

# Patogenia de la enfermedad de Alzheimer

M. Alegre, E. Noé, M.R. Luquin.

*Departamento de Neurología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.*

**RESUMEN.** A pesar de los grandes esfuerzos realizados en los últimos años, el carácter multifactorial hace muy difícil el esclarecimiento de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. En este artículo, se revisan los hallazgos recientes más importantes, centrados fundamentalmente en los factores genéticos, la isquemia cerebral y su relación con las lesiones histológicas típicas. Finalmente, se propone un hipotético modelo patogénico donde el beta amiloide constituye el eje fundamental.

**SUMMARY.** Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial entity with a complex pathogeny. Recent findings on this subject are discussed in this article, centering mainly on genetic factors, cerebral ischemia and their association with the most typical histologic lesions in AD. Finally, a hypothetical model is proposed, in which beta-amyloid represents the key element.

(Rev Med Univ Navarra 1997; 41: 46-57).

## Palabras clave

Alzheimer, patogenia, amiloide, tau.

## Key words

Alzheimer, pathogeny, amyloid, tau.

## Introducción

Con el adjetivo "degenerativas" se agrupa a un conjunto de enfermedades del sistema nervioso, de causa desconocida, caracterizadas por una pérdida neuronal progresiva más o menos selectiva. En muchas de ellas, con un patrón hereditario claro, se han encontrado a lo largo de los últimos años las alteraciones genéticas responsables. En la enfermedad de Alzheimer (EA), la falta de este patrón en la mayoría de los casos, ha llevado a la búsqueda de otros posibles factores (1). Se ha sugerido la posibilidad de un componente poligénico en su patogenia, y recientemente, se ha descrito un posible patrón de herencia materna que podría in-

dicar participación de los genes mitocondriales (2). Por otro lado, queda el gran campo de los factores ambientales, a los cuales se supone una gran influencia, a pesar de los escasos hallazgos hasta el momento. Un reciente estudio realizado en Finlandia (3), demuestra que la concordancia en gemelos homocigóticos, aunque significativamente mayor que en dicigóticos, es de solamente un 31,3%. Por tanto, toda la discrepancia restante debe atribuirse a factores ambientales o patrones de herencia no cromosómica (mitocondrial). En los amplios estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha se han aportado algunos datos de difícil interpretación. Por ejemplo, se ha encontrado una relación inversa con el consumo de antiinflamatorios no esteroideos y antihistamínicos (4), y parece que niveles altos de colesterol pueden predisponer a la enfermedad. También se ha encontrado una mayor incidencia de EA en mujeres (5), que desaparece con la administración de estrógenos tras la menopausia (6).

En cualquier caso, los estudios sobre la patogenia de la enfermedad se han centrado fundamentalmente hasta ahora en la búsqueda de un punto de enlace entre las lesiones histológicas más características (placas seniles y ovillos neurofibrilares) y los hallazgos genéticos.

## Amiloide y placas seniles.

Se distinguen tres tipos fundamentales de placas seniles (7). Las denominadas difusas constan fundamentalmente de  $\beta$ -amiloide soluble con algunas hebras de amiloide agregado, y no contienen neuritas. Las placas neuríticas contienen haces gruesos de fibras amiloides junto con neuritas distróficas, y las placas quemadas contienen  $\beta$ -amiloide denso con astrogliá reactiva, sin neuritas. El componente fundamental de todas ellas, como se deduce de su descripción, es el beta-amiloide.

Amiloide es un término genérico que indica un acúmulo de fibrillas extracelulares, con un tamaño entre 7 y 10 nm, que adoptan una conformación en lámina beta plegada (8). Histológicamente, se caracteriza por te-

ñirse con rojo Congo y tioflavina S. En el amiloide de las placas seniles, el péptido que constituye la fibrilla es un fragmento de una longitud aproximada de 39-43 aminoácidos, derivado de una proteína mayor denominada proteína precursora del amiloide (PPA) (9), también responsable del depósito de amiloide en la demencia pugilística y en la forma holandesa de angiopatía amiloide.

Proteasas e inhibidores de las mismas, fracciones del complemento, inmunoglobulinas, lipoproteínas, componentes de la membrana basal y el denominado componente P son también constituyentes de las placas(10).

### La proteína precursora del amiloide.

La PPA es una proteína transmembrana, de estructura similar a la de los receptores celulares, con una secuencia señal, una gran región N-terminal extracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana y una pequeña cola intracelular en el extremo C-terminal. Tiene diversas isoformas, generadas en función del corte y empalme de un único gen con 19 exones. Su función permanece por el momento desconocida, aunque dos de las isoformas más comunes (PPA 751 y PPA 770), que contienen un dominio inhibidor de serina proteasas, corresponden a la proteasa nexina II (11). Su expresión es común en diversas líneas celulares, y aumenta en situaciones de estrés o isquemia (12).

La PPA presenta una vía de degradación habitual (denominada vía secretora) por medio de la enzima  $\alpha$ -secretasa, en la que no se generan fragmentos capaces de formar amiloide, ya que el punto de corte se sitúa en medio de la secuencia del péptido responsable. Sin embargo, existe una vía alternativa endosómica-lisosomal (enzimas  $\beta$  o  $\gamma$ -secretasa) que genera derivados carboxi-terminales capaces de producir amiloide. El más común, de 40 aminoácidos ( $\beta_{1-40}$ ), contiene 28 residuos del dominio extracelular y 12 de la región transmembrana. La inclusión de algún otro aminoácido hidrofóbico de la región transmembrana favorece enormemente la agregación del péptido. Por ello, el péptido  $\beta_{1-42}$  presenta una capacidad amiloidogénica mucho mayor, y es considerado por muchos autores el factor que inicia la formación de la placa (13).

Diversas mutaciones en el gen de la PPA (localizado en el cromosoma 21) son capaces de producir enfermedad de Alzheimer, así como la forma holandesa de angiopatía amiloide. La mutación en la posición 717 (14-16), reemplazando valina por fenilalanina, isoleucina o glicina justo tras el extremo C-terminal del péptido beta,

favorece la formación de fragmentos de mayor longitud (como el  $\beta_{1-42}$ ) (17). La doble mutación 670/671, en el extremo N-terminal, favorece la acción de la  $\beta$ -secretasa aumentando la producción de péptido beta(18). Por último, la mutación responsable de la forma holandesa de angiopatía amiloide en el residuo 693 produce un péptido beta con mayor estabilidad al agregarse.

