



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES *MnSOD*,
GSTT1 Y *GSTM1* EN PACIENTES VENEZOLANOS CON
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la bachiller Elizabeth De Mendonca P.
como requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Biología.
Tutora: Dra. Mercedes Fernández-Mestre
Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela
Marzo, 2012

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, y se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria y las funciones cognitivas. Las características anatomopatológicas principales de la enfermedad son la presencia de placas amiloides y los ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral de los pacientes. Un factor genético de riesgo en la EA, es el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* el cual se ha reportado aumenta el riesgo a padecer la EA en los pacientes que poseen dicho alelo. Diversos estudios han reportado que en los cerebros de pacientes con EA hay un mayor daño oxidativo comparado con individuos sanos. Entre las enzimas con capacidad antioxidantes están las enzimas *GSTM1*, *GSTT1* y *MnSOD*. Se ha descrito que la actividad de las enzimas *GSTM1* y *GSTT1* puede estar ausente debido a la eliminación homocigota de los genes que las codifican. Además, el cambio de una timina (T) por una citosina (C) en el nucleótido 47 del gen *MnSOD*, provoca un cambio de aminoácido Val \rightarrow Ala en la posición -9 de la secuencia blanco mitocondrial, afectando el transporte de la enzima hacia la mitocondria debido al cambio en la estructura secundaria de la enzima. Debido a que se ha observado una posible implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer y que las enzimas *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* participan en la defensa frente al daño oxidativo, se planteó como objetivo estudiar la variabilidad de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* en individuos venezolanos sanos y con la Enfermedad de Alzheimer (EA). Este estudio se realizó en 179 individuos venezolanos, no relacionados, agrupados en pacientes con EA (n=79) e individuos sanos (n=100). A los individuos participantes en este estudio se les determinó el polimorfismo del gen *APOE* en un estudio realizado anteriormente en el cual se reportaron frecuencias incrementada en los pacientes con EA con respecto a los controles. Se determinó la presencia o ausencia de los genes *GSTT1/GSTM1* mediante PCR-SSP y el polimorfismo Ala -9Val del gen *MnSOD* utilizando la técnica de PCR-RFLP. Adicionalmente, como los individuos participantes habían sido previamente genotipificados para el gen *APOE*, se realizaron las combinaciones genotípicas de los genes *GSTT1*, *GSTM1*, *MnSOD* y *APOE*. El genotipo *GSTT1+/GSTM1-* parece favorecer el desarrollo de la EA (OR= 2,06; $p=0,01$), siendo el riesgo mayor al estar en combinación con el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*: *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon 3\epsilon 4* (OR= 3,07; $p = 0,05$) y *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon 4\epsilon 4* (OR= 5,52; $p = 0,02$). El polimorfismo Ala-9Val por sí solo no parece estar relacionado con la EA, sin embargo, el genotipo *Ala/Ala* aumenta el riesgo que proporciona el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*: *AlaAla/\epsilon 3\epsilon 4* (OR= 3,47; $p= 0,03$) y *AlaVal/\epsilon 4\epsilon 4* (OR= 6,3; $p = 0,01$). Estos resultados indican que la Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad compleja que involucra las interacciones de diferentes genes. Es importante tomar en cuenta que existen otros genes relacionados con estrés oxidativo y vías anti-oxidantes, los cuales pudiesen estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la Enfermedad de Alzheimer.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero comenzar dándole gracias a Dios, por llenar mi vida de bendiciones y permitirme lograr esta meta.

A mis Padres que me criaron, me cuidaron, me dieron amor, me respetaron, me dieron su mejor regalo que fue el darme una educación de calidad y hoy en día celebran junto a Mí este sueño que se ve materializado después de muchos días de estudio y dedicación, pero también de muchas recompensas. A ustedes les dedico éste nuestro triunfo.

A la Dra. Mercedes Fernández, por haber confiado en mí, por su paciencia, apoyo y por guiarme durante la elaboración de este trabajo.

A todos los del laboratorio de fisiopatología (IVIC), con los que compartí momentos de gran aprendizaje, por su apoyo durante el tiempo que pase en el laboratorio. Gracias chicos!

A la Dra. Guillermina Alonso por su apoyo y colaboración durante el periodo de realización de este trabajo.

Gracias a todos los profesores que a lo largo de la carrera me han brindado su apoyo y compartido sus conocimientos.

A mis eternas compañeras: Ana Victoria (Vicky Mouse), María de los Ángeles (María Maní), Luisana (Lu), Almary, Marianny (Nany) a ustedes que siempre compartieron conmigo, día a día, que entre risas, consejos y ratos muy gratos se fueron estos 10 semestres. Lo LOGRAMOS CHICAS.

Por último pero no menos importante, quiero darle las gracias a una persona que es muy importante para mí, ella es mi mejor amiga, y con quien sé que siempre podre contar. Gracias hermana por estar siempre a mi lado. Gracias también a una gran amiga que siempre me apoyo y dio consejos, gracias Gaby.

¡Dios les Bendiga siempre! Elizabeth de Mendonca Pestana.

ABREVIACIONES

A β = péptido β amiloide

ADN = ácido desoxirribonucleico

APOE = apolipoproteína E

APP = proteína precursora del amiloide

ATP = adenosina trifosfato

Ca⁺² = calcio

Cu²⁺ = ión cúprico

EA = Enfermedad de Alzheimer

FA = frecuencias alélicas

Fe³⁺ = ión férrico

FG = frecuencia genotípica

GST = glutatión S transferasa

GSTM1 = glutatión S transferasa M1

GSTT1 = glutatión S transferasa T1

GSTT2 = glutatión S transferasa T2

H₂O₂ = peróxido de hidrógeno

H-W = Hardy-Weinberg

IsoPs = isoprostano

MAO-B = monoamino oxidasa

MCI = deterioro cognitivo leve

MnSOD = superóxido dismutasa de manganeso

MTS = secuencia blanco mitocondrial

N = número de individuos

NPs = neuroprostano

NLB = buffer de lisis nuclear

O_2^- = superóxido

$^{\cdot}OH$ = hidroxilo

OR = odd ratio (relación de probabilidades)

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSP = reacción en cadena de la polimerasa- iniciadores de secuencia específica

PI = fosfatidil inositol

PSEN1 = presenilina 1

PSEN2 = presenilina 2

PtdCho = fosfatidil – colina

PtdEtn = fosfatidil - etanolamida

RCLB = buffer de lisis de células rojas

RFLP = polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

RNS = especie reactiva de nitrógeno

ROS = especie reactiva de oxígeno

SOD = superóxido dismutasa

4-HNE = 4- hidroxinonenal

8OHdG = 8-hidroxi 2 deoxiguanosina

INDICE

	Página
RESUMEN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIACIONES.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	20
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	35
DISCUSION.....	45
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de placas neuríticas o amiloides redondeadas en el hipocampo de un paciente con demencia de Alzheimer y neuronas en degeneración con ovillos neurofibrilares en el citoplasma. Las placas neuríticas contienen la proteína β -amiloide.....	2
2	Esquema del procesamiento de APP en individuos sanos y pacientes con EA	3
3	Mecanismos moleculares y patología en EA.....	11
4	Esquema de Exitotoxicidad neuronal.....	13
5	Esquema de la estructura de los genes <i>GSTT1</i> y <i>GSTM1</i>	17
6	Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ADNc que codifica para la enzima MnSOD humana.....	19
7	Esquema del análisis de predicción por el algoritmo Chou-Fasman in las dos variantes polimórficas (-9Ala y -9 Val) de MTS de la MnSOD humana.	20

8	Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....	35
9	Visualización de los productos amplificados de los genes <i>GSTT1</i> y <i>GSTMI</i> en gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....	36
10	Visualización de los productos amplificados del gen <i>MnSOD</i> , mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....	37
11	Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 107 pb del gen <i>MnSOD</i> con la enzima <i>NgoMIV</i> , mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (5,5%) en buffer TBE 1X.....	37
12	Esquema de la secuencia de eventos que llevan a la producción de ROS a partir del aumento de la agregación del péptido A β causado por la isoforma E4 de la apolipoproteína E.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	30
II	Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación (PCR) del polimorfismo Ala-9Val del gen <i>MnSOD</i>	31
III	Patrón de digestión para la asignación de los genotipos polimorfismo Ala-9Val del gen <i>MnSOD</i>	33
IV	Análisis del equilibrio de H-W para el polimorfismo en individuos sanos.....	38
V	Distribución de los alelos y de las combinaciones genotípicas de los genes <i>GSTT1</i> y <i>GSTM1</i> en pacientes con EA e individuos sanos.....	40
VI	Frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo <i>Ala-9Val</i> del gen <i>MnSOD</i> en pacientes con EA y controles sanos.	41

VII	Frecuencias de los genotipos del gen <i>APOE</i> en pacientes con EA e individuos sanos.....	42
VIII	Frecuencias de las combinaciones genotípicas <i>GSTT1/GSTM1/APOE</i> en pacientes con EA e individuos sanos.....	43
IX	Frecuencias de las combinaciones genotípicas <i>MnSOD/APOE</i> en pacientes con EA e individuos sanos.	44

INTRODUCCIÓN

En el año 1907, el neuropatólogo y psiquiatra clínico, Alois Alzheimer describió por primera vez la Enfermedad de Alzheimer (EA) al estudiar el caso de una mujer de 51 años de edad, que se encontraba en el manicomio de Frankfurt en Alemania, quien mostraba características clínicas que no correspondían con las enfermedades de demencia conocidas. Alzheimer diagnosticó a la paciente con demencia presenil y una vez realizada la autopsia, luego de su muerte, pudo evidenciar que presentaba atrofia cortical, pérdida de neuronas, placas y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral (Stelzma y col., 1995).

La Enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurológico degenerativo, progresivo e irreversible relacionado con la edad, que se caracteriza por la pérdida de la memoria y un deterioro de múltiples funciones cognitivas (Reddy y Beal, 2008). El diagnóstico se basa, principalmente, en los criterios desarrollados por el “*National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*” (NINCDS-ADRDA) (McKahann y col., 1984), o por los criterios de “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*” (DMS) (Cummings, 2005).

Los pacientes con la EA presentan lesiones en la corteza cerebral características de la enfermedad. Una de estas lesiones son las placas amiloides o neuríticas (Fig. 1). Estas placas son depósitos extracelulares de la proteína β -amiloide que por lo general se encuentran en grandes cantidades en la corteza de asociación límbica (Selkoe, 2001).



Figura 1. Placa neurítica o amiloide redondeada en el hipocampo de un paciente con demencia de Alzheimer (flecha negra) y neuronas en degeneración con ovillos neurofibrilares en el citoplasma (flecha roja). Las placas neuríticas contienen la proteína β -amiloide (Tomado y modificado de Perl, 2010).

El β -amiloide ($A\beta$) es un péptido de 39-42 aminoácidos, que deriva de la proteína precursora del amiloide (APP) (Casley y col., 2002; Keil y col., 2004). Esta proteína precursora del amiloide, es una proteína de membrana expresada en varios tipos celulares, incluyendo las neuronas, y se le ha relacionado con la formación de sinapsis, crecimiento axonal y dendrítico y supervivencia neuronal (De Strooper y Annaert, 2000). El procesamiento de la proteína precursora del amiloide puede ocurrir por dos vías: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, la APP pasa por una serie de proteólisis realizadas por dos enzimas, la β - y la γ - secretasas, las cuales cortan al comienzo y al final del dominio del péptido $A\beta$, respectivamente, produciendo así el péptido $A\beta$. En la vía no amiloidogénica la enzima α - secretasa realiza un corte de la cadena peptídica del $A\beta$ evitando la formación del péptido (Fig. 2) (Reddy y Beal, 2008).

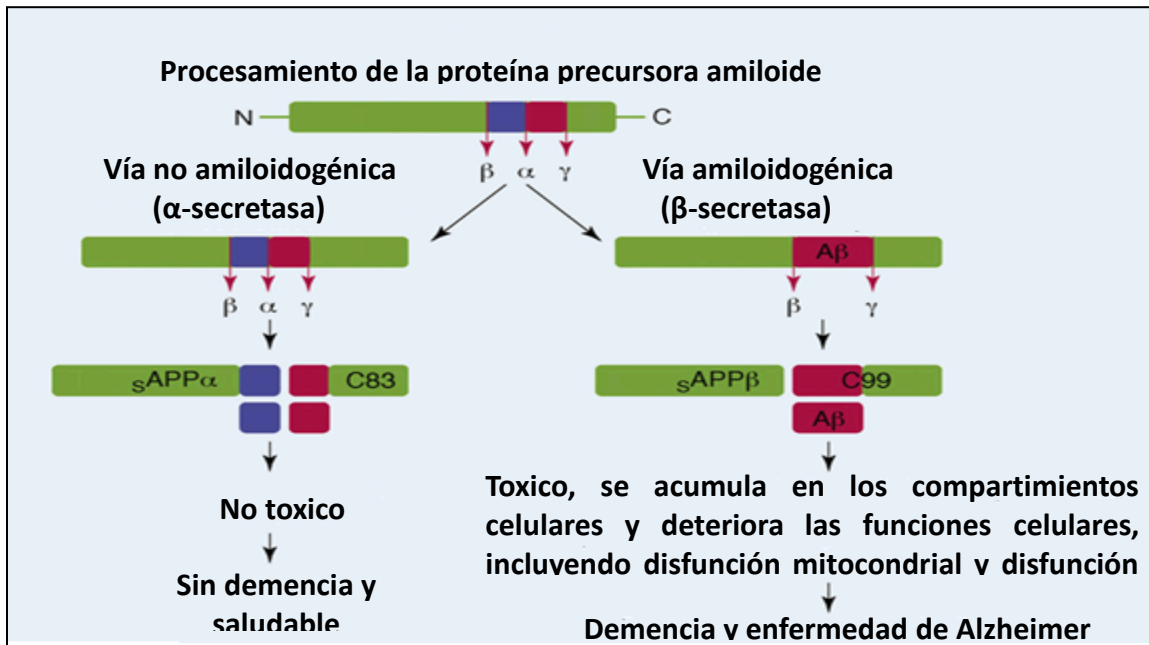


Figura 2. Procesamiento de APP en individuos sanos y pacientes con EA. El procesamiento de APP puede ocurrir por dos vías: la no amiloidogénica donde la α -secretasa corta dentro del dominio $A\beta$, generando un fragmento N-terminal soluble (sAPP- α) y un fragmento no amiloidogénico C-terminal de 83 aminoácidos (C83). En la vía amiloidogénica, el corte ocurre por la β -secretasa al comienzo del dominio de la $A\beta$ y genera un fragmento soluble N-terminal (sAPP- β) y un fragmento amiloidogénico C-terminal de 99 residuos (C99), que luego es cortado por la γ -secretasa y genera el péptido $A\beta$ (Tomado y modificado de Reddy y Beal, 2008).

