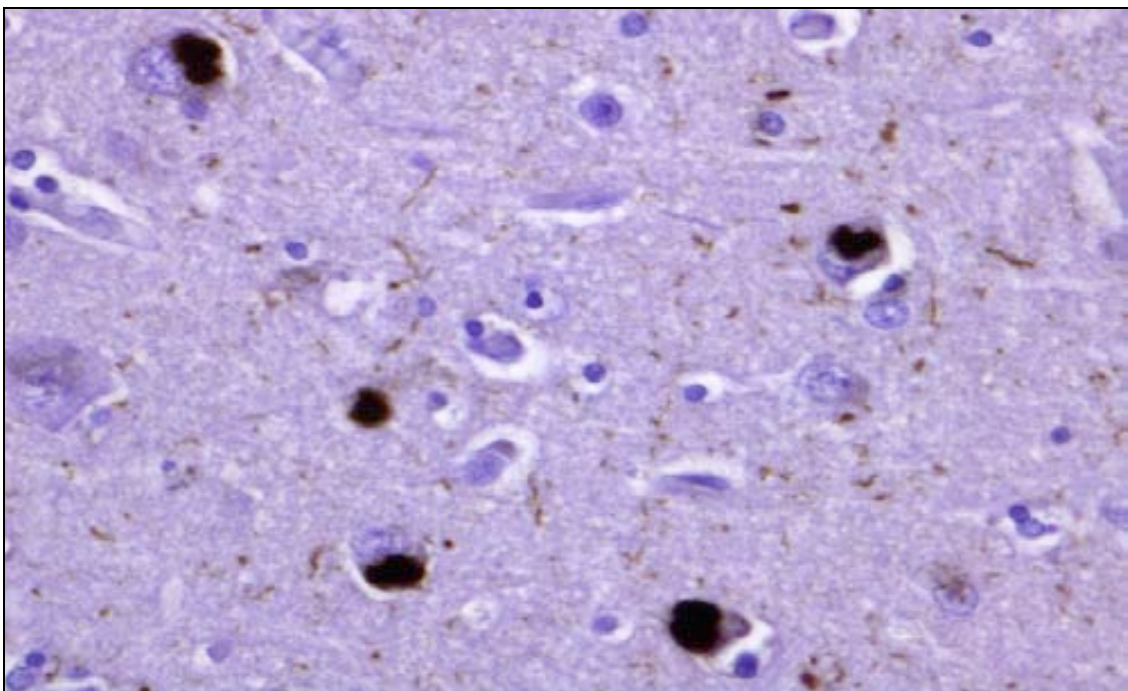


# **Genètica de la Butirilcolinesterasa en les sinucleïnopaties:**

**Establiment d'una eina pel diagnòstic diferencial  
de la demència amb cossos de Lewy**



Montserrat Domingo Sàbat

Tesi doctoral, juny 2010

Directora Dra. Katrin Beyer

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

---

**Genètica de la Butirilcolinesterasa en les sinucleïnopaties.**

**Establiment d'una eina pel diagnòstic diferencial de la  
demència amb cossos de Lewy**

Memòria de tesi doctoral presentada per

**Montserrat Domingo Sàbat**

per optar al grau de

**Doctora en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona**

Tesi realitzada sota la direcció de

Dra. Katrin Beyer

i tutoritzada per

Dra. Catalina Casas Louzao

Treball realitzat al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Germans Trias i Pujol i adscrit al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Montserrat Domingo Sàbat

Dra. Katrin Beyer

Dra. Catalina Casas Louzao

---

A tota la meva família

i a en Lluís



---

És difícil donar les gràcies a totes les persones que m'han ajudat en la realització d'aquesta tesi doctoral. Però crec que el primer lloc correspon indubtablement a la Katrin. M'agradaria donar-li les gràcies per transmetre'm els seus coneixements, però, sobretot, per la seva il·lusió i les seves ganes per la investigació; vull agrair-li la seva incondicional confiança, així com la seva paciència per ensenyar-me tot allò necessari des del dia que vaig arribar a can Ruti.

A continuació vull donar les gràcies a l'Ana i la Carol, que tot aquest temps han estat unes molt bones companyes de laboratori i de despatx i que sempre que ho he necessitat m'han ajudat. També vull agrair la companyia de la Maite. A més, vull mencionar l'Anna i el Jordi, que van estar amb mi en els meus inicis a can Ruti.

Agraeixo al doctor Aurelio Ariza que em permetés fer la tesi al seu departament, així com a tot el Servei d'Anatomia Patològica de can Ruti per haver-me acollit tan bé i on sempre m'he sentit com a casa.

També vull agrair el suport de tots els amics de la "Uni", segurament el fet d'estudiar junts, riure junts, estar dies i dies a la "Uni" junts va fer que m'agradés cada vegada més la biologia, cosa que m'ha permès arribar fins aquí. Us dono ànims a tots, ja que la majoria de vosaltres també us trobeu a la recta final de la tesi!

A la Maite i a en Sergi, per ser la meva *Deutsche Familie*.

I, finalment, però no amb menys importància, vull donar les gràcies sincerament i de tot cor a la meva estimada família, que m'ha donat suport sempre, en la vida i en aquesta tesi. Sense ella no seria qui sóc.

