye voces acusatorias o de denuncia y/o experimenta alucinaciones visuales amenazadoras.

Idea de suicidio

0 puntos - Ausente.

1 punto - Le parece que la vida no merece la pena ser vivida.

2 puntos - Desearía estar muerto o tiene pensamientos sobre la posibilidad de morirse.

3 puntos - Ideas o amenazas de suicidio.

4 puntos - Intentos de suicidio.

Insomnio precoz

0 puntos - Ausente.

1 punto - Dificultades ocasionales para dormirse, por ejemplo más de media hora.

2 puntos - Dificultades para dormirse cada noche.

Insomnio medio

0 puntos - Ausente.

1 punto - El paciente se queja de estar inquieto durante la noche.

2 puntos - Está despierto durante la noche; cualquier ocasión de levantarse de la cama se puntúa como 2, excepto si está justificada (orinar, tomar o dar medicación...).

Insomnio tardío

0 puntos - Ausente.

1 punto - Se despierta a primeras horas de la madrugada pero vuelve a dormirse.

2 puntos - No puede volver a dormirse si se levanta de la cama.

Problemas en el trabajo y actividades

0 puntos - Ausentes.

1 punto - Ideas y sentimientos de incapacidad. Fatiga o debilidad relacionadas con su trabajo, actividad o aficiones.

2 puntos - Pérdida de interés en su actividad, aficiones o trabajo, manifestado directamente por el enfermo o indirectamente por desatención, indecisión y vacilación.

3 puntos - Disminución del tiempo dedicado a actividades o descenso en la productividad.

4 puntos - Dejó de trabajar por la presente enfermedad.

Inhibición

0 puntos - Palabra y pensamiento normales.

1 punto - Ligero retraso en el diálogo.

2 puntos - Evidente retraso en el diálogo.

3 puntos - Diálogo difícil.

4 puntos - Torpeza absoluta.

Agitación

0 puntos - Ninguna.

1 punto - "Juega" con sus manos, cabellos, etc.

2 puntos - Se retuerce las manos, se muerde las uñas, los labios, se tira de los cabellos, etc.

Ansiedad psíquica

0 puntos - No hay dificultad.

1 punto - Tensión subjetiva e irritabilidad.

2 puntos - Preocupación por pequeñas cosas.

3 puntos - Actitud aprensiva aparente en la expresión o en el habla.

4 puntos - Terrores expresados sin preguntarle.

Ansiedad somática: signos o síntomas somáticos concomitantes de la ansiedad, como:

- Gastrointestinales: boca seca, flatulencia, diarrea, eructos, retortijones.
- Cardiovasculares: palpitaciones, cefalalgias.
- Respiratorios: hiperventilación, suspiros.
- Frecuencia urinaria.
- Sudoración.

0 puntos - Ausente. 1 punto - Ligera.
2 puntos - Moderada. 3 puntos - Grave.
4 puntos - Incapacitante.

Síntomas somáticos gastrointestinales

0 puntos - Ninguno.
1 punto - Pérdida del apetito, pero come sin necesidad de que lo estimulen. Sensación de pesadez en el abdomen.
2 puntos - Dificultad en comer si no se le insiste. Solicita o necesita laxantes o medicación intestinal o para sus síntomas gastrointestinales.

Síntomas somáticos generales

0 puntos - Ninguno.
1 punto - Pesadez en la extremidades, espalda o cabeza. Dorsalgias, cefalalgias, mialgias. Fatigabilidad y pérdida de energía.
2 puntos - Cualquiera de los síntomas anteriores se puntúa como 2 si está muy bien definido.

Síntomas genitales como pérdida de la libido y trastornos menstruales

- 0 puntos - Ausentes.
- 1 punto - Débiles.
- 2 puntos - Graves.
- 3 puntos - Incapacitantes.

Hipocondría

- 0 puntos - No la hay.
- 1 punto - Preocupado de sí mismo (corporalmente).
- 2 puntos - Preocupado por su salud.
- 3 puntos - Se lamenta constantemente. Solicita ayudas, etc.
- 4 puntos - Ideas delirantes hipocondríacas.

Pérdida de peso (completar sólo A o B)

A.- Según manifestaciones del paciente (primera evaluación)

- 0 puntos - No hay pérdida de peso.
- 1 punto - Probable pérdida de peso asociada con la enfermedad actual.
- 2 puntos - Pérdida de peso definida según el enfermo.

B.- Según pesaje por parte del médico (evaluaciones siguientes)

- 0 puntos - Pérdida de peso inferior a 500 g por semana (de promedio).
- 1 punto - Pérdida de peso de más de 500 g por semana (de promedio).
- 2 puntos - Pérdida de peso de más de 1 kg por semana (de promedio).

Insight (conciencia de enfermedad)

0 puntos - Se da cuenta de que está deprimido y enfermo.

1 punto - Se da cuenta de su enfermedad pero atribuye la causa a la mala alimentación, clima, exceso de trabajo, virus, etc.

2 puntos - Niega estar enfermo.

El marco de referencia temporal es el momento de la entrevista, excepto para los ítems del sueño, que se refieren a los dos días previos. Se suma la puntuación de todos los ítems para obtener la puntuación global. Proporciona una puntuación de la gravedad del cuadro.

PUNTUACIÓN TOTAL: 0-7: NORMAL; 8-12: DEPRESIÓN MAYOR; 13-17: DEPRESIÓN MODERADA;

18-29: DEPRESIÓN MAYOR; 30-52: DEPRESIÓN MUY SEVERA.

ANEXO 3: Tabla de puntuación del test de Stroop

BAREMOS (-1 D.T.)	Palabras	Colores	Palabras x colores
Adultos jóvenes: De 16 a 44 años	99	65	39
Adultos: De 45 a 65 años	99	58	34
Adultos mayores: > 65 años	76	31	25

Puntos de corte para suponer lesión cerebral:

P: 75; C: 58; PC: 25.

Puntuación baja en P: dislexia pura, discapacidad o problemas psiquiátricos.

Puntuación baja en todos los apartados: lesiones de hemisferio izquierdo o de tipo difuso.

P normal, C y PC bajos: lesiones en hemisferio derecho

P y C normales, PC bajo: lesiones prefrontales aisladas.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Descripción de la muestra.

Nuestra muestra consta de 33 casos y 21 controles. Los casos corresponden a sujetos hijos de pacientes con EA y genotipo ApoE 4/4, con lo cual nos aseguramos un genotipo 3/4 o 4/4. Los controles son sujetos sanos de similar edad que los casos sin antecedentes familiares de EA. Respecto a la distribución por sexos: de los 21 controles, 12 son mujeres (57%) y 9 hombres (43%); la misma proporción encontramos en los 33 casos, 57,5% mujeres y 42,5% hombres. Respecto a la edad, no existen diferencias significativas entre ambos grupos. La media de edad en los casos es de 41 ± 7 años (máximo 53, mínimo 23). En el grupo control la media de edad es de 39 ± 8 años (máximo 55, mínimo 25). Respecto al genotipo ApoE: en el grupo control encontramos un 90,5% de genotipo ApoE 3/3 y un 9,5% de genotipo indeterminado. En los casos existe un 45,5% de sujetos 3/4, 39,5% de 4/4 y un 15% con ApoE indeterminado. Respecto al nivel educacional, en el grupo control encontramos un 57% de los sujetos con estudios universitarios, 23,8% con estudios secundarios y el 19% con estudios primarios. En los casos existe un

34% con estudios universitarios, 39% con estudios secundarios y 27% con estudios primarios, sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas (Tabla 3). Si realizamos la clasificación de los sujetos respecto a su genotipo ApoE, no existen diferencias respecto a sexo y edad en los distintos grupos, sí existe mayor porcentaje de sujetos con estudios primarios entre los sujetos con ApoE 4/4, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Tabla 3. Descripción de la muestra según casos y controles.

		CONTROLES	CASOS
EDAD		39±8	41±7
SEXO	HOMBRES	43%	42,5%
	MUJERES	57%	57,5%
APOE	3/3	90,5%	0%
	3/4	0%	45,5%
	4/4	0%	39,4%
	INDETERM.	9,5%	15%
ESTUDIOS	PRIMARIOS	19%	27%
	SECUNDARIOS	23,8%	39%
	UNIVERSITARIOS	57%	34%

Tabla 3. Tabla descriptiva de las características de edad, sexo, genotipo ApoE y nivel de estudios entre casos (n=33) y controles (n=21), expresado en porcentaje sobre el total en el caso de sexo, genotipo ApoE y nivel de estudios, y expresado como la media ± desviación estándar en el caso de la edad.

Tabla 4. Descripción de la muestra según ApoE

		3/3	3/4	4/4
SEXO	HOMBRE	50%	39%	53%
	MUJER	50%	61%	47%
EDUCACIÓN	PRIMARIOS	14%	11%	33%
	SECUND.	29%	45%	27%
	UNIV.	57%	44%	40%
EDAD		39±9	39±9	41±8

Tabla 4. Tabla descriptiva de las características de edad, sexo y nivel de estudios entre los distintos subgrupos según ApoE (ApoE 3/3 n= 18, ApoE 3/4 n= 15, ApoE 4/4 n= 13), expresado en porcentaje sobre el total en el caso de sexo y nivel de estudios, y expresado como la media ± desviación estándar en el caso de la edad.

2.- Resultados sobre cognición.

2.1 Quejas subjetivas de memoria:

Encontramos un mayor porcentaje de quejas de memoria entre los casos que entre los controles (39% vs 5%) sin que en este resultado influya la edad ni el sexo ni el nivel de estudios de los sujetos. Tampoco existe relación con el antecedente de depresión de los sujetos (Gráfico 1). Cuando clasificamos a los sujetos según genotipo ApoE encontramos un 7% de quejas cognitivas en los 3/3, un 47% en los 3/4 y un 33% en los 4/4, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 2).

GRAFICO 1. Diferencias entre quejas cognitivas entre casos y controles.

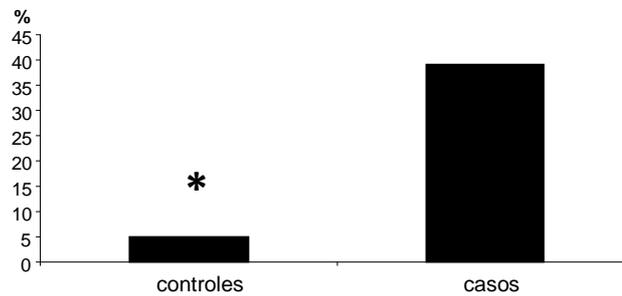


Gráfico 1. Diferencias entre el porcentaje de sujetos que refieren quejas de memoria entre los grupos casos (n=33) y controles (n=21). La diferencia significativa se indica como (*) $p < 0,05$ entre los grupos casos y controles.

GRAFICO 2. Diferencias entre quejas cognitivas entre los diferentes genotipos de ApoE

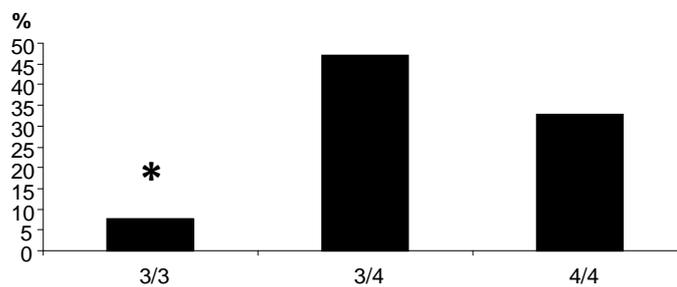


Gráfico 2. Diferencias entre el porcentaje de sujetos que refieren quejas de memoria entre los grupos ApoE 3/3 (n=18), ApoE 3/4 (n=15) y ApoE 4/4 (n=13). La diferencia significativa se expresa como (*) $p < 0,05$ entre el grupo ApoE 3/3 vs los grupos ApoE 3/4 y 4/4.

2.2 Test Neuropsicológicos:

2.2.1 Test de Stroop:

Realizamos el test Stroop a 52 de los 54 sujetos de nuestra muestra. Analizamos por separado los tres apartados de los que se compone este test: stroop palabras (p), stroop colores (c), stroop palabrasxcolores (pc). Se han detectado 2 sujetos con valores en el límite de la normalidad (caso 2 (ApoE 4/4): p 85, c 73, pc 20; y caso 10 (ApoE indeterminado): p 71, c 52, pc 33), ambas mujeres de aproximadamente 45 años y ambas con estudios primarios, una de ellas (caso 2) con síndrome depresivo en tratamiento, la otra sin antecedentes de interés ni consumo de fármacos. El resto de sujetos presentaron puntuaciones dentro de los límites de la normalidad.

No encontramos en nuestra muestra diferencias significativas entre casos y controles. Cuando clasificamos la muestra en 3 grupos según el genotipo ApoE encontramos una tendencia a presentar peores resultados en los sujetos con genotipo 4/4, tendencia que se observa con mayor claridad en el apartado stroop palabras si comparamos los grupos 3/3 y 4/4 y en los apartados de stroop

colores y palabrasxcolores si comparamos los grupos 3/4 vs 4/4 (Gráfico 3).

Encontramos una menor puntuación en el conjunto del test con la edad siendo esta diferencia estadísticamente significativa cuando comparamos a los sujetos menores y mayores de 40 años (Gráfico 4).

También encontramos que el test Stroop se encuentra muy influenciado por el nivel educacional (Gráfico 5), sobre todo en los apartados de stroop palabras (90 en estudios primarios vs 111 en universitarios, $p < 0.001$) y stroop palabrasxcolores (37 vs 50, $p < 0.001$). Cuando analizamos los resultados clasificando la muestra por subgrupos según el nivel educacional, en el subgrupo de estudios universitarios encontramos peores puntuaciones en los sujetos 4/4 respecto a los 3/3 siendo esta diferencia mayor para el apartado stroop colores (Gráfico 6).

GRÁFICO 3. Diferencias en el Test de Stroop según genotipo ApoE.

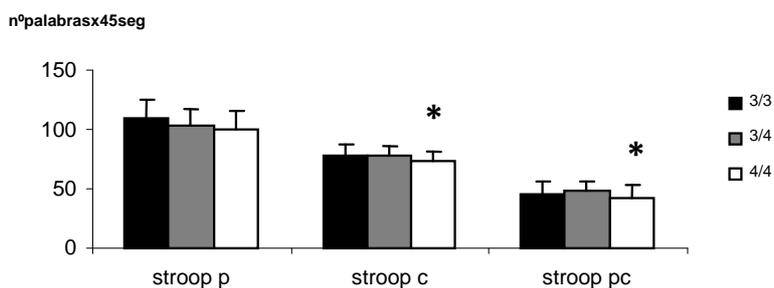


Gráfico 3. Diferencias entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados (p=palabras; c=colores; pc=palabrasxcolores) en los subgrupos por genotipo ApoE (3/3 n=18; 3/4 n=15; 4/4 n=13) expresado como número de palabras en 45 segundos. La diferencia significativa se expresa como (*) $p < 0.05$ entre los grupos ApoE 3/4 vs 4/4.

GRAFICO 4. Diferencias en el Test de Stroop según edad.

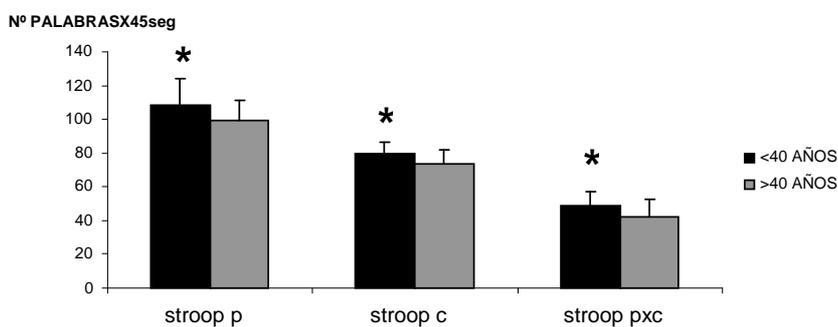


Gráfico 4. Diferencias entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados (p=palabras; c=colores; pc=palabrasxcolores) en los subgrupos por edad (mayores de 40 años n=29; menores de 40 años n= 23). La diferencia significativa se expresa como (*) $p < 0.05$.

GRÁFICO 5. Diferencias en el Test de Stroop según nivel educacional.

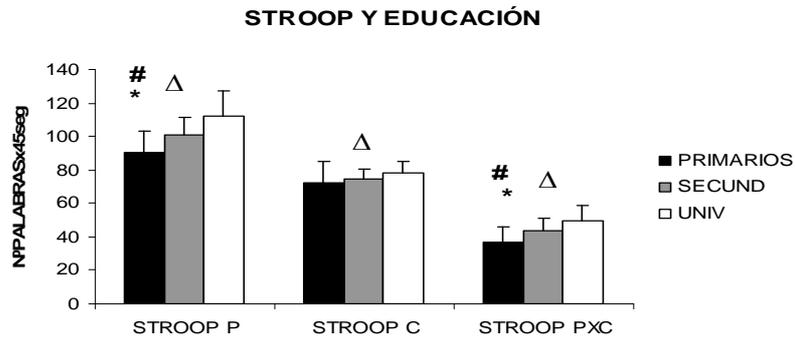


Gráfico 5. Diferencias entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados (p=palabras; c=colores; pc=palabrasxcolores) en los subgrupos por nivel educacional (estudios primarios n=13; estudios secundarios n=18; estudios universitarios n=21). Diferencia estadística expresada como sigue: (*) $p < 0,05$ entre los grupos estudios primarios vs secundarios; (#) $p < 0,001$ entre los grupos de estudios primarios vs universitarios; (Δ) $p < 0,05$ entre los grupos de estudios secundarios vs universitarios.

GRÁFICO 6. Diferencias en Test Stroop según ApoE y nivel educativo

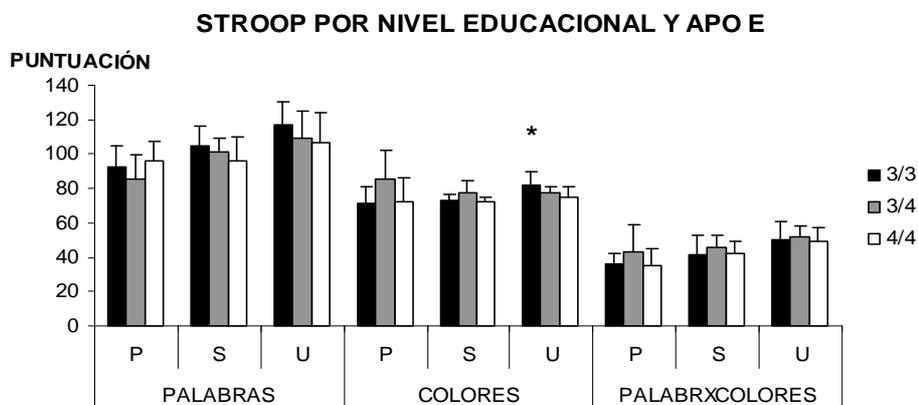


Gráfico 6. Diferencias entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados en los subgrupos según genotipo ApoE y nivel de estudios (P: estudios primarios, ApoE 3/3 n=3, ApoE 3/4 n=2, ApoE 4/4 n=4; S: estudios secundarios, ApoE 3/3 n=6, ApoE 3/4 n=7, ApoE 4/4 n=4; U: estudios universitarios ApoE 3/3 n=10, ApoE 3/4 n=6, ApoE 4/4 n=5). Significación estadística expresada como (*) $p=0.06$ entre el subgrupo de estudios universitarios con ApoE 3/3 vs los grupos 3/4 y 4/4 con el mismo nivel de estudios.

2.2.2 Test de Memoria de Rey:

Realizamos el test a 52 sujetos de los 54 de nuestra muestra. Cuando analizamos los resultados por ApoE encontramos una tendencia a presentar peores resultados en los sujetos 4/4 sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 7).