La otra alteración estructural que se encuentra en el cerebro de pacientes con EA, es el ovillo neurofibrilar (Fig. 1). Estos ovillos consisten de 2 filamentos largos (10 nm de ancho), que se encuentran pareados y enrollados helicoidalmente, que pueden ser abundantes y ocupan gran parte del citoplasma peri-nuclear. Estos ovillos están constituidos por una proteína asociada a los microtúbulos llamada tau (Kosik y col., 1986). La agregación de la proteína tau, que ocasiona la formación de los ovillos, se produce por la hiper-fosforilación que causa su disociación de los microtúbulos y su agregación en pares de filamentos helicoidales insolubles (Selkoe, 2001). La proteína tau se expresa principalmente en la neuronas, donde facilita la formación de los

microtúbulos, reduce la inestabilidad de los mismos y desempeña un papel en el mantenimiento de la integridad neuronal y el transporte axonal (Mandelkow y Mandelkow, 1995).

Tanto el péptido β amiloide como los agregados pareados helicoidalmente de la proteína tau tienen un efecto neurotóxico. La neurotoxicidad del péptido $A\beta$ puede ocurrir por diversos mecanismos como: daño oxidativo, peroxidación lipídica, inflamación, hiperfosforilación de tau y aumento de la neurotoxicidad glutamatérgica. Por otro lado, la proteína tau puede ocasionar estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (Yan y col., 1994).

La EA afecta a las personas de diferente manera, pero el patrón de los síntomas más comunes se inicia con el deterioro gradual de la capacidad de recordar información nueva. Esto se debe a que las alteraciones de las células cerebrales comienzan en las regiones involucradas con la formación de nuevos recuerdos (Alzheimer's Association, 2010).

Los síntomas clínicos que presentan los pacientes con EA pueden ser de tres tipos: cognitivos, conductuales y neurológicos. Los síntomas cognitivos incluyen deterioro precoz y progresivo de la memoria, alteraciones del lenguaje, trastornos visuales-espaciales, anormalidades sensoriales y motoras, y alteraciones del caminar. Los conductuales incluyen: agitación, ansiedad, alucinaciones, trastornos en la conducta alimenticia y depresión. Los síntomas neurológicos se presentan en la fase avanzada de la enfermedad con discapacidad para realizar actividades cotidianas, incontinencia,

trastornos del movimiento, discapacidad funcional operativa por fracaso cognitivo-conductual (Cacabelos, 2001).

Con el pasar del tiempo se ha ido observando como la EA se ha ido convirtiendo en una de las causas más frecuentes de muerte en poblaciones mayores de 65 años. Los casos de muerte por EA han aumentado en un 66% en un período comprendido entre el año 2000 y 2008, mientras que otras causas de muertes consideradas como número uno han disminuido hasta un 13%, como es el caso de enfermedades cardíacas. La mayoría de los casos con EA causan complicaciones, como inmovilidad, problemas al tragar y desnutrición. Estas complicaciones aumentan la probabilidad de padecer neumonía, constituyendo la causa principal de muerte en personas mayores con EA y otras demencias (Alzheimer's Association, 2010).

Para el año 2010, se reportaron 36 millones de personas con demencia, principalmente la EA (Alzheimer's Association, 2010), estimándose que este número aumentará a 42 millones para el año 2020 y 81 millones para el 2040 (Ferri y col., 2005). En un estudio realizado en el año 1990 por el Grupo de Investigaciones de Demencias 10/66, se determinó una prevalencia del 7 % de la EA en la población venezolana adulta mayor de 65 años (Alzheimer's Disease International).

1. Subtipos de la Enfermedad de Alzheimer

Las causas de la EA todavía no son completamente conocidas, varios expertos aseguran que son un conjunto de factores los que provocan el desarrollo de la enfermedad (Alzheimer's Association, 2010).

Uno de los factores de riesgo es la edad avanzada, pero la EA no es algo normal del envejecimiento. Existen pacientes de 65 años o más que padecen la enfermedad, así como pacientes menores de 65 años que también la padecen (Alzheimer's Association, 2010). Se ha reportado que entre el 90 y 95 % de los casos de EA son de la forma esporádica, donde el factor genético es un factor de riesgo, mientras que en la forma familiar, existe una herencia autosómica dominante y se presenta en un 10% de los casos (Goedert y col., 1994). En las dos formas de la enfermedad, las lesiones cerebrales son las mismas y presentan el mismo patrón de distribución (Harman, 2006).

1.1. Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana

Los casos de aparición temprana suelen progresar más rápido que los de inicio tardío. Se ha observado que familias con mutaciones en el gen *APP* (proteína precursora del amiloide) desarrollan la enfermedad en edades comprendidas entre los 50 y 65 años. Este gen *APP* se localiza en el cromosoma 21 y se ha observado en individuos con el Síndrome de Down, quienes presentan 3 copias de este gen, la presencia temprana de las placas neuríticas (Selkoe, 2001).

Las mutaciones del gen *APP* que se han asociado a la EA se localizan en las cercanías de los sitios de corte de la α , β y γ secretasa, ya sea inhibiendo la acción de la α -secretasa o favoreciendo la acción de la β -secretasa, con lo cual se favorece la formación del péptido β -amiloide (Selkoe, 2001).

La EA familiar también se ha visto asociada a mutaciones en otros genes como: el gen de la presenilina 1 (*PSEN 1*) en el cromosoma 14, y el gen de la presenilina 2

(*PSEN 2*) en el cromosoma 1, que favorecen la producción del péptido β -amiloide aumentado la acción de la γ secretasa (Maccioni y col., 2001).

El procesamiento anormal de la APP y la formación incrementada del β -amiloide parecen ser los eventos centrales en la patogénesis de la forma familiar de la EA (De Strooper y Annaert, 2000).

La hipótesis amiloide propone que el péptido β -amiloide tiene un efecto tóxico en los cuerpos celulares adyacentes, como las dendritas, o en los procesos celulares, como la sinapsis, provocando así la muerte neuronal. Esta hipótesis presenta un gran soporte de estudios que demuestran la neurotoxicidad de $A\beta$ (Carter y Lippa, 1992).

1.2. Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.

Esta forma de la enfermedad es la más frecuente, afectando a más de 15.000.000 de personas en el mundo. La mayoría de los casos de aparición tardía son del tipo esporádico. La causa de la forma esporádica no se conoce debido a que la enfermedad es heterogénea y posiblemente sea causada por el envejecimiento en combinación con factores genéticos y ambientales (Blennow y col., 2006).

Un factor genético en la EA de aparición tardía es la apolipoproteína E4 (APOE- ϵ 4). El gen de *APOE* está localizado en el cromosoma 19q13.2 cerca y ligado a los genes de *apo CI/CII*. Este gen está formado por cuatro exones y tres intrones, con una extensión de 3.597 nucleótidos. El gen estructural *APOE* es polimórfico y los tres alelos más comunes, que se denominan ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, producen tres isoformas de la proteína llamadas E2, E3 y E4. Estos tres alelos son heredados en forma codominante dando

como resultado seis genotipos: $\epsilon 2/2$, $\epsilon 3/2$, $\epsilon 3/3$, $\epsilon 3/4$, $\epsilon 4/4$, $\epsilon 4/\epsilon 2$ (Chou y col., 2006). De estas variantes, $\epsilon 3$ es la más frecuente en todas las poblaciones estudiadas. Estos polimorfismos tienen efectos funcionales en el metabolismo de las lipoproteínas (Brickell y col., 2006). Todos heredamos un alelo del gen *APOE* de cada padre. Se ha observado que quienes heredan un alelo $\epsilon 4$ tienen mayor riesgo a desarrollar EA y quienes heredan ambos alelos tienen un riesgo aún mayor. Sin embargo, heredar una o dos copias del alelo, no garantiza que la persona padecerá EA (Alzheimer's Association, 2010; Cedeño, 2007).

2. Estrés oxidativo y la EA

El cerebro es el órgano aeróbicamente más activo. Aunque este órgano representa un 2 % de la masa corporal total, consume el 20 % del oxígeno total basal (Smith y col., 2007). El cerebro de un adulto tiene alrededor de 10^{11} - 10^{12} neuronas, las cuales son protegidas por el doble de microglías (Emerit y col., 2004). Las neuronas utilizan el O_2 tomado para producir el ATP que necesitan para su funcionamiento. Esta energía la obtienen de la fosforilación oxidativa durante la respiración aeróbica que ocurre en la mitocondria de la célula (Moreira, 2008). Sin embargo, esta fosforilación oxidativa es la principal fuente de radicales libres endógenos, entre los que se incluyen: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilo ($\cdot OH$) y superóxido (O_2^-) (Wallace, 1999).

Los radicales libres son moléculas que presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad, lo cual lo hace altamente reactivo y con una gran capacidad para combinarse y producir daño en moléculas integrantes de la estructura celular, como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell y Gutterioge, 1989).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, “*Reactive Oxygen Species*”) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés, “*Reactive Nitrogen Species*”) son la causa del estrés oxidativo en el sistema nervioso (Emerit, 2004).

Los radicales libres son eliminados de las células gracias a un sistema de defensas antioxidantes, que incluye sistemas enzimáticos y no enzimáticos, que actúan ya sea disminuyendo la concentración de oxidantes, uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas, transformando los peróxidos en productos menos reactivos o deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres (Dorado y col., 2003).

El desbalance entre la producción de ROS y su eliminación por el sistema antioxidante se conoce como estrés oxidativo (Ansari y Scheff, 2010).

La oxidación de los lípidos causa disfunción celular o muerte celular en el caso de las neuronas, que son células post-mitóticas. La oxidación también puede causar alteraciones en las estructuras de algunas proteínas y favorecer la formación de agregados de proteínas. A su vez, estas proteínas alteradas pueden inducir daño oxidativo aumentando la producción de ROS (Reddy y Beal, 2008). Un ejemplo es el péptido β -amiloide, cuya producción aumenta por la activación de la β -secretasa (Reddy y Beal, 2008). Este péptido se ha visto involucrado en la inhibición de complejos de la cadena respiratoria y en la reducción de los niveles de ATP. La inhibición en la cadena respiratoria, particularmente a nivel de la citocromo oxidasa, puede contribuir al estrés oxidativo por la producción de especies reactivas del oxígeno como resultado de la fuga de electrones en los complejos I y III (Pereira y col., 1998; Pereira y col., 1999).

El estrés oxidativo también puede causar la ruptura de las cadenas de ADN y la modificación de las bases nucleotídicas, que pueden provocar alteraciones en la transcripción y traducción de proteínas. Estas alteraciones del ADN pueden alterar el funcionamiento neuronal y provocar la muerte neuronal (Markesbery y Lovell, 2007).

Estos daños oxidativos pueden ser causados por el péptido A β y los filamentos pareados helicoidalmente de la proteína tau, los cuales constituyen las lesiones características de la EA (Fig. 3). Se ha reportado que el péptido β amiloide puede originar radicales libres mediante una reacción en la cual se reduce el Fe³⁺ o Cu²⁺ y se produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Huang y col., 1999). Este péptido A β también actúa inhibiendo a la enzima citocromo oxidasa, lo cual contribuye con el estrés oxidativo por la generación de radicales libres debido a la fuga de electrones de la cadena respiratoria (Hong y col., 2007). El estrés oxidativo, causado por el péptido β amiloide, a su vez afecta la producción de este péptido A β neurotóxico, aumentando la actividad de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, ambas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide a partir de la cual se origina el péptido A β (Praticó, 2008). Por otra parte también se ha evidenciado que los filamentos pareados helicoidalmente de la proteína tau pueden formar productos avanzados de glicación, generando especies reactivas de oxígeno suficientes para causar daño oxidativo (Yan y col., 1994).

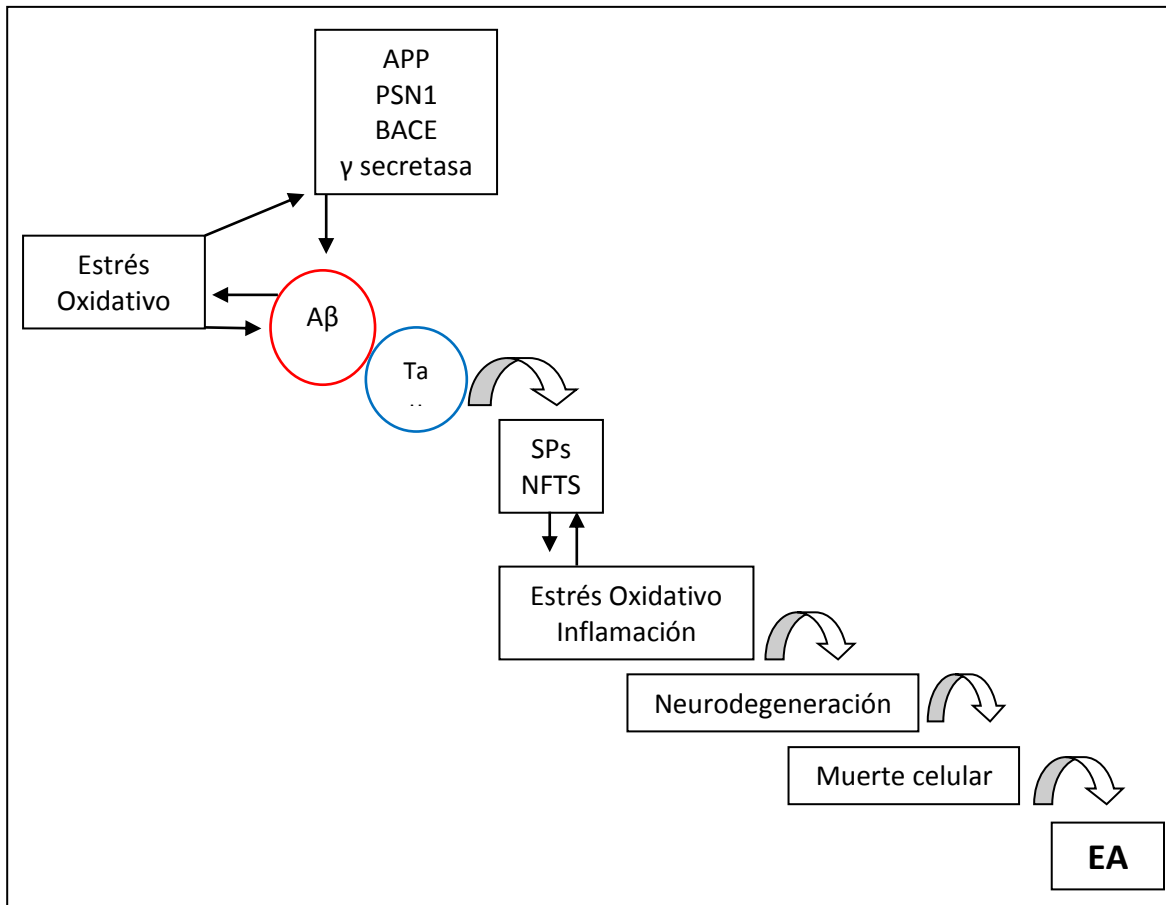


Figura 3. Mecanismos moleculares y patología en EA. Mutaciones genéticas en el gen que codifica la proteína precursora del péptido A β (*APP*) o en el gen de la presenilina-1 (*PSN1*) aumentan los niveles del péptido A β . El estrés oxidativo aumenta la formación de A β , ya sea aumentando los niveles de *APP* o modulando la actividad de la β -secretasa (*BACE*) y γ -secretasa. El péptido A β tiene habilidad oxidante, aumentando el estrés oxidativo. Los niveles elevados de A β favorecen la hiperfosforilación de tau. Con el tiempo se forman los depósitos extracelulares de A β (seniles plaques, *SPs*), mientras que la proteína tau hiperfosforilada forma los ovillos neurofibrilares (neurofibrillary tangles, *NFTs*). Ambas lesiones causan estrés oxidativo e inflamación que causan daño celular y llevan a la muerte celular (Tomado y modificado de Praticó, 2008).