Se ha logrado inducir la formación de placas amiloides, neuritas distróficas y pérdida de sinapsis (pero no ovillos neurofibrilares) en ratones transgénicos, con una localización de estas lesiones similar a la observada en la enfermedad de Alzheimer. En estos ratones, el fragmento de DNA incorporado incluye el cDNA de la PPA con la mutación en la posición 717, pero también la parte de los intrones responsable del corte y empalme alternativo del producto (19). Aunque se postula que el éxito de este modelo radica en la mutación introducida, también difiere de intentos previos en la inclusión de parte de la secuencia intrónica (que podría permitir mayor expresividad) (20).

La aparición de demencia temprana en personas con trisomía 21 con hallazgos histológicos corticales similares a los de la EA, podría explicarse por la existencia de una copia adicional del gen de la PPA, con el consiguiente aumento en la producción de sus derivados ( $\beta_{1-40}$ ,  $\beta_{1-42}$ )(21).

En estos mismos pacientes, se ha descrito recientemente muerte neuronal apoptótica sin aparición de depósitos de amiloide, lo que cuestiona que al menos en estos casos la formación de placas seniles sea el mecanismo subyacente. Además, se han descrito trastornos del aprendizaje y comportamiento en ausencia de placas u ovillos tanto en un modelo murino con trisomía parcial de la región del cromosoma 16 que codifica el equivalente a la PPA humana (22), como en aquellos con sobreexpresión del gen de la PPA sin mutaciones (23).

### APO E y amiloide

La apolipoproteína E, como su nombre indica, es uno de los componentes de las lipoproteínas plasmáticas. Se distinguen tres isoformas fundamentales (E2, E3 y E4) en función del número de residuos de cisteína que contienen en la región N-terminal (dos, uno y ninguno, respectivamente). El alelo APO E4 es el principal factor de riesgo genético conocido en la enfermedad de Alzheimer esporádica, con una relación dosis-dependiente (24). El mecanismo para esta mayor susceptibilidad es desconocido, aunque algunos autores han implicado al amiloide.

La APO E se localiza en las placas. Su región C-terminal se une de manera específica al amiloide (25,26)

y posee capacidad pro-agregante del mismo(27). Para algunos autores, esta capacidad es dependiente de la isoforma de APO E(28,29) (la APO E4 sería más eficaz como agregante), lo que explicaría la diferente susceptibilidad para sufrir EA.

Se ha demostrado que el extremo C-terminal de la APO E es capaz de agregarse para formar beta-amiloide (30). Esta misma región favorece la agregación del péptido beta, por lo que el efecto de la APO E sobre el  $\beta$ -amiloide podría ser co-agregante en vez de pro-agregante. La diferente capacidad de las tres isoformas APO E para formar  $\beta$ -amiloide podría derivarse de una susceptibilidad distinta a la proteólisis. Así, la APO E4, que carece de residuos de cisteína, no podría formar dímeros con puentes disulfuro que evitarán su degradación con la consiguiente producción de fragmentos amiloidogénicos.

Un polimorfismo en la alfa1-antiquimiotripsina, que coexiste con la APO E en las placas, parece modificar el riesgo asociado a los distintos alelos de esta última (31).

### **Amiloide y patología vascular cerebral:**

#### **La «hipótesis vascular»**

Existe una evidencia creciente a favor de la participación de la isquemia cerebral en la patogenia de la EA. El alelo APO E4, que favorece el desarrollo de EA, es además un factor de riesgo de patología isquémica cardíaca y demencia vascular(32). Otros hallazgos que sugieren una relación entre EA e isquemia son la existencia de una correlación positiva entre niveles de colesterol, hipertensión arterial y la EA independientemente del genotipo APO E(33), y el papel protector de los estrógenos sobre el desarrollo de EA en mujeres(6).

Además de estas razones, existe un habitual solapamiento entre las lesiones características de la EA y las lesiones isquémicas en los hallazgos necrópsicos de pacientes dementes.

La explicación a esta asociación podría basarse en que la isquemia y el estrés celular favorecen la expresión de la PPA, pudiendo aumentar la producción de  $\beta$ -amiloide (12,34). La existencia de depósitos de amiloide perivascular y la distribución de las placas más evolucionadas en torno a los vasos en un reciente estudio(35), apoya aún más la participación de factores vasculares en la formación de amiloide.

### **Consideraciones finales**

#### **Neurotoxicidad del amiloide**

Basados en lo expuesto anteriormente, numerosos autores defienden el papel fundamental del amiloide

en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado en cultivos neuronales que el beta amiloide es tóxico a concentraciones elevadas(36). La toxicidad parece ser producida únicamente (o predominantemente) por el beta amiloide agregado, y no por el soluble, lo que permitiría explicar la presencia de placas difusas en sujetos sanos de edad avanzada. Sin embargo, parece que no es necesaria la existencia de una placa para que el amiloide resulte tóxico.

El mecanismo por el que estos depósitos pueden resultar neurotóxicos no está aclarado. Se ha sugerido un mecanismo de necrosis(37), la inducción de apoptosis(38,39) e incluso el daño por acúmulo intracelular de PPA(40). Existe clara evidencia a favor de la participación del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido por el amiloide(41); incluso se ha propuesto un receptor que medie su efecto(42,43). En el endotelio vascular, el amiloide resulta tóxico a través de un incremento en la producción de radicales libres(44,45). Esto abre una interesante conexión con la "teoría vascular", comentada anteriormente, ya que en los procesos de muerte neuronal inducida por isquemia la producción de radicales libres desempeña un papel primordial.

Por otro lado, se ha propuesto que los depósitos de amiloide generan una respuesta inflamatoria, responsable de la pérdida sináptica y la muerte celular. A favor de esta teoría están los resultados epidemiológicos de una menor incidencia de EA en personas que toman antiinflamatorios o antihistamínicos de forma crónica(4), y el hallazgo de componentes del complemento en las placas (especialmente C1q)(46). Además, recientemente se han descrito dos receptores que parecen mediar la unión del amiloide a la microglía, favoreciendo la secreción de citoquinas y de productos reactivos del oxígeno(42,43,47).