Observamos una influencia de la edad en este test en sus tres apartados presentando peores puntuaciones los sujetos de mayor edad (Gráfico 8). Cuando hacemos subgrupos por edad y analizamos en cada subgrupo la muestra por ApoE se sigue manteniendo la tendencia de presentar peores resultados los sujetos 4/4 pero sin diferencias significativas ($p=0,08$ en mcp 4/4 vs 3/4 en el subgrupo de mayores de 40 años).

Encontramos que existe una gran influencia del nivel educacional sobre este test siendo mejores las puntuaciones a mayor nivel de estudios (Gráfico 9, $p<0,001$ primarios vs universitarios; $p<0,05$ secundarios vs universitarios). Cuando subdividimos nuestra muestra por nivel educativo y vemos las diferencias entre casos y controles encontramos menores puntuaciones en los casos con estudios universitarios que en los controles del mismo nivel educacional,

siendo esta diferencia significativa para la memoria a largo plazo y aprendizaje ($p < 0,05$). Por tanto nuestra muestra se comporta de similar manera en ambos test en los que encontramos peores puntuaciones en los casos con nivel de estudios universitario respecto a los controles (Gráfico 10). Cuando en este subgrupo se hace el análisis por ApoE se sigue manteniendo la tendencia de peores resultados en los 4/4, aunque se pierde la significación (Gráfico 11).

GRÁFICO 7. Diferencias en Test de Memoria de Rey según genotipo ApoE

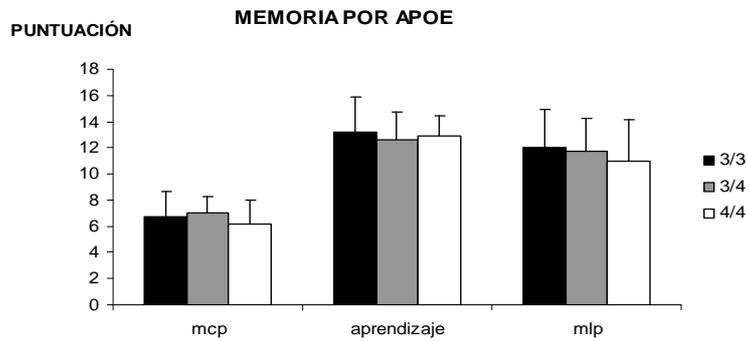


Gráfico 7. Diferencias en las puntuaciones del test de memoria de Rey en sus tres apartados (mcp= memoria a corto plazo; aprendizaje; mlp= memoria a largo plazo o de retención) entre los distintos grupos según genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=18, 3/4 n=15; 4/4 n=13)

GRÁFICO 8. Diferencias en el Test de Memoria de Rey según edad.

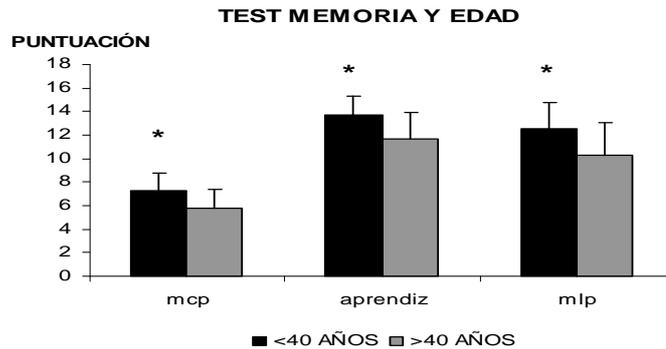


Gráfico 8. Diferencias entre las puntuaciones del test de Rey en sus tres apartados (mcp= memoria a corto plazo; aprendizaje; mlp= memoria a largo plazo o de retención) en los subgrupos por edad (> 40 años n=29; <40 años n= 23). La diferencia significativa se expresa como (*) p <0,001.

GRÁFICO 9. Diferencias en el Test de Memoria de Rey según nivel educacional.

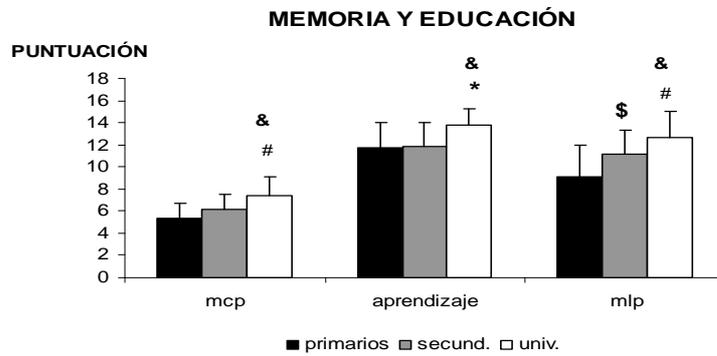


Gráfico 9. Diferencias entre las puntuaciones del test de memoria de Rey en sus tres apartados (mcp= memoria a corto plazo; aprendizaje; mlp= memoria a largo plazo o de retención) en los subgrupos por nivel educacional (estudios primarios n=13; estudios secundarios n=18; estudios universitarios n=21). Diferencia estadística expresada como sigue: (#) $p < 0,001$ entre los grupos de estudios primarios vs universitarios. (*) $p < 0,05$ entre los grupos de estudios primarios vs universitarios. (\$) $p < 0,05$ entre los grupos de estudios primarios vs secundarios. (&) $p < 0,05$ entre los grupos de estudios secundarios vs universitarios.

GRÁFICO 10. Diferencias entre casos y controles en los test neuropsicológicos en el subgrupo con estudios universitarios.

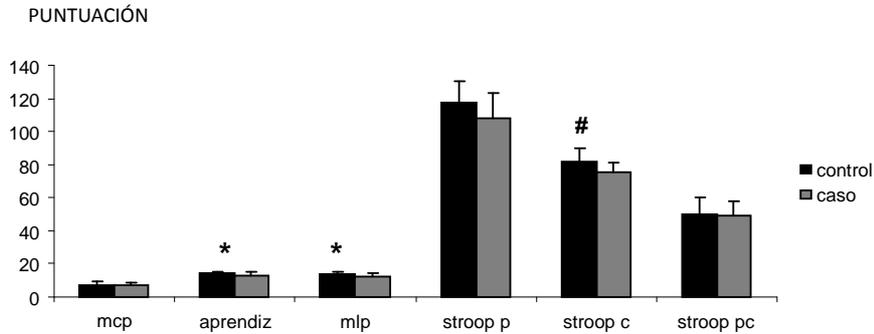


Gráfico 10. Diferencias entre las puntuaciones del test de memoria de Rey en sus tres apartados (mcp= memoria a corto plazo; aprendizaje; mlp= memoria a largo plazo o de retención) y entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados (p=palabras; c=colores; pc=palabrasxcolores) entre los sujetos con estudios universitarios divididos según correspondan al grupo de casos (n=11) o controles (n=10). Significación estadística expresada como sigue: (*) $p < 0,05$ entre casos y controles, (#) $p = 0,06$ entre casos y controles.

GRÁFICO 11. Diferencias entre grupos por ApoE en los test neuropsicológicos en el subgrupo con estudios universitarios.

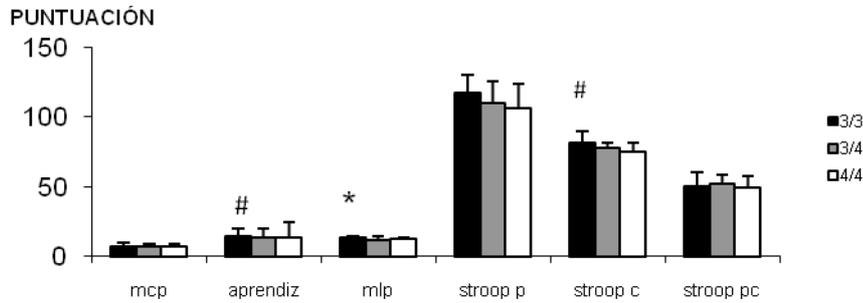


Gráfico 11. Diferencias entre las puntuaciones del test de memoria de Rey en sus tres apartados (mcp= memoria a corto plazo; aprendizaje; mlp= memoria a largo plazo o de retención) y entre las puntuaciones del test Stroop en sus tres apartados (p=palabras; c=colores; pc=palabrasxcolores) entre los sujetos con estudios universitarios divididos según correspondan al grupo de genotipo ApoE 3/3 (n=10), ApoE 3/4 (n=6) o 4/4 (n=5). Significación estadística expresada como sigue: (*) p=0,09 entre grupos 3/3 vs 3/4 y 4/4. # p=0,06 entre grupos 3/3 y 4/4.

3.- ApoE y relación con la depresión.

Todos los casos de depresión encontrados en nuestra muestra (5 en total, 3 con depresión leve reactiva y 2 con depresión moderada o severa), se encuentran entre los sujetos con al menos un alelo 4 de la ApoE, un 16% de los sujetos con ApoE 3/4 y un 13% de los sujetos 4/4, sin embargo los dos casos de depresión moderada-severa presentan ApoE 4/4 (Gráfico 12).

GRÁFICO 12. Genotipo ApoE y Síndrome depresivo

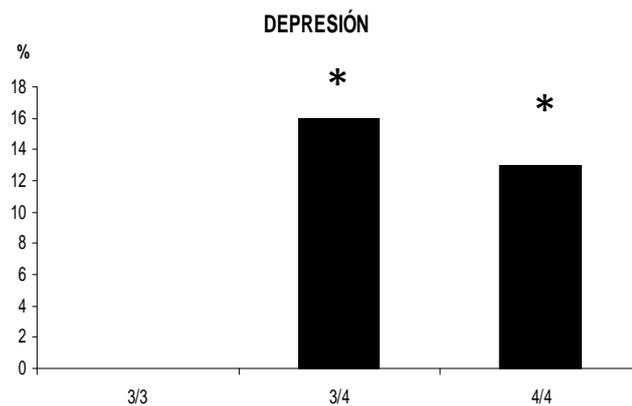


Gráfico 12. Porcentaje de sujetos con sndr. depresivo en los distintos grupos según genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=18; Apoe 3/4 n=15; ApoE 4/4 n=13). Diferencia significativa expresada como $p < 0,05$ en relación a grupo con ApoE 3/3.

4.- Resultados analíticos.

4.1 Colesterol:

Medimos mediante análisis clínicos el colesterol total, LDL y HDL-colesterol y cantidad de ApoE de 19 controles y 32 casos. Analizamos mediante kit de ELISA el colesterol oxidado en plasma y su porcentaje respecto al colesterol total. Dada la gran influencia del sexo sobre estos parámetros analizamos primeramente la diferencia entre hombres y mujeres y objetivamos que en los primeros existe mayor cantidad de colesterol total y de LDL-colesterol, menor HDL-colesterol y mayor cantidad de ApoE que en las mujeres (Gráfico 13). Dividimos cada uno de los grupos (hombres y mujeres) en dos subgrupos según sean casos o controles. No existen diferencias en el grupo de hombres (Gráfico 14), pero en el caso de las mujeres encontramos menor cantidad de HDL-colesterol en aquellas con alelo 4 de la ApoE respecto a aquellas con genotipo 3/3 (Gráfico 15).

La toma de estatinas puede ser un factor de confusión en nuestra muestra. Encontramos que el 8% de los sujetos con ApoE 4 toman dicha medicación en contraste con el 0% de los sujetos con

ApoE 3/3. Si eliminamos los sujetos en tratamiento con estatinas los resultados no varían.

4.2 Hemograma y metabolismo férrico:

4.2.1 Hemograma:

Mediante análisis clínicos medimos la cantidad de hematíes, hemoglobina y hematocrito en 19 controles y 33 casos. Como ocurría con el colesterol existen diferencias respecto al sexo siendo estos parámetros más altos en los hombres que en las mujeres (Gráfico 16). Al analizar las muestras de cada subgrupo no encontramos diferencias respecto al genotipo ApoE (Gráfico 17).

4.2.2 Metabolismo férrico:

Analizamos mediante análisis clínicos los niveles de hierro sérico, transferrina (transfer), índice de saturación de transferrina (ist) y ferritina en 30 casos y 18 controles. Igual que en los resultados analíticos anteriores encontramos dichos parámetros muy

influenciados por el sexo, encontrándose más elevados en los hombres el hierro sérico, ist y ferritina que en las mujeres y en éstas mayor cantidad de transferrina (Gráfico 18).

Cuando analizamos los resultados según el genotipo de la ApoE existe mayor cantidad de ferritina en los sujetos ApoE 3/3 respecto a los 3/4. Estos resultados se mantienen cuando realizamos la misma estadística en el subgrupo de los hombres (Gráfico 19), mientras que no encontramos diferencias en el de las mujeres (Gráfico 20).

4.3 Zinc y cobre:

Analizamos mediante análisis clínicos los niveles de cobre (cu) y zinc (zn) séricos en 15 controles y 31 casos de nuestra muestra. No existen diferencias en sus niveles respecto al genotipo ApoE. Sí que encontramos menores valores de cobre en los hombres respecto a las mujeres ($p < 0,001$). Cuando subdividimos la muestra en hombres y mujeres encontramos mayor cantidad de cobre en los sujetos 3/4 respecto a los 4/4 ($p = 0,07$). No existen diferencias en los valores de zinc por ApoE ni por sexos. (Gráficos 21-24).

GRÁFICO 13. Metabolismo colesterol según sexo.

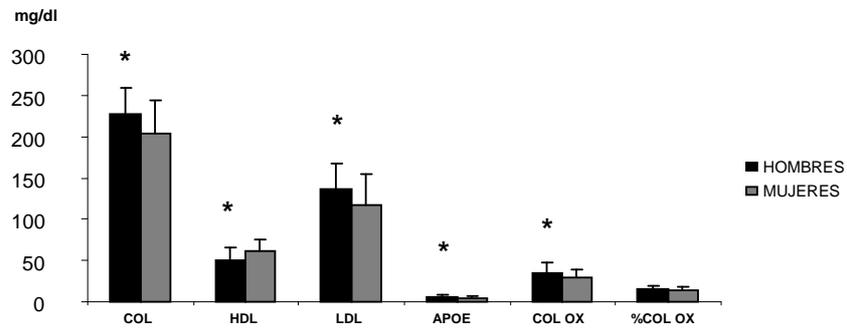


Gráfico 13. Diferencias entre distintos parámetros del metabolismo del colesterol (COL: colesterol total; HDL: HDL-colesterol; LDL: LDL-colesterol; COL OX: colesterol oxidado; %COL OX: porcentaje colesterol oxidado respecto al colesterol LDL) según sexo (hombres n=23; mujeres n=28). Significación estadística expresada como (*) $p < 0,05$ entre hombres y mujeres.

GRÁFICO 14. Metabolismo colesterol en hombres según ApoE

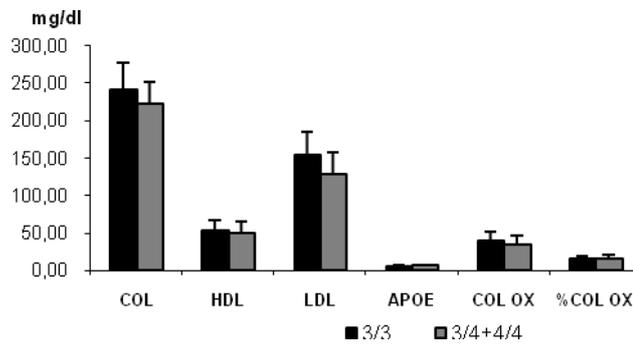


Gráfico 14. Diferencias entre distintos parámetros del metabolismo del colesterol (COL: colesterol total; HDL: HDL-colesterol; LDL: LDL-colesterol; COL OX: colesterol oxidado; %COL OX: porcentaje colesterol oxidado respecto al colesterol LDL) en el subgrupo de hombres según su genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=9; 3/4+4/4 n=13)

GRÁFICO 15. Metabolismo colesterol en mujeres según ApoE

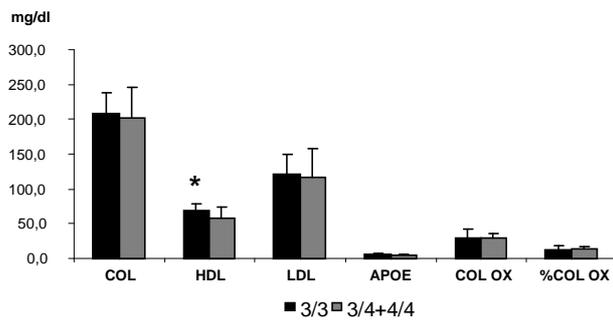


Gráfico 15. Diferencias entre distintos parámetros del metabolismo del colesterol (COL: colesterol total; HDL: HDL-colesterol; LDL: LDL-colesterol; COL OX: colesterol oxidado; %COL OX: porcentaje colesterol oxidado) en el subgrupo de mujeres según su genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=10; 3/4+4/4 n=14). Significación estadística expresada como (*) p<0,05.

GRÁFICO 16. Diferencias en el hemograma según sexos.

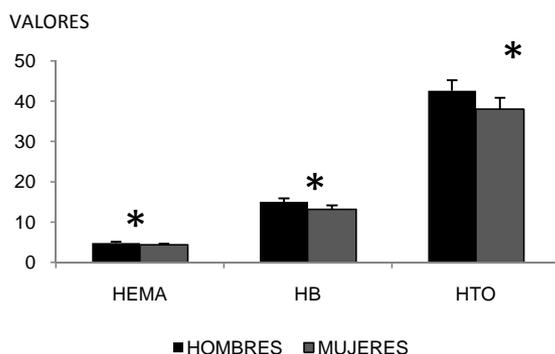


Gráfico 16. Diferencias en los valores de hemograma entre hombres (n=23) y mujeres (n=29). Dado que cada parámetro se expresa en unidades distintas, éstas se especifican como sigue: HEMA: nº hematíes ($\times 10^{12}/L$); HB: hemoglobina (gr/dL); HTO: hematocrito (%). La significación estadística se expresa como (*)= $p < 0,001$.

GRÁFICO 17. Diferencias en el hemograma según ApoE

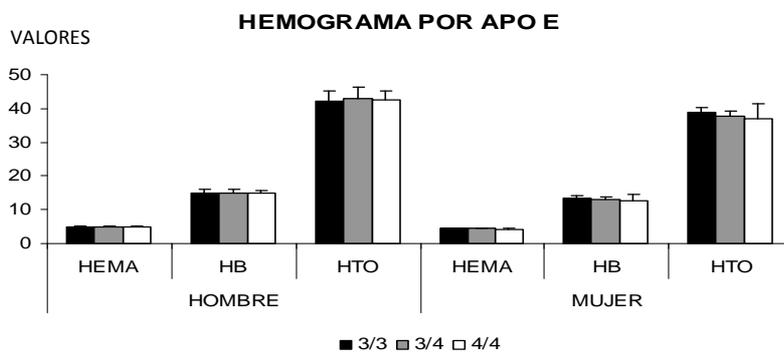


Gráfico 17. Diferencias en los valores de hemograma entre hombres y mujeres según su genotipo ApoE (ApoE 3/3 mujeres n=10, hombres n=9; ApooE 3/4 mujeres n=8, hombres n=6; ApoE 4/4 mujeres n=6, hombres n=7)

GRÁFICO 18. Diferencias en el metabolismo férrico según sexo

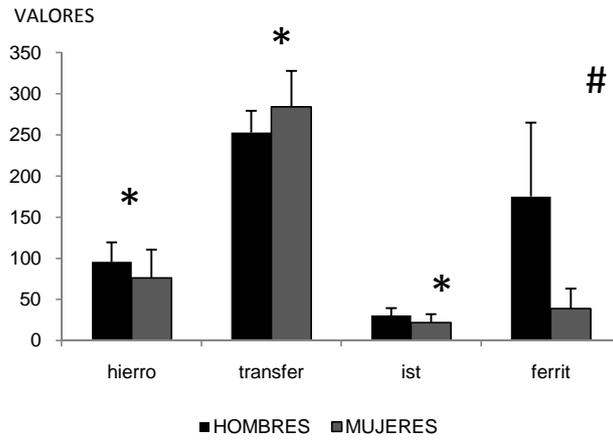


Gráfico 18. Diferencias en los valores de distintos parámetros del metabolismo férrico entre hombres (n=22) y mujeres (n=26). Dado que cada parámetro se expresa en unidades distintas, éstas se especifican como sigue: hierro (hierro sérico): $\mu\text{g/dL}$; transferrina: mg/dL ; ist (índice de saturación de transferrina): %; ferritina: ng/mL . La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$, (#) $p < 0,001$.