2.1. Muerte neuronal

La muerte celular puede ocurrir por exitotoxicidad, necrosis o apoptosis, siendo esta última la forma más frecuente (Emerit y col., 2004).

2.1.1. Exitotoxicidad

Las funciones neurológicas, como la cognición, la memoria y la sensación, son procesos en los cuales el glutamato y su receptor específico de membrana están involucrados (Lipton y Rosenberg, 1994). En varias enfermedades neurodegenerativas la activación excesiva de estos receptores puede causar grandes daños neuronales. Se denomina exitotoxicidad a la activación excesiva de los receptores de glutamato (Fig. 4). Esta mayor activación de receptores provoca una gran entrada de Ca^{+2} a las neuronas, trayendo como consecuencia la activación de una serie de enzimas, incluyendo fosfolipasas, lipasas, endonucleasas y óxido nítrico sintasa. Una vez activada la fosfolipasa A2 se genera el ácido araquidónico y el factor activador de plaquetas, el cual aumenta los niveles de calcio al estimular la liberación de glutamato. El ácido araquidónico, por su parte, inhibe la recaptura del glutamato y durante el metabolismo de este ácido se producen radicales libres (Lipton y Rosenberg, 1994).

En condiciones normales la concentración extracelular del glutamato es 0,6 mmol/L, cuando la concentración llega a valores entre 2 y 5 mmol/L, se espera que ocurra daño exitotóxico. Para evitar que esto suceda el glutamato es tomado del espacio extracelular por un sistema de alta afinidad dependiente de sodio, que lo transporta a los astrocitos y neuronas a través de transportadores (Lipton y Rosenberg, 1994).

Los astrocitos toman el glutamato y por medio de la glutamina sintetasa lo convierten en glutamina, que luego es liberada para la absorción por las neuronas, quienes vuelven a convertirlo en glutamato por medio de la glutaminasa. El estrés oxidativo puede dañar fácilmente la glutamina sintetasa provocando una interrupción de

este ciclo, causando acumulación extracelular del glutamato que provoca una gran activación de receptores glutamínicos (Emerit y col., 2004).

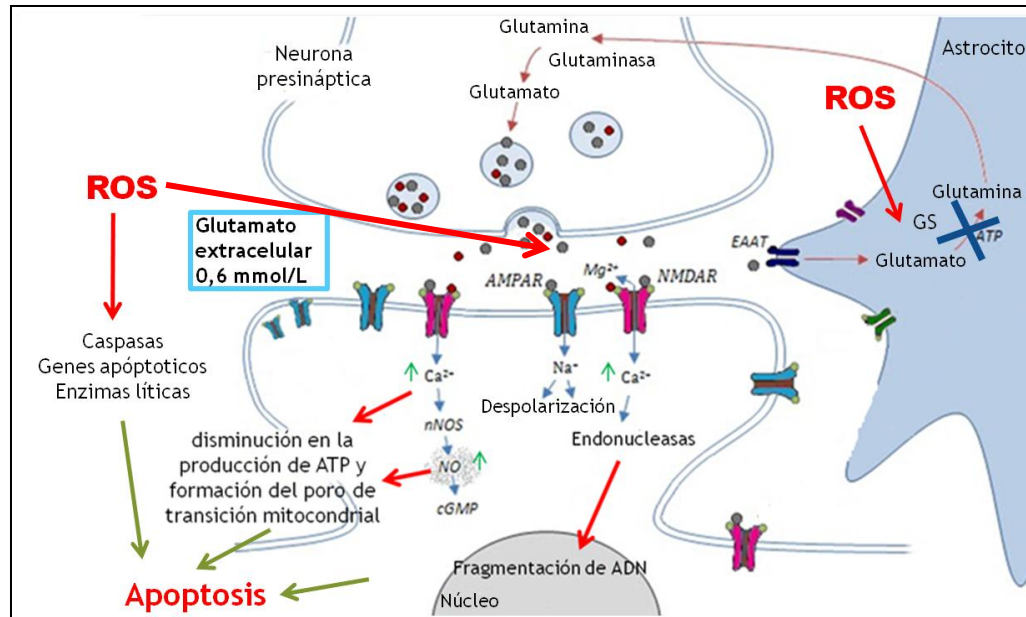


Figura 4. Exitotoxicidad neuronal. El aumento en los niveles de ROS produce que la neurona pre-sináptica libere el neurotransmisor excitatorio glutamato, que es captado por los receptores NMDA en la neurona post-sináptica. La sobre activación de los receptores NMDA lleva a un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} que activa endonucleasas, fosfolipasa y proteasas, así como a la óxido nítrico sintasa (NOS). El aumento en los niveles de óxido nítrico y calcio hacen que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial. El daño mitocondrial y el daño al ADN induce la activación de genes que llevan a la muerte por apoptosis. Los astrocitos normalmente captan el glutamato y lo regresan a la neurona en forma de glutamina, pero cuando hay estrés oxidativo las especies reactivas de oxígeno afectan a la glutamina sintetasa, de tal forma que se acumula glutamato extracelular. Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno también activan genes apoptóticos, caspasas y enzimas líticas llevando a la neurona a muerte celular por apoptosis (Tomado y modificado de Dorado y col., 2003).

Las endonucleasas activadas por el calcio que entra a las neuronas producto de la activación de los receptores, provocan la fragmentación de ADN, mientras que el aumento en la concentración de calcio y óxido nítrico en las neuronas provocan la disminución de la producción de ATP y la formación del poro de transición

mitocondrial. El déficit de ATP no permite el funcionamiento de la bomba dependiente de ATP y trae como consecuencia una entrada masiva de agua y sodio y una salida de potasio, causando la muerte celular. Este daño mitocondrial y el daño al ADN induce la activación de genes que desencadenan la apoptosis (Dorado y col., 2003).

2.1.2. Apoptosis y necrosis

La apoptosis es un proceso activo que involucra la muerte celular, en la cual no hay inflamación pero si cambios morfológicos que se manifiestan en el núcleo como: condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, mitocondrias electrodensas con cambios morfológicos y fragmentación celular en cuerpos apóptoticos que son fácilmente fagocitados. Los ROS pueden provocar la activación de caspasas, de genes apoptóticos y enzimas líticas que causan apoptosis (Dorado y col., 2003).

Por otra parte, la necrosis es un evento pasivo que ocurre por algún tipo de agresión, que provoca un mayor flujo de calcio. En este caso, sí se da una respuesta inflamatoria aguda, ocurren cambios metabólicos progresivos como reducción de ATP, ruptura de membranas, edema celular, liberación de hidrolasas, y fragmentación de ADN por endonucleasas. El daño oxidativo lleva a la necrosis, implicando una pérdida en la regulación por déficit de ATP que impide el funcionamiento de bombas causando entrada masiva de agua y sodio, provocando un edema celular. Este proceso de necrosis activa la muerte celular programada de células vecinas (Dorado y col., 2003).

2.2. Mecanismos eliminadores de radicales libres

La producción de radicales libres es un proceso inevitable que ocurre como consecuencia de la respiración aeróbica de las células. Los sistemas antioxidantes son las

defensas que presentan las células para evitar el daño oxidativo que los radicales pueden causar (Marcus y col., 2006). Los antioxidantes pueden ser enzimáticos, como la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión S-transferasa y la superóxido dismutasa o no enzimáticos, como ferritina, transferrina, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), licopeno, albúmina y bilirrubina, los cuales se consideran que tienen propiedades antioxidantes (Dorado y col., 2003). Como el cerebro tiene un alto consumo de oxígeno, es un tejido post mitótico con altas demandas de energía y posee una capacidad antioxidante limitada en comparación con otros tejidos, es muy susceptible al daño oxidativo, por lo que es de gran importancia que las defensas antioxidantes sean efectivas en la eliminación de los radicales libres (Lovel y Markesbery, 2007)

2.2.1. Glutatión-S-transferasa (GST)

La glutatión S transferasa es una enzima de la fase II de biotransformación que actúa en el sistema antioxidante catalizando la conjugación de radicales libres con el glutatión reducido, que actúa como un donante de electrones, protegiendo de esta forma a la célula de daños oxidativos (Zuntar y col., 2004). Las GST humanas se diferencian en dos súper familias, la súper familia citosólica o soluble y la súper familia microsomal (Hayes y Strange, 1995). Las enzimas de la familia microsomal están involucradas principalmente en el metabolismo del ácido araquidónico (Jakobsson y col., 1999), mientras que las enzimas de la familia citosólicas (GSTs) son enzimas diméricas que catalizan la conjugación del glutatión con drogas quimioterapéuticas, carcinógenos, xenobióticos y radicales libres, para facilitar su disolución en el medio acuosa celular y su eliminación del cuerpo (Haradam y Abei, 1992).

La súper familia de las GSTs están codificadas por aproximadamente 16 genes, subdivididos en 8 clases denominadas: Alpha (α), Kappa (κ), Mu (μ), Pi (π), Sigma (ς), Theta (θ), Zeta (ζ) y Omega (ω) (Hayes y Strange, 2000). Las clases μ y θ son conocidas por su capacidad de catalizar la desintoxicación de oxígeno reactivo y los productos de la peroxidación lipídica (Pinhel y col., 2008).

La clase μ comprende cinco isoenzimas diferentes, denominadas desde *GSTM1* a *GSTM5*, mientras que la clase θ comprende dos isoenzimas, la *GSTT1* y *GSTT2*. El gen *GSTM1* se localiza en el cromosoma 1 (1p13.3) y presenta 3 alelos, *GSTM1*A*, *GSTM1*B*, los cuales codifican para proteínas de 218 aminoácidos con una actividad enzimática idéntica, que difieren en una sustitución de una citosina por una guanina en la posición 543, y el alelo nulo *GSTM1*0* el cual consiste en una eliminación del gen. Este gen está ausente en un 10 a 64 % de la población según el grupo de estudio (Cooper, 1999). Por otra parte, el gen *GSTT1* se localiza en el cromosoma 22 (22q11.2) y presentan dos alelos, alelo nulo *GSTT1*0* y el alelo *GSTT1*A* que codifica para una proteína de 240 aminoácidos. El genotipo nulo del gen *GSTT1* se encuentra en un 10 a 20% de los individuos según la población de estudio (Pemble y col., 1994). Los genotipos nulos de estos genes (*GSTM1*0* y *GSTT1*0*) se caracterizan por una eliminación homocigota del gen completo, por lo que no hay actividad de la enzima (Cooper, 1999). La eliminación de estos genes parece haber ocurrido por una recombinación homóloga entre dos regiones idénticas que flanquean a estos dos genes (Fig 5.) (Xu y col., 1998). Tanto la *GSTT1* como la *GSTM1* son conocidas por su capacidad para catalizar la conjugación de ROS y lípidos producto de la peroxidación,

por esta razón la inactividad enzimática de GSTT1/M1 se relaciona con una mayor exposición al estrés oxidativo (Uzunoglu y col., 2006).

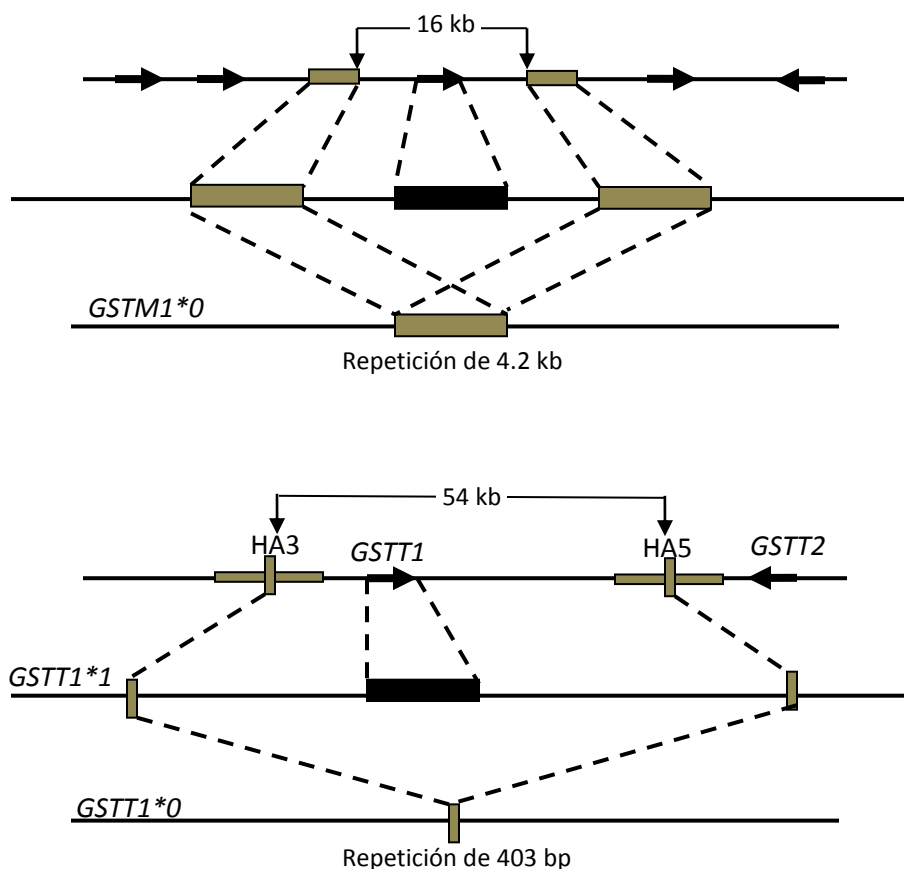


Figura 5. Estructura de los genes *GSTT1* y *GSTM1*. La recombinación homóloga de ambas repeticiones que flanquean cada gen da a lugar a la eliminación del gen completo (Tomado de Cooper, 1999)

2.2.2. Superóxido dismutasa (SOD)

Esta enzima es una de las principales defensas contra los daños que puede provocar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), catalizando la conversión del superóxido en

oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ($2O^{-2} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), que luego será convertido en agua por la acción de la enzima catalasa o la glutatión peroxidasa (Marcus y col., 2006). Existen tres isoformas de esta enzima: la citosólica (Cu/ZnSOD), la extracelular (EC-SOD) y la mitocondrial (MnSOD) (Zelko, 2002).