Sin embargo, la presencia de placas con depósito de  $\beta$ -amiloide no es específica de la enfermedad de Alzheimer, como se ha indicado antes. Aparecen también en algunos casos de demencia con cuerpos de Lewy (coexistiendo con éstos) y en la demencia pugilística. Por otra parte, el hallazgo neuropatológico que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo no es el número o tamaño de las placas, sino la pérdida sináptica(48,49). Por ello, muchos autores consideran que las placas son la consecuencia del trastorno que realmente produce la enfermedad, y no un factor inductor de la muerte neuronal. Incluso algunos científicos defienden que en los casos de mutaciones en la PPA es la pérdida de su función, y no el acúmulo de

péptidos beta en forma de amiloide, la responsable de la aparición de la enfermedad. Finalmente, no hay que olvidar que se ha descrito algún caso de demencia con ovillos neurofibrilares, pero sin placas seniles, en la necropsia.

### La patología neurofibrilar en la EA

Los ovillos neurofibrilares (ONF) están formados por una masa intracelular de fibras argentófilas, de forma globoide o alargada, que también se tiñe con tioflavina(7). La mayoría de los cerebros de enfermos con EA presentan una gran densidad de ONF en corteza entorrinal, hipocampo, neocórtex, locus ceruleus y núcleos dorsales del rafe. Sin embargo, los ONF no son lesiones específicas de la EA, ya que pueden observarse en otras enfermedades del SNC(50) (ver tabla 1) e incluso en cerebros de ancianos intelectualmente intactos (aunque en este caso, aparecen muy raramente en neocórtex). En las regiones donde aparece, el ONF afecta al citoplasma de las neuronas de mayor tamaño (tabla 1).

Los ONF son estructuras altamente insolubles, lo que les permite sobrevivir tras la muerte de la célula nerviosa como "ovillos fantasma" que se acumulan siendo posteriormente fagocitados y degradados lentamente por las células gliales. Al microscopio electrónico, están formados por filamentos helicoidales emparejados (FHE) y, en menor medida, filamentos rectos (que constituyen una variante estructural). Los FHE tienen forma helicoidal, con un diámetro que oscila entre 2 y 15 nm, y una periodicidad de aproximadamente 75 nm(51,52).

Se han detectado al menos 20 componentes diferentes en los ONF(53), incluidos en 5 grupos : proteí-

nas estructurales (fundamentalmente tau anormalmente fosforilada), kinasas y otras enzimas citosólicas, proteínas de estrés, amiloide y proteínas asociadas, y otros.

### Proteína tau

Tau es una proteína asociada al microtúbulo, de unos 50000 a 64000 daltons. Es el componente proteico más importante de los FHE. La tau obtenida de pacientes con EA presenta una serie de diferencias con la de sujetos normales, atribuidas fundamentalmente a un estado de hiperfosforilación, ya que desaparecen tras el tratamiento con fosfatasas. Posee una potente capacidad para inducir el ensamblaje de la tubulina *in vitro* y estabilizar los microtúbulos *in vivo*. En su extremo carboxi-terminal, tau tiene una serie de secuencias repetidas de 31-32 aminoácidos que representan la zona de unión al microtúbulo, común con otras proteínas asociadas a los mismos como MAP 2(51). Este conjunto forma el núcleo del FHE. El extremo amino-terminal de tau contacta con la membrana neuronal(54) y filamentos de actina, envolviendo a este núcleo(55).

Tau está codificada por un único gen de 100 Kb con 16 exones, localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Puede dar lugar a seis isoformas fundamentales, con rango entre 352 y 441 aminoácidos, que difieren por la presencia y situación de 3 o 4 copias de la secuencia repetida de aminoácidos en su extremo carboxi-terminal(51).

En el cerebro humano existe una gran cantidad de proteína tau normal. En la mayoría de las neuronas es segregada al compartimento axonal, encargándose de la estabilización de los microtúbulos y siendo por tanto más abundante en la sustancia blanca que en la gris (56). La presencia de tau en forma de FHE en neuritas distróficas (formadas originalmente por axones y dendritas normales) sugiere una distribución de tau en el compartimento somatodendrítico, al menos bajo las condiciones de la EA. Parece existir una distribución diferente de las distintas isoformas de tau, cada una con una afinidad distinta por la unión al microtúbulo, en función de la longitud del axón de las neuronas.

En la EA, tau fosforilada no sólo forma parte de los ONF, sino también de las hebras del neuropilo, y de los gránulos densos vacuolares de neuronas piramidales hipocámpicas (degeneración granulovacuolar).

### Mecanismos de hiperfosforilación de tau Kinasas y fosfatasas

En condiciones normales, tau está fosforilada en una proporción de 2.5-3.5 moles de fosfato por mol de

Tabla 1

#### Enfermedades neurológicas con ONF

Demencia pugilística  
Demencia dialítica  
Parkinsonismo postencefalítico  
Parálisis supranuclear progresiva  
Encefalopatías espongiiformes  
Enfermedad de Kuffs  
Enfermedad de Niemann-Pick tipo C  
Panencefalitis esclerosante subaguda  
Complejo ELA-demencia de la isla de Guam  
Enfermedad de Alzheimer

proteína. La tau obtenida a partir de los FHE (FHE-tau) contiene entre 10 y 12 moles de fosfato por mol de proteína. La fosforilación anómala de tau en los FHE es por tanto una exageración del fenómeno fisiológico de fosforilación, lo que sugiere una alteración de los mecanismos de fosforilación/desfosforilación en la EA y en el resto de enfermedades con patología neurofibrilar.