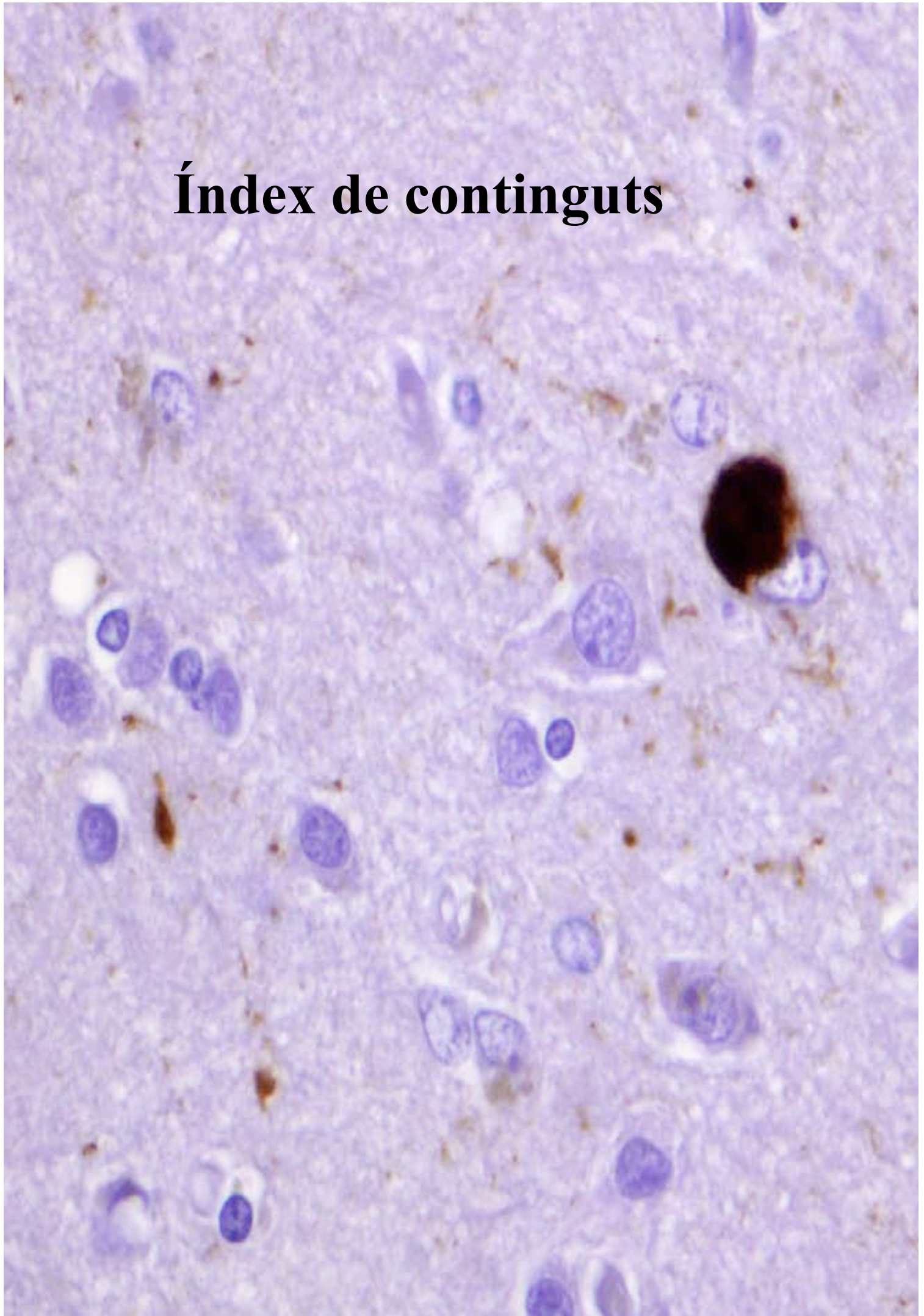
---

Gràcies, papes, per haver-me estimat i haver-me ensenyat a fer-ho. Gràcies, germanetes, per estar sempre juntes. Gràcies als tiets, tietes, cosinets, cosinetes, sogres, al cunyat, al meu fillol i també al nebodet o nebodeta que està en camí.

Però m'agradaria dedicar aquesta tesi especialment als avis: a la iaia, per ser la seva néta preferida i a l'avi, que si estigués amb nosaltres segur que estaria molt orgullós de la seva néta gran.

I per últim, a en Lluís. Gràcies per ser sempre al costat meu i per estimar-me tant.

# Índex de continguts







<b>Índex.....</b>	<b>i</b>
<b>Índex de taules.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índex de figures.....</b>	<b>ix</b>
<b>Acrònims.....</b>	<b>1</b>
<b>Resum.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Introducció.....</b>	<b>13</b>
1.1 Les demències.....	15
1.1.1 Les sinucleïnopaties.....	16
1.1.2 Les malalties amb cossos de Lewy.....	16
1.1.2.1 La malaltia de Parkinson.....	17
1.1.2.2 La demència amb cossos de Lewy.....	19
1.1.3 L'atrofia multisistèmica.....	21
1.1.4 La malaltia d'Alzheimer.....	22
1.2 Biomarcadors de les malalties amb cossos de Lewy.....	25
1.2.1 Desenvolupament de biomarcadors.....	25
1.2.2 Proteòmica, eina per trobar nous biomarcadors.....	26
1.2.3 Biomarcadors potencials per a la malaltia de Parkinson.....	27
1.2.4 Biomarcadors potencials per a la demència amb cossos de Lewy.....	28
1.2.5 Biomarcadors potencials per a l'atròfia multisistèmica.....	30
1.2.6 Biomarcadors potencials per a la malaltia d'Alzheimer.....	31
1.3 La Butirilcolinesterasa.....	34
1.3.1 Primers estudis sobre butirilcolinesterasa.....	34
1.3.2 Funcions de la butirilcolinesterasa.....	34
1.3.3 Estructura i mecanismes d'acció de la butirilcolinesterasa.....	36
1.3.4 Butirilcolinesterasa durant el desenvolupament del sistema nerviós.....	37
1.3.5 Estructures moleculars de la butirilcolinesterasa.....	38
1.3.6 Distribució de la butirilcolinesterasa al cervell.....	39
1.3.7 Distribució de butirilcolinesterasa al cervell amb malaltia d'Alzheimer...40	
1.3.8 El gen de la butirilcolinesterasa.....	41
1.3.9 Polimorfismes de la butirilcolinesterasa.....	41

1.3.10	La butirilcolinesterasa atenua la formació de fibril·les de $\beta$ -amiloide.....	43
1.3.11	Influència de la variant-K de la BChE en la formació de fibril·les de $\beta$ -amiloide.....	45
1.3.12	Inhibidors de colinesterases com a tractament en la malaltia d'Alzheimer.....	46
<b>2.</b>	<b>Objectius.....</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>Materials i mètodes.....</b>	<b>55</b>
3.1	Mostres.....	57
3.1.1	Mostres de teixit.....	57
3.1.2	Mostres de sang per a l'estudi poblacional.....	57
3.1.3	Mostres de sang de pacients amb malaltia de Parkinson i atròfia multisistèmica.....	58
3.2	Extracció d'àcids nucleics i proteïnes.....	58
3.2.1	Extracció d'RNA.....	58
3.2.2	Extracció de DNA.....	59
	a- Extracció de DNA a partir de mostres de teixit.....	59
	b- Extracció de DNA a partir de sang.....	60
3.3	Genotipat.....	60
3.3.1	PCR i seqüenciació.....	61
3.3.2	Anàlisi de polimorfismes.....	62
	a- PCR mutació específica.....	62
	b- PCR i digestió.....	63
	c- PCR i analitzador genètic.....	64
	d- Anàlisi estadística per analitzar els polimorfismes.....	65
3.4	Determinació de l'expressió relativa per a PCR a temps real.....	66
3.4.1	Transcripció inversa.....	67
3.4.2	Disseny d'encebadors variant de <i>splicing</i> específics.....	67
3.4.3	PCR a temps real.....	68
3.4.4	Mètode delta delta Ct.....	69
3.4.5	Coamplificació de VS1 i VS2.....	71

3.4.6 Anàlisi estadística per analitzar l'expressió de les VS1 i VS2 de BChE ...	71
3.5 Immunohistoquímica.....	72
<b>4. Resultats.....</b>	<b>75</b>
4.1 Caracterització dels polimorfismes de BChE.....	77
4.1.1 Caracterització dels polimorfismes exònics de BChE en mostres post mortem.....	77
a- Variant–K de BChE (G1615A).....	77
b- Variant–A de BChE (A209G).....	78
c- Variant–H de BChE (G424A) i variant–J de BChE (A1490T).....	78
4.1.2 Caracterització dels polimorfismes del promotor de BChE.....	80
a- Polimorfisme A–1314G.....	80
b- Polimorfisme A–795G.....	81
c- Polimorfisme C–558T.....	81
d- Polimorfisme poliT.....	82
4.2 Combinacions genotípiques de BChE.....	83
4.2.1 Correspondència entre el diagnòstic clínic i neuropatològic.....	83
4.2.2 Combinacions genotípiques en mostres post mortem.....	83
a- Anàlisi de correspondència.....	83
b- Combinacions genotípiques freqüents.....	85
c- Combinacions genotípiques malaltia específiques.....	86
d- Combinació genotípica poliT-77 i variant K-KW.....	86
4.2.3 Combinacions genotípiques en pacients amb malaltia d'Alzheimer, malaltia de Parkinson i atròfia multisistèmica.....	87
4.2.3.1 Anàlisi de les combinacions genotípiques en pacients amb malaltia d'Alzheimer.....	87
a- Anàlisi de correspondència.....	88
b- Combinacions genotípiques freqüents.....	89
c- Combinacions genotípiques malaltia específiques.....	90
d- Combinació genotípica poliT-77 i variant K-KW.....	91
4.2.3.2 Anàlisi de les combinacions genotípiques en pacients amb malaltia de Parkinson i d'atròfia multisistèmica.....	91
a- Anàlisi de correspondència.....	92