El 90 % de las especies reactivas de oxígeno se originan en la mitocondria, por lo que la MnSOD es un antioxidante crítico en la protección de las células frente al estrés oxidativo. Además, de la gran producción de ROS en este organelo, también se debe considerar que el ADN mitocondrial es muy susceptible al daño oxidativo debido a los niveles del metabolismo de oxígeno, la reparación relativamente ineficiente del ADN y la falta de histonas (Perry y col., 2010). La actividad de esta enzima mitocondrial, provee una defensa frente a la peroxidación de lípidos y protege la viabilidad de la membrana neuronal. La MnSOD es un homo-tetramero, donde cada una de las unidades consta de 196 aminoácidos y tiene unida a ellas un ión manganeso (Ventriglia y col., 2005).

La enzima MnSOD es codificada por el gen *SOD2* que se encuentra en el cromosoma 6q25 (Ventriglia y col., 2005). Esta enzima es sintetizada en el citosol y luego es transportada a la mitocondria. En el transporte de esta enzima a la mitocondria está involucrada una secuencia de 24 aminoácidos que se denomina secuencia blanco mitocondrial (MTS), la cual forma una estructura anfifílica helicoidal necesaria para su transporte hacia la mitocondria. En la matriz mitocondrial la secuencia blanco es escindida y la proteína madura se ensambla formando el homo-tetramero (Sutton y col., 2003). La sustitución de una timina (T) por una citosina (C) en el nucleótido 47, provoca el cambio de aminoácido Val \rightarrow Ala en la posición -9 de la MTS (Fig. 6), lo que causa la

alteración de la estructura secundaria de la enzima. Modelos computarizados muestran una estructura en forma de alfa hélice para la variante Ala, mientras que en la variante Val la estructura es de lámina beta causando la retención de esta variante en la membrana mitocondrial, en contraste la variante con Ala se localiza en la matriz mitocondrial (Shimoda-Matsubayasi y col., 1996) (Fig. 7). Estos cambios en la estructura afectan el transporte de la MnSOD dentro de la mitocondria y, por tanto, afecta la defensa celular contra los radicales superóxidos (Sutton y col., 2003).

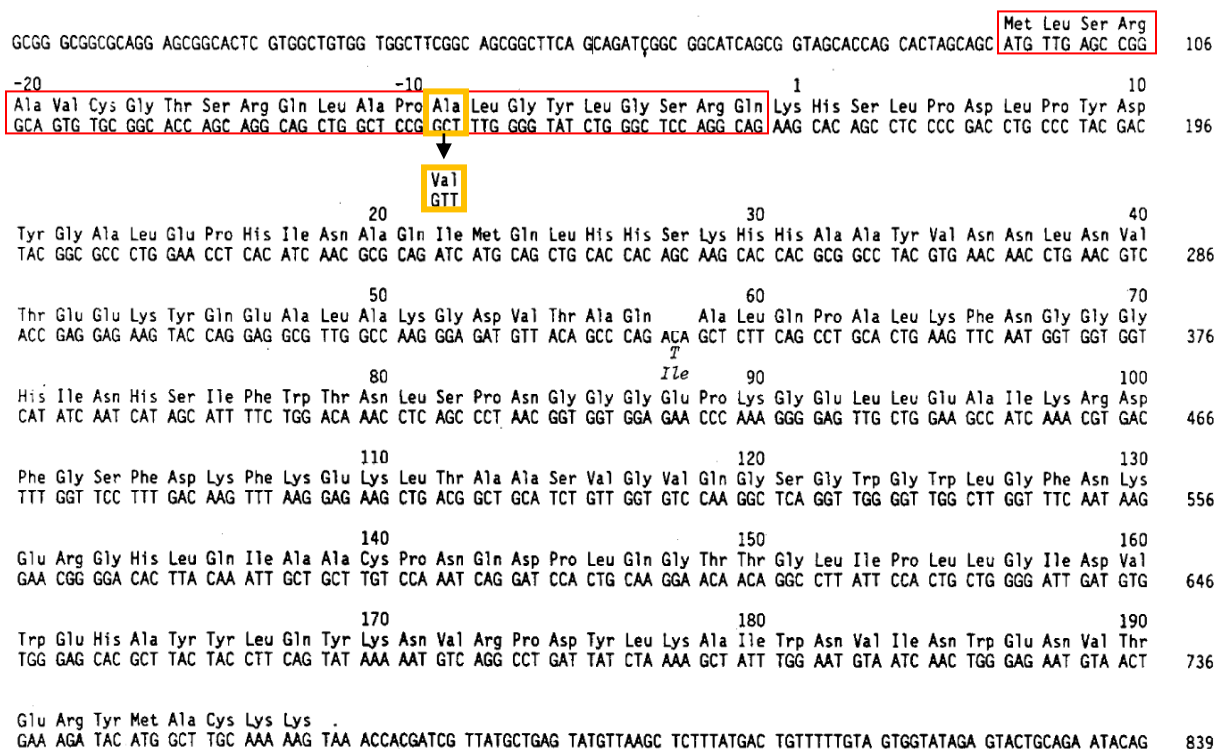


Figura 6. Nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ADNc que codifica para la enzima MnSOD humana. Recuadro rojo la secuencia blanco mitocondrial y recuadro amarillo el aminoácido alanina en la posición -9 de la secuencia blanco mitocondrial (Tomado y modificado de Ho y Crapo, 1988).

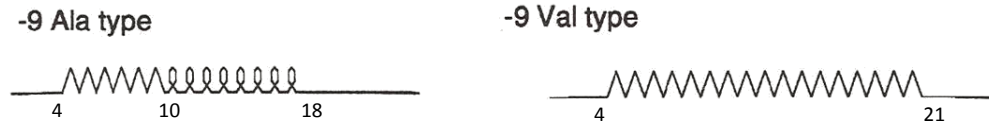


Figura 7. Esquema del análisis de predicción por el algoritmo Chou-Fasman en las dos variantes polimórficas (-9Ala y -9 Val) de MTS de la MnSOD humana. (Tomado y modificado de Shimoda-Matsubayasi y col., 1996).

ANTECEDENTES

Existen una gran cantidad de evidencias que sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la neurodegeneración en la EA.

Roger Nitsch y colaboradores (1992) encontraron que dos clases de fosfolípidos, PtdCho (fosfatidil-colina) y PtdEtn (fosfatidil-etanolamida), se encontraban en menor cantidad en la corteza cerebral de pacientes con EA en comparación con individuos controles. Seis años después, Prasad Renuka y colaboradores (1998) también observaron una disminución de fosfatidil-etanolamida (PtdEtn) y fosfatidil-inositol (PI) en el cerebro de pacientes con EA, estos fosfolípidos son ricos en ácidos grasos poli-insaturados fácilmente oxidables, por lo que esta disminución sugiere un papel del estrés oxidativo en el aumento de la degradación de los fosfolípidos en cerebros de pacientes con EA.

Por otra parte, Sayre (1997) y Markesbery (1998) reportaron un aumento en la cantidad de 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producto de la peroxidación lipídica que se ha demostrado es neurotóxico. Las regiones del cerebro donde se encontró un aumento significativo de 4-HNE en pacientes con EA fueron el hipocampo, la circunvolución del

hipocampo y la amígdala, que son regiones que muestran las alteraciones histopatológicas más pronunciada en los pacientes que padecen la enfermedad. Para este mismo año (1998), Lovell y colaboradores observaron una disminución en la actividad de la glutatión S transferasa, la cual interviene en el proceso de eliminación del 4-HNE. Las regiones donde Lovell detecta la disminución de la actividad de esta enzima, corresponden con las regiones donde Markesbery observó un aumento de 4-HNE y en otras regiones más del cerebro. Al ser el 4-HNE neurotóxico, una disminución en la actividad de la GST podría relacionarse con la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (Lovell y col., 1998). Otra enzima que se ha encontrado con niveles de oxidación mayores en pacientes con EA en comparación con individuos sanos es la glutatión sintasa (Butterfield y col., 1997).

El isoprostano (IsoPs) y neuroprostano (NPs) son productos de la oxidación no enzimática inducida por radicales libre del ácido docosahexaenóico y ácido araquidónico (Roberts y col., 1998). Montine y colaboradores notifican, para el año 1998, un aumento de los niveles de IsoPs en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA, mientras que en el año 2001 Erin Reich observa un aumento significativo en los niveles de NPs en cerebros de pacientes con EA en comparación con cerebros de individuos sanos.

Otras evidencias de mayor oxidación proteica en cerebros de pacientes fueron notificadas por Smith y colaboradores (1991) y Hensley y colaboradores (1995), los cuales encontraron niveles elevados de productos de la oxidación proteica, como son los carbonilos en el lóbulo frontal, hipocampo y la circunvalación temporal media de los cerebros de pacientes con EA.

Las evidencias del papel del estrés oxidativo en la Enfermedad de Alzheimer también se han encontrado a nivel del material genético. Mecocci y colaboradores (1994) notificaron un aumento triplicado de los niveles de 8-hidroxi-2 deoxiguanosina (8-OHdG) en el ADN mitocondrial y una menor diferencia en el ADN nuclear. Este compuesto (8-OHdG) se produce con la oxidación del ADN por el ataque de grupos hidroxilo. Este aumento triplicado de oxidación de ADN en la mitocondria confirma que la mitocondria es altamente sensible a la oxidación. En 1998, Gabbita y colaboradores también reportan un aumento en la cantidad de ADN nuclear oxidado en los pacientes con EA, mientras que Nunomura y colaboradores (1999) reportan las primeras evidencias de aumento en la oxidación del ARN en pacientes con EA.

Además, de una mayor oxidación de lípidos, proteínas y ADN, también se han observado diferencias en la actividad y polimorfismos de los genes que codifican las enzimas GST (T1 y M1) y MnSOD en pacientes con Alzheimer.

Stroombergen M. y Waring R (1999) realizaron un estudio para determinar el polimorfismo de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en pacientes con EA (n= 43), Enfermedad de Parkinson (n= 187) y enfermedades neuromotoras (n= 65), encontrando que la eliminación del gen *GSTT1* (alelo *GSTT1*0*) parece proporcionar susceptibilidad a padecer la EA. Un resultado similar fue presentado por Pinhel, M. y colaboradores (2008), quienes realizaron un estudio de los polimorfismos de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en una población brasilera (n= 215). Ellos encontraron que el alelo *GSTT1*0* en combinación con el alelo *APOE ε4* proporciona susceptibilidad a padecer EA.

En otro estudio realizado, en el año 2010, por Ansari y colaboradores se analizó la actividad de una variedad de enzimas, incluyendo la GST. El estudio fue realizado en muestras congeladas de corteza frontal de pacientes con EA e individuos sanos. En este estudio se publica que hay una disminución significativa de la enzima en las fracciones de la mitocondria y sinaptosomas de los pacientes con EA en comparación con los controles. Otra de las enzimas estudiadas fue la MnSOD, encontrando una actividad disminuida en los pacientes con EA en comparación con el grupo control.

También se han realizado estudios del polimorfismo *Ala -9Val* del gen *MnSOD*. Ventriglia y colaboradores, en el año 2005, realizaron un estudio en pacientes con Alzheimer, en el cual no observaron diferencias significativas ni en la frecuencia alélicas, ni genotípicas de la variante *Ala -9Val* en los pacientes con EA en comparación con los controles, sugiriendo que no parece haber ninguna asociación entre el polimorfismo de dicho gen y la susceptibilidad a la enfermedad.

Un factor genético de riesgo a padecer la EA, es el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*. Existen diversos estudios que reportan un mayor riesgo a padecer la EA en pacientes que presentan una o dos copias del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* (Strittmatter, y col., 1993; Saunders, y col., 1993). En el año 2007, Cedeño realizó un estudio del polimorfismo del gen *APOE* en pacientes venezolanos con EA, reportando frecuencias incrementadas del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con EA en comparación con los controles.

Considerando el papel de las enzimas GSTT1, GSTM1 y MnSOD en la defensa frente al estrés oxidativo y la existencia de una posible relación entre el estrés oxidativo

y la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer, nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el polimorfismo de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* en individuos venezolanos sanos y con la Enfermedad de Alzheimer (EA).

Objetivos específicos:

1. Detectar, mediante técnicas de biología molecular, la presencia o ausencia de los genes *GSTT1* y *GSTM1*, en individuos con EA e individuos sanos.
2. Establecer asociaciones entre las mutaciones nulas de *GSTM1* y *GSTT1* y el riesgo de sufrir EA.
3. Establecer posibles asociaciones entre el polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* y el riesgo a padecer EA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes con EA

El estudio fue realizado en 79 pacientes (edad promedio de 70 ± 10 años) diagnosticados con la Enfermedad de Alzheimer del tipo esporádico, quienes acudieron al Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario, entre Septiembre del 2004 y Octubre del 2006. Estos pacientes fueron seleccionados según el protocolo clínico aplicado en la Unidad de Neuropsicología Dr. Luis Borges, del Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Caracas (Cedeño, 2007). Dicho protocolo se estructuró de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) Los criterios de la Sociedad Psiquiátrica Americana (DSM-IV) del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales (NINCDS) y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (ADRDA).
- b) Evaluación médica geriátrica, la cual consistió en la historia clínica general y la aplicación de la escala de Deterioro Global de Resberg (GDR) y del Test de Demencia Clínica (CDR).
- c) Evaluación médica neurológica según protocolo clínico específico, documentada con el mini-examen mental de Folstein, la escala isquémica de Hachinski y los instrumentos de evaluación diagnóstica para demencia vascular (ADDTC, MINDA-ADRA).
- d) Evaluación psicológica, realizada mediante entrevistas dirigidas a pacientes y familiares, así como también la aplicación de baterías de pruebas neuropsicológicas y el Alzheimer's Disease Assesment Scale (ADAS).

- e) Estudios imagenológicos correspondientes a la evaluación estructural por neuro-imagen mediante las pruebas de tomografía axial computarizada (TAC) y/o resonancia magnética (RM).
- f) Estudios de laboratorio: hematología completa química sanguínea, electrolitos, hormonas tiroideas (T3, T4, TSH), VDRL y VIH, niveles de B12.
- g) Electroencefalograma de manera opcional.

2. Selección del grupo control

El grupo control estuvo conformado por 100 individuos sin la Enfermedad de Alzheimer, venezolanos, con un promedio de edad de 71 ± 10 años. A este grupo se le realizó el mini-examen mental de Folstein, las pruebas de laboratorio e imagenológicas (Cedeño, 2007).

Todos los individuos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado, el cual en el caso de los pacientes con EA, fue autorizado por su representante. Dicho consentimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del IVIC y del Hospital Clínica de Caracas.

3. Extracción del ADN genómico

El ADN genómico fue extraído por el Dr. N. Cedeño, quien utilizó los siguientes métodos: el método con solvente orgánico (Bunce, 2000) y la utilización del estuche comercial Qiagen Kit (QIAamp DNA Mini Kit).

El ADN se obtuvo a partir de 10 mL de sangre periférica utilizando EDTA como

anticoagulante.

a) **Extracción de ADN por el Método de Bunce :**

La muestra de sangre periférica se centrifugó durante 10 min a 1000g para obtener los leucocitos (capa blanca), los cuales fueron lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB, red cell lysing buffer). Luego se centrifugó a 1000g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quedó de color blanco.