Se han identificado 19 posibles lugares de fosforilación en la forma más larga de la tau humana, con anticuerpos que los reconocen específicamente, lo que permite comprobar el efecto de cada enzima o factor sobre el grado de fosforilación. Los puntos de unión de grupos fosfato se agrupan justo antes y después de las secuencias repetidas de tau, salvo el residuo de serina 262(57) que se encuentra en el interior de las mismas. El dipéptido Ser-Pro/Thr-Pro, presente en nueve de estos lugares, es una secuencia conocida de activación de dos clases de quinasas, denominadas serina/treonina kinasas dirigidas por prolina, encargadas del control del ciclo celular y transducción de señales. Varias de ellas, como la tau proteína-quinasa I / glucógeno sintasa quinasa III (tau PK1/GSK3) (57,58), la proteína-quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) o kinasas activadas por mitógenos (MAPK) (59), son capaces de fosforilar la tau de los FHE(60). Otras kinasas, como la proteína-quinasa II calcio-calmodulina dependiente y la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico(61), tienen un papel regulador en la fosforilación de tau aunque ellas solas no pueden convertir tau en FHE-tau(62). Constituyen un primer paso en la fosforilación de tau facilitando al resto de kinasas el acceso a un mayor número de lugares de fosforilación.

Cada una de las seis isoformas fundamentales de tau, además de distinta afinidad por los microtúbulos, presenta también distinta afinidad por una u otra quinasa.

El hecho de que tau fetal tenga más grupos fosfato que tau madura permite plantear que exista un déficit en la desfosforilación (fosfatasa) a lo largo de la maduración cerebral en enfermos con EA. En este sentido, sustancias inhibitorias específicas de las serina/treonina fosfatasa 1 y 2A (la proteína con mayor actividad fosfatasa sobre tau encontrada en el cerebro) son capaces de inducir en la rata déficit de memoria y formación de tau-FHE, pero también depósitos de amiloide(63). Se ha encontrado en la EA tanto un aumento en la actividad de determinadas kinasas(59) como una disminución en la actividad de las fosfatasa(64,65).

### Efectos de la hiperfosforilación sobre tau

La fosforilación de tau regula negativamente su afinidad de unión a los microtúbulos (66-69). Tau hiperfosforilada tiene 1/10 de la afinidad de tau, mientras que FHE-tau desfosforilada se comporta como tau normal. Además, tau hiperfosforilada interactúa con tau normal bloqueando su acción estabilizadora(66). Como consecuencia de todo ello, aparece una disminución en el transporte intraneuronal con el consiguiente trastorno del flujo neuroplasmático, una alteración de la geometría celular y una disminución de los procesos celulares vitales que alteran la viabilidad neuronal.

Aunque tau tiene la capacidad de autoensamblarse en su estado nativo (fundamentalmente los fragmentos que contienen la fracción de unión al microtúbulo(70)), la fosforilación la activa enormemente, iniciando la formación de los FHE (ver figura 1).

### Factores que influyen en la fosforilación de tau

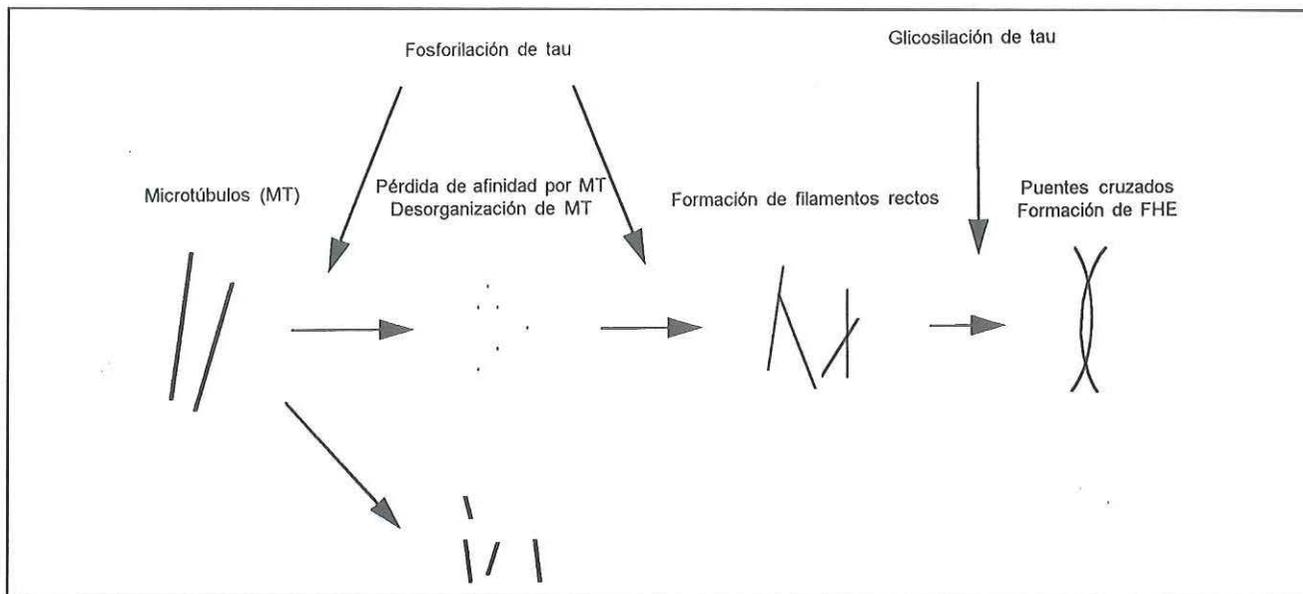
Existen diversos factores que intervienen directa o indirectamente en la fosforilación de tau. Se ha propuesto una activación de la fosforilación de tau en el contexto del daño neuronal producido por la entrada de calcio(71). Este hecho enlaza con la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato a través de procesos calcio-dependientes, los cuales a su vez se han relacionado con alteraciones citoesqueléticas similares a las que se producen en la formación de ONF.

La aparición de ONF en la demencia dialítica, en la que el aluminio juega un papel fundamental, ha sugerido una relación entre este elemento y la EA. Aunque parece promover la agregación y fosforilación de tau(72), no guarda relación con la formación de placas seniles(73), y no hay una elevación de sus cifras en la EA(74).

También la isquemia cerebral puede producir una alteración en el citoesqueleto neuronal a través de mecanismos dependientes de calcio y glutamato. Por ejemplo, tras isquemia focal mantenida se ha encontrado una elevación de anticuerpos frente a tau anormalmente fosforilada(75).