GRÁFICO 19. Metabolismo férrico en hombres según ApoE

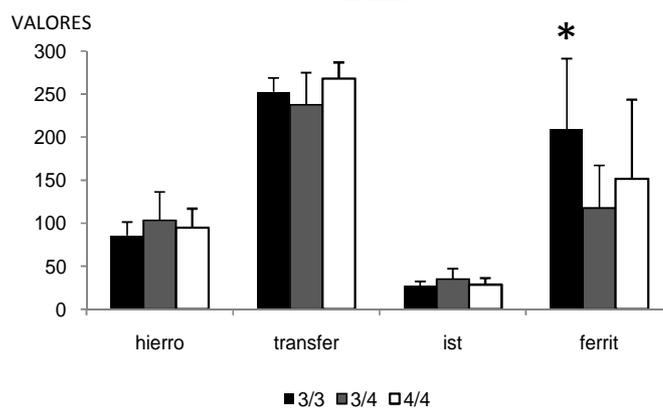


Gráfico 19. Diferencias en los valores de distintos parámetros del metabolismo férrico en el subgrupo de los hombres según genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=8; 3/4 n=6; 4/4 n=7). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ entre los grupos 3/3 y 3/4.

GRÁFICO 20. Metabolismo férrico en mujeres según ApoE

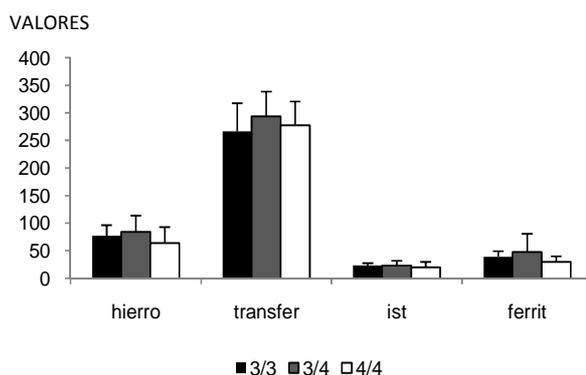


Gráfico 20. Diferencias en los valores de distintos parámetros del metabolismo férrico en el subgrupo de mujeres según genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=9; 3/4 n=8; 4/4 n=6).

GRÁFICO 21. Niveles de cobre y zinc según ApoE

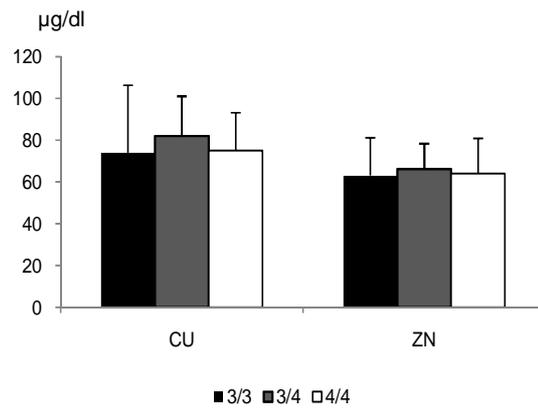


Gráfico 21. Diferencias en los niveles de cobre (CU) y zinc (ZN) en los distintos grupos según ApoE (ApoE 3/3 n=15; 3/4 n=15; 4/4 n=13)

GRÁFICO 22. Niveles de cobre y zinc según sexo.

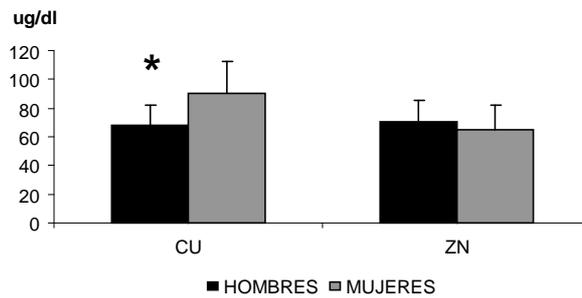


Gráfico 22. Diferencias en los niveles de cobre (CU) y zinc (ZN) en los distintos grupos según sexo (hombres n=20; mujeres n=26). Significación estadística expresada como (*) p<0,001.

GRÁFICO 23. Niveles de cobre y zinc en mujeres según ApoE

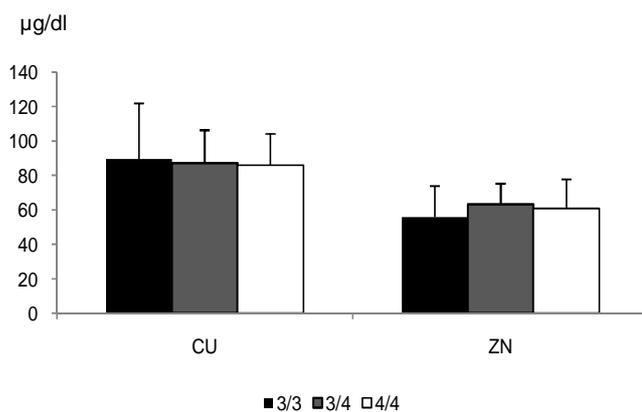


Gráfico 23. Diferencias en los niveles de cobre (CU) y zinc (ZN) en el subgrupo de mujeres según genotipo ApoE (3/3 n=8, 3/4 n=8, 4/4 n=6)

GRÁFICO 24. Niveles de cobre y zinc en hombres según ApoE

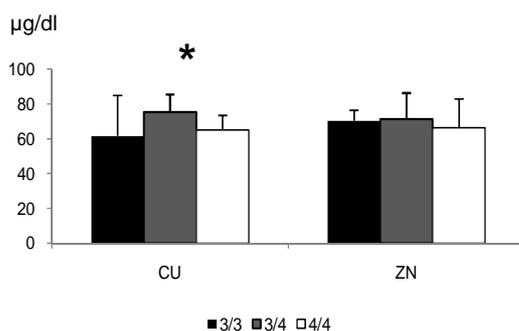


Gráfico 24. Diferencias en los niveles de cobre (CU) y zinc (ZN) en el subgrupo de hombres según genotipo ApoE (3/3 n=7, 3/4 n=6, 4/4 n=7). Significación estadística expresada como (*) p=0,07

5.- ApoE y estrés oxidativo.

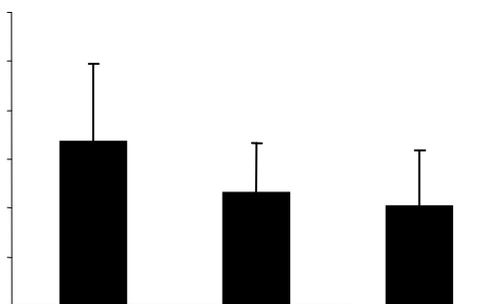
5.1. Glutación:

5.1.1 Glutación basal:

Al analizar los niveles de glutación en sangre total basal (la muestra se trata en el momento de la extracción) encontramos mayor glutación oxidado (GSSG) y un mayor ratio (GSSG/GSHX100) en los controles que en los casos siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Encontramos también menor cantidad de glutación reducido (GSH), aunque las diferencias no son significativas (Gáficos 25-27).

Cuando analizamos los resultados de glutación en los distintos subgrupos por ApoE encontramos menor cantidad de GSSG a mayor carga de alelo 4, con diferencias significativas entre los grupos 3/3 vs 4/4 (Gráfico 28). Lo mismo ocurre con el GSH (mas cantidad 4/4>3/4>3/3), aunque sin diferencias significativas (Gráfico 29).

No existen diferencias en los valores basales de glutación entre sexos, tampoco encontramos una correlación con la edad. Sí



que encontramos influencia del tabaquismo en los resultados, existiendo mayor cantidad de GSSG en los sujetos que fuman (65 vs 41 nmol/ml $p < 0.05$) así como menor cantidad de GSH (3.600 vs 4.100 nmol/ml). Por tanto repetimos los cálculos eliminando a los sujetos fumadores de la muestra y observamos que se mantiene el patrón de una mayor cantidad de GSSG y mayor ratio entre los controles respecto a los casos. Cuando realizamos subgrupos por ApoE encontramos menor GSSG y mayor GSH a mayor carga de alelo 4 de la ApoE.

GRÁFICO 25. Diferencia en niveles de glutatión oxidado (GSSG) en sangre basal entre casos y controles

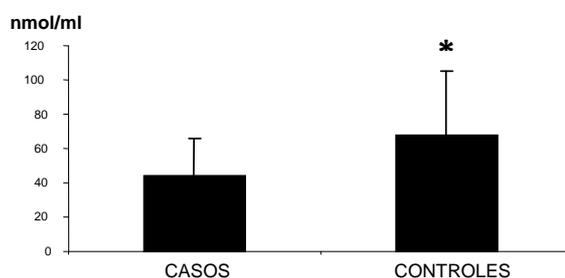


Gráfico 25. Diferencia en los niveles de GSSG en sangre basal (muestra procesada inmediatamente tras la extracción) entre los grupos casos (n=33) y controles (n=21). Significación estadística expresada como (*) p<0,05.

GRÁFICO 26. Diferencias entre ratio GSSG/GSH en sangre basal entre casos y controles.

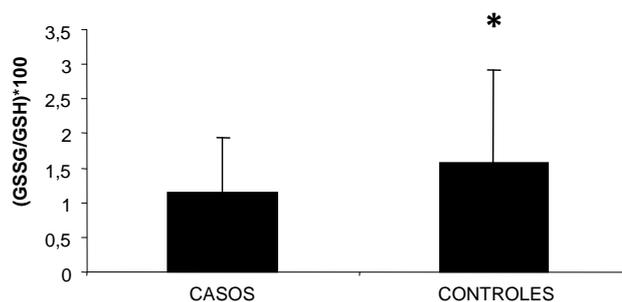


Gráfico 26. Diferencia en el ratio GSSG/GSH en sangre basal (muestra procesada inmediatamente tras la extracción) entre los grupos casos (n=33) y controles (n=21). Significación estadística expresada como (*) p<0,05.

GRÁFICO 27. Diferencias entre niveles de glutatión reducido (GSH) en sangre basal entre casos y controles.

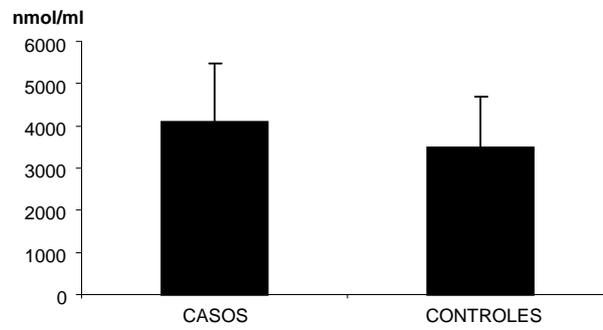


Gráfico 27. Diferencia en los niveles de GSH en sangre basal (muestra procesada inmediatamente tras la extracción) entre los grupos casos (n=33) y controles (n=21).

GRÁFICO 28. Diferencia en niveles de glutatión oxidado (GSSG) en sangre basal según ApoE

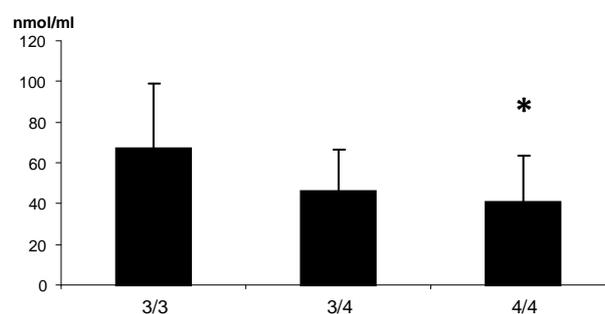


Gráfico 28. Diferencia en los niveles de GSSG en sangre basal (muestra procesada inmediatamente tras la extracción) entre los grupos según ApoE (ApoE 3/3 n =19, 3/4 n=15, 4/4 n=13). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ entre los grupos 3/3 vs 4/4.

GRÁFICO 29. Diferencia en niveles de glutatión reducido (GSH) en sangre basal según ApoE

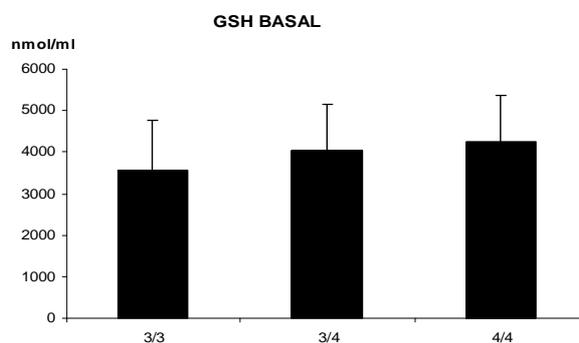


Gráfico 29. Diferencia en los niveles de GSH en sangre basal (muestra procesada inmediatamente tras la extracción) entre los grupos según ApoE (ApoE 3/3 n =19, 3/4 n=15, 4/4 n=13).

5.1.2 Glutación tras incubación con A β :

La sangre de cada paciente se dividió en dos partes, una de ellas es incubada durante 24 horas con A β 1-42 y la otra con su péptido control 42-1 a una concentración de 20 μ m. Se realizó este experimento con la sangre de 27 sujetos (17 casos y 10 controles). Lo primero que analizamos es si la incubación con el péptido A β resulta en un aumento de estrés oxidativo para nuestra muestra.

Como muestran los gráficos (Gráficos 30-31-32) existe mayor estrés oxidativo tras la incubación de la sangre, expresado tanto en aumento de GSSG y ratio y disminución de GSH (*= $p < 0,001$ valores basales en sangre procesada tras su extracción vs incubación con A β 1-42 o 42-1 24 horas), pero esta diferencia es la misma tanto si incubamos con A β 1-42 o con su péptido control A β 42-1, con lo cual el péptido A β 1-42 no ha resultado tóxico para nuestra muestra en términos de estrés oxidativo y lo que objetivamos es el efecto de una agresión común para las dos partes de la muestra como es la incubación durante 24 horas.

Posteriormente analizamos los cambios en los niveles de GSSG, GSH y ratio respecto a los niveles basales tras la incubación 24

horas y encontramos un mayor aumento de GSSG en los controles que en los casos junto con mayor aumento de ratio, sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas probablemente debido a un insuficiente tamaño muestral (Gráficos 33-34-35). Cuando dividimos la muestra por ApoE se observa una tendencia a presentar menor aumento de GSSG y ratio a mayor carga de alelo 4, pero sin significación estadística debido probablemente al número de casos insuficiente en cada grupo.

GRÁFICO 30. Diferencias en niveles de GSSG en sangre total tras incubación con A β 1-42 y 42-1 respecto a niveles basales.

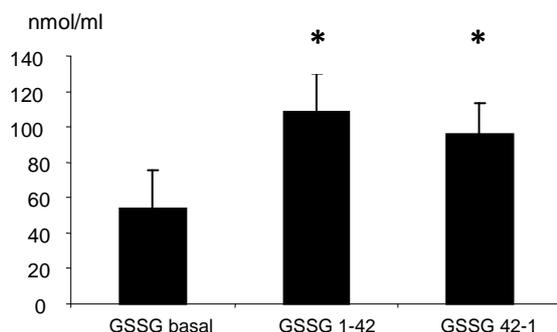


Gráfico 30. Diferencia de los niveles de GSSG entre sangre basal (procesada tras extracción), tras incubación 24 horas con A β 1-42 (GSSG 1-42) y tras incubación 24 horas con A β 42-1 (GSSG 42-1). n=27. Significación estadística expresada como (*) p<0,001 entre los grupos GSSG basal vs GSSG 1-42 y entre los grupos GSSG basal vs GSSG 42-1.

GRÁFICO 31. Diferencias en niveles de GSH en sangre total tras incubación con A β 1-42 y 42-1 respecto a niveles basales.

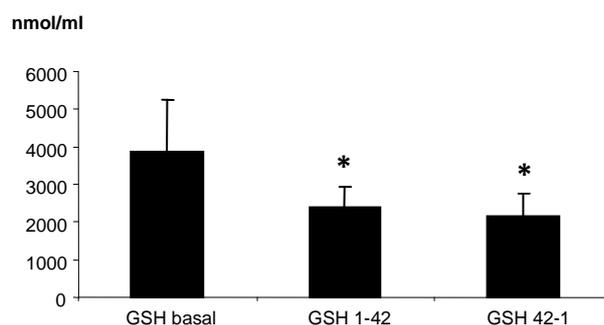


Gráfico 31. Diferencia de los niveles de GSH entre sangre basal (procesada tras extracción), tras incubación 24 horas con A β 1-42 (GSH 1-42) y tras incubación 24 horas con A β 42-1 (GSH 42-1). n=27. Significación estadística expresada como (*) p<0,001 entre los grupos GSH basal vs GSH 1-42 y entre los grupos GSH basal vs GSH 42-1.

GRÁFICO 32. Diferencias en ratio GSSG/GSH en sangre total tras incubación con A β 1-42 y 42-1 respecto a niveles basales.

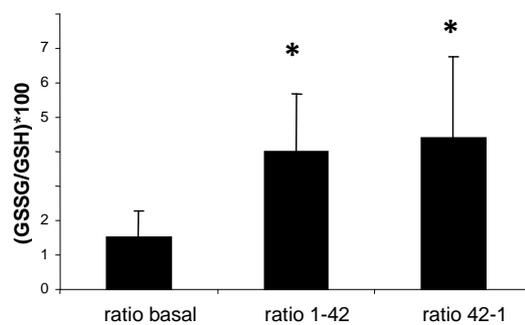


Gráfico 32. Diferencia en el ratio GSSG/GSH entre sangre basal (procesada tras extracción), tras incubación 24 horas con A β 1-42 (ratio 1-42) y tras incubación 24 horas con A β 42-1 (ratio 42-1). n=27. Significación estadística expresada como (*) p<0,001 entre los grupos ratio basal vs ratio 1-42 y entre los grupos ratio basal vs ratio 42-1.

GRÁFICO 33. Diferencias entre casos y controles en niveles de GSSG en sangre total tras incubación 24h

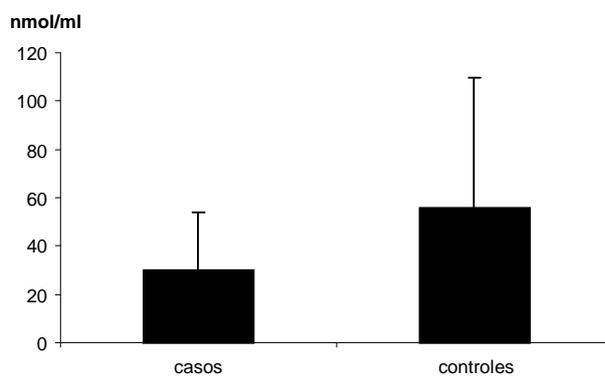


Gráfico 33. Diferencias entre los niveles de GSSG en sangre total tras incubación 24 horas entre casos (n=17) y controles (n=10).