El precipitado se resuspendió en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB, nuclear lysis buffer) y se dejó en baño a 56°C hasta que se disolvió. Luego se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó por vórtex, se añadieron 2 mL de cloroformo, se volvió a agitar hasta formar una solución lechosa, se centrifugó durante 20 min a 1000g, se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de polipropileno.

A la fase acuosa se le añadieron 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rotó el tubo hasta que precipitó el ADN, se atrapó la malla con una pipeta de transferencia de polipropileno y se pasó a un tubo eppendorf estéril de (1,5 mL). El ADN se resuspendió en etanol (70%) y se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad y se volteó el tubo sobre una servilleta para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN hasta su dilución en buffer TE 1X.

b) **Extracción de ADN empleando el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen):**

Se tomaron 200 µL de la capa de células blancas y se mezclaron con 20 µL de la solución stock de proteasas y 200 µL de buffer AL, mezclándose durante 15 segundos en vórtex. Se incubó a 56°C durante 10 min y se añadieron 200 µL de etanol 96%, se

mezcló por vórtex durante 15 segundos y se centrifugó para bajar las gotas. Esta mezcla se hizo pasar por una columna de QIAamp sin mojar los bordes, se tapó bien y se centrifugó a 6000g por 1 min. Luego la columna fue colocada en un tubo colector de 2 mL y se le añadieron 500 μ L de buffer Aw1 sin mojar los bordes, se centrifugó a 6000g durante 1 min. Seguidamente, se colocó la columna en un tubo colector de 2 mL y se descartó el que posee el filtrado.

Se abrió la columna y se añadieron 500 μ L de buffer Aw2 sin mojar los bordes, se tapó bien y se centrifugó a máxima velocidad durante 4 min. Se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 200 μ L de buffer AE, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugó a 6000g por 1 min.

4. Ajuste de la concentración de ADN

La concentración de ADN se estimó por lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de cada muestra (2 μ l) utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000).

La concentración del ADN (μ g/mL) se determinó a través de la siguiente por la fórmula:

[ADN] doble cadena = 50 μ g /mL (factor constante) \times DO 260nm.

1DO260nm = 50 μ g de ADN/mL

Se calculó el índice = DO260nm / DO280nm (Debe ser mayor a 1,6) y se ajustó la concentración de ADN a 200 μ g/mL.

5. Integridad del ADN

La integridad de las muestras extraídas se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,75% en TBE 1X, utilizando bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) para la detección del ADN. En cada pozo del gel se colocaron 2 μ l de buffer de carga con 5 μ l de

ADN. En uno de los pozos del gel se colocó, como control de la concentración del ADN, 5µl del fago lambda (200 µg/mL) sin digerir. La corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de 100 voltios por media hora.

6. Métodos para el análisis de los polimorfismos.

El análisis de los genes de interés se realizó empleando la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica fue descrita en el año 1983 por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987).

El principio básico de la PCR es el incremento exponencial de una secuencia específica de ADN utilizando iniciadores oligonucleotídicos, cuyas secuencias corresponden con la region blanco y delimitan el segmento de ADN a amplificar (Mullis, K y Faloona, F.A., 1987).

Para llevar a cabo los análisis realizados se utilizaron dos técnicas: 1. PCR-SSP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Iniciadores de Secuencias Específicas), que permite identificar el polimorfismo, utilizando iniciadores específicos durante el proceso de PCR (Shyamala y Ames, 1993). 2. PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción), técnica mediante la cual el producto obtenido por PCR es incubado con enzimas de restricción, las cuales reconocen y digieren secuencias de ADN en sitios específicos, originando fragmentos de distintas longitudes asociados al polimorfismo existente, es decir, originando patrones de digestión distintos (Arens, 2001).

6.1. PCR-SSP de los genes *GSTT1*/*GSTM1*

Para detectar la presencia o ausencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se utilizó el método PCR múltiplex, utilizando el protocolo modificado y los iniciadores específicos publicados por Chen y colaboradores (Chen y col., 1996) (Tabla I).

La PCR se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X; 0,75 μ M de cada uno de los iniciadores de los genes *GSTM1* y *GSTT1*; 0,2 μ M de los iniciadores de β -globina; 2,5 mM de KCl; 0,4 mM de Tris HCl; 0,2 mM de dNTPs; 3,3 mM de MgCl₂; 1,25 U/ml de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) y agua destilada hasta completar un volumen final de 15 μ l. Se utilizaron 5 μ l de muestra de ADN genómico (200 μ g/ml) para un volumen total de reacción de 20 μ l.

TABLA I. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de *GSTM1* y *GSTT1*. Se indica el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como las características de los iniciadores para β -globina como control positivo de la reacción.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>GSTM1</i>	F1 R1	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G	219
<i>GSTT1</i>	F1 R1	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	459
β -globina	F1 R1	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	286

El ciclo de reacción utilizado fue el siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 64°C durante 1 minuto y

extensión a 72°C durante 1 minuto. Culminado el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C durante 5 minutos.

Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Sigma) al 2 %, tratado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 35 min a 100 voltios.

6.2 PCR-RFLP del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD*

El polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD*, que conlleva al cambio del aminoácido Alanina por Valina en la posición -9 de la secuencia blanco mitocondrial (SNP-9 T/C) del gen *MnSOD*, se estudió mediante la técnica de PCR-RFLP, utilizando los iniciadores (Tabla II) y protocolo de amplificación descritos por Ambrosone y colaboradores (Ambrosone y col., 1999).

TABLA II. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación (PCR) del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD*. Se indica el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>MnSOD</i>	F1 R1	ACC AGC AGG CAG CTG GCG CCG G GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG	107

La amplificación se realizó en un termociclador empleando la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X; 1,2 pmol de cada iniciador; 1,87mM de dNTPs; 2,0 mM de MgCl₂; 1,25 U/ml de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) y agua destilada hasta completar un volumen final de 18 µl. Se utilizaron 2 µl de muestra de ADN genómico (200 µg/ml), para un volumen de reacción de 20 µl.

La reacción de amplificación consistió de un ciclo de desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C durante 7 minutos.

El producto de PCR de 107 pb se verificó en geles de agarosa al 1,5% (Sigma), tratado con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 45 minutos. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

El producto amplificado fue digerido con la enzima de restricción *NgoMIV* (Promega), cuyo sitio de reconocimiento es 5'...GCCGGC...3' y 3'...CGGCCG...5'. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: buffer de digestión 1X, 1U de enzima *NgoMIV*, 6 µl de ADN (200mg/µl) y agua destilada hasta un volumen final de 15 µl. La reacción se incubó a 37°C durante 16 horas.

El producto amplificado al ser sometido a la digestión con la enzima de restricción puede generar tres bandas (107 pb, 89 pb y 18 pb) correspondientes al genotipo heterocigoto (V/A), dos bandas (89 pb y 18 pb) correspondiente al genotipo homocigoto de la variante mutada (A/A) o una sola banda (107 pb) correspondiente al genotipo homocigoto silvestre (V/V) (Tabla III). Los productos de la digestión se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 5,5%, utilizando bromuro de etidio (0,5µg/ml) para la detección del ADN. La corrida electroforética fue realizada a 100 voltios durante 50 min.

TABLA III. Patrón de digestión para la asignación de los genotipos polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD*.

Genotipo	Número de bandas obtenidas después de la digestión con la enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos de ADN producidos
VV	1	107 pb
VA	3	107 pb 89 pb 18 pb
AA	2	89 pb 18 pb

7. Análisis estadísticos.

El análisis estadístico se realizó calculando las frecuencias alélicas y genotípicas.

Las frecuencias alélicas (FA) para el gen *MnSOD*, fueron obtenidas por conteo directo a partir de los alelos asignados a cada individuo. Se determina el número de veces que se observa el alelo y se divide entre dos veces el número total de individuos estudiados (N).

$$FA = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el alelo}}{2N}$$

Las frecuencias genotípicas de cada gen, fueron obtenidas por conteo directo a partir de los genotipos asignados a cada individuo. Se determina el número de veces que se observa el genotipo y se divide entre el número total de individuos estudiados (N).

$$FG = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el genotipo}}{N}$$

Se realizó la prueba de equilibrio para la distribución genotípica en el grupo control de acuerdo a Hardy-Weinberg (H-W). La significancia (p) del desequilibrio de los genotipos se calculó con la prueba de χ^2 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$$

Donde O es el valor de las frecuencias observadas y E el valor de las frecuencias esperadas. La significancia (p) del mismo se buscó en la tabla de χ^2 con 1 grado de libertad.

La asociación del alelo o genotipo con la condición de estudio (EA), se estimó de acuerdo a los postulados de Woolf y Haldane, calculando, a partir de tablas de contingencia 2x2, la relación de probabilidades (OR, odds ratio) (Haldane J.; 1956). La significancia estadística se determinó por la prueba exacta de Fisher.

El OR es usado para estimar el riesgo en estudios caso-control en los cuales los cálculos de riesgo relativo no son apropiados. Un OR < 1 indica protección, mientras un OR >1 indica un riesgo incrementado. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

3.1.- Integridad del ADN genómico

Una vez ajustada la concentración del ADN a 200µg/mL, fue visualizado en geles de agarosa al 0,75% utilizando bromuro de etidio para su detección. Esto permitió verificar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200µg/mL (ADN sin digerir de fago lambda). Estos geles también permitieron verificar la integridad del ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica (Fig.8).

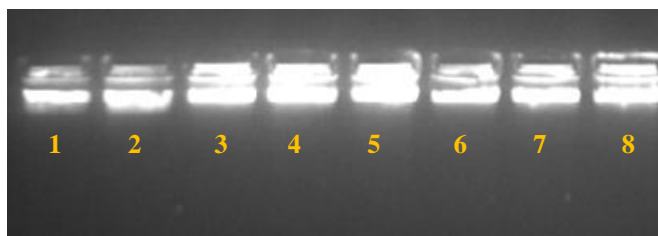


Figura 8. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,5%) en buffer TBE 1X, tratado con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al fago lambda ajustado a 200µg/ml (marcador de referencia) y a continuación (carril 2 al 8) corresponde a las muestras de ADN de algunos de los individuos incluidos en el estudio.

3.2. Detección de los genes *GSTT1* y *GSTM1* por PCR-SSP

Para detectar la presencia o ausencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se utilizó el método PCR, empleando las condiciones descritas en la metodología, obteniéndose una banda de 219 pb para el gen *GSTM1*, 459 pb para el gen *GSTT1* y 286 pb para el control interno (*β-globina*). Es importante mencionar que la presencia de las bandas de 459 pb y 219 pb denota la presencia del fragmento del gen que codifica para la *GSTT1* y *GSTM1*, respectivamente, mientras que la ausencia de las bandas de 459 pb y de 219 pb

indica la ausencia del gen *GSTT1* y *GSTM1*, respectivamente. Es importante destacar que la β -globina actúa como control interno permitiendo la discriminación entre muestras de pacientes que sean nulos para los genes *GSTT1* y *GSTM1*, y muestras que hayan fallado en la amplificación, ya sea por la degradación de ADN o por la presencia de alguna impureza que interfiera con el resultado. Por tal motivo es indispensable que haya una amplificación positiva del gen que codifica la β -globina, de modo contrario es necesario repetir la técnica y verificar los posibles errores (Fig. 9).

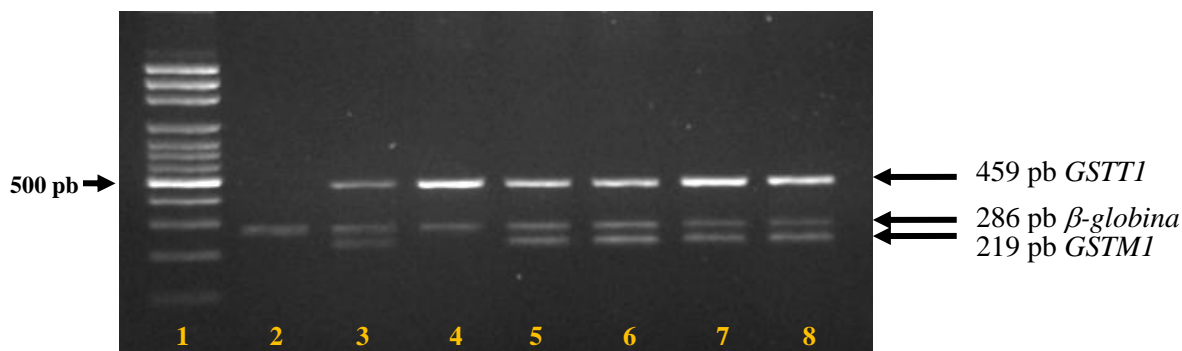


Figura 9. Visualización de los productos amplificados de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 1X, tratado con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100pb (Axygen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los carriles 2 al 8 corresponden a muestras de pacientes donde se muestran las bandas correspondientes a los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *B-globina*.

3.3.- Estudio del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* por PCR-RFLP

El estudio del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* se realizó mediante la amplificación de un segmento de 107 pb del gen, dentro del cual se encuentra el polimorfismo *Ala-9Val* (Fig. 10).

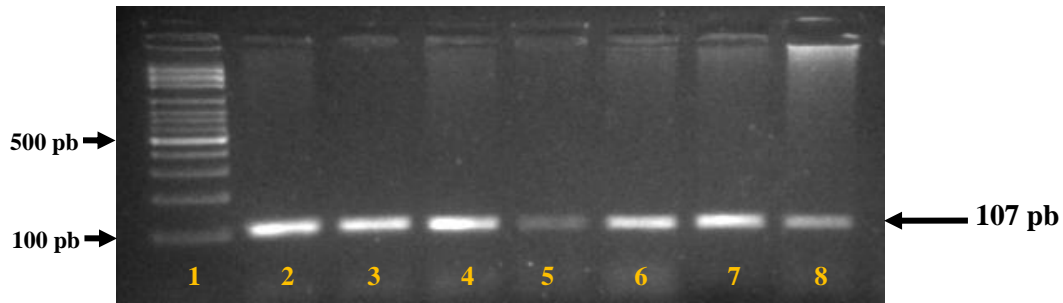


Figura 10. Visualización de los productos amplificados del gen *MnSOD*, mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, tratado con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100pb (Axygen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los carriles 2 al 8 corresponden a muestras de pacientes donde se muestran las bandas correspondientes al fragmento de ADN del gen *MnSOD*.

El producto amplificado se sometió a digestión con la enzima *NgoMIV*, con lo que se observó el siguiente patrón de bandas: 1 banda de 107 pb, correspondiente al alelo V y dos bandas, una de 89 pb y otra de 18 pb la cual no se logra visualizar en el gel, correspondiente al alelo A (Fig. 11).