b- Combinacions genotípiques freqüents.....	94
c- Combinacions genotípiques específiques.....	94
4.3 Variants de <i>splicing</i> de BChE.....	95
4.3.1 Variants de <i>splicing</i> de BChE a nivell de RNA.....	95
4.3.2 Variants de <i>splicing</i> de BChE a nivell proteic.....	97
4.4 Expressió de les variants de <i>splicing</i> de BChE.....	98
4.4.1 Expressió de les variants de <i>splicing</i> de BChE en diferents àrees cerebrals.....	98
4.4.2 Expressió de les variants de <i>splicing</i> de BChE en teixits no neuronals.....	99
4.5 Anàlisi de l'expressió relativa de les variants de <i>splicing</i> de BChE en diferents àrees cerebrals.....	101
4.5.1 Expressió de VS3.....	101
4.5.2 Expressió de VS4.....	103
4.5.3 Coamplificació VS1 i VS2.....	104
4.6 Influència dels polimorfismes de BChE sobre l'expressió del gen.....	105
4.6.1 Expressió de VS3 en el nucli caudat en dependència del polimorfisme C-558T.....	106
4.6.2 Expressió de VS4 en cerebel en dependència del polimorfisme A-1314G.....	107
4.7 Anàlisi de l'expressió de BChE en dependència de les combinacions genotípiques.....	108
4.8 Localització de BChE per immunohistoquímica.....	109
<b>5. Discussió.....</b>	<b>115</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>133</b>
<b>Referències bibliogràfiques.....</b>	<b>139</b>
<b>Annex: Característiques de les mostres amb diagnòstic neuropatològic.....</b>	<b>169</b>

## Índex de taules

**Taula 1.** Encebadors utilitzats per seqüenciar el promotor.

**Taula 2.** Encebadors utilitzats per a la determinació dels polimorfismes.

**Taula 3.** Programes de PCR utilitzats per a l'anàlisi dels polimorfismes.

**Taula 4.** Encebadors utilitzats per amplificar les VS de BChE i  $\beta$ -actina.

**Taula 5.** Programes de PCR utilitzats per amplificar les VS de BChE.

**Taula 6.** Distribució al·lèlica i genotípica de la variant-K de BChE.

**Taula 7.** Taula de correspondència obtinguda a partir de les mostres amb diagnòstic neuropatològic.

**Taula 8.** Distribució de les dues combinacions genotípiques específiques més freqüents en mostres de pacients diagnosticats neuropatològicament.

**Taula 9.** Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques de la variant-K/poliT de BChE en les diferents malalties i controls.

**Taula 10.** Taula de correspondència obtinguda per les mostres amb diagnòstic clínic.

**Taula 11.** Combinacions genotípiques més freqüents a les mostres amb diagnòstic clínic i a les mostres post mortem.

**Taula 12.** Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques que havien estat establertes com a específiques a l'estudi de mostres post mortem en funció de la malaltia en pacients amb diagnòstic clínic.

**Taula 13.** Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques variant-K/poliT de BChE en MA i controls.

**Taula 14.** Taula de correspondència obtinguda per les mostres amb diagnòstic clínic.

**Taula 15.** Canvis dels nivells d'expressió de BChE en funció del genotip A+ del polimorfisme A-1314G i del genotip C+ del polimorfisme C-558T.

**Taula 16.** Canvis en els nivells d'expressió de VS3 en el nucli caudat en dependència del genotip C+ del polimorfisme C-558T.

**Taula 17.** Canvis en els nivells d'expressió de VS4 en el cerebel en dependència del genotip A+ del polimorfisme A-1314G.

**Taula 18.** Resultats de la immunohistoquímica de BChE i  $\alpha$ -sinucleïna.



## Índex de figures

**Figura 1.** Malalties neurodegeneratives estudiades en aquest treball.

**Figura 2.** Dominis funcionals de la proteïna.

**Figura 3.** Representació esquemàtica del gen de BChE amb els polimorfismes més freqüents.

**Figura 4.** Esquema de la relació dels diferents factors que intervenen en la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide en la MA.

**Figura 5.** Representació esquemàtica del gen de BChE amb les variants i polimorfismes estudiats.

**Figura 6.** Anàlisi de la variant- K i dels polimorfismes del promotor A-1314G, A-795G i C-558T de la BChE en un gel d'agarosa [d'alta resolució al 3%](#).

**Figura 7.** Representació esquemàtica de les 4 VS de BChE.

**Figura 8.** Exemple del gràfic l'anàlisi de fusió ("melting") de VS3 de BChE proporcionat pel software del Rotor Gene 6000.

**Figura 9.** Exemple de corba estàndard, on es veu reflectida l'eficiència de la PCR i els valors de  $R > 0,99$  i  $R^2 > 0,99$ .

**Figura 10.** Fórmules utilitzades per calcular els canvis d'expressió.

**Figura 11.** Detecció dels polimorfismes (A) A -1314 G, (B) A -795 G i (C) C -558 T per seqüenciació.

**Figura 12.** Polimorfisme poli T. A- Mostra homozigota (7T seguides); B- Mostra heterozigota (7T / 8T) per aquest polimorfisme.

**Figura 13.** Anàlisi de la poliT a les mostres a través de l'analitzador genètic.

**Figura 14.** Gràfic de correspondència obtingut pels quatre grups.

**Figura 15.** Gràfic de correspondència obtingut pels quatre grups.

**Figura 16.** Estructura dels quatre RNA i les seves seqüències codificants (CDS) corresponents.

**Figura 17.** Separació dels productes de PCR específics per a cada VS en gels d'agarosa.

**Figura 18.** Estructura proteica potencial de les VS de BChE.

**Figura 19.** Expressió de totes les VS de BChE en diferents àrees cerebrals.

**Figura 20.** Expressió de totes les VS de BChE en diferents teixits no neuronals.

**Figura 21.** Expressió de VS3 de BChE en el còrtex frontal (CF), còrtex temporal (CT), nucli caudat (Ca) i cerebel (Cr) a totes les malalties estudiades.

**Figura 22.** Expressió de VS4 de BChE en el còrtex frontal (CF), còrtex temporal (CT), nucli caudat (Ca) i cerebel (Cr) a totes les malalties estudiades.

**Figura 23.** Canvis d'expressió significatius de VS3 i VS4 de BChE a mostres portadores de les combinacions genotípiques específiques.