El efecto nocivo del alelo E4 en la EA se ha asociado a la incapacidad de la APO E4 para interactuar con tau y prevenir su hiperfosforilación, a diferencia de la APO E3(76-78). De hecho, en cultivos neuronales la apolipoproteína E4 se asocia a una inhibición del crecimiento de las neuritas, por despolimerización de microtúbulos, mientras que la APO E3 favorece dicho crecimiento, detectándose además en mayor cantidad en soma y neuritas(79).

Figura 1



Modelo teórico de la formación de FHE

Finalmente, el  $\beta$ -amiloide es capaz de influir sobre la fosforilación de tau (80), estableciéndose de esta forma una vía de conexión entre las placas seniles y los ONF. Una de las enzimas implicadas podría ser la tau PK1/GSK3 (40,81).

### Otras modificaciones postraduccionales

En cerebros con EA existen formas altamente fosforiladas de tau en fracciones solubles sin formar FHE. Ello implica la existencia de otras modificaciones postraduccionales en la formación de los FHE además de la fosforilación (82,83). En la EA, se han encontrado otros dos tipos de modificaciones de tau, ambas en residuos lisina: la ubiquitinación (en los FHE más viejos) y la glicosilación. Otros cambios descritos incluyen la desaminación de residuos glutamina y asparragina.

La ubiquitina es una proteína compuesta por una cadena de 76 aminoácidos con un peso de 8.5 kilodaltons, universalmente presente en todas las células eucariotas tanto en forma libre como unida a otras proteínas a través de residuos de lisina y glicina por su extremo C-terminal. Parece formar parte de un sistema celular de defensa contra proteínas anómalas (su unión a una proteína sirve de señal para su degradación), por lo que su aumento en relación con los ONF puede representar una respuesta a los cambios neuro-

fibrilares o a la presencia de proteínas alteradas por alteraciones metabólicas. La incorporación de la ubiquitina es un proceso tardío en la formación de los ONF, apareciendo tras la formación de FHE por fosforilación de tau (84) y estando presente en ONF extracelulares. Se ha descrito un aumento en los niveles de esta proteína en la EA en estrecha relación con el grado de degeneración neurofibrilar (85).

Otra posible modificación de residuos de lisina es la glicosilación (86). Su consecuencia funcional parece ser el mantenimiento del carácter helicoidal de los FHE, estableciendo puentes cruzados y facilitando la formación de estructuras de tipo ONF. Probablemente, se trata de un proceso posterior a la fosforilación. La desglicosilación de los ONF los convierte en haces de filamentos rectos similares a los formados por la interacción de tau con FHE-tau (87). Por otra parte, tau glicosilada *in vitro* es capaz de inducir estrés celular, añadiendo un nuevo factor a la destrucción neuronal.

Los productos de la peroxidación lipídica, que son un índice indirecto de aumento de estrés oxidativo y se encuentran incrementados en la EA, también pueden contribuir a la formación de ONF (88).

Un modelo especulativo de la patogenia de los ONF (89) (ver figura 1) podría iniciarse en la fosforila-

ción anómala de la proteína tau, que llevaría a su disociación de los microtúbulos por un cambio conformacional y provocaría la formación de filamentos rectos por agregación de monómeros. A continuación se produciría la glicosilación de tau, lo que permitiría formar enlaces cruzados emparejando de forma helicoidal a los filamentos, sobre los que se añadirían residuos de ubiquitina. Así se formarían los ONF intraneuronales, que inducirían la muerte neuronal, pasando a ser entonces extraneuronales.

### ONF, pérdida sináptica y correlación clínica

El desarrollo de los ONF sigue un patrón estereotipado con correlación clínico-patológica, a diferencia de los depósitos de amiloide, sujetos a gran variabilidad. Su presencia abundante a nivel hipocámpico-entorrinal coincide con los estudios inmunocitoquímicos realizados con anticuerpos frente a tau anormalmente fosforilada(90). El número y la extensión de las lesiones marcadas se correlaciona con la severidad clínica. No ocurre lo mismo con las placas seniles. De hecho, algunos individuos no dementes pueden tener más amiloide que la media de pacientes con EA. Por ello, el depósito de beta amiloide por sí solo no parece ser suficiente para la expresión clínica de demencia, sino que debe coexistir con patología neurofibrilar(48).

La abundante presencia de ONF a nivel hipocámpico-entorrinal es suficiente para explicar la muerte neuronal en esta región ; sin embargo resulta más difícil en neocórtex ya que el número de ONF a ese nivel es escaso. En esta zona, los ONF se localizan sobre todo en las grandes células piramidales de las capas III y V, que envían largas proyecciones a otras zonas corticales y subcorticales. De esta manera, un número escaso de ONF puede generar una gran destrucción sináptica. Este hecho permite explicar el hallazgo de ONF en corteza entorrinal e hipocámpica de sujetos sanos, ya que en este caso existiría una preservación sináptica cortical relativa. La selectividad del daño neuronal parece residir en la gran riqueza de neurofilamentos de estas células, con gran concentración de sus proteínas componentes (tau).

### Presenilina 1 y 2

Se han descrito hasta el momento 27 mutaciones en el gen de la proteína S 182 o presenilina 1 (PS-1, cromosoma 14), responsables de la mayor parte de los casos familiares de EA de inicio precoz(91-97). También se ha propuesto un polimorfismo intrónico en este

mismo gen como factor de riesgo en EA esporádica(98). Sin embargo, se desconoce prácticamente todo sobre su función.

Al igual que la PS-2 (localizada en el cromosoma 1, también responsable de EA familiar(99), la PS-1 es una proteína transmembrana localizada preferentemente en retículo endoplasmático y aparato de Golgi(100). Las mutaciones se agrupan en dos regiones de la porción transmembrana : TM2 y TM6(101). Los hallazgos histológicos en pacientes con estas mutaciones no difieren de los presentes en otras formas de EA. Recientemente se ha demostrado que diversas mutaciones en estos dos genes inducen un aumento de la secreción de  $\beta_{1-42}$  in vivo(102,103), pudiendo favorecer de esta forma el depósito de amiloide.