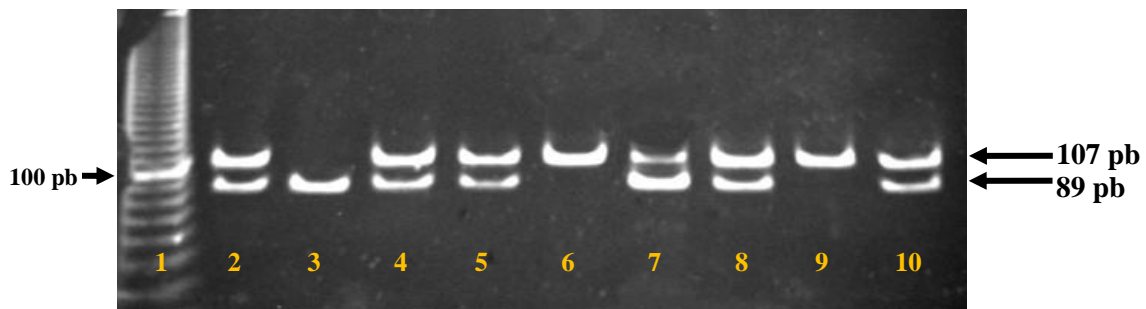


Figura 11. Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 107 pb del gen *MnSOD* con la enzima *NgoMIV*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (5,5%) en buffer TBE 1X. El pozo número 1 corresponde al marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen), y los pozos 2 al 10 corresponden a las muestras de pacientes con EA.

3.4 Evaluación de la estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para la distribución genotípica del polimorfismo del gen *MnSOD* en individuos venezolanos sanos.

La prueba de H-W se estimó para cada sitio polimórfico por separado, ya que se desconoce la fase gamética por ausencia de los datos familiares asociados a cada muestra. Se pudo constatar la no existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución genotípica del sitio polimórfico *Ala-9Val* del gen *MnSOD*.

TABLA IV. Análisis del equilibrio de H-W para el polimorfismo en individuos sanos

Polimorfismo estudiado	X ²	P. de Fisher, g.l.
<i>Val-9Ala MnSOD</i>	6,2925	Significativo

X²: Ji cuadrado; *p*: significancia; **g.l.**: grados de libertad

3.5 Distribución de los genes GST en individuos sanos y pacientes con EA.

En la tabla V se muestra la distribución de los alelos del gen *GSTM1* (alelo presente +, alelo nulo -) y el gen *GSTT1* (alelo presente +, alelo nulo -) en individuos sanos y con EA. Se observó que el alelo *GSTT1+* presentaba una mayor frecuencia con respecto al alelo *GSTM1+* y el alelo *GSTM1-* una mayor frecuencia con respecto al alelo *GSTT1-* tanto en el grupo control como en los pacientes con EA.

Con respecto al gen *GSTT1*, se observó que el alelo nulo (*GSTT1-*) presenta la menor frecuencia tanto en los pacientes con EA como en los individuos sanos (16% vs.

22%, respectivamente), mientras que el alelo *GSTT1+* muestra la mayor frecuencia en ambos grupos estudiados (84% vs. 78%, respectivamente). En relación al gen *GSTM1*, el alelo nulo presentó una frecuencia incrementada en los pacientes con respecto a los individuos sanos (52% vs. 40%, respectivamente, OR=1,62; $p=0,07$), y el alelo *GSTM1+* presentó una frecuencia disminuida en los pacientes con EA en comparación a los individuos sanos (48% vs. 60%, respectivamente, OR=0,62; $p=0,07$). Sin embargo, las diferencias de frecuencias observadas no son significativas.

En ambos grupos se observaron todas las combinaciones de genotipos posibles: *GSTT1+/GSTM1+*, *GSTT1+/GSTM1-*, *GSTT1-/GSTM1+* y *GSTT1-/GSTM1-*. En los pacientes con EA la combinación *GSTT1+/GSTM1-* presentó una frecuencia elevada (48%), seguida por las combinaciones *GSTT1+/GSTM1+* (35%), *GSTT1-/GSTM1+* (11%) y *GSTT1-/GSTM1-* (5%). A diferencia de este grupo, en los individuos sanos la combinación *GSTT1+/GSTM1+* presentó la frecuencia más elevada (47%), seguida por las combinaciones *GSTT1+/GSTM1-* (31%), *GSTT1-/GSTM1-* (13%) y *GSTT1-/GSTM1+* (9%).

Al establecer comparaciones entre ambos grupos estudiados se observaron diferencias significativas. Presentando la combinación genotípica *GSTT1+/GSTM1-* una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con respecto a los individuos sanos (48% vs. 31%, respectivamente, OR= 2,06; $p= 0,01$). Por otra parte, se observó una frecuencia ligeramente incrementada, pero no significativa, de la combinación genotípica *GSTT1+/GSTM1+* en los controles con respecto a los pacientes (35% vs. 47%, respectivamente, OR= 0,62; $p= 0,08$).

TABLA V. Distribución genotípica y de las combinaciones genotípicas de los genes *GSTT1* y *GSTMI* en pacientes con EA e individuos sanos.

	EA n= 79	Controles n= 100	OR (IC95%)	p (X ²)
Genotipo				
<i>GSTT1</i> +	84 (66)	78 (78)	1,43	0,23
<i>GSTT1</i> -	16 (13)	22 (22)	0,69	0,23
<i>GSTMI</i> +	48 (38)	60 (60)	0,62	0,07
<i>GSTMI</i> -	52 (41)	40 (40)	1,62	0,07
Combinaciones				
<i>GSTT1</i> + <i>GSTMI</i> +	35 (28)	47 (47)	0,62	0,08
<i>GSTT1</i> - <i>GSTMI</i> -	5 (4)	9 (9)	0,54	0,24
<i>GSTT1</i> + <i>GSTMI</i> -	48 (38)	31 (31)	2,06	0,01
<i>GSTT1</i> - <i>GSTMI</i> +	11 (9)	13 (13)	0,46	0,86

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

3.6.- Distribución de la frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MnSOD* en individuos sanos y pacientes con EA

Al analizar el SNP *Val-9 Ala* del gen *MnSOD* en ambos grupos, se observaron los tres genotipos posibles (*Val/Val*, *Val/Ala* y *Ala/Ala*).

En los pacientes con EA el genotipo *Ala/Val* presentó una frecuencia elevada (54%), seguido por los genotipos *Ala/Ala* (27%) y *Val/Val* (19%). En los individuos sanos el genotipo *Ala/Val* presentó la frecuencia más elevada (63%), seguido por los genotipos *Val/Val* (21%) y *Ala/Ala* (16%). Además, el alelo *Ala* es el más frecuente en pacientes con EA (54%) y el alelo *Val* en los controles (52%). Al establecer las comparaciones entre los pacientes e individuos sanos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, aunque la frecuencia del genotipo *Ala/Ala* está

ligeramente incrementado en los pacientes con respecto a los controles (27% vs. 16%, respectivamente, OR= 1.9; $p= 0,06$) (Tabla VI).

TABLA VI. Frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* en pacientes con EA y controles sanos.

	EA n= 79	Controles n= 100	OR (IC95%)	p (X^2)
Alelos				
<i>Ala</i>	54 (85)	48 (95)	1,28	0,15
<i>Val</i>	46 (73)	52 (105)	0,77	0,14
Genotipos				
<i>Ala/Ala</i>	27 (21)	16(16)	1,9	0,06
<i>Ala/Val</i>	54 (43)	63 (63)	0,7	0,15
<i>Val/Val</i>	19(15)	21 (21)	0,88	0,44

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

3.7.- Estudio del efecto combinado del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD*, *GSTT1*, *GSTMI* y del gen *APOE*.

Una vez determinadas las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes *MnSOD*, *GSTT1*, *GSTMI* y contando con la información del polimorfismo del gen *APOE* de los individuos que participaron en este estudio, se determinó si existen combinaciones que favorecen o protegen frente al desarrollo de la EA.

En la tabla VII se muestran los 5 genotipos del gen *APOE* presentes en pacientes con EA e individuos sanos. Los genotipos $\epsilon 2\epsilon 3$ (0% vs 12%, OR= 0,04; $p = 0,002$) y $\epsilon 3\epsilon 3$ (46% vs 60%, OR= 0,56; $p = 0,04$) están significativamente incrementados en los individuos sanos, mientras que en los pacientes con la EA los genotipos $\epsilon 3\epsilon 4$ (38% vs 24%, OR=

1,94; $p = 0,03$) y $\epsilon 4\epsilon 4$ (15% vs 4%, OR= 4,29; $p = 0,009$) están incrementados significativamente en comparación con los individuos sanos. Estos datos concuerdan con lo reportado anteriormente que indica que los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ confieren protección contra el desarrollo de la EA, mientras que el alelo $\epsilon 4$ favorece el desarrollo de EA.

TABLA VII. Frecuencias de los genotipos *del gen APOE* en pacientes con EA e individuos sanos.

	EA n= 79	Controles n= 100	OR (IC95%)	P
Genotipo				
$\epsilon 2/ \epsilon 3$	0 (0)	12 (12)	0,04	0,002
$\epsilon 2/ \epsilon 4$	1 (1)	0 (0)	3,84	0,4
$\epsilon 3/ \epsilon 3$	46 (36)	60 (60)	0,56	0,04
$\epsilon 3/ \epsilon 4$	38 (30)	24 (24)	1,94	0,03
$\epsilon 4/ \epsilon 4$	15 (12)	4 (4)	4,29	0,009

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo. La frecuencia está expresada en porcentaje

3.7.1- Estudio del efecto combinado del polimorfismo de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y el gen *APOE*.

En la tabla VIII se muestran 15 de las 24 combinaciones *GSTT1/GSTM1/APOE* presentes en pacientes con EA e individuos sanos. Al realizar el análisis se observa que las frecuencias de las combinaciones *GSTT1+/GSTM1+/ $\epsilon 2\epsilon 3$* (5% vs 0%, respectivamente, OR= 0,11; $p = 0,05$) y *GSTT1+/GSTM1+/ $\epsilon 3\epsilon 3$* (26% vs 14%, respectivamente, OR= 0,46; $p = 0,05$) están significativamente incrementadas en los individuos sanos con respecto a los pacientes. En contraste, las frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1+/GSTM1-/ $\epsilon 3\epsilon 4$* (14% vs. 5%, respectivamente, OR=

3,07; p = 0,05) y *GSTT1+/GSTMI-/ε4ε4* (10% vs. 2%, respectivamente, OR= 5,52; p = 0,02) están significativamente incrementadas en los pacientes con respecto a los individuos sanos.

TABLA VIII. Frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1/GSTMI/APOE* en pacientes con EA e individuos sanos.

Genotipo	EA n= 79	Controles n= 100	OR (IC95%)	p (X ²)
<i>GSTT1+/GSTMI+ /ε2ε3</i>	0 (0)	5 (5)	0,11	0,05
<i>GSTT1+/GSTMI+ /ε3ε3</i>	14 (11)	26 (26)	0,46	0,03
<i>GSTT1+/GSTMI+ /ε3ε4</i>	15 (12)	13 (13)	1,2	0,42
<i>GSTT1+/GSTMI+ /ε4ε4</i>	6 (5)	3 (3)	2,18	0,24
<i>GSTT1+/GSTMI- /ε2ε3</i>	0 (0)	4 (4)	0,13	0,1
<i>GSTT1+/GSTMI- /ε3ε3</i>	24 (19)	20 (20)	1,27	0,32
<i>GSTT1+/GSTMI- /ε3ε4</i>	14 (11)	5 (5)	3,07	0,05
<i>GSTT1+/GSTMI- /ε4ε4</i>	10 (8)	2 (2)	5,52	0,02
<i>GSTT1-/GSTMI+ /ε2ε3</i>	0 (0)	2 (2)	0,25	0,31
<i>GSTT1-/GSTMI+ /ε3ε3</i>	6 (5)	9 (9)	0,68	0,35
<i>GSTT1-/GSTMI+ /ε3ε4</i>	4 (3)	2 (2)	1,93	0,39
<i>GSTT1-/GSTMI- /ε2ε3</i>	0 (0)	1 (1)	0,41	0,41
<i>GSTT1-/GSTMI- /ε3ε3</i>	1 (1)	5 (5)	0,24	0,17
<i>GSTT1-/GSTMI- /ε3ε4</i>	1 (1)	2 (2)	0,63	0,42
<i>GSTT1-/GSTMI- /ε4ε4</i>	2 (2)	1 (1)	2,57	0,41

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo. La frecuencia está expresada en porcentaje

3.4.2- Estudio del efecto combinado del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* y el gen *APOE*.

En la tabla IX se muestran 12 de las 18 combinaciones posibles *MnSOD/APOE*. Al realizar el análisis se observa que las frecuencias de la combinaciones *AlaAla/ε3ε4* (13 vs. 4%, respectivamente; OR= 3,47; p= 0,03) y *AlaVal/ε4ε4* (11 vs. 2%,

respectivamente; OR= 6,3; p= 0,01) están significativamente incrementadas en los pacientes con EA con respecto a los individuos sanos. En contraste, las frecuencias de las combinaciones genotípicas *AlaVal/ε2ε3* (6 vs. 0%, respectivamente; OR= 0,09; p= 0,03), *AlaVal/ε3ε3* (42 vs. 27%, respectivamente; OR= 0,5; p= 0,02) y *ValVal/ε2ε3* (5 vs. 0%, respectivamente; OR= 0,11; p= 0,05) están significativamente incrementadas en los individuos sanos con respecto a los pacientes.

TABLA IX. Frecuencias de las combinaciones genotípicas *MnSOD/APOE* en pacientes con EA e individuos sanos.

Genotipo	EA n= 79	Controles n= 100	OR (IC95%)	p (X ²)
<i>AlaAla/ε2ε3</i>	0 (0)	1 (1)	0,42	0,4
<i>AlaAla/ε3ε3</i>	10 (8)	10 (10)	1,01	0,41
<i>AlaAla/ε3ε4</i>	13 (10)	4 (4)	3,47	0,03
<i>AlaAla/ε4ε4</i>	4 (3)	1 (1)	3,9	0,22
<i>AlaVal/ε2ε3</i>	0 (0)	6 (6)	0,09	0,03
<i>AlaVal/ε3ε3</i>	27 (21)	42 (42)	0,5	0,02
<i>AlaVal/ε3ε4</i>	16 (13)	13 (13)	1,32	0,33
<i>AlaVal/ε4ε4</i>	11 (9)	2 (2)	6,3	0,01
<i>ValVal/ε2ε3</i>	0 (0)	5 (5)	0,11	0,05
<i>ValVal/ε3ε3</i>	9 (7)	8 (8)	1,11	0,47
<i>ValVal/ε4ε4</i>	3 (2)	2 (2)	1,27	0,39
<i>ValVal/ε3ε4</i>	6 (5)	6 (6)	1,06	0,41

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

DISCUSION

La mayor fuente de especies reactivas de oxígeno es la cadena respiratoria mitocondrial, en la cual bajo niveles fisiológicos de O₂, un porcentaje del oxígeno consumido, que oscila entre 1 y 2%, se convierte en ROS. Un desbalance entre la producción de ROS y su eliminación es lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual puede ser contrarrestado por la célula restaurando así el balance redox. Esto evita la pérdida de funciones neuronales y la muerte neuronal, que se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Emerit y col., 2004).