**Figura 24.** Detecció de BChE en talls de teixit parafinat mitjançant immunohistoquímica.

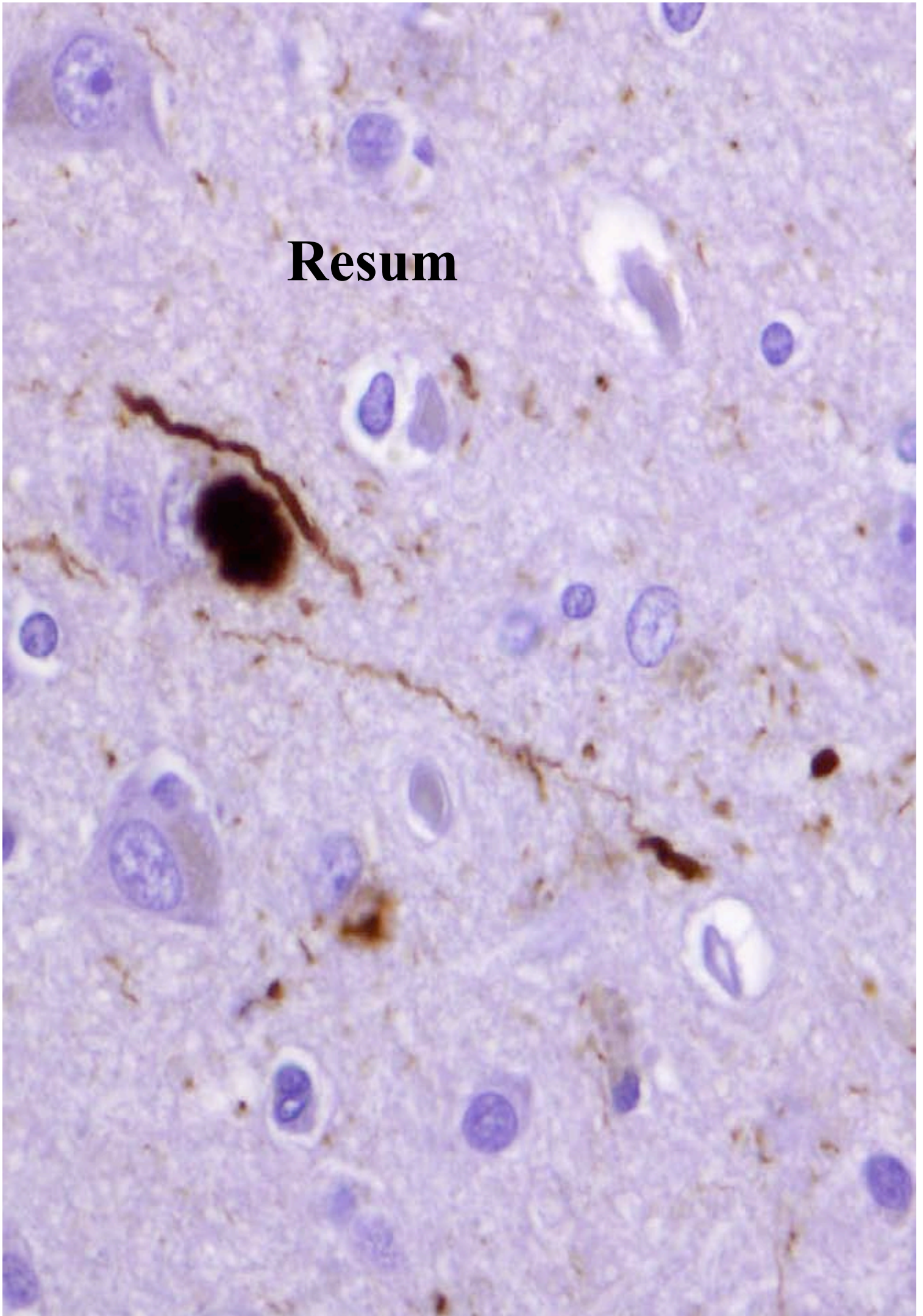
**Figura 25.** Detecció d' $\alpha$ -sinucleïna en talls de teixit parafinat mitjançant immunohistoquímica.

**Figura 26.** Detecció simultània de BChE i  $\alpha$ -sinucleïna mitjançant immunohistoquímica amb doble marcatge.

**Figura 27.** Proposta d'un logaritme diagnòstic derivat dels resultats obtinguts del genotipat de BChE.



# Resum





Les malalties neurodegeneratives es desenvolupen gràcies a diferents mecanismes moleculars, que produeixen agregació de proteïnes mal plegades en diverses àrees cerebrals. D'una banda, l' $\alpha$ -sinucleïna es troba als cossos de Lewy presents a la malaltia de Parkinson i a les demències amb cossos de Lewy (DCL: DCL de tipus pur, DCLp; DCL de tipus comuna, DCLc) i a les inclusions citoplasmàtiques gials, que són la característica neuropatològica de l'atròfia multisistèmica (AMS). D'altra banda, les plaques senils formades principalment per  $\beta$ -amiloide i cabdells neurofibril·lars amb tau hiperfosforilada són la peculiaritat principal de la malaltia d'Alzheimer (MA). A més, la MA es caracteritza per un dèficit colinèrgic, el qual és encara més acusat a les DCL. En el present treball s'ha estudiat la genètica de la butirilcolinesterasa (BChE), un enzim de tipus glicoproteic que intervé en el metabolisme de l'acetilcolina, sobre les sinucleïnopaties en comparació amb la MA com a control de neurodegeneració, així com mostres control.

L'estudi es va iniciar analitzant la freqüència de la variant K (A1699G, A539T) de BChE que està descrit com un possible factor de risc a patir la MA a les mostres post mortem (25 MA, 12 DCLp, 24 DCLc, 5 MP, 6 AMS i 25 controls). Es va observar una marcada acumulació de l'al·lel K de BChE en totes les demències en comparació amb els controls.

A continuació es va caracteritzar el promotor de BChE mitjançant seqüenciació i s'hi van trobar quatre polimorfismes no descrits. Aquests es van genotipar a totes les mostres post mortem i els resultats van ser analitzats conjuntament per identificar possibles combinacions genotípiques específiques formades pels polimorfismes del promotor i la variant K de BChE. El resultat més rellevant va ser la detecció d'una combinació genotípica, AAAGCC8+K+, específica per al 17% de les mostres amb DCL. L'aplicació del genotipat de BChE com a eina per al diagnòstic diferencial augmentaria l'especificitat diagnòstica de les DCL, que tot i que l'any 2005 es van establir nous criteris per al seu diagnòstic clínic, es diagnostiquen erròniament entre el 40 i el 80 % dels casos. Per corroborar les dades obtingudes a partir de mostres post mortem, es va fer un estudi a partir de mostres de sang de 230 pacients amb MA, 21 amb AMS, 23 amb MP i 160 controls.

Per completar l'anàlisi de BChE, es va analitzar l'expressió relativa de les quatre variants de *splicing* a nivell d'mRNA al còrtex frontal, còrtex temporal, nucli caudat i cerebel utilitzant PCR a temps real. El resultat va ser l'obtenció de patrons d'expressió determinats per a cada malaltia estudiada. Finalment, per immunohistoquímica es va

concloure que BChE no es troba en els cossos de Lewy, ja que no colocalitza amb  $\alpha$ -sinucleïna.

Encara que per a la MA s'han descrit diferents marcadors genètics, fins al moment no se'n coneix cap per a les DCL. Mentre que els patrons d'expressió de mRNA característics de cada patologia trobats poden ajudar a elucidar els possibles mecanismes moleculars involucrats en el desenvolupament de les DCL, la determinació de les combinacions genotípiques específiques podran ajudar en el seu diagnòstic diferencial.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cells stained with hematoxylin and eosin (H&E). The cells are stained purple, and the background tissue is a light pinkish-purple. There are several large, dark brown, irregularly shaped structures scattered throughout the field, which could be melanin pigmentation or other cellular inclusions. The overall appearance is that of a dense cellular area with significant pigmentation.