Por otra parte, se ha detectado PS-1 (mediante anticuerpos contra su extremo C-terminal) formando parte del amiloide en pacientes con EA, junto con la APO E y el péptido beta(104), lo que plantea la posibilidad de una acción favorecedora de PS-1 en el depósito de amiloide, tal y como se postula para la APO E. Determinar la función normal de estas proteínas, así como las alteraciones funcionales o metabólicas inducidas por las mutaciones, puede ser fundamental para esclarecer la patogenia de la EA.

### Otros factores

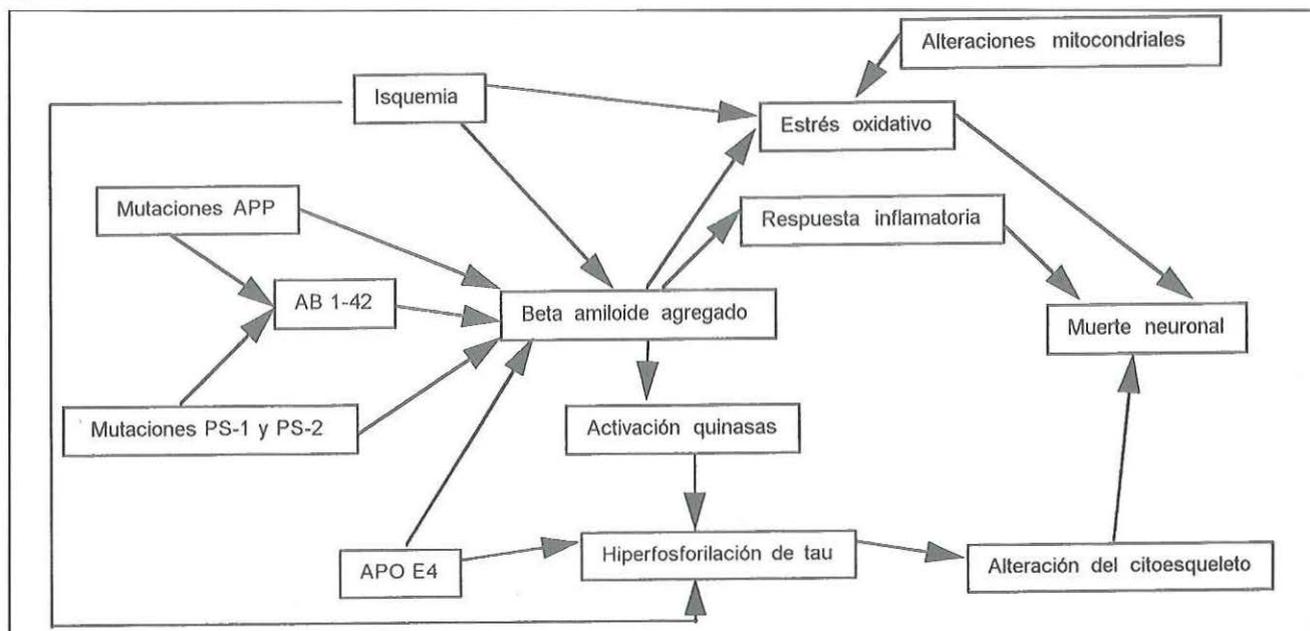
Se han encontrado modificaciones en los fosfolípidos de membrana en los cerebros con EA(105), que se han correlacionado con alteraciones en la homeostasis del calcio y con liberación de radicales libres, congruentes con las alteraciones mitocondriales que algunos autores consideran que pueden existir en la EA. De hecho, el patrón hereditario con preponderancia materna propuesto recientemente podría hacer pensar en un componente de transmisión mitocondrial, como se ha comentado anteriormente(2).

Además, las neuronas de pacientes con trisomía 21 muestran in vitro una mayor producción de radicales libres derivados del oxígeno junto a un incremento en el índice de peroxidación lipídica, y tras una diferenciación adecuada, sufren apoptosis(106) (todo ello, sin formación de ovillos neurofibrilares ni depósitos de amiloide). Estos hallazgos apoyan también la participación del estrés oxidativo como agente causal primario en la EA(107).

### Consideraciones finales

Un esquema global de la patogenia de la EA podría ser el representado en la figura 2.

Figura 2



Modelo de la patología de la EA.

La mayor parte de autores defienden un modelo multifactorial con una vía final común que lleve a la muerte neuronal, probablemente por apoptosis. También existe consenso sobre la importancia del estrés oxidativo como factor inductor de la misma. La dificultad mayor estriba en enlazar los factores causales conocidos con los hallazgos histológicos.

El mayor punto a favor de la participación del amiloide en la patología de la EA lo constituyen las mutaciones en la PPA. Además, hallazgos recientes permiten explicar cómo el amiloide puede resultar tóxico para la neurona. Se ha relacionado a la APO E y a la PS-1 con la formación de la placa, reforzando la hipótesis causal del amiloide.

Sin embargo, como se ha comentado previamente, el grado de demencia guarda mejor correlación con la presencia de ONF. Estos explican mejor la pérdida sináptica, y su localización cronológica guarda una mayor relación con el curso clínico de la enfermedad. Pe-

ro, al contrario de lo que ocurre con el b-amiloide, sólo se ha encontrado una posible relación con los alelos de la APO E, quedando por demostrar una asociación convincente entre el resto de factores genéticos causantes o predisponentes a la EA y los ONF. Este aparente dilema podría resolverse si, como sugieren algunos autores(40,80,81,108-110), existe una relación causal entre el amiloide y los ONF, aunque tampoco puede descartarse que ambos fenómenos sean únicamente la consecuencia de la acción de un agente patógeno aún no determinado.

Por último, cada vez existe mayor evidencia de la participación de la isquemia cerebral en la patología de la EA. Se ha descrito su influencia tanto sobre la formación de amiloide(12,34) como sobre la fosforilación de tau(75). De esta forma, podría explicar al menos una parte del gran componente ambiental que, como se indica en la introducción, debe existir en la EA.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mayeux R. Understanding Alzheimer's disease: Expect more genes and other things (editorial). *Ann Neurol* 1996; 39:689-690.

2. Edland SD, Silverman JM, Peskind

ER, Tsuang D, Wijsman E, Morris JC. Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: Evidence for maternal inheritance. *Neurology* 1996; 47:254-256.

3. Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Alzheimer's disease in Finnish twins. *Lancet* 1996; 347:573-578.