GRÁFICO 34. Diferencias entre casos y controles en niveles de GSH en sangre total tras incubación 24h

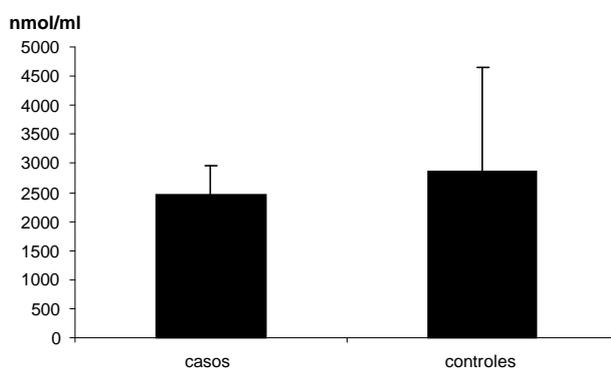


Gráfico 34. Diferencias entre los niveles de GSH en sangre total tras incubación 24 horas entre casos (n=17) y controles (n=10).

GRÁFICO 35. Diferencias entre casos y controles en ratio GSSG/GSH en sangre total tras incubación 24h

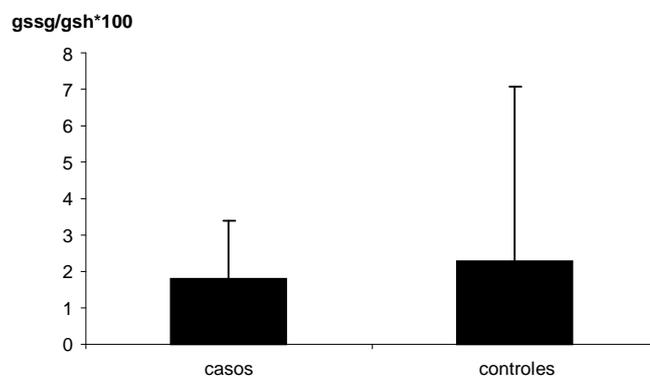


Gráfico 35. Diferencias entre el ratio GSSG/GSH en sangre total tras incubación 24 horas entre casos (n=17) y controles (n=10).

5.2 Enzimas antioxidantes:

Medimos por PCR la cantidad de ARN de distintas enzimas antioxidantes en linfocitos aislados. Tomando como referencia la cantidad existente en los controles, encontramos un aumento significativo en los casos para las enzimas de síntesis de glutatión (GCLC, GCLM) y glutatión peroxidasa (GPx) (Gráfico 36).

Cuando analizamos los resultados por ApoE, tomando como referencia el grupo de sujetos con genotipo 3/3, encontramos una tendencia a presentar mayor ARN para los enzimas SOD y GCLM en los sujetos ApoE 3/4 que en los 4/4 pero sin diferencias significativas estadísticamente, sin que existan diferencias en el resto (Gráfico 37).

GRÁFICO 36. Sobreexpresión de enzimas antioxidantes en los sujetos casos respecto a los controles.

Expresión relativa respecto a control.

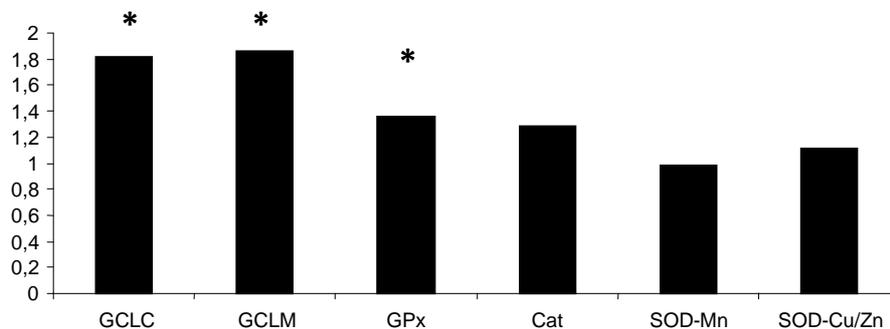


Gráfico 36. Comparación de la expresión relativa de ARN en los casos de nuestra muestra (n=28), medido por PCR, tomando como referencia los valores de los sujetos control (n=19), de distintos enzimas antioxidantes (GCLC: unidad catalítica de la glutamato cistein ligasa (GCL); GCLM: unidad moduladora de la GCL. GPx: glutatión peroxidasa; Cat: catalasa; SOD-Mn: superóxido dismutasa-manganeso; SOD-CU/ZN: superóxido dismutasa cobre/zinc). Significación estadística expresada como (*) $p < 0,05$ entre la expresión del enzima entre el grupo caso vs controles.

GRÁFICO 37. Sobreexpresión de enzimas antioxidantes en los sujetos casos respecto a los controles, según ApoE .

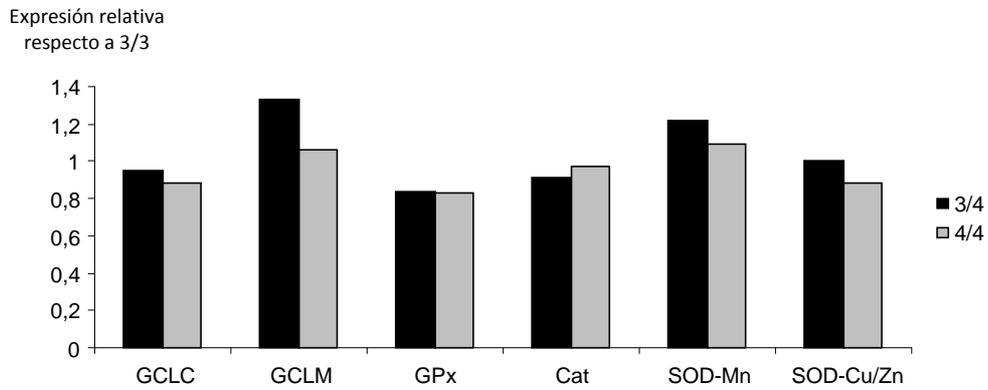


Gráfico 37. Comparación de la expresión relativa de ARN en los sujetos de nuestra muestra con ApoE 3/4 (n=15) y ApoE 4/4 (n=13), medido por PCR, tomando como referencia los valores de los sujetos con ApoE 3/3 (n=19), de distintos enzimas antioxidantes (GCLC: unidad catalítica de la glutamato cistein ligasa (GCL); GCLM: unidad moduladora de la GCL. GPx: glutatión peroxidasa; Cat: catalasa; SOD-Mn: superoxido dismutasa-manganeso; SOD-CU/ZN: superóxido dismutasa cobre/zinc).

5.3 Peróxidos:

Medimos peróxidos por citometría de flujo tanto en plaquetas como en linfocitos de las muestras de 16 controles y 26 casos, sin que encontráramos diferencias entre ambos grupos, tampoco existen diferencias entre los distintos genotipos de la ApoE. Incubamos las muestras de cada sujeto con A β 1-42 y A β 42-1 durante 24 horas y como ocurría en el caso del glutatión no encontramos diferencias entre incubar con el péptido tóxico o con su control y no existen diferencias significativas entre los niveles basales de peróxidos y tras la incubación en ninguno de los grupos.

6.- ApoE y muerte celular.

6.1 Caspasas:

Estudiamos el nivel de caspasas 3-7, proteínas iniciadoras de la cascada apoptótica, mediante microscopio confocal en linfocitos aislados tras incubación con A β 1-42 y A β 42-1 a una concentración de 20 μ m durante 24 horas. El experimento se realiza con las muestras de 11 controles y 16 casos. Los resultados se expresan en porcentaje de linfocitos que se marcan con el fluorocromo correspondiente. Primeramente comparamos los resultados de toda la muestra dependiendo si la incubación se realizó con A β 1-42 o A β 42-1 y no encontramos diferencias significativas, por lo tanto, el péptido A β no ha producido un aumento de activación de caspasas en nuestra muestra y lo que observamos es el llamado efecto de apoptosis espontánea al incubar los linfocitos 24 horas. Cuando comparamos los resultados entre casos y controles no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos (Gráfico 38).

6.2 Muerte celular:

Analizamos el porcentaje de linfocitos muertos por apoptosis mediante tinción con anexina y yoduro de propidio tras incubación con A β 1-42 y A β 42-1. Nuevamente encontramos el mismo porcentaje de muerte celular con ambos péptidos. Cuando analizamos el resultado entre casos y controles encontramos mayor porcentaje de muerte celular en los controles que en los casos (Gráfico 39).

No existe diferencias en el porcentaje de linfocitos marcados para caspasas ni diferencias en muerte celular cuando analizamos los datos según la edad de los sujetos, sí existe una mayor muerte celular en hombres que en mujeres, pero dado que existe similar porcentaje de mujeres en los grupos casos y controles, este hecho no influye en las diferencias encontradas en estos grupos. No obstante dividimos la muestra entre hombres y mujeres y comprobamos que se sigue manteniendo la tendencia de una mayor muerte celular en los controles que en los casos.

GRÁFICO 38. Activación de caspasas tras incubación 24h en los distintos genotipos ApoE.

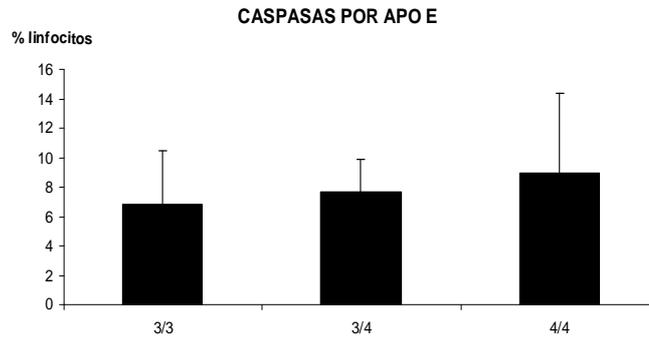


Gráfico 38. Diferencias entre porcentaje de linfocitos con activación de caspasas entre los distintos grupos según ApoE (ApoE 3/3 n=11, 3/4 n=9, 4/4 n=7)

GRÁFICO 39. Muerte celular por apoptosis tras incubación 24h en los distintos genotipos ApoE.

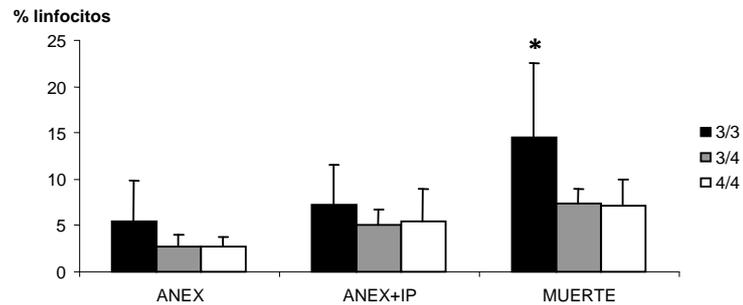


Gráfico 39. Diferencias entre porcentaje de linfocitos en apoptosis (ANEX: linfocitos marcados con anexina (apoptosis precoz); ANEX+IP: linfocitos marcados con anexina y yoduro de propidio (apoptosis tardía); MUERTE: apoptosis precoz+tardía) entre los distintos grupos según ApoE (ApoE 3/3 n=11, 3/4 n=12, 4/4 n=9). Significación estadística expresada como (*) $p < 0,05$ entre el grupo 3/3 vs 3/4 y 4/4.

7.- ApoE y alteración mitocondrial.

7.1 Mitocondrias de plaquetas:

Estudiamos el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en plaquetas de las muestras obtenidas de 35 sujetos (13 controles y 22 casos), tras incubación con A β 1-42 y A β 42-1, por citometría de flujo, estudiado como la cantidad de fluorescencia roja emitida por el fluorocromo JC-1. No encontramos diferencias del PMM en plaquetas tras incubar con A β 1-42 vs su péptido control. Encontramos un mayor PMM en los casos que en los controles (Gráfico 40). Cuando realizamos subgrupos según el genotipo ApoE encontramos una tendencia a presentar mayor PMM a mayor carga de ApoE 4 (Gráfico 41). No existen diferencias respecto al sexo ni la edad. No existen diferencias respecto a la morfología y tamaño de las mitocondrias entre los distintos grupos.

7.2 Mitocondrias de linfocitos:

Comparamos el PMM de las muestras obtenidas de 35 sujetos (13 controles y 22 casos), tras incubación con A β 1-42 y A β 42-1, medido por citometría de flujo, estudiado como la cantidad de

fluorescencia roja emitida por el fluorocromo JC-1, de linfocitos aislados entre los grupos casos y controles y entre los grupos por genotipo ApoE sin que existan diferencias entre ellos. No encontramos diferencias del PMM en plaquetas tras incubación con A β 1-42 vs su péptido control. Tampoco encontramos diferencias entre la morfología y tamaño de las mitocondrias de los distintos grupos.

7.3 Liberación de citocromo C:

Determinamos por kit de ELISA la cantidad de citocromo C en sobrenadante de muestra de linfocitos y plaquetas incubados con A β 1-42 y 42-1, en 14 controles y 32 casos, y objetivamos mayor cantidad de citocromo C en las muestras de los sujetos controles respecto a nuestros casos (Gráfico 42), sin llegar a ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,08$). Como en anteriores experimentos, no existe diferencia en los valores de citocromo C si la muestra se incubaba con el péptido A β 1-42 o con su péptido control A β 42-1.

GRÁFICO 40. Diferencias en potencial de membrana mitocondrial (PMM) en plaquetas entre casos y controles tras incubación 24h.

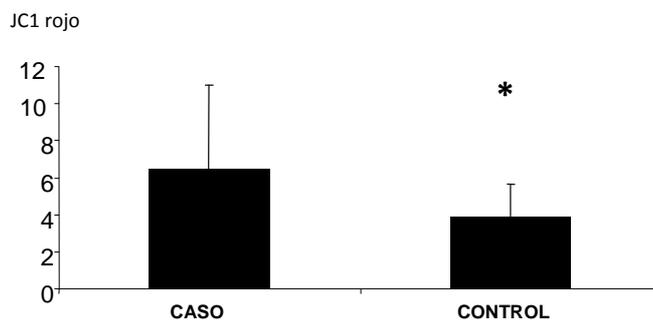


Gráfico 40. Diferencia en el PMM de plaquetas medido por citometría de flujo entre casos (n=22) y controles (n=13) tras incubación 24 hora. Significación estadística expresada como (*) p<0,05.

GRÁFICO 41. Diferencias en PMM en plaquetas entre grupos por ApoE tras incubación 24h.

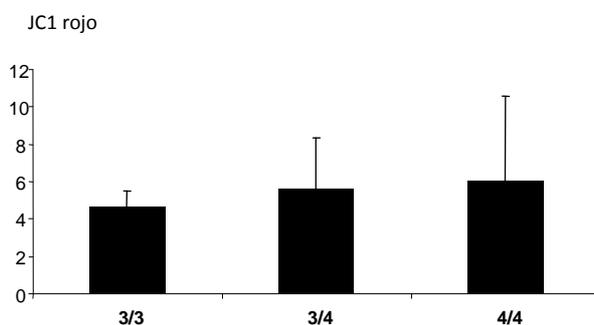


Gráfico 41. Diferencia en el PMM de plaquetas medido por citometría de flujo entre los distintos grupos según genotipo ApoE (3/3 n=13, 3/4 n=11, 4/4 n=11) tras incubación 24h.

GRÁFICO 42. Diferencia entre casos y controles en cantidad de citocromo C en muestra de linfocitos y plaquetas incubados 24h

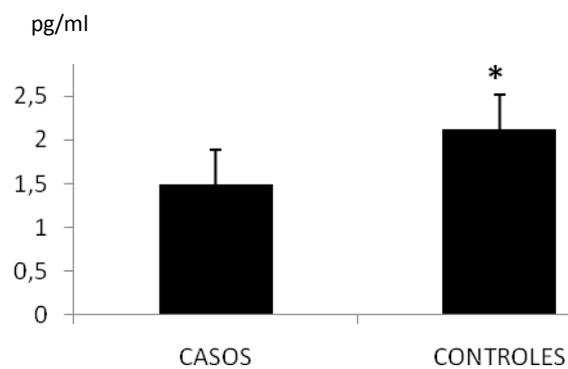


Gráfico 42. Diferencia de cantidad de citocromo C medido por método ELISA de muestras de linfocitos y plaquetas incubados 24 horas, entre casos (n=32) y controles (n=14). Significación estadística expresada como (*) $p=0,08$.

8.- ApoE y enzimas relacionadas con la fosforilización de la proteína

tau.

Analizamos por PCR la expresión de ARN de genes relacionados con la fosforilación de la proteína tau como son RCAN (proteína reguladora de la calcineurina) 1.1 y 1.4, calcineurina, PKR (proteín-quinasa dependiente de RNA) y GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β) en muestra de linfocitos aislados. Tomando como referencia los resultados en los sujetos 3/3, encontramos mayor expresión de dichas enzimas en los sujetos con ApoE 3/4, siendo esta expresión mayor en los sujetos con ApoE 4/4 (Gráfico 43).

Por electroforesis y western blotting cuantificamos la cantidad de calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3 β en muestra de linfocitos aislados diferenciando 3 grupos respecto ApoE. Encontramos mayor cantidad de calcineurina y GSK3 β en sujetos con 1 o 2 alelos 4 de la ApoE respecto a los sujetos con ApoE 3/3. Respecto a RCAN 1.4, encontramos mayor cantidad de proteína en sujetos ApoE 4/4 respecto a 3/3 y 3/4 (Gráfico 44).

GRÁFICO 43. Sobreexpresión de enzimas relacionadas con la fosforilización de tau en sujetos con ApoE 3/4 y 4/4 respecto a sujetos 3/3.

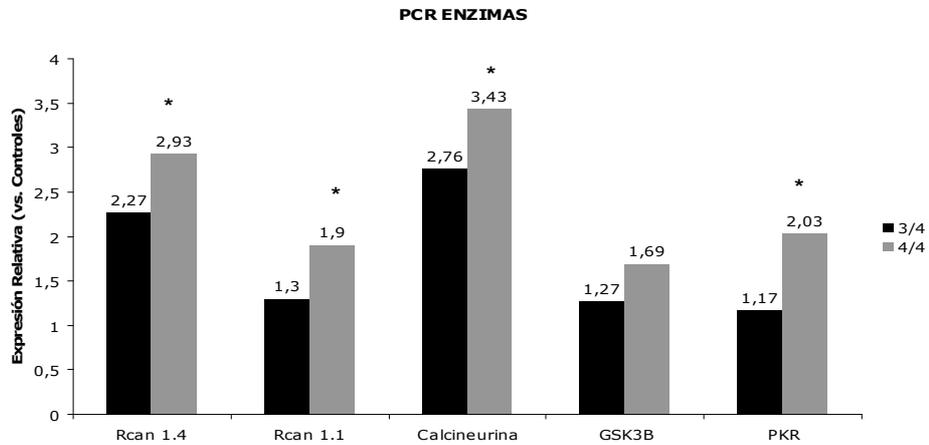


Gráfico 43. Comparación de la expresión relativa de ARN en los sujetos de nuestra muestra con ApoE 3/4 (n=15) y ApoE 4/4 (n=13), medido por PCR, tomando como referencia los valores de los sujetos con ApoE 3/3 (n=19), de distintas enzimas relacionadas con la proteína tau (RCAN: proteína reguladora de la calcineurina, calcineurina, PKR: protein-kinasa dependiente de RNA y GSK3 β : glucógeno sintasa kinasa 3 β). Significación estadística expresada como (*) $p < 0,05$ entre la expresión del enzima entre el grupo ApoE 3/4 y 4/4 vs el grupo con ApoE 3/3.

GRÁFICO 44. Cuantificación de proteínas relacionadas con la fosforilización de tau según genotipo ApoE.