Las investigaciones relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer se han centrado en el papel del estrés oxidativo, debido al alto consumo energético y al bajo nivel de defensa antioxidante del sistema nervioso central, que lo hace altamente sensible al estrés oxidativo (Castellani y col., 2002). El cerebro, aunque representa un 2% del peso corporal, utiliza un 20% del oxígeno consumido. Este oxígeno es tomado por las neuronas, donde se produce ATP mediante la respiración celular en la mitocondria, manteniendo la homeostasis de la célula (Emerit y col., 2004).

Ansari y colaboradores (2010) evaluaron los niveles de diversos marcadores de estrés oxidativo y niveles de la actividad de enzimas que participan en la defensa antioxidante en pacientes con Alzheimer y pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), el cual se ha establecido como una etapa entre el envejecimiento normal y la demencia (Flicker y col., 1991; Morris y col., 2001). Se han descrito niveles elevados de diversos marcadores de estrés oxidativo y una actividad disminuida de varias enzimas, entre las que se encuentran la glutatión S transferasa y la superóxido dismutasa, tanto en pacientes

con EA como pacientes con deterioro cognitivo leve. Estos resultados ayudaron a reforzar la idea sobre el estrés oxidativo como un evento temprano en la Enfermedad de Alzheimer, así como también un evento que continúa a lo largo de la enfermedad (Ansari y col., 2010).

La glutatión S transferasa es una familia de enzimas que conjuga el glutatión reducido con compuestos electrofílicos, facilitando su eliminación de las células y evitando así el daño oxidativo (Hayes y col., 1995). Se han publicado diversos estudios sobre el papel de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, con resultados contradictorios. En este estudio no se observan diferencias significativas en relación a la presencia o ausencia del gen *GSTM1*, en concordancia con lo descrito en otros estudios (Green y col., 1995; Stroombergen y Waring, 1999; Bernadini y col., 2005; Pinhel y col., 2008). En cuanto a la ausencia o presencia del gen *GSTT1* no se observan diferencias significativas entre pacientes y controles, en concordancia con los resultados presentados por Bernadini y colaboradores (2005). Sin embargo, al evaluar las combinaciones genotípicas *GSTT1/GSTM1* observamos que la combinación *GSTT1+/GSTM1-* es más frecuente en los pacientes con EA versus controles, sugiriendo que el alelo nulo *GSTM1* podría estar relacionado con el desarrollo de EA. La combinación *GSTT1+/GSTM1-* confiere hasta dos veces mayor riesgo a padecer la enfermedad en quienes portan dicho genotipo (OR= 2,06; $p=0,01$). A diferencia de los resultados obtenidos, Stroombergen y colaboradores (1999) determinaron que en los pacientes con EA hay una mayor frecuencia del alelo nulo *GSTT1* en comparación a los individuos sanos (54% vs. 29%, respectivamente; $p<0,01$). En otro estudio, realizado por Pinhel y colaboradores (2008) no se observaron diferencias significativas, pero al evaluar la combinación de los polimorfismo de los

genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* y *APOE*, observaron que la combinación del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, el alelo V del gen *GSTP1* y el alelo nulo de *GSTT1*, era más frecuente en los pacientes en comparación con los controles (OR= 10,65; $p= 0,04$).

Considerando que una gran variedad de estudios sugieren que la variabilidad del gen *APOE* es un factor genético de riesgo en la EA (Strittmatter, y col., 1993; Saunders, y col., 1993; Cedeño, 2007), se establecieron combinaciones con los genotipos de este gen obteniéndose resultados interesantes. Se determinó que las frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1*+/*GSTM1*-/ $\epsilon 3\epsilon 4$ (OR= 3,07; $p = 0,05$) y *GSTT1*+/*GSTM1*-/ $\epsilon 4\epsilon 4$ (OR= 5,52; $p = 0,02$) están significativamente incrementadas en los pacientes con respecto a los individuos sanos, sugiriendo que la presencia de las mismas pudiese conferir susceptibilidad al desarrollo de EA. Estos resultados sugieren que el riesgo que parece conferir la presencia de uno o dos alelos $\epsilon 4$ del gen *APOE* se incrementa en aquella combinación donde el gen *GSTM1* está ausente (*GSTT1*+/*GSTM1*-). Por lo tanto, la ausencia del gen *GSTM1* podría estar afectando las defensas antioxidantes, favoreciendo el desarrollo de la EA. Además, se observó que las frecuencias de las combinaciones *GSTT1*+/*GSTM1*+/ $\epsilon 2\epsilon 3$ (OR= 0,11; $p = 0,05$) y *GSTT1*+/*GSTM1*+/ $\epsilon 3\epsilon 3$ (OR= 0,46; $p = 0,05$) están significativamente incrementadas en los individuos sanos con respecto a los pacientes, sugiriendo que la presencia de las mismas pudiese conferir protección contra el desarrollo de la EA. Por lo tanto, la presencia del alelo $\epsilon 3$ y del gen *GSTM1* parece proteger a los individuos de desarrollar la EA.

El mecanismo por el cual apoE4 está implicado en la patogenia de la EA no está del todo claro. Algunos estudios indican una relación entre la densidad de las placas

amiloides y la dosis de alelos $\epsilon 4$ del gen *APOE* (Rebeck y col, 1993; Schmechel y col., 1993). Un estudio demuestra que las tres isoformas de apoE promueven la agregación de $A\beta$, teniendo un mayor efecto la isoforma E4 en comparación con las isoformas E3 y E2 (Ma y col., 1994; Castaño y col., 1995; Wisniewski, y col., 1994). Algunos estudios indican que la eficiencia de la formación de complejos con el $A\beta$ tiene el siguiente orden: $E2 > E3 >> E4$, lo cual muestra que es posible que el papel de apoE en la patogénesis de la EA puede ser en la eliminación del $A\beta$ (Tokuda y col., 2000). Por otra parte, otros estudios parecen indicar que las tres isoformas parecen inhibir la agregación de $A\beta$, siendo la isoforma conferida por el alelo $\epsilon 4$ la menos eficiente en la inhibición (Kim, J., y col. 2009).

La neurotoxicidad del péptido $A\beta$ es caracterizada por niveles elevados del radical libre H_2O_2 y es contrarrestado por la acción de antioxidantes como la vitamina E (Behl y col. 1994). Kaminsky y colaboradores en el 2008, describen un aumento en los niveles de H_2O_2 y proponen que la causa de este aumento es la entrada masiva de calcio a la célula, causando la despolarización de la membrana de la mitocondria lo cual afecta la cadena respiratoria y trae como consecuencia que se produzcan radicales O_2^- , que por la acción de la enzima MnSOD es convertido en H_2O_2 y O_2 . Este péptido también se ha visto involucrado en la disminución de la expresión de la citocromo c oxidasa en la mitocondria, afectando así la cadena transportadora de electrones y originando ROS (Hong y col. 2007).

Un aumento en la agregación del péptido $A\beta$ debido a la isoforma E4 de la apolipoproteína E, junto con la disminución de defensas antioxidantes, como consecuencia de la eliminación homocigota del gen *GSTM1*, podría estar causando un

mayor estrés oxidativo y por ende, una mayor muerte neuronal en los pacientes con EA, explicando así como el riesgo proporcionado por el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* se ve aumentando en ausencia del gen *GSTM1*.

Otra enzima que forma parte de la primera línea de defensa celular contra el anión superóxido es la MnSOD (Zelko y col., 2002). Existen diversos estudios que sugieren que la MnSOD tiene un papel en la supervivencia de las neuronas frente al estrés oxidativo. Entre estas evidencias está el estudio realizado con ratones “knockout” para el gen *MnSOD*, en el cual se reportó que los ratones presentaban neurodegeneración y morían poco tiempo después de nacer (Li y col., 1995; Lebovitz y col., 1996). También se ha reportado que la deficiencia de MnSOD en ratones transgénicos causa un aumento en los niveles del péptido β amiloide, favoreciendo la formación de las placas neuríticas (Li y col., 2004; Esposito y col., 2006). En contraste, otro estudio describe que la sobre-expresión de la enzima MnSOD protege a las neuronas del daño oxidativo (Gonzalez-Zulueta y col., 1998; Keller y col., 1998; Klivenyi y col., 1998).

En nuestro estudio del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* no observamos diferencias significativas entre pacientes y controles, en concordancia con lo reportado por Ventriglia y colaboradores en población italiana (Ventriglia y colaboradores, 2005). Sin embargo, al evaluar el efecto combinado del gen *MnSOD* y *APOE*, se observó que las frecuencias de las combinaciones *AlaAla*/ $\epsilon 3\epsilon 4$ (OR= 3,47; p= 0,03) y *AlaVal*/ $\epsilon 4\epsilon 4$ (OR= 6,3; p= 0,01) están incrementadas significativamente en los pacientes con EA con respecto a los individuos sanos, sugiriendo que la presencia de las mismas pudiese conferir susceptibilidad al desarrollo de EA. Por lo tanto, la presencia del alelo $\epsilon 4$, en una o dos dosis, favorece el desarrollo de la EA. También se puede notar que el riesgo

que confieren los genotipos $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$ (OR= 1,94 y OR= 4,29, respectivamente) se ve aumentando al estar en combinación con los genotipos *AlaAla* y *AlaVal* del gen *MnSOD*. En contraste, las frecuencias de las combinaciones genotípicas *AlaVal*/ $\epsilon 2\epsilon 3$ (OR= 0,09; p= 0,03), *AlaVal*/ $\epsilon 3\epsilon 3$ (OR= 0,5; p= 0,02) y *ValVal*/ $\epsilon 2\epsilon 3$ (OR= 0,11; p= 0,05) están significativamente incrementadas en los individuos sanos con respecto a los pacientes, sugiriendo que la presencia de las mismas pudiese conferir protección contra el desarrollo de la EA. Por lo tanto, la presencia del alelo $\epsilon 3$, en forma homocigota o con el alelo $\epsilon 2$, protege a los individuos de desarrollar la EA.

El polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* es uno de los más estudiados. Se ha descrito que el transporte de la forma *Ala* hacia la mitocondria es entre un 30% y 40% más eficiente que la forma *Val* (Sutton y col., 2003). De acuerdo con estos hallazgos es de esperar que sea la forma *Val* la que este asociada con un mayor nivel de ROS. Sin embargo, diversos estudios en los cuales se estudió el polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* en pacientes con cáncer, enfermedad en la cual se ha establecido que las especies reactivas de oxígeno tienen un posible papel, la frecuencia del alelo *Ala* se encuentra significativamente incrementado en los pacientes con respecto a individuos sanos (Woodson y col., 2003; (Ambrosone y col., 2005; Li y col., 2005; Kang y col., 2007). La MnSOD cataliza la conversión del anión $\cdot\text{OH}$ a O_2 y H_2O_2 , que luego es eliminado de la mitocondria por la acción de la catalasa y glutatión peroxidasa. De esta forma, una mayor actividad de la enzima MnSOD podría causar un desbalance e inducir toxicidad, si la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa se ve disminuida (Kinula y Crapo, 2004).

En el año 2008, Kaminsky y Kosenko, reportan un aumento en la producción de H_2O_2 al incubar las mitocondrias con agregados de péptido $A\beta$, así como un aumento en la actividad de la enzima MnSOD y una disminución en la actividad de la catalasa y glutatión peroxidasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos y con lo reportado por Kaminsky y Kosenko respecto a los efectos del péptido $A\beta$ en las enzimas involucradas en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, y el efecto que tiene la apolipoproteína E4 aumentando la agregación del péptido $A\beta$, se sugiere que hay un incremento en la producción de ROS en individuos que presentan el alelo *Ala* del gen *MnSOD* en combinación con el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.

La forma E4 de la apolipoproteína E incrementa los niveles del péptido $A\beta$, el cual a su vez causa un incremento en la concentración de Ca^{2+} que es tomado por la mitocondria, causando despolarización de la membrana y alterando la cadena respiratoria al aumentar los niveles del radical O_2^- (Cheah y col., 1970). Al mismo tiempo, esta entrada de calcio afecta la actividad de algunas enzimas causando un aumento de la actividad de enzimas, como la monoamina oxidativa (MAO-B), que produce H_2O_2 al catalizar la oxidación de aminas, y la MnSOD. Mientras que la actividad de enzimas involucradas con la eliminación del H_2O_2 , como la catalasa y glutatión peroxidasa, disminuye. Todos estos eventos conducen a una acumulación de ROS provocando un daño oxidativo en la célula (Fig. 12) (Kaminsky y Kosenko, 2008).

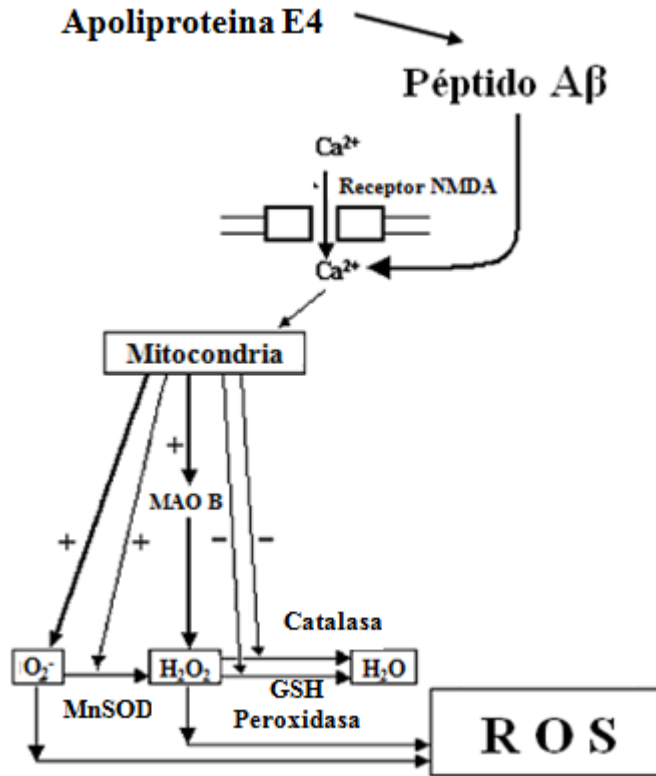


Figura 12. Esquema de la secuencia de eventos que llevan a la producción de ROS a partir del aumento de la agregación del péptido A β causado por la isoforma E4 de la apolipoproteína E. Los símbolos “+” y “-” corresponden a efectos de activación e inhibición respectivamente (Tomado y modificado de Kaminsky y Kosenko, 2008).