## **Acrònims**



A: adenina

AChE: Acetilcolinesterasa

AMS: atrofia multisistèmica

APOE: apolipoproteïna E

BChE: Butirilcolinesterasa

C: citosina

Ca: nucli caudat

CDS: seqüència codificant

cDNA: àcid desoxiribonucleic complementari

CF: còrtex frontal

CL: cossos de Lewy

CLc: cossos de Lewy corticals

CP: còrtex parietal

Cr: cerebel

CT: còrtex temporal

D: àcid aspàrtic

DCL: demència amb cossos de Lewy

DCLp: demència amb cossos de Lewy pura

DCLc: demència amb cossos de Lewy comú

DNA: àcid desoxiribonucleic

E: àcid glutàmic

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic

G: guanina

H: histidina

kb: quilo bases

L: leucina

MA: malaltia d'Alzheimer

MP: malaltia de Parkinson

mRNA: àcid ribonucleic missatger

n: nombre de mostres

p: p-valor

PAS: "*peripheral anionic binding site*", lloc d'unió aniònic perifèric

pb: parells de bases

PCR: "*polymerase chain reaction*" reacció en cadena de la polimerasa

## Acrònims

---

S: serina

SNC: sistema nerviós central

T: timina

V: valina

VS: variant d'*splicing*

vs: versus

W: triptòfan

Y: tirosina



A microscopic image of tissue, likely a histological section, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The background is a light purple color, indicating the presence of nuclei stained with hematoxylin. There are several dark brown, irregular spots scattered throughout the field, which could be artifacts or specific cellular components. The overall appearance is that of a dense cellular structure with some darker, possibly necrotic or pigmented areas.

# 1. Introducció



## 1.1 Les demències

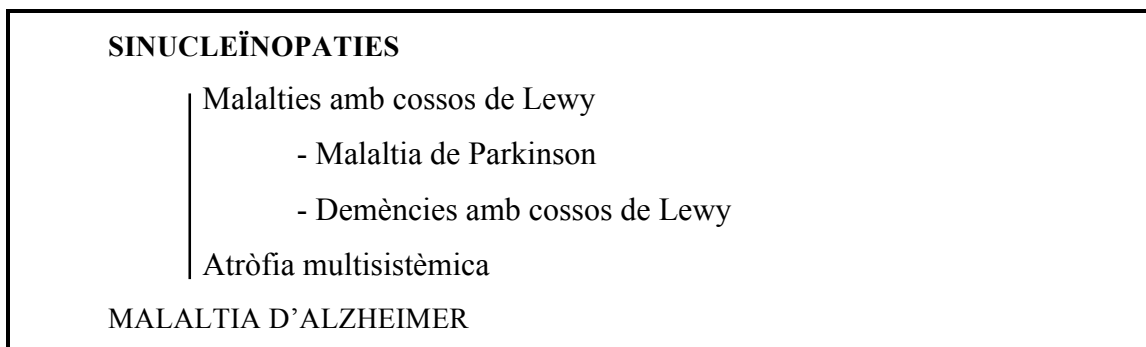
La demència es caracteritza per la pèrdua progressiva de les funcions cognitives, deguda a danys cerebrals més enllà dels atribuïbles a l'envelliment normal. Pot ser estàtica, com a resultat d'una única lesió cerebral, o progressiva, per una disminució gradual de les funcions cognitives provocada per un dany cerebral, per una malaltia o normalment a causa de l'envelliment.

La primera causa de demència és la malaltia d'Alzheimer (MA); la segona, la demència amb cossos de Lewy (DCL); i la tercera, les demències vasculares provocades per lesions vasculares al cervell. Totes són malalties estretament vinculades a l'envelliment.

Atès l'augment de l'esperança de vida als països desenvolupats, és previsible un augment significatiu de la prevalença de les malalties neurodegeneratives en els pròxims anys. Mentre que als 60-65 anys, aproximadament l'1 % de la població pateix alguna demència, aquest percentatge augmenta fins el 10-35 % en persones majors de 85 anys. Cal destacar que a partir dels 80 anys aquestes malalties afecten més els homes que no pas les dones (Kester i Scheltens, 2009). Actualment a l'Estat espanyol més de 800.000 persones presenten algun tipus de demència i la previsió és que el 2025 aquesta xifra augmenti fins a 1.200.000 persones. Per aquest motiu, cal disposar d'un diagnòstic precoç i precís, d'una banda, i de desenvolupar nous tractaments i millorar els existents, de l'altra.

Al present treball s'han estudiat diferents polimorfismes, així com l'expressió a nivell d'RNA de l'enzim butirilcolinesterasa (BChE) en les sinucleïnopaties, utilitzant la MA com a control de neurodegeneració (figura 1).

**Figura 1. Malalties neurodegeneratives estudiades en aquest treball.**



### 1.1.1 Les sinucleïnopaties

Les sinucleïnopaties són malalties neurodegeneratives que neuropatològicament es caracteritzen per l'agregació d' $\alpha$ -sinucleïna en cossos d'inclusió a diferents àrees cerebrals (Beyer i Ariza, 2007). La malaltia de Parkinson (MP), la demència amb cossos de Lewy (DCL) i l'atròfia multisistèmica (AMS) formen el grup de les sinucleïnopaties. Els mecanismes d'acumulació d' $\alpha$ -sinucleïna no es coneixen, però el contingut dels cossos d'inclusió indica que hi ha similituds i diferències en l'etiopatogènesi de les diferents malalties. Els cossos de Lewy són la característica neuropatològica de la MP i les DCL; en canvi, l'AMS presenta inclusions gials i neuronals.

### 1.1.2 Les malalties amb cossos de Lewy

Les malalties amb cossos de Lewy són un tipus de malalties neurodegeneratives progressives que clínicament comprenen la MP i la DCL. Ambdues es caracteritzen per la presència d'acumulacions anormals de proteïnes filamentoses en forma d'agregats amb l' $\alpha$ -sinucleïna com a component principal. Aquests agregats s'anomenen cossos de Lewy (CL) i es poden trobar en neurones i en neurites, com també en terminals presinàptiques, ja sigui del sistema nerviós central, perifèric o autònom (Jellinger, 2008). Leverenz i col·laboradors seus van identificar 296 proteïnes en aquests cossos d'inclusió eosinòfils i citoplasmàtics (Leverenz, *et al*, 2007). Segons l'estructura se'n distingeixen dos tipus:

- CL clàssics: són inclusions esfèriques amb un diàmetre de 8-30  $\mu\text{m}$ , un nucli eosinofílic, bandes concèntriques lamel·lars i un halo estret. Ultraestructuralment, els CL són granulomatosos formats per filaments intermedis disposats de forma radial i associats a material granular i vesícules, que formen un nucli dens (Forno, 1969; Jellinger, 2009).
- CL corticals: són estructures eosinofíliques i rodones sense halo. Ultraestructuralment, són poc organitzades i formades per filaments de 7-27 nm de gruix.

$\alpha$ -Sinucleïna és una proteïna de 140 aminoàcids identificada el 1993 com el component no  $\beta$ -amiloide de l'amiloide de les plaques senils (Ueda, *et al*, 1993) i el 1997 se'n va demostrar l'importància en la neurodegeneració de la DCL i de la MP. (Polymeropoulos, *et al*, 1997). Fins a l'actualitat s'han descrit quatre variants de *splicing* diferents (Beyer i Ariza, 2007).