4. Breitner JC, Welsh KA, Helms MJ, Gaskell PC, Gau BA, Roses AD, et al. Delayed onset of Alzheimer's disease with nonsteroidal anti-inflammatory and histamine H2 blocking drugs. *Neurobiol Aging* 1995; 16:523-530.
5. Payami H, Montee K, Grimslid H, Shattuc S, Kaye J. Increased risk of familial late-onset Alzheimer's disease in women. *Neurology* 1996; 46:126-129.
6. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348:429-432.
7. Terry RD, Masliah E, Hansen LA. Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer's disease. En: Terry MD, Katzman R, Bick KL, editores. *Alzheimer disease*. New York: Raven press, 1994:179-196.
8. Goldman J, Côté L. Aging of the brain: Dementia of the Alzheimer's type. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editores. *Principles of the neural science*. 3rd ed. Prentice Hall, 1991:974-983.
9. Selkoe DJ. Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell* 1989; 58:611-612.
10. Maury CPJ. Molecular pathogenesis of beta-amyloidosis in Alzheimer's disease and other cerebral amyloidoses. *Lab Invest* 1995; 72:4-16.
11. Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood K, Beattie EC, et al. The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 1989; 341:144-147.
12. Abe K, Tanzi RE, Kogure K. Selective induction of Kunitz-type protease inhibitor domain-containing amyloid precursor protein mRNA after persistent focal ischemia in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1991; 125:172-174.
13. Younkin SG. Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease [editorial; comment]. *Ann Neurol* 1995; 37:287-288.
14. Chartier-Harlin M, Crawford F, Houlihan H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991; 353:844-846.
15. Goate A, Chartier-Harlin M, Muller M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349:704-706.
16. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 1991; 254:97-99.
17. Suzuki N, Cheung TT, Cai X, Odaoka A, Otvos L, Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264:1336-1340.
18. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992; 360:672-674.
19. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Barthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373:523-527.
20. Duff K, Hardy J. Mouse model made. *Nature* 1995; 373:476-477.
21. Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna Bricarelli F, et al. Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome [see comments]. *Nat Med* 1996; 2:93-95.
22. Reeves RH, Irving N, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, et al. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 1995; 11:177-183.
23. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 1995; 15:1203-1218.
24. Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4725-4727.
25. Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlstrom AR, Bogdanovic N, et al. Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* 1995; 15:219-228.
26. Castaño EM, Prelli F, Pras M, Frangione B. Apolipoprotein E carboxyl-terminal fragments are complexed to amyloids A and L. *J Biol Chem* 1995; 270:17610-17615.
27. Soto C, Castaño EM, Prelli F, Kumar A, Baumann M. Apolipoprotein E increases the fibrillogenic potential of synthetic peptides derived from Alzheimer's, Gelsolin and AA amyloids. *FEBS Lett* 1995; 371:110-114.
28. LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT. Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta amyloid. *J Biol Chem* 1995; 270:9039-9042.
29. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta protein into filaments. *Nature* 1994; 272:92-94.
30. Wisniewski T, Lalowski M, Golabek A, Vogel T, Frangione B. Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? *Lancet* 1995; 345:956-958.
31. Kamboh MI, Narambir B, Sanghera K, Ferrell R, DeKosky S. APOE4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 1995; 10:486-488.
32. Martínez Lage JM. Genotipos APO E en otras enfermedades neurológicas. En: *Enfermedad de Alzheimer: proteínas y genes*. Zaragoza: Real Academia de Medicina de Zaragoza, 1996:92-96.

33. Jarvik GP, Wijsman E, Kukull W, Schellenberg GD, Yu CE, Larson E. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 1995; 45:1092-1096.
34. Jendroska K, Poewe W, Daniel SE, Pluess J, Iwerssen Schmidt H, Paulsen J, et al. Ischemic stress induces deposition of amyloid beta immunoreactivity in human brain. *Acta Neuropathol Berl* 1995; 90:461-466.
35. Armstrong RA. Is the clustering of beta-amyloid (A beta) deposits in the frontal cortex of Alzheimer patients determined by blood vessels? *Neurosci Lett* 1995; 195:121-124.
36. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990; 250:279-282.
37. Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 1994; 645:253-264.
38. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7951-7955.
39. Le W, Colom LV, Xie W, Smith RG, Alexianu M, Appel SH. Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res* 1995; 686:49-60.
40. Takashima A, Yamaguchi H, Noguchi K, Michel G, Ishiguro K, Sato K, et al. Amyloid beta peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase 1/glycogen synthase kinase-3 beta in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1995; 198:83-86.
41. Mattson MP. Free radicals and disruption of neuronal ion homeostasis in AD: a role for amyloid beta-peptide? [comentario]. *Neurobiol Aging* 1995; 16:679-682.
42. Mattson MP, Rydel RE. Amyloid ox-tox transducers. *Nature* 1996; 382:674-675.
43. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382:685-691.
44. Stamler JS. A radical vascular connection. *Nature* 1996; 380:108-111.
45. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996; 380:168-171.
46. Afagh A, Cummings BJ, Cribbs DH, Cotman CW, Tenner AJ. Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* 1996; 138:22-32.
47. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 1996; 382:716-719.
48. McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1991; 30:156-165.
49. Terry MD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30:572-580.
50. Feany MB, Dickson DW. Neurodegenerative disorders with extensive Tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* 1996; 40:139-148.
51. Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *TINS* 1993; 16:460-466.
52. Ruben GC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Johnson JE. The organization of the microtubule associated protein tau in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* 1993; 602:1-13.
53. Yen SH, Liu WK, Hall FL, Yan SD, Stern D, Dickson DW. Alzheimer neurofibrillary lesions: molecular nature and potential roles of different components. *Neurobiol Aging* 1995; 16:381-387.
54. Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 1995; 131:1237-1240.
55. Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol* 1991; 1:279-286.
56. Janke C, Holzer M, Klose J, Arendt T. Distribution of isoforms of the microtubule-associated protein tau in grey and white matter areas of human brain: a two-dimensional gelelectrophoretic analysis. *FEBS Lett* 1996; 379:222-226.
57. Moreno FJ, Medina M, Pérez M, Montejo de Garcini E, Avila J. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin). *FEBS Lett* 1995; 372:65-68.
58. Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett* 1995; 197:149-153.
59. Arendt T, Holzer M, Grossmann A, Zedlick D, Brückner MK. Increased expression and subcellular translocation of the mitogen activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1995; 68:5-18.
60. Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH. Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* 1993; 268:23512-23518.
61. Scott CW, Spreen RC, Herman JL, Chow FP, Davison MD, Young J, et al. Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1993; 268:1166-1173.