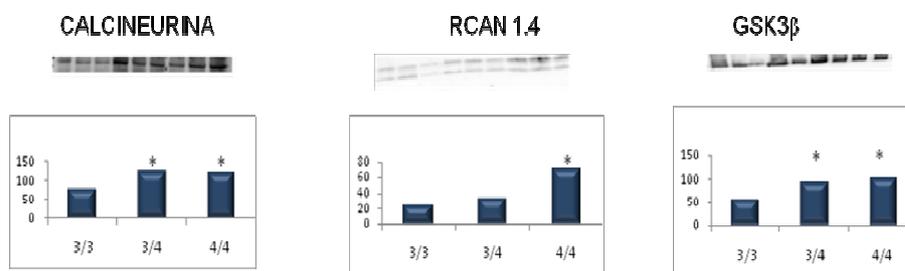


Gráfico 44. Cuantificación de calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3β por electroforesis y Western blotting en sujetos con genotipo ApoE 3/3 (n=9), ApoE 3/4 (n=9) y ApoE 4/4 (n=9). Aumento estadísticamente significativo de calcineurina y GSK3β en grupos 3/4 y 4/4 respecto a 3/3. Aumento estadísticamente significativo de RCAN 1.4 en sujetos 4/4 respecto a 3/3 y 3/4. *p<0.05.

9.- Enzimas antioxidantes y enzimas relacionados con tau en sujetos con Enfermedad de Alzheimer.

Realizamos por PCR medición de expresión de enzimas antioxidantes y de relación con fosforilación de tau en 11 sujetos con Enfermedad de Alzheimer y que presenten al menos un alelo 4 de la ApoE, comparado con controles del mismo sexo y edad. Encontramos mayor expresión de RCAN 1.4 y calcineurina y menor expresión de enzimas de síntesis de glutatión (Gráficos 44 y 45).

GRÁFICO 45. Expresión relativa en sujetos con EA, respecto a controles, de enzimas antioxidantes.

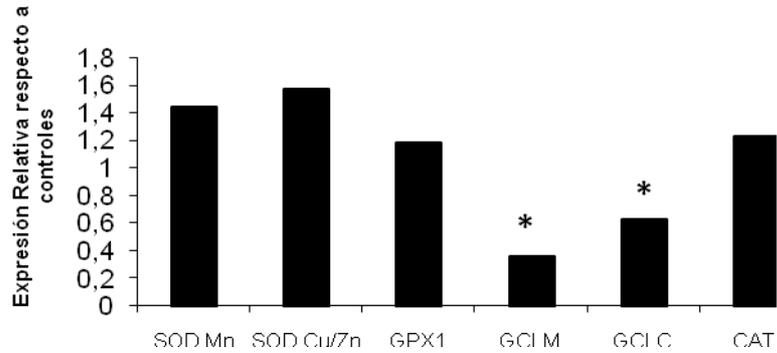


Gráfico 44. Comparación de la expresión relativa de ARN en sujetos con EA y al menos un alelo 4 de la ApoE (n=11), medido por PCR, tomando como referencia los valores de sujetos control (n=8), de distintas enzimas antioxidantes (SOD-Mn: superóxido dismutasa-manganeso; SOD-CU/ZN: superóxido dismutasa cobre/zinc; GPx: glutatión peroxidasa; GCLC: unidad catalítica de la glutamato cistein ligasa (GCL); GCLM: unidad moduladora de la GCL.; Cat: catalasa). Significación estadística expresada como (*) $p < 0,05$ entre la expresión del enzima entre casos vs controles.

GRÁFICO 46. Expresión relativa en sujetos con EA, respecto a sujetos control, de enzimas relacionadas con fosforilización de tau.

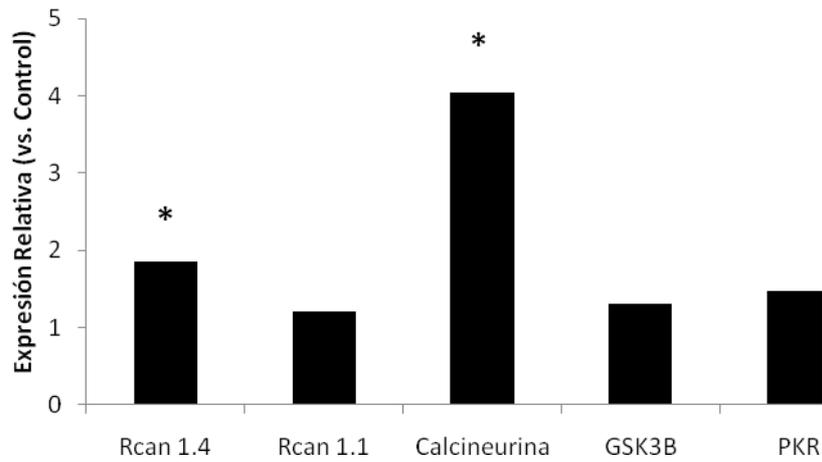


Gráfico 45. Comparación de la expresión relativa de ARN en sujetos con EA y al menos un alelo 4 de la ApoE (n=11), medido por PCR, tomando como referencia los valores de sujetos control (n=8), de distintas enzimas relacionadas con la proteína tau (RCAN: proteína reguladora de la calcineurina, calcineurina, PKR: protein-kinasa dependiente de RNA y GSK3 β : glucógeno sintasa kinasa 3 β). Significación estadística expresada como (*) p<0,05 entre la expresión del enzima entre casos vs controles.

10. ApoE y marcadores de inflamación.

Medimos por kit de ELISA los niveles de TNF α de suero de sangre total incubada durante 24 horas con péptido A β 1-42 y 42-1 y estimulada con lipopolisacáridos (LPS), en 10 controles y 23 casos. Como ha ocurrido en otros experimentos, no encontramos diferencias en los niveles de TNF α tras incubación con el péptido tóxico o con su péptido control.

Al comparar entre los distintos grupos según su genotipo ApoE, encontramos una tendencia a presentar menores niveles de TNF α en los sujetos con genotipo 4/4 respecto a los 3/3 y 3/4 (Gráfico 46) sin llegar a ser estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,07$).

GRÁFICO 47. Niveles de TNF α según genotipo ApoE tras incubación de sangre total con A β

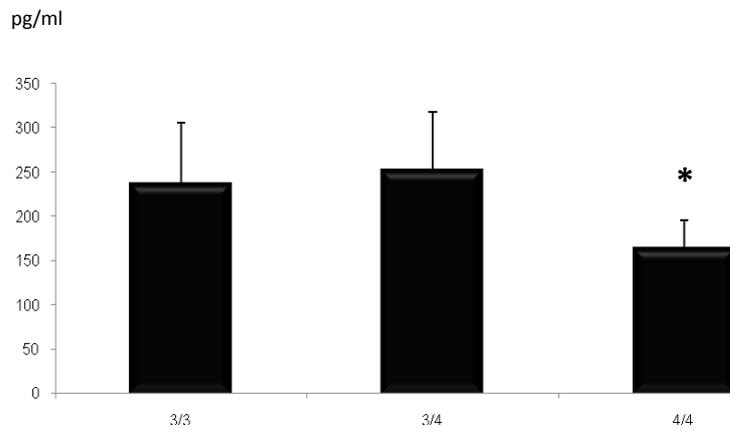


Gráfico 46. Diferencias de los niveles de TNF α medidos mediante ELISA entre los distintos grupos según genotipo ApoE (ApoE 3/3 n=10, 3/4 n=11, 4/4 n=12). Significación estadística expresada como (*) p=0,07.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- Genotipo ApoE y cognición.

1.1 Quejas subjetivas de memoria:

En nuestra muestra encontramos diferencias significativas entre el porcentaje de sujetos que presentan quejas subjetivas de memoria y son portadores de al menos un alelo de la ApoE frente a los sujetos que no lo son. Se ha investigado y descartado la posibilidad de que en este hecho influyera el antecedente de depresión, más prevalente en nuestros sujetos con ApoE 4, el sexo o la edad. No obstante estos datos han de tomarse con cautela dado que se trata de un síntoma cargado de subjetividad y nuestros casos son hijos de pacientes con EA por lo que pueden estar más condicionados a darle más importancia a fallos de memoria banales.

Otros autores han descrito previamente una correlación similar a la que nosotros encontramos. Stewart y cols. en un trabajo publicado en *Neurology*, encuentran una correlación entre ApoE 4 y fallos subjetivos de memoria en 1049 pacientes sin demencia, en resultados ajustados a la presencia de depresión y quejas somáticas (Stewart R y cols., 2001). Nuestros datos corroborarían estos estudios.

1.2 Test Neuropsicológicos:

Uno de los primeros déficits cognitivos observados en la EA son los problemas de atención y de memoria reciente y de trabajo, es por eso que decidimos elegir el test de Stroop, que mide atención y funciones frontales, y el test de memoria de Rey para valorar memoria inmediata, aprendizaje y memoria diferida.

En nuestra muestra hemos encontrado que en ambos test, y como ya está descrito en la literatura, influyen de forma importante tanto la edad como el nivel educacional, presentando peores puntuaciones los sujetos mayores de 40 años respecto a los de menor edad y menor puntuación a menor nivel educativo.

Respecto a la influencia del genotipo ApoE sobre los resultados en los test cognitivos, encontramos peores puntuaciones en los sujetos 4/4. Estas diferencias son más claras cuando se analiza el subgrupo de sujetos con estudios universitarios, quizá por ser un grupo más homogéneo respecto a cognición.

Estos datos van a favor de los estudios que diversos autores han realizado en sujetos no dementes y que les ha llevado a la conclusión de que podría existir un “fenotipo cognitivo” asociado al

genotipo 4 de la ApoE. Así existen estudios en sujetos jóvenes que demuestran una menor puntuación en test de atención (Greenwood PM y cols., 2000), menor memoria verbal (Flory JD y cols., 2000) y de trabajo (Parasuraman R y cols., 2002) en sujetos portadores del alelo 4 de la ApoE.

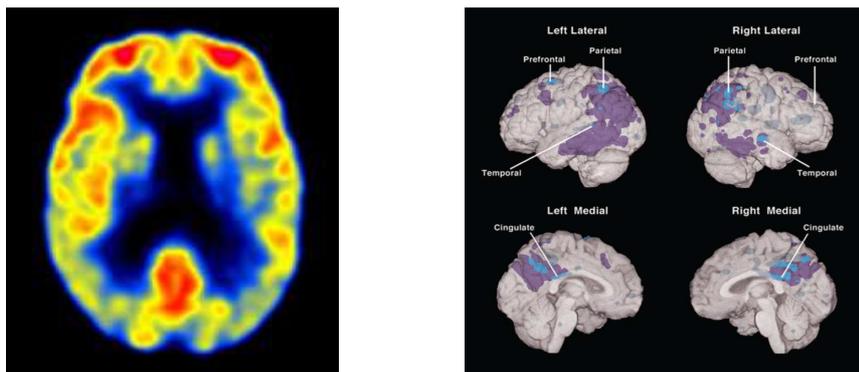
También se han realizado estudios cognitivos en sujetos ancianos no dementes en relación su genotipo ApoE. Así se ha encontrado relación entre ApoE 4 y peores resultados en test cognitivos en estos sujetos (Baxter LC y cols., 2003).

1.2.1 Técnicas de imagen:

Existen estudios en la literatura realizados con técnicas de imagen que apoyan los resultados de los estudios neuropsicológicos antes comentados, en los que se relaciona el genotipo 4 de la ApoE con mayor atrofia cerebral en sujetos no dementes (Wishart HA y cols., 2006; Lind J y cols., 2006). También en sujetos jóvenes con ApoE 4 se han realizado estudios con resonancia magnética cerebral funcional, SPECT y PET cerebral, y mientras unos autores encuentran una disminución en la activación de zonas característicamente

alteradas en la EA (Reiman EM y cols., 2004), otros hallan todo lo contrario, sugiriendo así un mecanismo compensatorio (Wishart HA y cols., 2006). En sujetos ancianos no dementes se ha asociado a mayor atrofia cerebral del lóbulo temporal mesial (Lemaître H y cols., 2005) y menor metabolismo cerebral por PET en áreas parieto-temporales (Reiman EM y cols., 1996).

Figura 9. Hipometabolismo en regiones parieto-temporales.



2.- Genotipo ApoE y síndrome depresivo

Un total de 5 sujetos presentaban sintomatología depresiva, 3 de ellos depresión leve reactiva y 2 de ellos depresión moderada-severa que precisaba medicación y controles por psiquiatra. Los 5 sujetos presentan al menos un alelo 4 de la ApoE y los dos sujetos con depresión moderada-severa pertenecen al grupo 4/4 de la ApoE.

En la bibliografía encontramos que existe una asociación entre ApoE 4 y depresión tanto en sujetos dementes (Delano-Wood L y cols., 2008) como en sujetos no dementes (Yen YC y cols., 2008). Además se ha encontrado un efecto protector del alelo 2 de la ApoE frente a depresión mayor (Fan PL y cols., 2006). Por tanto nuestros datos estarían a favor de un efecto favorecedor de la ApoE 4 sobre el síndrome depresivo y además dosis dependiente, siendo de mayor gravedad la depresión en los sujetos homocigotos.

Numerosos autores han intentado explicar esta relación entre depresión y genotipo ApoE, así algunos piensan que en los sujetos dementes con ApoE 4 existiría una mayor densidad de placas de amiloide en regiones cerebrales importantes en regular la emoción como es el sistema límbico (Roses AD, 1994). Otro tema es

la relación entre ApoE 4 y depresión en ancianos no dementes, que muchos autores han atribuido a que el alelo 4 de la ApoE es un factor de riesgo vascular y por tanto de la depresión de inicio en el anciano, la llamada “hipótesis de la depresión vascular” (Lavretsky H y cols., 2000; Alexopoulos GS y cols., 1997). Sin embargo otros estudios han demostrado que la ApoE 4 se relaciona con la depresión de inicio en la vejez de forma independiente a los factores de riesgo vascular (Yen YC y cols., 2007).

Se ha constatado que en los ancianos sin deterioro cognitivo y con depresión no sólo de inicio tardío sino también de inicio precoz en la vida existe un menor tamaño hipocampal que en los controles (Hickie I y cols., 2005) y también existen estudios, como comentábamos antes, que asocian ApoE 4 con un menor tamaño hipocampal y un menor rendimiento en test cognitivos dependientes del hipocampo en sujetos jóvenes (Lind J y cols., 2006). Un reciente trabajo de Kok y cols. en el que estudiaban los cerebros tras autopsia de 603 sujetos de todas las edades, asegura que el acúmulo de lesiones cerebrales relacionadas con la EA, en especial las placas seniles, se empieza a producir en la edad media de la vida en los sujetos con genotipo ApoE 4 (Kok E y cols., 2009).

Por tanto una posible causa de la relación entre ApoE 4 y depresión sería que ésta se asocia a un menor volumen del hipocampo y un mayor acúmulo de amiloide, lo que conllevaría a un peor rendimiento de dicha región cerebral que se manifiesta tanto en funciones cognitivas como emocionales, con resultado de peores puntuaciones en test cognitivos y una mayor predisposición a trastornos del ánimo como la depresión.

3.- Genotipo ApoE y resultados analíticos.

3.1 Colesterol:

ApoE 4 es un factor de riesgo vascular y se asocia a niveles mayores de LDL y menores de HDL-colesterol (Leon AS y cols., 2004). Además se ha demostrado que cifras altas de colesterol aumentan el riesgo de padecer EA (Anstey KJ y cols., 2008). En nuestra muestra encontramos mayores cifras de colesterol total y de LDL-colesterol, así como menores cifras de HDL-colesterol en los varones respecto a las mujeres. Cuando analizamos cada subgrupo según genotipo ApoE no existen diferencias entre los hombres y sí que encontramos menores niveles de HDL entre las mujeres con ApoE 4. El 8% de

nuestros casos se encuentran en tratamiento con estatinas y el 16% han recibido el diagnóstico de dislipemia en algún momento de su vida en contraste con el 0% en nuestros controles. Todo ello indica una mayor tendencia a la dislipemia en los sujetos con ApoE 4 de nuestra muestra.

Existen muchos estudios que relacionan el colesterol con la patología de la EA (Stefani M y Liguri G, 2009). El colesterol se dispone en las células, y por supuesto en las neuronas, formando microdominios donde actúan múltiples proteínas y se conoce que la beta y gamma secretasa, es decir, la vía amiloidogénica de la APP actúan en estos microdominios, mientras que la alfa secretasa o vía no amiloidogénica lo hace fuera de éstos, por tanto a mayor colesterol en la membrana celular más se favorece la producción de A β (Liu WW y cols., 2009) (figura 10). La ApoE tiene como función el transporte lipídico entre las células contribuyendo así a la reparación de las membranas, reinervación y sinaptogénesis. ApoE 4 sería la isoforma menos efectiva en esta función produciéndose una disminución de la sinaptogénesis y reparación de membranas, un aumento de colesterol en las mismas con la consecuente facilitación de la vía amiloidótica de la APP (Hirsch-Reinshagen V y cols., 2009).

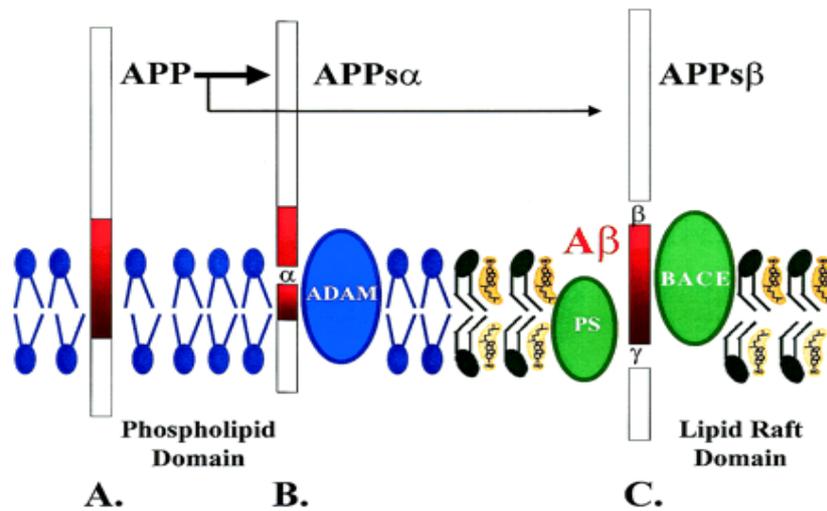


Figura 10. Influencia de los microdominios de colesterol en las membranas celulares en la proteólisis de APP y producción de Aβ. ADAM=α-secretasa; PS=γ-secretasa; BACE=β-secretasa.

3.2 Hemograma y metabolismo férrico:

No encontramos diferencias en la cantidad de hematíes, hemoglobina ni hematocrito en los distintos grupos según ApoE. Sí encontramos diferencias significativas respecto al sexo con mayor tendencia a la anemización en las mujeres probablemente secundarias a pérdidas menstruales ya que las mujeres de nuestra muestra son jóvenes y en periodo fértil.

Encontramos menores depósitos de hierro en las mujeres que en los hombres en nuestra muestra, como hemos comentado anteriormente debido probablemente a pérdidas menstruales. Cuando analizamos por subgrupos respecto al sexo encontramos mayor cantidad de ferritina en los sujetos varones 3/3 respecto a los 3/4 y 4/4.

Se ha encontrado una asociación entre menores niveles de hierro sérico y EA (Basun H y cols., 1991), existe otro estudio que objetivaba menores niveles de transferrina y similares niveles de ferritina que en los controles también en sujetos con EA (Fischer P y cols., 1997). No hemos hallado en la bibliografía estudios previos que describan una correlación entre el genotipo ApoE y el metabolismo férrico en sujetos jóvenes.