El primer intent de classificar correctament les malalties amb cossos de Lewy va ser el 1984 quan Kosaka i col·laboradors (Kosaka, *et al*, 1984) van dividir els casos segons l'àrea cerebral més afectada: afectació predominant del tronc de l'encèfal, límbic o neocortical. El 1996 el Consorci de les malalties amb cossos de Lewy (Consortium on DLB International Workshop) (McKeith, *et al*, 1996) va proposar les pautes detallades per al diagnòstic clínic correcte com també el diagnòstic post mortem de les malalties amb cossos de Lewy. Aquest últim avalua la freqüència dels CL corticals i els classifica en una escala de distribució semiquantitativa. Braak i col·laboradors (Braak, *et al*, 2003), seguint el concepte proposat per Kosaka i aplicant tincions per  $\alpha$ -sinucleïna van proposar una nova classificació. Van remarcar que la patologia relacionada amb  $\alpha$ -sinucleïna s'inicia al nucli motor dorsal del vague i progressa de caudal a rostral fins arribar, finalment, al neocòrtex. A més, el 2005 (McKeith, *et al*, 2005), el Consorci de les malalties amb cossos de Lewy va revisar el protocol elaborat el 1996, afegint la tinció per immunohistoquímica d' $\alpha$ -sinucleïna i noves àrees cerebrals a estudiar per assegurar el diagnòstic correcte. Tots dos sistemes han proposat etapes de les malalties basades en l'evolució topogràfica de les lesions neuropatològiques que comença al tronc de l'encèfal, progressa al sistema límbic i, més tard, al neocòrtex cerebral.

En els darrers anys, s'ha publicat un gran nombre de treballs que indiquen que per a ambdós sistemes de classificació fins a un 50 % dels casos no poden ser classificats (Beach, *et al*, 2009; Jellinger, 2008; Leverenz, *et al*, 2008; Leverenz, *et al*, 2008). Per aquest motiu, Leverenz i col·laboradors (Leverenz, *et al*, 2008) van modificar la classificació de McKeith incrementant el nombre de casos classificables del 49 % fins al 97 %. Aquests canvis consistien a reduir el nombre d'àrees cerebrals a examinar, en determinades àrees cerebrals permetre més variabilitat en la puntuació de la patologia Lewy i examinar l'amígdala (Leverenz, *et al*, 2008).

### 1.1.2.1 La malaltia de Parkinson

El 1817 James Parkinson va escriure l'assaig *An Essay on the Shaking Palsy* on descrivia els símptomes de la malaltia de Parkinson (MP). Però no va ser fins al 1861 que Jean-Martin Charcot va posar nom a aquesta malaltia honorant James Parkinson.

La MP és el desordre neurodegeneratiu del moviment més comú a la vellesa i es caracteritza per tremolor, rigidesa i bradicinèsia. La incidència de la MP augmenta significativament amb l'edat. Entre els 50 i els 59 anys la incidència és del 17,4 per cada

100.000 persones, i augmenta fins a un 93,1 entre els 70 i els 79 anys (Lees, *et al*, 2009). A més, s'ha corroborat que és 1,5 vegades més freqüent en homes que en dones.

Hi ha evidències que la MP és un desordre multisistèmic que produeix una degeneració progressiva del sistema dopaminèrgic nigroestriatal i altres xarxes neuronals causat per la pèrdua de neurones pigmentades en la substància negra compacta i en nuclis subcorticals, inclosos els no-dopaminèrgics (Braak, *et al*, 2006). Els CL i les neurites de Lewy es troben àmpliament distribuïdes al cervell i a nuclis específics de la medul·la espinal (Braak, *et al*, 2004). Braak i col·laboradors (Braak, *et al*, 2003) postulen que l'acumulació d' $\alpha$ -sinucleïna de fases preclíniques a simptomàtiques de la malaltia, i posteriorment a una fase avançada d'aquesta, no té lloc de manera aleatòria; concretament, segueix les vies axonals interconnectant regions cerebrals vulnerables. Arbitràriament, aquests investigadors ho han subdividit en sis estadis diferents. La malaltia comença al plexe gàstric de Meissner i a les terminacions nervioses del nervi olfactori, a continuació, es dirigeix cap a regions específiques de la medul·la oblongata i el nucli olfactori anterior. Des de la part inferior del tronc de l'encèfal, el procés de la malaltia ascendeix gradualment fins a estructures més rostrals del tronc de l'encèfal, en aquest moment és quan s'afecta la *pars* compacta de la substància negra. La patologia cortical només es dona al mesocòrtex temporal a la fase següent de la malaltia; llavors s'estén fins al neocòrtex i, finalment, fins a les àrees neocorticals d'associació sensorial i àrees premotores (Lees, *et al*, 2009).

En els darrers anys, estudis genètics sobre la MP han desvelat que mutacions en alguns gens són responsables només d'una petita proporció dels casos i que la majoria tenen un origen esporàdic o ambiental. L'edat és el principal factor de risc, tot i que el 10 % dels casos es donen en persones de menys de 45 anys. S'han trobat sis gens mutats responsables de les formes mendelianes de la MP. El primer gen identificat va ser  $\alpha$ -sinucleïna, on s'han descrit tres mutacions puntuals (A30P, A53T i E476K) (Kruger, *et al*, 1998; Polymeropoulos, *et al*, 1997; Zarranz, *et al*, 2004) així com duplicacions i triplicacions del gen (Nishioka, *et al*, 2006; Singleton, *et al*, 2003). Altres casos de la MP familiar són causats per mutacions al gen *DJ-1* (PARK7) (Maraganore, *et al*, 2004) i Pten putative kinase 1 (PINK1) (Gosal, *et al*, 2006). A més, la mutació I93M del gen ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCH-L1) ha estat associada a casos de MP autosòmics dominants (Marx, *et al*, 2003), mentre que el polimorfisme S18Y del mateix gen s'associa a una disminució significativa del risc de tenir la MP (Nishikawa, *et al*,

2003). D'altra banda, s'ha descrit una mutació al gen de la sinfilina en dos casos de MP esporàdica (Marx, *et al*, 2003).

Mutacions al gen leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) (Hernandez, *et al*, 2005; Khan, *et al*, 2005) s'han relacionat amb casos familiars de MP (3-10 %), així com, amb casos esporàdics (1-8 %) en diverses poblacions europees. Finalment, les mutacions al gen de la parquina (PRKN) són les responsables d'aproximadament el 50 % de tots els casos de MP autosòmics recessius de debut precoç i del 77 % dels casos d'inici juvenil (Hedrich, *et al*, 2004).

### 1.1.2.2 La demència amb cossos de Lewy

La DCL és la segona causa més freqüent de demència en persones grans després de la MA (Jellinger, 2003); a més, diversos estudis han revelat que representen entre 10-15 % de les autòpsies de persones grans amb demència (McKeith, *et al*, 2004). Clínicament, es caracteritza per una demència progressiva i fluctuant, normalment acompanyada de parkinsonisme, símptomes psiquiàtrics i al·lucinacions visuals recurrents (McKeith, *et al*, 1996). Molts d'aquests símptomes solapen amb els característics de la MA; per això moltes vegades es dona un diagnòstic clínic erroni d'aquesta malaltia (Kraybill, *et al*, 2005).

L'àmplia distribució dels CL en totes les àrees cerebrals és una característica típica de la DCL, tot i que les regions principals implicades són el còrtex frontal, el mesencèfal pigmentat i el nucli del tronc cerebral, el nucli eferent dorsal del nervi vague, el nucli basal del prosencèfal i regions corticals límbiques (Neef i Walling, 2006). Neuroquímicament, la DCL es caracteritza per pèrdua de marcadors colinèrgics corticals i dopamina nigroestriatal. Neuropatològicament, la DCL es subdivideix en dos tipus: DCLp, en la qual els cervells presenten únicament patologia relacionada amb  $\alpha$ -sinucleïna i, DCLc, en què els cervells contenen, a més a més dels CL i neurites de Lewy també plaques senils i cabdells neurofibril·lars. Segons la classificació de Braak (Braak, *et al*, 2006), la patologia relacionada amb l'acumulació d' $\alpha$ -sinucleïna es divideix en sis estadis d'afectació cerebral. D'aquestes, les dues últimes es caracteritzen per l'àmplia presència de CL en quasi totes les àrees cerebrals. Alguns investigadors postulen que aquests estadis amb afectació del còrtex representen l'evolució de la MP, on l'afectació es troba restringida a àrees inferiors (Jellinger, 2008). La recent revisió del consens pel diagnòstic patològic de la DCL proposat per McKeith (McKeith, *et al*,

2005) ha plantejat una escala semiquantitativa de gravetat de la patologia en lleu, moderat, greu i molt greu. Aquest sistema es basa en una valoració semiquantitativa de la densitat dels CL (McKeith, *et al*, 2005).