62. Singh TJ, Haque N, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Rapid Alzheimer-like phosphorylation of tau by the synergistic actions of non-proline-dependent protein kinases and GSK-3. *FEBS Lett* 1995; 358:267-272.
63. Arendt T, Holzer M, Fruth R, Brückner MK, Gartner U. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience* 1995; 69:691-698.
64. Gong CX, Shaikh S, Wang J, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1995; 65:732-738.
65. Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1993; 61:921-927.
66. Alonso Ad, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:5562-5566.
67. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993; 10:1089-1099.
68. Scott CW, Vulliet PR, Caputo CB. Phosphorylation of tau by proline-directed protein kinase (p34cdc2/p58 cyclin A) decreases tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. *Brain Res* 1993; 611:237-242.
69. Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, et al. The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett* 1992; 307:199-205.
70. Bondareff W, Harrington CR, Wischik CM, Hauser DL, Roth M. Absence of abnormal hyperphosphorylation of tau in intracellular tangles in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54:657-663.
71. Mattson MP, Engle MG, Rychlik B. Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol* 1991; 15:117-142.
72. Harrington CR, Wischik CM, McArthur FK, Taylor GA, Edwardson JA, Candy JM. Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet* 1994; 343:993-997.
73. Kasa P, Szerdahelyi P, Wisniewski HM. Lack of topographical relationship between sites of aluminum deposition and senile plaques in the Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Berl* 1995; 90:526-531.
74. Martínez-Lage P. Estudio de la concentración sérica de aluminio en la enfermedad de Alzheimer. Tesis doctoral. 1994; Universidad de Navarra.
75. Dewar D, Graham DI, Teasdale GM, McCulloch J. Cerebral ischemia induces alterations in tau and ubiquitin proteins. *Dementia* 1994; 5:168-173.
76. Genis I, Gordon I, Sehayek E, Michaelson DM. Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 1995; 199:5-8.
77. Huang DY, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Roses AD, Strittmatter WJ. ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci Lett* 1995; 192:209-212.
78. Huang DY, Goedert M, Jakes R, Weisgraber KH, Garner CG, Saunders AM, et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with the microtubule-associated protein MAP2c: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994; 182:55-58.
79. Nathan BP, Chang K, Bellosta S, Brisch E, Ge N, Mahley RW, et al. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J Biol Chem* 1995; 270:19791-19799.
80. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 1995; 14:879-888.
81. Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7789-7793.
82. Ledesma MD, Avila J, Correas I. Isolation of a phosphorylated soluble tau fraction from Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16:515-522.
83. Iqbal K, Alonso Ad, Gong CX, Khatoon S, Singh TJ, Grundke-Iqbal I. Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 1994; 9:119-123.
84. Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM. Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res* 1991; 539:11-18.
85. Wang GP, Khatoon S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Brain ubiquitin is markedly elevated in Alzheimer disease. *Brain Res* 1991; 566:146-151.
86. Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 1994; 34:21614-21619.
87. Wang J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2:871-875.
88. Montine TJ, Amarnath V, Martin ME, Strittmatter WJ, Graham DG. E-4-Hydroxy-2-Nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *Am J Pathol* 1996; 148:89-93.
89. Yankner BA. New clues to Alzheimer's disease: Unraveling the roles of amyloid and tau. *Nat Med* 1996; 2:850-852.

90. Holzer M, Holzapfel H, Zedlick D, Brückner MK, Arendt T. Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer's disease: heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity. *Neuroscience* 1994; 63:499-516.

91. Wasco W, Pettingell W, Jondro P. Familial Alzheimers chromosome 14 mutations. *Nat Med* 1996; 1:848

92. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* 1995; 11:219-222.

93. Chapman J, Asherov A, Wang N, Treves TA, Korczyn AD, Goldfarb LG. Familial Alzheimer's disease associated with S182 codon 286 mutation. *Lancet* 1995; 346:1040

94. Harrison PJ. S182: from worm sperm to Alzheimer's disease [comentario]. *Lancet* 1995; 346:388

95. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375:754-760.

96. Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Piacentini S, Sherrington R, Rogaev E, et al. Missense mutation of S182 gene in Italian families with early-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1995; 346:439-440.

97. Tanahashi H, Mitsunaga Y, Takahashi K, Tasaki H, Watanabe S, Tabira T. Missense mutation of S182 gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet* 1995; 346:440

98. Wragg M, Hutton M, Talbot C, Alzheimer's disease collaborative group. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimers disease. *Lancet* 1996; 347:509-512.

99. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376:775-778.

100. Kovacs DM, Fausett HF, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 1996; 2:224-229.

101. Hutton M, Pérez-Tur J, and Hardy J. The molecular biology of the PS-1 gene. The 5th international conference on Alzheimer's disease and related disorders. Osaka.1996;

102. Mann DM, Iwatsubo T, Cairns NJ, Lantos P, Nochlin D, Sumi SM, et al. Amyloid beta protein (A beta) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of A beta 42 (43). *Ann Neurol* 1996; 40:149-156.

103. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2:864-870.

104. Wisniewski T, Palha JA, Ghiso J, Frangione B. S182 protein in Alzheimer's disease neuritic plaques. *Lancet* 1995; 346:1366

105. Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL. Disease and anatomic specificity of ethanalamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 1995; 698:223-226.

106. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378:776-779.

107. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 1995; 16:661-674.

108. Giaccone G, Pedrotti B, Migheli A, Verga L, Perez J, Racagni G, et al. beta PP and Tau interaction. A possible link between amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 148:79-87.

109. Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS. Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7104-7108.

110. Caputo CB, Evangelista Sobel IR, Scott CW, Brunner WF, Barth PT, Blowers DP. Association of the carboxy-terminus of beta-amyloid protein precursor with Alzheimer paired helical filaments. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185:1034-1040.