3.3 Zinc y cobre:

Encontramos en la bibliografía estudios que relacionan la EA con niveles elevados de cobre y zinc y estos niveles son más elevados en los sujetos con EA y genotipo ApoE 4 (Squitti R y cols., 2002; González C y cols., 1999). No encontramos en la bibliografía estudios

que relacionen el genotipo ApoE con los niveles séricos de cobre y zinc en sujetos sanos. En nuestra muestra no encontramos diferencias de estos metales entre casos y controles, únicamente encontramos mayores niveles de cobre entre los sujetos 3/4 respecto a los 4/4 en el subgrupo de los hombres, pero sin diferencias respecto a los sujetos 3/3, lo cual nos induce a pensar que no existe relación entre los niveles de cobre y zinc y el genotipo ApoE en sujetos jóvenes.

Sí que encontramos mayores niveles de cobre en mujeres respecto a los varones, lo que ya se ha descrito con anterioridad en estudios poblacionales (Farzin L y cols., 2008).

4.- Genotipo ApoE y estrés oxidativo.

4.1 Glutación:

Desde hace años se conoce la relación entre EA y estrés oxidativo como comentábamos en la introducción. Lloret A y cols. demostraron que los sujetos con EA presentaban mayor cantidad de glutación oxidado que los sujetos no dementes de igual sexo y edad.

Además este aumento de glutatión oxidado era mayor a mayor grado de demencia (Lloret A y cols., 2009) (Gráfico 47).

Gráfico 48. Glutatión y deterioro cognitivo.

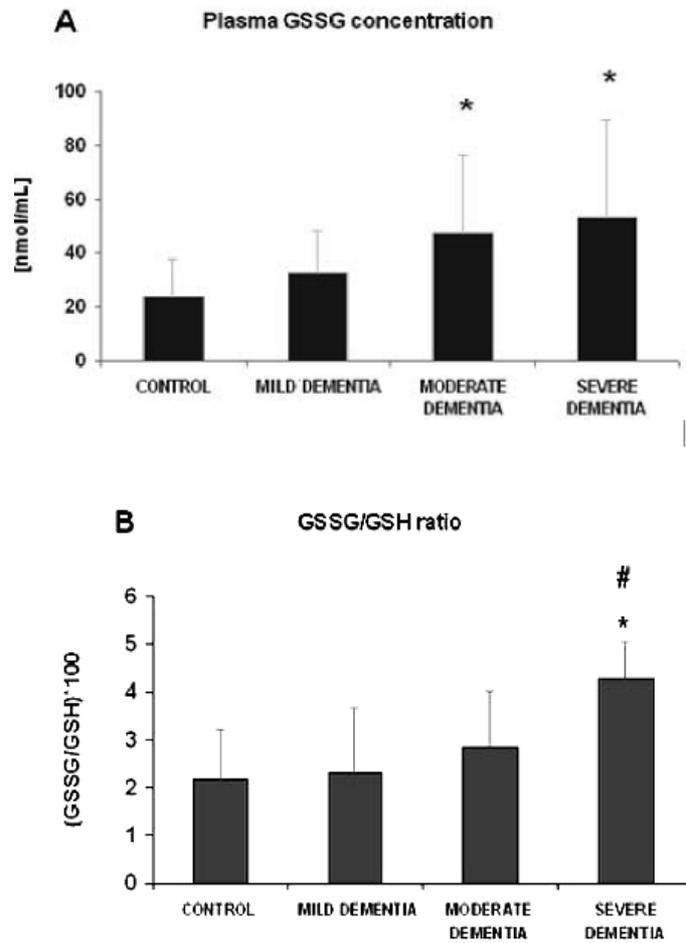


Gráfico 47. Relación entre glutatión oxidado (GSSG) (A) y ratio GSSG/GSH (B) con el diagnóstico de demencia y el grado de deterioro cognitivo.

El alelo 4 de la ApoE ha sido asociado a mayor cantidad de radicales libres (Ihara Y y cols., 2000), mayor oxidación proteica inducida por hierro (Mazur-Kolecka B y cols., 2006) y un aumento en los parámetros de oxidación intracelular en sujetos con EA y con deterioro cognitivo ligero (Baldeiras I y cols., 2008). Kharrazi y cols. demostraron una disminución del estatus antioxidante total, de actividad de catalasa y de glutatión peroxidasa junto con un aumento de la Cu-Zn superoxidodismutasa eritrocitaria en los sujetos con EA respecto a controles, y que este patrón era más marcado en los sujetos con EA y portadores de la ApoE 4 (Kharrazi H y cols., 2008). Todo ello se ha postulado que puede ser secundario al hecho de que la ApoE tiene función antioxidante y que el alelo 4 muestra un déficit en esta función respecto al resto de alelos, así como que la ApoE puede ser un modulador de la toxicidad del péptido A β (Lauderback CM y cols., 2002). No hemos encontrado estudios que asocien el genotipo ApoE con parámetros de estrés oxidativo en sujetos jóvenes, por lo que en este sentido nuestro trabajo es totalmente original.

Nuestros resultados muestran, al contrario de lo que cabría esperar, una mayor cantidad de glutatión oxidado en los sujetos

sanos con ApoE 3/3 respecto a los sujetos con al menos un alelo 4 de la ApoE. Además encontramos una tendencia a presentar mayor aumento de glutatión oxidado tras incubación 24 horas en los sujetos controles, sugiriendo, junto con otros resultados que comentaremos posteriormente, que los sujetos portadores de la menos un alelo 4 de la ApoE no sólo presentan menor estrés oxidativo en situación basal sino que además, sus células son más resistentes a agresiones externas, pareciendo que este efecto es dependiente del número de alelos 4 que posea el individuo (mejores resultados en 4/4 que en 3/4).

Conocemos que el alelo 4 de la ApoE presenta una menor capacidad antioxidante que el alelo 3, por lo que decidimos estudiar otros sistemas antioxidantes para valorar si nos encontramos ante una situación de sobrecompensación, ya que no olvidemos que el estudio se realiza en sujetos jóvenes y sanos.

4.2 Enzimas antioxidantes.

Midiendo por PCR en linfocitos aislados encontramos sobreexpresión de todos los enzimas antioxidantes estudiados en

nuestros sujetos “casos” respecto a los sujetos “controles”: enzimas de síntesis de glutatión (GCLC, GCLM), glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, siendo esta diferencia significativa para las enzimas de síntesis de glutatión y glutatión peroxidasa.

Estos resultados nos llevan a pensar que dado que el genotipo 4 de la ApoE presenta menor capacidad antioxidante que el 2 y 3, el resto de mecanismos antioxidantes tienden a sobreexpresarse para compensar dicho déficit y así mantener un equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes.

A este respecto son muy interesantes los experimentos de Shea TB y cols. en los cuales medían glutatión y niveles de antioxidantes en ratones normales y en ratones transgénicos con déficit de ApoE. Encontraron que en situaciones basales los ratones con déficit de ApoE presentaban más glutatión y niveles de antioxidantes. Posteriormente provocaban una situación de estrés oxidativo mediante la deprivación de folato y/o el aumento de ingesta de hierro. Descubrieron que si sometían a los ratones a uno de éstos insultos ambos grupos respondían aumentando su glutatión y los niveles de antioxidantes. Cuando los exponían a ambos insultos

se producía una depleción de antioxidantes en los ratones deficientes de ApoE, sobrepasando así su capacidad compensatoria, e induciendo daño oxidativo (Shea TB y cols., 2002).

Dado que nuestra muestra está compuesta por sujetos jóvenes, probablemente estamos objetivando una situación en la cual el resto de recursos antioxidantes se encuentran sobreexpresados para compensar el déficit de función antioxidante de la ApoE 4 y que con el tiempo y el acúmulo de insultos oxidantes esa capacidad compensatoria es agotada y se produce el daño oxidativo.

De hecho y como hemos expuesto con anterioridad conocemos que existe un aumento de estrés oxidativo en sujetos con EA respecto a los controles que aumenta con el grado de demencia (Lloret A y cols., 2009) y que está aumentado en los sujetos con EA y ApoE 4 respecto a los ApoE 3 (Kharrazi H y cols., 2008).

Nos faltaba conocer qué ocurre con los enzimas antioxidantes en los sujetos con EA y ApoE 4.

4.3 Enzimas antioxidantes en la EA:

Encontramos una disminución de la expresión de los enzimas de síntesis de glutatión y una ligera sobreexpresión de la SOD en los sujetos con EA y ApoE 4 respecto a los controles. Estos resultados son similares a los de Kharrazi H y cols. que encontraron una disminución del estado antioxidante total, catalasa y glutatión peroxidasa y un aumento de superóxido dismutasa en sujetos con EA siendo estas diferencias más marcadas en los sujetos con EA y ApoE 4 (Kharrazi H y cols., 2008).

Estos datos apoyan más nuestra hipótesis de que ser portador de la ApoE 4 produce un aumento de defensas antioxidantes intentando suplir el déficit de función antioxidante en los sujetos jóvenes que terminará agotándose a lo largo de los años predisponiendo al daño oxidativo y por tanto al desarrollo de la EA.

4.4 ApoE y peróxidos:

Los peróxidos son sustancias oxidantes que presentan un enlace oxígeno-oxígeno, de los cuales el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂) es el más importante. Su aumento en las células es un indicador de daño oxidativo.

Como comentábamos en la introducción el aumento de radicales libres parece tener una implicación etiopatogénica en la EA (Cross CE y cols., 1987) y no sólo a nivel cerebral sino también a nivel sistémico (Begni B y cols., 2004). De hecho se piensa que la toxicidad del péptido A β en las células está causado por medio del aumento de radicales libres (Behl C y cols., 1994) lo cual se ha demostrado en cultivos celulares (Butterfield DA y cols., 2002).

En nuestros experimentos el hecho de medir peróxidos tenía doble finalidad, el de encontrar diferencias en sus niveles basales en los distintos grupos y por otra parte como medida de toxicidad del péptido A β . No hemos encontrado diferencias entre sus niveles basales y sus niveles tras incubación con A β ni tampoco entre los distintos grupos de nuestra muestra. Dado que el experimento se realizó en un solo momento puntual quizá no detectamos el aumento de peróxidos y la determinación se realizó demasiado precoz o tras la actuación de los mecanismos antioxidantes celulares, por lo que se necesitarían nuevos experimentos con

determinaciones seriadas para descartar que el péptido A β no produzca aumento de peróxidos en nuestras muestras.

5.- ApoE y muerte celular.

La apoptosis, tal como apuntábamos en la introducción, es una muerte celular programada y la cascada de las caspasas es la vía principal de ejecución (Martin SJ y cols., 1995). En concreto las caspasas 3 y 7 forman parte de las llamadas caspasas efectoras. Se conoce que en la EA se produce muerte neuronal por el mecanismo de apoptosis que se desencadena secundario al daño mitocondrial producido por el péptido A β bien de forma directa o indirecta a través de los radicales libres. Este daño mitocondrial produce la liberación del citocromo C que es el encargado de iniciar la cascada de las caspasas (Velez-pardo C y cols., 2002; Takuma K y cols., 2005).

Se ha demostrado en cultivos celulares que la ApoE 4 induce apoptosis (Hashimoto Y y cols., 2000) y existen experimentos en los que se objetiva un aumento de la apoptosis y de la caspasa 3 en linfocitos de sangre periférica de sujetos con EA respecto a controles y que dicho aumento es mayor en los sujetos con EA y ApoE 4 (Frey

C, 2006). No hemos encontrado estudios que relacionen el genotipo ApoE y la susceptibilidad a la apoptosis en sujetos jóvenes.

En nuestra muestra no hemos encontrado diferencias significativas respecto a la activación de caspasas entre los distintos grupos. Cuando analizamos la muerte celular por apoptosis tras incubación 24 horas encontramos mayor porcentaje en los linfocitos de los sujetos con genotipo 3/3 respecto a los otros grupos. Por tanto los linfocitos de nuestros casos presentan mayor protección frente a las agresiones externas que los controles, lo que va en concordancia con los resultados de glutatión y enzimas antioxidantes. Al ser unas células con mayores defensas antioxidantes son capaces de soportar mejor los insultos proapoptóticos.

Adicionalmente encontramos que existe mayor muerte celular en varones que en mujeres (datos no mostrados). Pensamos que las mujeres podrían estar más protegidas gracias a las hormonas estrogénicas. Estudios del grupo del Dr. Viña, en el departamento de Fisiología de Valencia, han puesto de manifiesto que los estrógenos estimulan la sobreexpresión de genes de longevidad así como genes

de enzimas antioxidantes (Borrás C y cols., 2005) y se ha demostrado que puede ser protector frente a A β en cultivos celulares neuronales (Vallés SL y cols., 2008).

6. ApoE y alteración mitocondrial.

La disminución del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la liberación del citocromo C son los primeros pasos para iniciar la cascada de la apoptosis celular.

Se conoce que la alteración mitocondrial juega un papel importante en la fisiopatología de la EA (Sompol P y cols., 2008). Como comentábamos en la introducción conocemos que el péptido A β es capaz en estudios *in vitro* de producir alteraciones mitocondriales con liberación de radicales libres y citocromo C así como de provocar agregación mitocondrial (Lloret A y cols., 2008). Respecto a su relación con la ApoE, existen experimentos en los cuales se objetiva mayor susceptibilidad a la toxicidad del péptido A β y a la disfunción mitocondrial en ratones transgénicos knock-out para ApoE (Keller JN y cols., 2000).

En nuestros experimentos encontramos, tras incubación durante 24 horas, un descenso del PMM en plaquetas de nuestros sujetos controles así como aumento de citocromo C respecto a nuestros casos, sin que encontremos diferencias significativas en el PMM en linfocitos. No encontramos diferencias en el tamaño ni en la morfología de las mitocondrias entre los distintos grupos. Estos datos están en concordancia con el mayor porcentaje de muerte celular que encontramos en nuestros controles medido con anexina y yoduro de propidio en microscopía confocal.

Estos resultados hay que tomarlos con reservas ya que no hemos encontrado una activación de caspasas por microscopía confocal y además la disminución del PMM sólo la encontramos en plaquetas y no en linfocitos. El citocromo C es una molécula intracitosólica y nuestras mediciones se limitan a la cantidad de citocromo C en sobrenadante, por lo que puede que estemos midiendo liberación de citocromo C secundaria a la muerte celular y no implique la medición de un proceso de iniciación a la apoptosis. Por tanto no podemos asegurar que la muerte celular y apoptosis en nuestros linfocitos sean secundarios a la activación de las caspasas.

7.-ApoE y marcadores de inflamación.

Como ya comentamos en la introducción se piensa que la inflamación juega un papel importante en la EA. Son muchos los estudios que han investigado marcadores de inflamación a nivel periférico en sujetos con diagnóstico de EA y en sujetos con deterioro cognitivo ligero con el fin de encontrar un marcador biológico de futura progresión a demencia. Los resultados de estos estudios son contradictorios. En el caso de el TNF α , que es la citokina que hemos medido en nuestros experimentos, encontramos en la bibliografía estudios en los cuales han hallado un aumento de dicha molécula en sangre de sujetos con EA (Gomez-Rabetti M y Moscato P, 2008; Baranowsda-Bik A y cols., 2008), otros que han encontrado un descenso (Alvarez XA y cols., 1996) y finalmente otros en los que no se objetiva ningún cambio respecto a los controles (Angelopoulos G y cols., 2008).

Respecto a su asociación con la ApoE, encontramos estudios en ratones, también con falta de concordancia en sus resultados. Mientras existen autores que aseguran una menor producción de TNF α en células con genotipo ApoE 4 respecto a las ApoE 3 (Boesch-

Saadatmandi C y cols., 2009), otros autores aseguran lo contrario (Tsoi LM y cols., 2007).

En nuestra muestra hemos encontrado una menor producción de TNF α en los linfocitos de sujetos ApoE 4/4 respecto a los 3/3 y 3/4. No hemos encontrado artículos en la bibliografía donde este experimento se haya realizado en humanos. Estos resultados estarían en concordancia con el resto de experimentos y con una mayor protección frente a las agresiones en los sujetos con ApoE 4.

8.- ApoE y enzimas relacionadas con tau.

Por PCR medimos la expresión de RCAN 1.1, 1.4, GSK3 β , PKR y calcineurina en nuestra muestra de sujetos jóvenes y en sujetos con EA. Encontramos sobreexpresión de todas las enzimas en nuestros casos respecto a los controles presentando mayor sobreexpresión los sujetos 4/4 respecto a los 3/4, siendo más evidente para RCAN 1.4 y calcineurina. En los sujetos con EA también encontramos sobreexpresión de todos los enzimas, siendo estas diferencias más significativas para RCAN 1.4 y calcineurina.

Por electroforesis y posterior Western blotting medimos la expresión de proteína calcineurina, RCAN 1.4 y GSK3 β en sujetos jóvenes en relación a su genotipo ApoE, encontrando mayor expresión de calcineurina y GSK3 β en sujetos con genotipo ApoE 3/4 y 4/4 y mayor expresión de RCAN 1.4 en sujetos 4/4, confirmando los resultados hallados con la técnica de PCR.

El hecho de que calcineurina esté sobreexpresada en ambos grupos tiene dos lecturas, una de ellas es que la inhibición por parte de RCAN1 de su actividad produzca una sobreexpresión del enzima intentando compensar dicha inhibición. Otra lectura más interesante sería que la hiperactividad de la calcineurina está asociada a la EA y que tiene un papel independiente de la proteína tau en la patogenia de dicha enfermedad. Existen estudios que han hallado un aumento de actividad de calcineurina en cerebros con EA (Liu F y cols., 2005; Norris CM y cols., 2005) que apoyan esta hipótesis. Se ha demostrado que aunque en experimentos *in vitro* calcineurina es capaz de defosforilar tau (Gong CX y cols., 1995), ésta presenta mucha menor afinidad por tau que otras fosfatasas cerebrales. Otros estudios en los que se compara la actividad de defosforilación de distintos enzimas cerebrales han demostrado que la contribución de

calcineurina en la actividad total de tau fosfatasa es de aproximadamente el 7% (Liu F y cols., 2005).

Se ha demostrado que tanto el péptido A β como la disfunción mitocondrial activan calcineurina, bien directamente como a través del aumento del calcio citosólico, y que la activación de la calcineurina favorece la fragmentación mitocondrial y la excitotoxicidad por glutamato, lo cual produce apoptosis celular (Agostinho P y cols., 2008; Quintanilla RA y cols., 2009).

No existen en la literatura experimentos que relacionen la sobreexpresión de este enzima en relación al genotipo ApoE ni tampoco en sujetos jóvenes.

Como apuntábamos en la introducción, existen fuertes evidencias para implicar a GSK3 en la patogenia de la EA, pues se ha encontrado aumentada en los sujetos con EA tanto a nivel cerebral como periférico y se conoce que produce hiperfosforilación de tau, aumento de la producción de A β , deterioro cognitivo y neurodegeneración. Todo esto ha llevado a plantear a algunos autores la "hipótesis de la GSK en la EA" y ya existen ensayos terapéuticos con inhibidores de la GSK (Hooper C y cols., 2008). Se

ha encontrado que el polimorfismo TT de la GSK3 es un factor de riesgo para desarrollar la EA (Mateo I y cols., 2006). En estudios con cultivos celulares se ha encontrado que la adición de ApoE disminuye los niveles de GSK3 (Hoe HS y cols., 2006) y que ApoE 4 produce activación de GSK3 respecto a ApoE 3 (Cedazo-Minguez A y cols., 2003). No encontramos en la literatura estudios que relacionen la expresión de este enzima respecto a genotipo ApoE ni en sujetos con EA ni en sujetos jóvenes.