Clínicament, la DCL es caracteritza per un deteriorament cognitiu menys sever, però presenta una pèrdua més pronunciada de les funcions executives i d'atenció que pacients amb MA (Bullock i Lane, 2007; Kraybill, *et al*, 2005; Metzler-Baddeley, 2007; Tiraboschi, *et al*, 2006). A més, una altra diferència simptomatològica entre la DCL i la MA és una disminució menor de la memòria de reconeixement amb major freqüència, i la presentació de símptomes psiquiàtrics observats únicament en les últimes etapes de la MA (Ferman i Boeve, 2007; Stavitsky, *et al*, 2006; Tiraboschi, *et al*, 2006). Les al·lucinacions visuals a les primeres etapes de la malaltia representen una característica específica de la DCL (Tiraboschi, *et al*, 2006). Com que la DCLc està associada a la MA amb una extensió variable (Neef i Walling, 2006), la naturalesa dels símptomes clínics dels pacients amb DCLc depèn directament de la densitat dels CL i inversament de la gravetat de la patologia relacionada amb la MA (McKeith, *et al*, 2005).

El 1996 també es van establir les primeres bases per al diagnòstic clínic probable i possible de la DCL (McKeith, *et al*, 1996). El 2005 es van revisar aquests criteris per millorar la sensibilitat per al diagnòstic de la DCL (McKeith, *et al*, 2005). Aquests criteris inclouen sis punts principals. La característica bàsica per al diagnòstic possible i probable de la DCL comprèn la decadència cognitiva i progressiva, com també la pèrdua de memòria (McKeith, *et al*, 1996). A continuació, s'avaluen tres característiques principals, la cognició fluctuant amb marcades variacions de l'estat d'atenció i d'alerta, al·lucinacions visuals recurrents i símptomes parkinsonians. En cas que el pacient en presenti dues, rebrà el diagnòstic de DCL probable, i si només en presenta una, serà diagnosticat com a possible DCL. Com que totes les característiques anteriors esmentades poden quedar emmascarades pels símptomes provocats pels cabdells neurofibril·lars, els criteris revisats el 2005 inclouen característiques suggestives que cal tenir en compte per a un diagnòstic correcte de la DCL. Aquestes són problemes amb la fase REM del son, sensitivitat a neurofibril·lars i disminució en l'assimilació de la dopamina als ganglis basals. Cal destacar que en la DCL s'aconsegueix una especificitat elevada al diagnòstic clínic (entre el 90-99 % segons l'estudi), però la sensibilitat és relativament baixa (entre el 18-83 %) (Litvan, *et al*, 2003; Lopez, *et al*, 2002; Luis, *et al*, 1999; McKeith, *et al*, 2000).



### 1.1.3 L'atròfia multisistèmica

L'atròfia multisistèmica (AMS) és una malaltia neurodegenerativa esporàdica caracteritzada clínicament per qualsevol combinació de símptomes parkinsonians, autonòmics, cerebel·lars o signes piramidals. Neuropatològicament es detecta pèrdua cel·lular, gliosi i inclusions citoplasmàtiques gials (ICG) en diverses estructures del sistema nerviós central (Ozawa, 2006). Els canvis patològics tenen lloc d'una manera selectiva i afecten el *pons*, la medul·la, el putamen, el cerebel, la substància negra *pars compacta* i estructures autonòmiques preganglionars (Nishie, *et al*, 2004; Ozawa, 2007; Sone, *et al*, 2005). L'AMS afecta homes i dones, generalment debuta a partir dels 60 anys amb una mitjana de supervivència de vuit anys (Schrag, *et al*, 2008; Wenning i Stefanova, 2009) i una prevalença d'aproximadament 1,94-4,5 per 100.000 persones (Chrysostome, *et al*, 2004; Schrag, *et al*, 1999).

Històricament, la degeneració estriatonigrica, l'atròfia olivopontocerebel·losa i la síndrome Shy-Drager eren considerades tres malalties diferents. El 1969, Graham i Oppenheimer van introduir el terme AMS (Burn i Jaros, 2001) que les englobava totes. Clínicament es poden distingir dues presentacions motores. L'AMS de tipus parkinsonià (AMS-P) amb predomini de característiques parkinsonianes, presenta acinèsia progressiva i rigidesa, així com tremolor postural. Molts pacients presenten distonia orofacial o craniocervical associada a disàrtria. Els problemes del sistema nerviós autònom característics comprenen disfunció urogenital juntament amb problemes d'erecció, incontinència i disfunció ortostàtica. A l'inici de la malaltia ja presenten problemes d'estabilitat postural. Distingir l'AMS-P de la MP en les primeres fases de la malaltia és difícil per la similitud dels símptomes (Wenning, *et al*, 2004; Wenning i Stefanova, 2009).

La presentació motora principal de l'AMS de tipus cerebel·lar (AMS-C) és l'atàxia cerebel·lar, incloent-hi atàxia en caminar, atàxia límbica cinètica, disàrtria i problemes cerebel·lars oculomotors (Wenning, *et al*, 2004). En el transcurs de la malaltia, la majoria dels pacients desenvolupen símptomes no cerebel·lars, que permeten distingir-la de l'atàxia cerebel·lar idiopàtica de debut tardà (Abele, *et al*, 2002).

Segons Ozawa, la distribució fenotípica de l'AMS està associada a diferents poblacions (Ozawa, 2006). Mentre que a la població caucàsica el 80 % dels casos són AMS-P (Wenning i Stefanova, 2009), en la població japonesa la forma més freqüent és AMS-C (Watanabe, *et al*, 2002).

Les ICG van ser descrites el 1989 per Papp en cèl·lules oligodendroglials de cervells amb AMS (Papp, *et al*, 1989). Aquestes inclusions argirofíliques de proteïnes mal plegades poden tenir forma de mitja lluna, ovalada o cònica i estan formades per moltes capes de 20-30 nm de filaments tubulars (Gai, *et al*, 2003). Aquestes estan constituïdes per filaments d' $\alpha$ -sinucleïna en primer lloc i, a més, per moltes altres proteïnes, com ubiquitina,  $\alpha$  i  $\beta$ -tubulina, tau 2 i 4, la proteïna 14-3-3, midkina C-terminal, Leu-7, transferrina, MAP-5, cdk-5, MAPK, PI3K i Bcl-2 (Wenning i Jellinger, 2005). Les ICG es distribueixen als ganglis basals, al còrtex motor primari i suplementari, a la formació reticular i al sistema pontocerebel·lar (Papp i Lantos, 1994).

L'AMS és considerada una sinucleïnopatia juntament amb la MP i la DCL, ja que  $\alpha$ -sinucleïna és un marcador d'inclusió en aquesta malaltia (Spillantini, *et al*, 1998; Wakabayashi, *et al*, 1998; Wenning i Stefanova, 2009).