Es importante destacar que existen otros genes relacionados con estrés oxidativo y vías anti-oxidantes, los cuales pudiesen estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la Enfermedad de Alzheimer, y probablemente la variabilidad genética de dichos genes sea más relevante. Además, sería de interés agrupar a los pacientes en función de la presencia del alelo $\epsilon 4$ para confirmar el papel de genes distintos a *APOE* en el desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La susceptibilidad conferida por la combinación *GSTT1*+/*GSTM1*- se incrementa con la presencia, en una o dos dosis, del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.
2. La presencia del alelo $\epsilon 3$ del gen *APOE*, en forma homocigota o con el alelo $\epsilon 2$, confiere protección al desarrollo de EA en individuos con la combinación *GSTT1*+/*GSTM1*+
3. El polimorfismo *Ala-9Val MnSOD* por sí solo, no parece jugar un papel en la patogénesis de la EA, aunque aumenta el riesgo que proporciona el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.
4. Los resultados obtenidos indican que la Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad compleja que involucra las interacciones de diferentes genes.

BIBLIOGRAFIA

- Alzheimer's Association. 2010. 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers. Dement.* **6**: 158- 194.
- Ansari, M.A., Scheff, S.W., 2010. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69** (2): 155 – 167.
- Ambrosone, C.B., Freudenheim, J.L., Thompson, P.A., Bowman, E., Vena, J.E., Marshall, J.R., Graham, S., y colaboradores. 1999. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer. Res.* **59** (3): 602 - 606.
- Ambrosone, C.B., Ahn, J., Singh, K.K. 2005. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* **65**:1105 – 11.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. y Schubert, D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.* **77**(6):817-827.
- Bernardini, S., Bellincampi, L., Ballerini, S., Federici, G., Iori, R., Trequatrini, A., Ciappi, F., Baldinetti, F., y colaboradores. 2005. Glutathione S-transferase P1 *C Allelic Variant Increases Susceptibility for Late-Onset Alzheimer Disease: Association Study and Relationship with Apolipoprotein E ϵ 4 Allele. *Clin. Chem.* **51**(6):944-951
- Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* **368** (9533): 387-403.

- Brickell, K.L., Steinbart, E.J., Rumbaugh, M., Payami, H., Schellenberg, G.D., Van Deerlin, V., Yuan, W., Bird, T.D. 2006. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer diseases: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **63** (9): 1307 – 1311.
- Butterfield, D.A., Hensley, K., Cole, P., Subramaniam, R., Aksenov, M., Aksenova, M., Bummer, P.M. y colaboradores. 1997. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butylphenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**. 674–678
- Bunce M. 2000. Histocompatibility testing. Ed: Lidwell and Navarrette C. Imperial College Press, London.
- Cacabelos, R. 2001. Enfermedad de Alzheimer. Presente terapéutico y retos futuros (Primera Parte). *Rev. Colomb. Psiquiatr.* **XXX** (003): 215 – 238.
- Carter, J., Lippa, C.F. 1992. β -Amyloid, Neuronal Death and Alzheimer's Disease. *Curr. Mol. Med.* **1**: 733 – 737.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C., Frangione, B. 1995. Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J.* **306** : 599–604.
- Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., Sharpe, M.A. 2002. B-Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.* **80**: 91 – 100.

- Cedeño, N. 2007. Estudio de los factores inmunogenéticos de riesgo involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer: *CCR5*, *NOS2*, *NOS3*, *C5* y *Tau*. Tesis de doctorado. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.
- Chen, H., Sandler, D.P., Taylor, J.A., Shore, D.L., Liu, E., Bloomfield, C.D., Bell, D.A. 1996. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (*GSTT1*) gene defect. *Lancet*. **347**(8997): 295 - 297.
- Chou, C., Jen, W., Hsieh, Y., Shiao, M., Chang, G. 2006. Structural and Functional Variations in Human Apolipoprotein E3 and E4. *J. Biol. Chem.* **281** (19): 13333 – 13344.
- Cheah, K.S., Chance, B. 1970. The oxidase system of *Ascaris*-muscle mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **223**: 55-60.
- Cooper, D.N. 1999. Human Gene Evolution. Elsevier, primera edición, España.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmler, J.B., y colaboradores. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* **7**(2):180-184.
- Cummings, J.L. 2005. Clinical evaluation as a biomarker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **8**: 327 – 337.
- De Strooper, B., Annaert, W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell. Sci.* **113**: 1857 – 1870.

- Dorado, C., Rugerio, C., Rivas, S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **46** (6): 229 – 235.
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F. 2004. Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 39 – 46.
- Esposito, L., Raber, J., Kekoni, L., Yan, F.R., Yu, G.Q., Bien-Ly, N., Puolivali, J., y colaboradores. 2006. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* **26**:5167–5179.
- Ferri, C., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., y colaboradores. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* **366** (9503): 2112–2117.
- Flicker, C., Ferris, S.H., Reisberg, B. 1991. Mild cognitive impairment in the elderly: Predictors of dementia. *Neurology.* **41**:1006-1009
- Gabbita, S.P., Lovell, M.A., Markesbery, W.R. 1998. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **71**: 2034–2040.
- Goedert, M., Strittmatter, W.J., Roses, A.D. 1994. Alzheimer's disease. Risky apolipoprotein in brain. *Nature.* **372** (6501): 45-46.
- Gonzalez-Zulueta, M., Ensz, L.M., Mukhina, G., Lebovitz, R.M., Zwacka, R.M., Engelhardt, J.F., Oberley, L.W., Dawson, V.L., Dawson, T.M. 1998. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* **18**:2040–2055.

- Green, V.J., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Knapp, M.J., Park, B.K. 1995. Glutathione S-transferase mu genotype (GSTM1*0) in Alzheimer's patients with tacrine transaminitis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **39** :411–415.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Cuarta Edición, New York, E.U.A.
- Harman, D. 2006. Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067**: 454–460.
- Hayes, J.D., Strange, R.C. 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free. Rad. Res.* **22**: 193 – 207.
- Hayes, J.D., Strange, R.C. 2000. Glutathiones S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology.* **61**: 154 – 166.
- Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M. y colaboradores. 1995. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J. Neurochem.* **65**: 2146–2156.
- Ho, Y. y Crapo, J. 1988. Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **229**(2):256-260.

- Hong, W.K., Han, E.H., Kim, D.G., Ahn, J.Y., Park, J.S, Han, B.G. 2007. Amyloid-beta-peptide reduces the expression level of mitochondrial cytochrome oxidase subunits. *Neurochem Res.* **32** (9): 1483-1488.
- Huang, X., Cuajungco, M., Atwood, C., Hartshorn, M.A., Tyndall, J., Hanson, G.R., Stokes, K., Leopold, M. y colaboradores. 1999. Cu(II) Potentiation of Alzheimer Ab Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274** (52): 37111–37116.
- Jakobsson, P-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. 1999. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein. Sci.* **8**: 689–692.
- Kaminsky, Y., Kosenko, E. 2008. Effects of amyloid-beta peptides on hydrogen peroxide-metabolizing enzymes in rat brain *in vivo*. *Free Radical Res.* **42**(6): 564-573.
- Kang, D., Lee, K., Park, S., Berndt, S., Peters, U., Reding, D., Chatterjee, N., Welch, R., y colaboradores. 2007. Functional Variant of Manganese Superoxide Dismutase (SOD2 V16A) Polymorphism Is Associated with Prostate Cancer Risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **16**:1581-1586.
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C.A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J.B., Müller-Spahn, M., y colaboradores. 2004. Amyloid β -induced Changes in Nitric Oxide Production and Mitochondrial Activity Lead to Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279** (48): 50310 - 50320.

- Keller, J.N., Kindy, M.S., Holtsberg, F.W., St Clair, D.K., Yen, H.C., Germeyer, A., Steiner SM, y colaboradores. 1998. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* **18**:687–697.
- Kim, J., Basak, J.M., Holtzman, D.M. 2009. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron.* **63**(3): 287-303.
- Kinnula, V.L., Crapo, J.D. 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.* **36**:718–44.
- Klivenyi, P., St Clair, D., Wermer, M., Yen, H.C., Oberley, T., Yang, L.C., Beal, M.F. 1998. Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol. Dis.* **5**:253–258.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J. 1986. Microtubule-associated protein, tau, is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4044 – 4048.
- Lebovitz, R.M., Zhang, H.J., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N.F., Huang, S., Matzuk, M.M. 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutasedeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:9782–9787.
- Li, F., Calingasan, N.Y., Yu, F.M., Mauck, W.M., Toidze, M., Almeida, C.G., Takahashi, R.H., Carlson, G.A., y colaboradores. 2004. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J. Neurochem.* **89**:1308–1312.

- Li, H., Kantoff, P.W., Giovannucci, E., Leitzmann, M.F., Gaziano, J.M., Stampfer, M.J., Ma, J. 2005. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. *Cancer Res.* **65**:2498 – 2504.
- Li, Y.B., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, T.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., y colaboradores. 1995. Dilated Cardiomyopathy And Neonatal Lethality In Mutant Mice Lacking Manganese Superoxide-Dismutase. *Nat. Genet.* **11**:376–381.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330** (9): 613 – 622.
- Lovell, M.A., Markesbery, W.R. 1998. Decreased glutathione transferase in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurology* . **51** :1562–1566
- Lovell, M.A., Markesbery, W.R. 2007. Oxidative Damage in Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Res.* **85**: 3036 – 3040.
- Maccioni, R.B., Muñoz, J.P., Barbeito, L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. 2001. *Arch. Med. Res.* **32**: 367 - 381.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B. Jr, Das, S., Potter, H. 1994. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*.**372**: 92–94.
- Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 72 – 81.

- Marcus, D.L., Strafaci, J.A., Freedman, M.L. 2006. Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's Disease. *Med. Sci. Monit.* **12** (1): BR8-14.
- Markesbery, W.R. y Lovell, M.A. 1998. 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* **19**. 33–36.
- Markesbery, W.R., Lovell, M.A. 2007. Damage to Lipids, Proteins, DNA, and RNA in Mild Cognitive Impairment. *Arch. Neurol.* **64** (7): 954 – 956.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* **34**: 939 – 944.
- Mecocci, P. MacGarvey, U., Beal, M.F. 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **36**: 747–751
- Montine, T.J., Markesbery, W.R., Morrow, J.D., Roberts, L.J. 2nd. 1998. Cerebrospinal fluid F2 isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **44**: 410–413.
- Moreira, P.I., Nunomura, A., Nakamura, M., Takeda, A., Shenk, J.C., Aliev, G., Smith, M. y colaboradores. 2008. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free. Radical. Bio. Med.* **44**: 1493 – 1505.

- Morris, J.C., Storandt, M., Miller, J.P. 2001. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol* . **58**:397-405
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* **155**: 335 - 350.
- Nitsch, R.M., Blusztajn, J.K., Pittas, A.G., Slack, B.E., Growdon, J.H., Wurtman, R.J. 1992. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 1671–1675
- Nunomura, A, Perry, G., Pappolla, M.A., Wade, W., Hirai, K., Chiba, S., Smith, M.A. 1999. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **19**: 1959–1964
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., Taylor, J.B. 1994. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* **300**: 271–276.
- Pereira C., Santos M. S. and Oliveira C. 1998. Mitochondrial function impairment induced by amyloid beta-peptide on PC12 cells. *Neuroreport.* **9** (8): 1749 - 1755.
- Pereira C., Santos M. S. and Oliveira C. 1999. Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A beta peptides on PC12 cells: Protection by antioxidants. *Neurobiol. Dis.* **6** (3): 209 - 219.

- Perl, D.P. 2010. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai. J. Med.* **77**(1): 32–42.
- Perry, J.J., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Tainer, J.A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**: 245 – 262.
- Pinhel, M.A., Nakazone, M.A., Cação J.C., Piteri, R., Dantas, R.T., Godoy, M.F., Godoy, M.R., y colaboradores. 2008. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein ξ 4 allele. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46** (4): 439 – 445.
- Prasad, M.R., Lovell, M.A., Yatin, M., Dhillon, H., Markesbery, W.R. 1998. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **23**: 81–88.
- Praticó, D. 2008. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci.* **29** (12): 609-615.
- Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., Hyman, B.T. 1993. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron.* **11**:575–580.
- Reddy, P.H., Beal, M.F. 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends. Mol. Med.* **14** (2): 45 – 53.

- Reich, E.E, Markesbery, W.R., Roberts, L.J., Swift, L.L., Morrow, J.D., Montine, T.J. 2001. Brain regional quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathology*. **158**. 293–297
- Roberts, L.J. Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W.D., Morrow, J.D. 1998. Formation of isoprostanes-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahaexanoic acid. *J. Biol. Chem.* **22**: 13605–13612.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L. y colaboradores. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. **43**(8):1467-1472.
- Sayre, L.M. Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G., Smith, M.A. 1997. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **68**: 2092–2097.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., Roses, A.D. 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**:9649–9653.
- Selkoe, D. 2001. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.* **81** (2): 741 – 766.

- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., Mizuno, Y. 1996. Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **226** (2): 561 – 565.
- Shyamala, V., Ames, G.F. 1993. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction.. *Methods Enzymol.* **217** :436-446.
- Smith, C.D., J.M. Carney, Starke-Reed, Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R. 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 10540–10543.
- Smith, D.G, Cappai, R., Barnham, K.J. 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**: 1976 – 1990.
- Stelzma, R., Schnitzlein, N., Murtagh, F. 1995. An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin. Anat.* **8**: 429 – 431.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **90**(5):1977-1981.
- Stroombergen, M., Waring, R. 1999. Determination of glutathione S-transferase μ and θ polymorphisms in neurological disease. *Hum. Exp. Toxicol.* **18**: 141 – 145.

- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Ceganec, C., Pessayre, D., Degoul, F. 2003. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. **13**(3): 145-157.
- Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., Zlokovic, B., Smith, J.D., Ladu, M.J., Rostagno, A., y colaboradores. 2000. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J*. **348** : 359–365.
- Uzunoglu, S., Acar, H., Okudan, N., Gokbel, H., Mevlitoğlu, I., Sari, F. 2006. Evaluation of the association between null genotypes of glutathione-S-transferases and Behcet's disease. *Arch Dermatol Res*. **297** (7): 289 - 293.
- Ventriglia, M., Bocchio, L., Scassellat, C., Squitti, R., Binetti, G., Ghidoni, R., Roossini, P.M., Gennarelli, M. 2005. Lack of association between MnSOD gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Aging. Clin. Exp. Res*. **17** (6): 445 – 448.
- Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. **283**: 1482 – 1488.
- Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T., Frangione, B. 1994. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol*. **145**:1030–1035.

- Woodson, K., Tangrea, J.A., Lehman, T.A, Modali, R., Taylor, K.M., Snyder, K., Taylor, P.R., y colaboradores. 2003. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, a-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (Finland). *Cancer Causes Control*. **14**: 513 – 518.
- Xu, S., Wang, Y., Roe, B. y Pearson, W. 1998. Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion. *J Biol Chem*. **273** (6): 3517-3527.
- Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, A., Brett, J., Godman, G., Zou, Y., Scott, C. 1994. Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 7787 – 7791.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free. Radical. Bio. Med*. **33** (3): 337 – 349.
- Zuntar, I., Kalanj-Bognar, S., Topic, E., Petlevski, R., Stefanovic, M., Demarin, V. 2004. The glutathione S-transferase polymorphisms in a control population and in Alzheimer's disease patients. *Clin. Chem. Lab. Med*. **42**(3): 334 – 339.