Como comentábamos en la introducción RCAN1 es una proteína inhibidora de la calcineurina, que es capaz de estimular GSK3 y que se encuentra aumentada en el cerebro de los sujetos con EA. Existen diversas isoformas de las cuales las principales son la RCAN 1.1 y RCAN 1.4, que difieren en su región N-terminal. Estudios experimentales han demostrado que el estrés oxidativo es capaz de estimular la expresión de RCAN 1.4 vía calcineurina, existiendo un feedback negativo entre ambas proteínas, esto es que el aumento de radicales libres estimula la expresión de calcineurina que a su vez estimula la expresión de RCAN1 que inhibiría a la primera (Porta S y cols., 2007). Diversos estudios han demostrado que la estimulación de calcineurina y RCAN1 secundario al estrés oxidativo tiene como

función proteger a la célula del daño secundario al aumento de radicales libres, pero que una estimulación crónica de estas proteínas conlleva a daño celular (Emark G y cols., 2002). Como se ha comentado anteriormente calcineurina está implicada en la fragmentación mitocondrial, la apoptosis celular y la excitotoxicidad por glutamato y RCAN1 está asociado a estimulación de GSK3 e hiperfosforilación de tau.

No existe en la literatura estudios que relacionen el genotipo ApoE con la expresión de RCAN.

Otra proteína interesante es la PKR, una protein-quinasa dependiente de RNA que está implicada con la supervivencia y activación de la apoptosis celular y es activada como respuesta al estrés. Dicha proteína se ha visto que aumenta con la edad y en la EA (Bullido MJ y cols., 2008; Peel AL y cols., 2003). Existen estudios que han relacionado la activación de esta proteína en linfocitos de sangre periférica de sujetos con EA con sus resultados en test cognitivos (Paccalin M y cols., 2006). Además, diversos autores han relacionado la activación de PKR con el aumento de apoptosis en respuesta al estrés oxidativo y la entrada de calcio a la célula secundaria a la

toxicidad al péptido A β (Chang RC y cols., 2002). También se conoce que es capaz de estimular GSK3 β (Baltzis D y cols., 2007).

No encontramos en la literatura estudios que relacionen el genotipo ApoE con la activación de PKR.

Por tanto esta es la primera vez que se describe un aumento de expresión de proteínas relacionadas con respuesta al estrés y con la hiperfosforilación de tau en sujetos jóvenes con genotipo ApoE 4, hijos de sujetos con EA, en linfocitos de sangre periférica.

Según estos datos podemos hipotetizar que los sujetos con genotipo 4 de la ApoE, al presentar un déficit de defensas antioxidantes, presentan una sobreexpresión de otras vías metabólicas que intentan compensarlo, igual que ocurría con los enzimas de síntesis de glutatión. Así existiría una sobreexpresión de calcineurina y de PKR que activaría GSK3 β vía RCAN1. Esta vía tiene un efecto protector en la célula si su activación es transitoria, pero si ocurre de forma crónica acarrea efectos perjudiciales para la célula que terminan en la muerte celular por apoptosis e hiperfosforilación de tau (figura 11).

Figura 11. ApoE y apoptosis

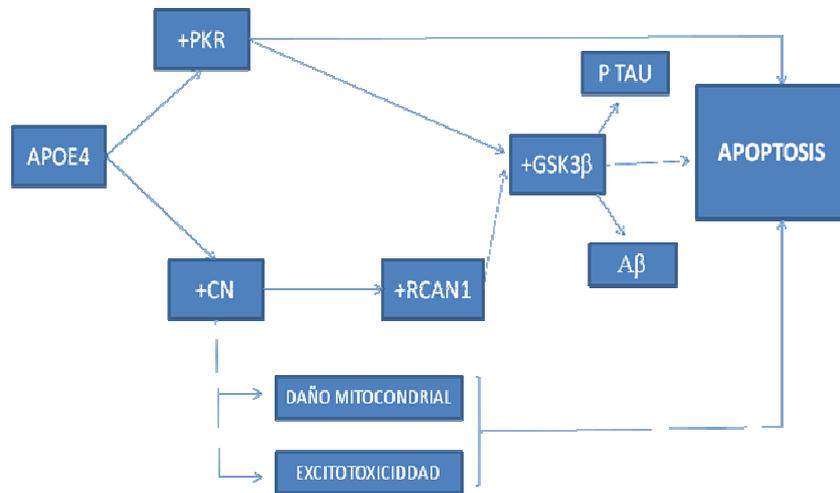


Figura 11. Mecanismo por el cual ApoE 4 produciría apoptosis celular, fosforilación de proteína tau y acúmulo de A β . +=estimula; CN= calcineurina; PTau= fosforila tau.

9.- Efecto del péptido A β en nuestra muestra.

Uno de nuestros objetivos al inicio del estudio era investigar el posible aumento de susceptibilidad a la toxicidad del péptido A β en los linfocitos de nuestros sujetos con ApoE 4, hipotetizando que la

ApoE 4 podría predisponer a padecer EA al ser más susceptible a las agresiones por dicho péptido.

Inicialmente elegimos una dosis de 10 μ m en incubación durante 6 horas pues en estudios previos en nuestro laboratorio dicha dosis resultaba tóxica en cultivos de mitocondrias aisladas (Lloret A y cols., 2008). Posteriormente aumentamos la dosis a 20 μ m en incubación durante 24 horas. Usamos distintas preparaciones del péptido: en fresco, en forma de oligómeros, prefibrillas y fibrillas según el artículo de Tamagno y cols (Tamagno E y cols., 2006) dado que existe controversia sobre si el péptido resulta tóxico en su forma fibrilar o en su forma soluble (Lai CS y cols., 2009).

Elegimos realizar el estudio en linfocitos por su facilidad en obtención de la muestra y por haber demostrado con anterioridad ser un buen modelo periférico para el estudio de la EA, presentando muchas similitudes con las células neuronales (Eckert A y cols., 1998; Velez-Pardo C y cols., 2002).

En nuestros experimentos no hemos encontrado que el péptido A β 1-42 produjera mayor toxicidad que su péptido control 42-1, por lo que todos los efectos observados en nuestras muestras

son atribuibles a la agresión de incubar los linfocitos durante 24 horas, lo cual es un estímulo apoptogénico. Hemos intentado medir si existía toxicidad por A β de múltiples maneras, con marcadores de estrés oxidativo como el glutatión oxidado y los peróxidos, con marcadores de alteración mitocondrial como el PMM y el citocromo C, midiendo apoptosis tanto por citometría como por microscopía confocal y midiendo marcadores de inflamación como el TNF α , sin encontrar variaciones en ninguno de estos parámetros.

Existen en la literatura estudios que han encontrado toxicidad del péptido A β sobre linfocitos aislados que nosotros no hemos podido reproducir, es el caso de los experimentos de Velez-Pardo y cols., pero en sus experimentos la toxicidad aparecía con la adición de A β y H₂O₂ (Velez-Pardo C y cols., 2002). Otros estudios lo que observan es un aumento en la proliferación de linfocitos y de liberación de citokinas al añadir A β (Yin Y y cols., 2009; Trieb K y cols., 2006).

Por tanto nuestros resultados muestran que el péptido A β no produce toxicidad sobre linfocitos aislados.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1.- Hemos encontrado que las personas jóvenes y sanas que poseen un alelo 4 de la ApoE presentan peores resultados en test cognitivos junto con un mayor porcentaje de quejas de memoria, respecto a sujetos jóvenes con genotipo ApoE 3. Nuestros datos corroboran la hipótesis de que existe un fenotipo cognitivo asociado al alelo 4 de la ApoE.

2.- Hemos hallado una mayor tendencia a la depresión en sujetos con genotipo 4 de la ApoE siendo ésta de mayor gravedad en los sujetos 4/4 respecto a los 3/4.

3.- Existe un mayor porcentaje de sujetos en tratamiento con estatinas y con diagnóstico de dislipemia en algún momento de la vida entre los sujetos con genotipo ApoE 4 respecto a los sujetos control, lo que traduce una mayor tendencia a la dislipemia.

4.- Existe una disminución de niveles de HDL-colesterol en mujeres con genotipo 4 de la ApoE respecto a controles, por lo que ApoE 4 actuaría como factor de riesgo vascular en este grupo de sujetos. Así mismo, encontramos mayor cantidad de ferritina en el grupo de hombres con genotipo 3 de la ApoE respecto al grupo con genotipo 4.

5.- Nuestros experimentos ponen de manifiesto la ausencia de toxicidad del péptido A β sobre linfocitos aislados.

6.- Hemos demostrado que los sujetos con genotipo ApoE 4 presentan un patrón antioxidante diferente en sangre periférica, con mayores niveles de glutatión reducido en situación basal y después de agresiones apoptogénicas. Esto es contradictorio frente a lo que conocemos sobre la ApoE 4, ya que se sabe que este genotipo se asocia a una función antioxidante menos eficaz que sus otras isoformas.

7.- Las células de los sujetos con genotipo ApoE 4 son más resistentes a las agresiones respecto a las de los sujetos con genotipo ApoE 3, presentando menor oxidación de glutatión en sangre periférica y menor apoptosis en linfocitos aislados, así como menor caída del PMM en plaquetas y menor liberación de citocromo C.

8.- Encontramos menor producción de TNF α tras estimulación antigénica en linfocitos aislados de sujetos con genotipo ApoE 4/4, respecto a los sujetos con genotipo 3/4 y 3/3.

9.- Consideramos que existe una sobrecompensación de sistemas antioxidantes en los sujetos jóvenes con genotipo 4 de la ApoE respecto a los sujetos controles, lo cual hemos corroborado al encontrar una sobreexpresión de enzimas de síntesis de glutatión así como de calcineurina, PKR, GSK3 β y RCAN 1.4.

10.- Existe un agotamiento de los mecanismos antioxidantes compensatorios en los sujetos con Enfermedad de Alzheimer y genotipo ApoE 4, lo que se refleja en una menor expresión de

enzimas de síntesis de glutatión. A nivel de enzimas relacionadas con la proteína tau y su fosforilización, encontramos un patrón similar de sobreexpresión en los sujetos con Enfermedad de Alzheimer y genotipo ApoE 4 y los sujetos jóvenes con genotipo ApoE 4, con sobreexpresión de ARN de los enzimas RCAN 1.4 y calcineurina.

CONCLUSIÓN FINAL

Ser portador del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE es un factor de riesgo para desarrollar la EA, probablemente debido a una disminución de la función antioxidante de la ApoE, lo cual conlleva a la sobreexpresión de otros sistemas antioxidantes que finalmente terminan por agotarse (como es el caso de los enzimas de síntesis de glutatión) o produciendo alteraciones celulares secundarias a su activación crónica (como es el caso de calcineurina, PKR, RCAN 1.4 y GSK3 β) como son la muerte celular por apoptosis y la hiperfosforilización de la proteína tau.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA:

1. Adachi A, Kano F, Saido TC, Murata M. Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. *Genes Cells* 2009;14:355-69.
2. Agostinho P, Lopes JP, Velez Z, Oliveira CR. Overactivation of calcineurin induced by amyloid-beta and prion proteins. *Neurochem Int* 2008;52:1226-33.
3. Alberca R, López-Pousa S. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Madrid: Editorial Médica Panamericana;2002.
4. Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1996;327:207-214.
5. Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Campbell S, Silbersweig D, Charlson M. 'Vascular depression' hypothesis. *J Neuroscience* 1997;17:516-529.
6. Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Az-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 1999;453:260-264.
7. Alvarez XA, Franco A, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 1996;29:237-52.
8. Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkankugn der Hirnrinde. 1907.

9. Alzheimer's Association. 2009 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2009;5:234-70.
10. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2008;4:110-33.
11. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 3rd ed. Revised. Washington DC: Am Psychia Assoc;1987.
12. Amieva H, Le Goff M, Millet X, Orgogozo JM, Pérès K, Barberger-Gateau P et al. Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms. *Ann Neurol* 2008;64:492-8.
13. Anderton BH, Betts J, Blackstock WPI. Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochem Soc Symp* 2001;67:73–80.
14. Andreasen N, Minthon L, Davidsson P. Evaluation of csf-tau and csf-A β 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 2001;58:373-379.
15. Angelopoulos P, Agouridaki H, Vaiopoulos H, Siskou E, Doutsou K, Costa V et al. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Neurosci* 2008;118:1659-72.
16. Ankarcrona M, Winblad B. Biomarkers for apoptosis in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2005;20:101–105.
17. Anstey KJ, Lipnicki DM, Low LF. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of

prospective studies with meta-analysis. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008;16:343-54.

18. Arranz L, de Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. Impaired immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:251-60.
19. Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* 1994;217:323-328.
20. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27: 199-214.
21. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;267: 1456-1462
22. Asuni AA, Hooper C, Reynolds CH, Lovestone S, Anderton BH, Killick R. GSK3alpha exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt. *Eur J Neurosci* 2006;24:3387–3392.
23. Baldeiras I, Santana I, Proença MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A et al. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008;15:117-28.
24. Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Barcikowska M et al. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett* 2008;29:75-9.

25. Basun H, Forssell LG, Wetterberg L, Winblad B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1991;3:231-58.
26. Baxter LC, Caselli RJ, Johnson SC, Reiman E, Osborne D. Apolipoprotein E epsilon 4 affects new learning in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:947-52.
27. Beffert U, Danik M, Krzywkowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 1998;27:119-142.
28. Begni B, Brighina L, Sirtori E, Fumagalli L, Andreoni S, Beretta S et al. Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2004;37:892-901.
29. Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 1982;126:374-80.
30. Bellomo C, Jewel SA, Thor H, Orrenius S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6842-46.
31. Bermejo P, Gómez-Serranillos P, Santos J, Pastor E, Gil P, Martín-Aragón S. Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology* 1997; 43:218-22.

32. Bermejo-Pareja F. Enfermedades neurológicas crónicas: desde la clínica a la población. *Neurología* 2007;22:236-48.
33. Bermejo-Pareja F, Benito-León J, Vega S, Medrano MJ, Román GC. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol Sci* 2008;264:63–72.
34. Blalock EM, Geddes J W, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *PNAS* 2004;101:2173–2178.
35. Boada M, Peña-Casanova J, Bermejo F, Guillén F, Hart WM, Espinosa C, et al. Costs of health care resources of ambulatory-care patients diagnosed with Alzheimer's disease in Spain. *Med Clin (Barc)* 1999;113:690-5.
36. Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski H. Atrophy of hippocampal formation subdivisions correlatos with stage and duration of Alzheimer's disease. *Dementia* 1995;6:205-210.
37. Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Minihane AM, Rimbach G. Effect of apoE genotype and dietary quercetin on blood lipids and TNF-alpha levels in apoE3 and apoE4 targeted gene replacement mice. *Br J Nutr* 2009;101:1440-3.
38. Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE et al. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expresión via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* 2005;4:113-8.
39. Braak H, Braak E. Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in

cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathol* 1990;80:479-86.

40. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-259.
41. Braak H, Braak E. Cortical destruction and cell death in Alzheimer's disease. pp. 497-507. En: Koliatsos, Ratan. Cell death and diseases of the nervous system. Ed. Humana Press.1999.
42. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol Med* 1995; 18:1033-77.
43. Breffner JCS, BA Gau, KA Welsh. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease. *Neurol* 1994;44:227.
44. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantization of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2529-34.
45. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
46. Butterfield DA, Drake J, Pocermich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 2001;7:548-54.
47. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation an its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002;23:655-64.

48. Cain K, Bratton SB. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002;84:203-14.
49. Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2008;30:43-65.
50. Casado A, López-Fernández M, Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* 2008;33:450-8.
51. Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C et al. Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid B peptides and apolipoprotein E. *Biochemistry Journal* 1995;306:599-604.
52. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2003;85:1394-401.
53. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Namias B, Bagnoli S et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1372-9.
54. Cecchi C, Fiorillo C, Baglioni S, Pensalfini A, Bagnoli S, Nacmias B et al. Increased susceptibility to amyloid toxicity in familial Alzheimer's fibroblasts. *Neurobiol Aging* 2007;28:863-76.
55. Cedazo-Mínguez A, Popescu BO, Blanco-Millán JM, Akterin S, Pei JJ, Winblad B et al. Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-

- 42) regulation of glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 2003;87:1152-64.
56. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
57. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993; 14:191-197.
58. Choi J, Malakowsky CA, Talent JM. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1566-70
59. Conrad CC, Marshall PL, Talent JM. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:678-81.
60. Cook CN, Hejna MJ, Magnuson DJ, Lee JM. Expression of calcipressin1, an inhibitor of the phosphatase calcineurin, is altered with aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2005;8:63-73.
61. Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biological Chemistry* 1997;378:793-802.
62. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell Jr PC, Roses AD et al. The apolipoprotein E allele and sex-specific risk of Alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association* 1995;273:373-4.
63. Cruz-Sánchez FF. Antigenic determinant properties of neurofibrillary tangles. Relevance to progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm* 1994;42:165S-178S.

64. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Pacher L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982; 107:1198-1205.
65. Delano-Wood L, Houston WS, Emond JA, Marchant NL, Salmon DP, Jeste DV et al. APOE genotype predicts depression in women with Alzheimer's disease: a retrospective study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008;23:632-6.
66. Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV et al. Xanthine Oxidase is Involved in Free Radical Production in Type 1 Diabetes. Protection by Allopurinol. *Diabetes* 2002;51:1118–1124.
67. Desikan RS, Fischl B, Cabral HJ, Kemper TL, Guttman CR, Blacker D et al. MRI measures of temporoparietal regions show differential rates of atrophy during prodromal AD. *Neurology* 2008;71:819-25.
68. Dyrks T, Dyrks E, Harmann R, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem* 1992;267:18210-7.
69. Duker NJ, Sperling J, Soprano KJ. Beta-amyloid protein induces de formation of purine dimers in cellular DNA. *J Cell Biochem* 2001;81:393-400.
70. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2009;118:5-36.
71. Eckert A, Cotman CW, Zerfass R, Hennerici M, Müller WE. Lymphocytes as cell model to study apoptosis in Alzheimer's

disease: vulnerability to programmed cell death appears to be altered. *J Neural Transm Suppl* 1998;54:259-67.

72. Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 1971;251:427-34.
73. Ermak G, Harris CD, Davies KJ. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J* 2002;16:814–824.
74. Ermak G, Harris CD, Battocchio D, Davies KJA. RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3 β . *FEBS J* 2006;273:2100-9.
75. Fan PL, Chen CD, Kao WT, Shu BC, Lung FW. Protective effect of the apo epsilon2 allele in major depressive disorder in Taiwanese. *Acta Psychiatr Scand* 2006;113:48-53.
76. Fang F, Liu GT. Protective effects of compound FLZ, a novel synthetic analogue of squamosamide, on beta-amyloid-induced rat brain mitochondrial dysfunction in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:522-9.
77. Farzin L, Moassesi ME, Sajadi F, Amiri M, Shams H. Serum Levels of Antioxidants (Zn, Cu, Se) in Healthy Volunteers Living in Tehran. *Biol Trace Elem Res* 2008 Dec 9.
78. Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 2009 May 28.

79. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366:2112-17.
80. Fischer P, Götz ME, Danielczyk W, Gsell W, Riederer P. Blood transferrin and ferritin in Alzheimer's disease. *Life Sci* 1997;60:2273-8.
81. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:857-62.
82. Fleury C, Mignotte B. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002;84:131-41.
83. Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE, Ryan CM, Muldoon MF. Memory performance and the apolipoprotein E polymorphism in a community sample of middle-aged adults. *Am J Med Genet* 2000;96:707-11.
84. Frackowiak J, Potempska A, Mazur-Kolecka B. Formation of amyloid-beta oligomers in brain vascular smooth muscle cells transiently exposed to iron-induced oxidative stress. *Acta Neuropathol* 2009;117:557-67.
85. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 1982;47:412-426.
86. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J of Medicine* 1994;97:5S-13S.

87. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzimol* 1974;41:35-97.
88. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Methods Enzymol* 1986;58:61-97.
89. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2001;71:2034-40
90. Gálvez-Vargas R, Lardelli-Claret P, García-Martín M. Epidemiología de la enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Demencias y enfermedad de Alzheimer. Enfermedad de Parkinson. En: Piédrola-Gil G, ed. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. 10 ed. Barcelona: Masson Salvat-Medicina; 2000. p. 745-55.
91. Gaugler JE, Yu F, Krichbaum K, Wyman JF. Predictors of nursing home admission for persons with dementia. *Med Care* 2009;47:191-8.
92. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* 2009;3.
93. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 1999;97:395-406
94. Golden CJ. *Stroop Color and Word test*. Chicago: Stoelting Co.;1978.

95. Goldman JS, Miller BL, Safar J, de Turreil S. When sporadic disease is not sporadic. *Arch Neurol* 2004;61:213-6.
96. Gómez-Ravetti M, Moscato P. Identification of a 5-protein biomarker molecular signature for predicting Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2008;3:e3111
97. Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem* 1994;62:803-6.
98. González C, Martín T, Cacho J, Breñas MT, Arroyo T, García-Berrocal B et al. Serum zinc, copper, insulin and lipids in Alzheimer's disease epsilon 4 apolipoprotein E allele carriers. *Eur J Clin Invest* 1999;29:637-42
99. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
100. Greenwood PM, Sunderland T, Friz JL, Parasuraman R. Genetics and visual attention: selective deficits in healthy adult carriers of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11661-6.
101. Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksnadel K, Leblhuber F et al. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 2008;42:633-8.
102. Hageman HH, Bast A, Vermeulen NPE. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: Analytical aspects. *Chem Biol Interactions* 1992;82:243-293.

103. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 1991;91:14S-22S.
104. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions* 1996;24:1023-1027.
105. Hardy JA, Owen MJ, Goate AM, James LA, Haynes AR, Rossor MN, et al. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 1989;17:75-6.
106. Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 2006;52:3-13.
107. Hashimoto Y, Jiang H, Niikura T, Ito Y, Hagiwara A, Umezawa K et al. Neuronal apoptosis by apolipoprotein E4 through low-density lipoprotein receptor-related protein and heterotrimeric GTPases. *J Neurosci* 2000;20:8401-9.
108. Hazle JR, Williams EE. The role of alterations in membrana lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 1990;29:167-227.
109. Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA. Is the risk of developing AD greater for women than for men? *Am J Epidemiol* 2001;153:132-6.
110. Henao E. Normalización piloto de pruebas neuropsicológicas ejecutivo-atencionales: Test de Stroop, Trail Making Test, Test Símbolo Dígito, Test de cancelación de

dígitos, en una población española. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona;2000.

111. Henneman WJ, Sluimer JD, Barnes J, van der Flier WM, Sluimer IC, Fox NC et al. Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures. *Neurology* 2009;72:999-1007.
112. Hensley K, Hall N, Subramaniam R. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995;65:2146-56.
113. Hickie I, Naismith S, Ward PB, Turner K, Scott E, Mitchell P et al. Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression. *Br J Psychiatry* 2005;186:197-202.
114. Hirsch-Reinshagen V, Burgess BL, Wellington CL. Why lipids are important for Alzheimer disease? *Mol Cell Biochem* 2009;326:121-9.
115. Hoe HS, Freeman J, Rebeck GW. Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. *Mol Neurodegener* 2006;1:18.
116. Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A, Lee JY et al. Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 2009;29:7459-73.
117. Hoey SE, Williams RJ, Perkinton MS. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid

precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J Neurosci* 2009;29:4442-60.

118. Holmgren A. Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1979; 254:3664-3671.
119. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2008;104:1433-1439.
120. Hooper C, Markevich V, Plattner F. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 2007;25:81-86.
121. Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S et al. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2719-2723.
122. Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R et al. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2005;373:1-4.
123. Hyman BY, Trojanowski JK. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease from the National Institute on Aging and the Reagan' Institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assesment of Alzheimer's disease. *J Neuropahtol Exp Neurol* 1997;56:1095.
124. Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Pate Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW et al. Expression of

apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. Proceedings from the National Academy of Sciences, USA 1986; 83:1125-29.

125. Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Kawada R, Nakashima Y, Kuroda S. Relationship between oxidative stress and apoE phenotype in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2000;102:346-9.
126. Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J et al. Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003;163:1057-67.
127. Jorgensen AB, Volbracht C, Pedersen LO, Jensen KG, Karlsson JJ, Larsen SA et al. Differential effects of gamma-secretase and BACE1 inhibition on brain Abeta levels in vitro and in vivo. *J Neurochem* 2009 Jun 10.
128. Keller JN, Lauderback CM. Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Neurochemistry* 2000;74:1579-1586.
129. Ketterer B. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 1986;16:957-73.
130. Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavailani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2008;41:932-6.

131. Kingsbury TJ, Cunningham KW. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 2000;14:1595–1604.
132. Knight JA, Smith SE, Kinder VE, Pieper RK. Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults. *Clin Chem* 1988; 34:1107-1110.
133. Kolsch H, Rao ML. Neuroprotective effects of estradiol-17beta: implications for psychiatric disorders. *Arch Women Ment Health* 2002;5:105-10.
134. Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma G. ROS and innate immunity. *Anticancer Res* 2009;29:817-21.
135. Kok E, Haikonen S, Luoto T, Huhtala H, Goebeler S, Haapasalo H et al. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol* 2009;65:650-657.
136. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:149-184.
137. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:433-5.
138. Kwok JB, Loy CT, Hamilton G, Lau E, Hallupp M, Williams J et al. Glycogen synthase kinase-3beta and tau genes interact in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2008;64:446-54.
139. LaFontaine MA, Mattson MP, Butterfield DA. Oxidative stress in synaptosomal proteins from mutant presenilin-1

knock-in mice: implications for familial Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2002;27:417-21.

140. Lai CS, Preisler J, Baum L, Lee DH, Ng HK, Hugon J et al. Low molecular weight Abeta induces collapse of endoplasmic reticulum. *Mol Cell Neurosci* 2009;41:32-43.
141. Langbaum JB, Chen K, Lee W, Reschke C, Bandy D, Fleisher AS et al.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Categorical and correlational analyses of baseline fluorodeoxyglucose positron emission tomography images from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Neuroimage* 2009 May 1;45(4):1107-16
142. Lauderback CM, Kanski J, Hackett JM, Maeda N, Kindy MS, Butterfield DA. Apolipoprotein E modulates Alzheimer's Abeta(1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner. *Brain Res* 2002;924:90-7.
143. Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA et al. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology* 1999;52:78-84.
144. Lavretsky H, Lesser IM, Wohl M, Miller BL, Mehringer M, Vinters HV. Apolipoprotein-E and whitematter hyperintensities in late-life depression. *Am J Geriatric Psychiatry* 2000;8:257-261.
145. Leahy KP, Davies KJ, Dull M, Kort JJ, Lawrence KW, Crawford DR. adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys* 1999;368:67-74.

146. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-630.
147. Lemaître H, Crivello F, Dufouil C, Grassiot B, Tzourio C, Alperovitch A et al. No epsilon4 gene dose effect on hippocampal atrophy in a large MRI database of healthy elderly subjects. *Neuroimage* 2005;24:1205-13.
148. Leon AS, Togashi K, Rankinen T, Després JP, Rao DC, Skinner JS et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with blood lipids and maximal oxygen uptake in the sedentary state and after exercise training in the HERITAGE family study. *Metabolism* 2004;53:108-16.
149. Lind J, Larsson A, Persson J, Ingvar M, Nilsson LG, Bäckman L et al. Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. *Neurosci Lett* 2006;396:23-7.
150. Lippman RD. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp Gerontol* 1985;20:1-5.
151. Lithell H, Hansson L, Skoog I. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertension* 2003;21:875–886.
152. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Oda Y, Tomizawa K, Gong CX. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem* 2005;280:37755-62.

153. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2005;22:1942-50.
154. Liu WW, Todd S, Coulson DT, Irvine GB, Passmore AP, McGuinness B et al. A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and beta-secretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *J Neurochem* 2009;108:341-9.
155. Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR et al. Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008;28:13805-14.
156. Lloret A, Badía MC, Mora NJ, Ortega A, Pallardó FV, Alonso MD et al. Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2008;44:2019-25.
157. Lloret A, Badía MC, Mora NJ, Pallardó FV, Alonso MD, Viña J. Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental. *Journal of Alzheimer Disease* 2009;16:1-7.
158. Lockshin RA, Beaulaton J. Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J* 1981;13:659-666.
159. Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M et al. Amyloid β interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2000;3:460-4.

160. Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 2001;20:27–39.
161. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N et al. ABAD Directly Links A to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science* 2004;304:448-452.
162. Ma H, Xiong H, Liu T, Zhang L, Godzik A, Zhang Z. Aggregate formation and synaptic abnormality induced by DSCR1. *J Neurochem* 2004;88:1485–1496.
163. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Detrimental effects of apolipoprotein E4: potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007;4:537-40.
164. Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol* 1995;136:107-22.
165. Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J, Combarros O. Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;21:228-32.
166. Mazur-Kolecka B, Dickson D, Frackowiak J. Induction of vascular amyloidosis-beta by oxidative stress depends on APOE genotype. *Neurobiol Aging* 2006;27:804-14.
167. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions . Radicals generated by the interaction of sulfite dimetil sulfoxide and oxygen. *J Biol Chem* 1969;244:6056-63.

168. Mckhann G, Drachman D, Folstein M. 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. *Neurol* 1984;34:939-944.
169. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994;36:747-51.
170. Meister A, Tate SS. Glutathione and related g-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem* 1976;45:559.
171. Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2005;26:587-95.
172. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and betaamyloid peptides. *Nat Gene* 1996;14:55-61.
173. Montine TJ, Beal MF, Cudkovicz ME. Increased cerebrospinal fluid F2-isoprostane concentration in probable Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;52:562-5.
174. Morais Cardoso S, Swerdlow RH, Oliveira CR. Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid beta 25-35 requires functional mitochondria. *Brain Res* 2002;931:117-25.
175. Moser M. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*, Washington, DC, American Psychiatric Association;1994.

176. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* 2008;8:1703-18.
177. Nelson PT, Jicha GA, Schmitt FA, Liu H, Davis DG, Mendiondo MS et al. Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:1136-46.
178. Nelson VM, Dancik CM, Pan W, Jiang ZG, Lebowitz MS, Ghanbari HA. PAN-811 Inhibits Oxidative Stress-Induced Cell Death of Human Alzheimer's Disease-Derived and Age-Matched Olfactory Neuroepithelial Cells Via Suppression of Intracellular Reactive Oxygen Species. *J Alzheimers Dis* 2009 May 11.
179. Newcomer RJ, Clay TH, Yaffe K, Covinsky KE. Mortality risk and prospective medicare expenditures for persons with dementia. *J Am Geriatr Soc* 2005;53:2001-6
180. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:299-306.
181. Norris CM, Kadish I, Blalock EM, Chen KC, Thibault V, Porter NM et al. Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *J Neurosci* 2005;25:4649-58.
182. Ochoa S. Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983;223:325-49.

183. Orrenius S, Moldeus P. The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 1984;5:432-35.
184. Pajares MA, Duran C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM. Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem* 1992;267:17598-605.
185. Packard CJ, Westendorp RG, Stott DJ, Caslake MJ, Murray HM, Shepherd J et al. Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk Group. Association between apolipoprotein E4 and cognitive decline in elderly adults. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1777-85.
186. Panegyres PK. The functions of the amyloid precursor protein gene. *Rev Neurosci* 2001;12:1-39.
187. Parasuraman R, Greenwood PM, Sunderland T. The apolipoprotein E gene, attention, and brain function. *Neuropsychology* 2002;16:254-74.
188. Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M. Practice parameter : early detection of dementia: Mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56:1133-42.
189. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 2003;423:435-439.
190. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodeling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 1993; 55:81-90.

191. Poirier J, Davignon J, Boutheillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet* 1993;342:697-699.
192. Poirier J. Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 1996;21:128-134.
193. Polidori MC, Mecocci P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 2002;4:517-22.
194. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: Activation, specificity and regulation. *J Biol Chem* 2009 May 26.
195. Pope SK, Shue VM, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Ann Rev Public Health* 2003;24:111-32.
196. Porta S, Serra SA, Huch M, Valverde MA, Llorens F, Estivill X et al. RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* 2007;16:1039-1050.
197. Practicò D, Lee VM, Trojanowski JQ. Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998;12:1777-84.
198. Pratico D, Urdu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 2001;21:4183-7.

199. Pratico D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:972-76.
200. Quintanilla RA, Matthews-Roberson TA, Dolan PJ, Johnson GV. Caspase-cleaved tau expression results in mitochondrial dysfunction in cortical neurons. Implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2009.
201. Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 1980;106:55-62.
202. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D et al. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:284-9.
203. Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S et al. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med* 1996;334:752-8.
204. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *The American Journal of Psychiatry* 1982;139:1136-1139.
205. Rey A. *L'examen clinique en psychologie*. Paris: Presses Universitaires de France;1964.

206. Rissman RA, De Blas AL, Armstrong DM. GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2007;103:1285-92.
207. Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE, Melendez JA. Mitochondrial or cytosolic catalase reverses de Mn SOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Radical Biol and Med* 2000;29:801-13.
208. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376: 775-8.
209. Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 2007;82:235-46.
210. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 1996;47:387-400.
211. Roses AD. Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer disease expression: beta-amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:429-437.
212. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 2000;275:8719-8725.

213. Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, Oxidative Stress and Aging. *Free Rad Res* 2000;32:189–198.
214. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH et al. Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993;43:1467-72.
215. Saz P, López-Antón R, Dewey ME, Ventura T, Martín A, Marcos G et al. Prevalence and implications of psychopathological non-cognitive symptoms in dementia. *Acta Psychiatr Scand* 2009;119:107-16
216. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992;258:668-71.
217. Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR. Preclinical AD revisited. Neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology* 2000;55:370-76.
218. Schneider LS, Tariot PN, Dagerman KS, Davis SM, Hsiao JK, Ismail MS et al; CATIE-AD Study Group. Effectiveness of atypical antipsychotic drugs in patients with Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2006;355:1525-38.
219. Shea TB, Rogers E, Ashline D, Ortiz D, Sheu MS. Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1115-20

220. Sheridan JW, Bishop CJ. Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line. *J Cell Sci* 1981;49:119-37.
221. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986;25:1058-1071.
222. Sies H, De Groot H. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicology Letters* 1993;64:547.
223. Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
224. Smith MA, Siedlak SL, Richey PL, Nagaraj RH, Elhammer A, Perry G. Quantitative solubilization and analysis of insoluble paired helical filaments from Alzheimer disease. *Brain Research* 1996; 717:99-108.
225. Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, et al. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 1998;70:2212-5.
226. Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mannermaa A, Paljarvi L, Talasniemi S et al. A severe loss of choline acetyl transferase in the frontal cortex of Alzheimer's patients carrying apolipoprotein e4 allele. *Neuroscience Letters* 1995;187:79-82.
227. Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I et al. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience* 2008;153:120-30.

228. Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chiovenda P et al. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002;59:1153-61.
229. Stadman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220-1224.
230. Stampfer MJ. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J Int Med* 2006;260:211-223.
231. Stefani M, Liguri G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr Alzheimer Res* 2009;6:15-29.
232. Stewart R, Russ C, Richards M, Brayne C, Lovestone S, Mann A. Depression, APOE genotype and subjective memory impairment: a cross-sectional study in an African-Caribbean population. *Psychol Med* 2001;31:431-40.
233. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology* 1935;18:643-662.
234. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J et al. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J* 2005;19:597-8.
235. Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. The various aggregation states of β -amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radical Biol Med* 2006;41:202-12.
236. Terrádez P, Asensi M, Lasso de la Vega MC, Puertes IR, Viña J, Estrela JM. Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular

proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem J* 1993;292:477-83.

237. Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J et al. Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2003;23:994-1005.
238. Thompson SM, Mattison HA. Neuroscience: Secret of synapse specificity. *Nature* 2009;458:296-7.
239. Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zorzitto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P. The NINCDS-ADRDA Work Group Criteria for the Clinical diagnosis of probable Alzheimer's Disease: a clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* 1988;38:359-364.
240. Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ, Corey-Bloom J. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 2004;62:1977-83.
241. Tolbert NE. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu Rev Biochem* 1981;50:133-57.
242. Traykov L, Bayle AC, Latour F, Lenoir H, Seux ML, Hanon O et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele frequency in elderly depressed patients with and without cerebrovascular disease. *J Neurol Sci* 2007;257:280-3.
243. Trieb K, Ransmayr G, Sgonc R, Lassmann H, Grubeck-Loebenstein B. APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17:541-7.

244. Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S. Cell extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1999;19:7420–7427.
245. Tsoi LM, Wong KY, Liu YM, Ho YY. Apoprotein E isoform-dependent expression and secretion of pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-6 in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 2007;460:33-40.
246. Turenne GA, Price BD. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol* 2001:12.
247. Vallés SL, Borrás C, Gambini J, Furriol J, Ortega A, Sastre J et al . Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging Cell* 2008;7:112-8.
248. Vance PG, Keeler Jr. BB, Rajapogalan KV. Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme. *J Biol Chem* 1972; 247:4782-86.
249. Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:321–331.
250. Vélez-Pardo C, Ospina GG, Jiménez del Río M. Abeta(25-35) peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism: involvement of H₂O₂, caspase-3, NF-kappaB, p53 and c-Jun. *Neurotoxicology* 2002;23:351-65.

251. Viña J. Glutathione metabolism and physiological functions. CRC Press, Boca Raton; 1990.
252. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV et al. Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life* 2000;50:271–277.
253. Waragai M, Mizumura S, Yamada T, Matsuda H. Differentiation of early-stage Alzheimer's disease from other types of dementia using brain perfusion single photon emission computed tomography with easy Z-score imaging system analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008;26:547-55.
254. Weisger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase: Organella specificity. *J Biol Chem* 1973; 248:3582-91.
255. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 1993;294: 625–629.
256. Wetter SR, Delis DC, Houston WS, Jacobson MW, Lansing A, Cobell K et al. Deficits in inhibition and flexibility are associated with the APOE-E4 allele in nondemented older adults. *J Clin Exp Neuropsychol* 2005;27:943-52.
257. Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. A modified b-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the b-amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry* 2004;91:513–520.

258. Williams JB. A Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale. *Archives of General Psychiatry, American Medical Association* 1988;45:742-747.
259. Wishart HA, Saykin AJ, McAllister TW, Rabin LA, McDonald BC, Flashman LA et al. Regional brain atrophy in cognitively intact adults with a single APOE epsilon4 allele. *Neurology* 2006;67:1221-4.
260. Wishart HA, Saykin AJ, Rabin LA, Santulli RB, Flashman LA, Guerin SJ et al. Increased brain activation during working memory in cognitively intact adults with the APOE epsilon4 allele. *Am J Psychiatry* 2006;163:1603-10.
261. Wyllie AH, Kerr JF. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
262. Yen YC, Rebok GW, Yang MJ, Lung FW. A multilevel analysis of the influence of Apolipoprotein E genotypes on depressive symptoms in late-life moderated by the environment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008 15;32:479-86.
263. Yen YC, Rebok GW, Gallo JJ, Yang MJ, Lung FW, Shih CH. ApoE4 allele is associated with late-life depression: a population-based study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2007;15:858-68.
264. Yin Y, Wen S, Li G, Wang D. Hypoxia enhances stimulating effect of amyloid beta peptide (25-35) for interleukin 17 and T helper lymphocyte subtype 17 upregulation in cultured peripheral blood mononuclear cells. *Microbiol Immunol* 2009;53:281-6.
265. Yost FJ, Fridovich I. An iron containing Superoxide dismutase from *E. Coli*. *J Biol Chem* 1973;248:2905-08.

266. Zavaloni M, van Reekum R. Prevention of Alzheimer disease. *Can Fam Physician* 2006;52:200-207.
267. Zawia NH, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:1241-9.
268. Zimmermann KC, Bonzon C. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92:57-70.