Principalment, l'AMS és considerada una malaltia esporàdica (Wenning, *et al*, 1993), tot i que, alguns casos familiars s'han descrit (Soma, *et al*, 2006; Wullner, *et al*, 2004). Estudis sobre la possible associació entre el gen  $\alpha$ -sinucleïna i l'AMS no han donat cap resultat satisfactori (Lincoln, *et al*, 2007; Ozawa, *et al*, 1999). En els últims anys, polimorfismes de gens involucrats en processos inflamatoris han estat associats amb un elevat risc de patir aquesta patologia (Wenning i Stefanova, 2009). Entre aquests gens hi ha interleucina-8, la molècula d'adhesió intercel·lular-1, interleucina-1A, interleucina-1B i  $\alpha$ -1-antiquimotripsina. El genotip TT del polimorfisme -251 de l'interleucina-8 augmenta quatre vegades el risc de patir l'AMS. Aquest genotip juntament amb el genotip KK del polimorfisme E469K de la molècula d'adhesió intercel·lular-1 augmenta el risc onze vegades (Infante, *et al*, 2005). En canvi, el risc a patir aquesta patologia es veu augmentat cinc vegades quan l'al·lel 2 de la posició -889 de l'interleucina-1A està en homozigosi (Combarros, *et al*, 2003); igual que l'al·lel 1 del polimorfisme -511 de l'interleucina-1B que predisposa a un debut precoç de l'AMS (Nishimura, *et al*, 2002). L'al·lel AA de l' $\alpha$ -1-antiquimotripsina indica un debut precoç d'AMS, com també una ràpida progressió d'aquesta (Furiya, *et al*, 2005).

### 1.1.4 La malaltia d'Alzheimer

La MA és la malaltia neurodegenerativa del sistema nerviós central més comuna a la vellesa (aproximadament un 65 % dels casos de demència en persones grans) (Jellinger, 2006). El 1906, Alois Alzheimer va fer la primera descripció clínica i histològica

d'aquesta malaltia (Alzheimer, *et al*, 1995). Tot i els avenços científics des d'aleshores i les noves tècniques de diagnòstic, com la neuroimatge i la genètica, entre altres, aquesta malaltia encara és d'etiologia desconeguda i no s'estableix el diagnòstic definitiu fins a l'examinació neuropatològica post mortem (Jellinger, 2006). Segons un estudi sobre la prevalença de les demències a Europa realitzat per Lobo i col·laboradors, la prevalença de patir la MA als 65 anys és del 5 % i augmenta fins al 22 % als 95 anys (Lobo, *et al*, 2000).

Clínicament, la MA es caracteritza per un deteriorament progressiu de les funcions cognitives, fet que comporta una dependència completa del malalt i, finalment, la mort, normalment després 10-15 anys d'evolució de la malaltia. El símptoma principal és la pèrdua de la memòria recent acompanyat d'altres símptomes molt variats com la pèrdua de la personalitat, canvi de comportament, confusió, problemes de llenguatge, al·lucinacions, problemes motors i pèrdua de pes.

Neuropatològicament, els cervells que presenten MA posseeixen dos tipus de lesions neuropatològiques: les plaques senils extracel·lulars amb pèptids de  $\beta$ -amiloide com a component principal i els cabdells neurofibril·lars intraneuronals formats per filaments hiperfosforil·lats de proteïna tau (Braak i Braak, 1991). A més, s'observa una pèrdua selectiva de neurones colinèrgiques i una pèrdua de l'activitat de les colinesterases en cervells de pacients amb MA (Davies i Maloney, 1976). L'estudi de la distribució de cabdells neurofibril·lars al cervell adult ha permès distingir-ne les etapes d'evolució. En les etapes I i II els cabdells neurofibril·lars es formen a l'àrea entorínica del còrtex mediotemporal. A continuació, en les etapes III i IV apareixen a l'hipocamp i, finalment, arriben al neocòrtex amb una relativa preservació de l'àrea occipital estriada (etapa V) (Braak i Braak, 1991).

En les últimes dues dècades s'han fet molts estudis genètics sobre la MA, sobretot, en les formes familiars de debut precoç de la malaltia. La conclusió principal que se'n desprèn és que la MA és complexa i genèticament molt heterogènia. S'han identificat mutacions penetrants en tres gens, en el gen de la proteïna precursora de l'amiloide (APP) i en els gens de la presinilina 1 i 2 (PSEN1 i PSEN2). A més, s'ha identificat un gen de risc en la MA de debut tardà, el gen de l'apolipoproteïna E (ApoE) (Brouwers, *et al*, 2008). El gen de l'APP, localitzat al cromosoma 21, va ser el primer gen autosòmic dominant responsable de la transmissió identificat per a casos familiars de debut precoç de la MA. Aquest gen està format per 18 exons i part de l'exó 16 i 17 codifiquen pel pèptid del  $\beta$ -amiloide (Yoshikai, *et al*, 1990). Fins al moment, s'han identificat trenta-

## 1 Introducció

---

dues mutacions substitutives en vuitanta-sis famílies ([www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/](http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/)) i el 75 % d'aquestes mutacions es troben als exons 16 i 17. El gen PSEN1, situat al cromosoma 14, està constituït per tretze exons, mentre que PSEN2 es troba al cromosoma 1 i té dotze exons. PSEN1 i PSEN2 són proteïnes que presenten una homologia d'aproximadament el 80 % en el seu contingut aminoacídic i, a més, posseeixen una estructura genètica molt similar. Les PSENs són proteïnes amb nou dominis transmembrana que poden actuar com a receptors cel·lulars, canals proteics o en el transport intracel·lular de proteïnes, com també regulant el transport intracel·lular d'APP (Levy-Lahad, *et al*, 1995; Sherrington, *et al*, 1995). A més, les PSENs formen la subunitat catalítica del complex gamma secretasa que produeix el pèptid de  $\beta$ -amiloide; aquest fet confirma la importància d'aquestes proteïnes en la MA (Brunkan i Goate, 2005).

Actualment s'han identificat 177 mutacions en el gen de PSEN1 en 392 famílies i catorze mutacions en el gen de PSEN2 en vint-i-tres famílies ([www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/](http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/)). La majoria de mutacions localitzades en aquests dos gens causen la MA de debut precoç. L'anàlisi detallada d'algunes mutacions a les PSENs va demostrar que part d'elles incrementaven la ràtio  $\beta$ -amiloide 42/ $\beta$ -amiloide 40 (Kumar-Singh, *et al*, 2006), implicant la pèrdua de funció de la PSEN i causant la MA.

Per a la MA de debut tardà, és a dir, per la MA més freqüent, s'han descobert regions cromosòmiques associades amb la malaltia, però els gens implicats encara no han estat identificats. El descobriment de nous gens contribuirà a l'estudi de vies metabòliques implicades que podrien portar a possibles dianes terapèutiques (Brouwers, *et al*, 2008).

## **1.2 Biomarcadors de les malalties amb cossos de Lewy**

Un biomarcador o també anomenat marcador biològic és una característica que es pot mesurar objectivament i avaluar com un indicador de processos biològics normals, processos patogènics o respostes fisiològiques com a conseqüència de la intervenció terapèutica (Gerlach, *et al*, 2008). Actualment hi ha grans esperances per al desenvolupament de nous biomarcadors que permetin una millora en el diagnòstic i en la classificació de malalties. Tanmateix, els biomarcadors també poden ser utilitzats per determinar l'eficàcia de noves eines terapèutiques i per monitorar el desenvolupament de les malalties (Gerlach, *et al*, 2008).

Un tipus de biomarcador són els biomarcadors genètics, els quals no reflecteixen una condició d'un organisme en un moment determinat de la vida, sinó una característica invariable, ja que la informació genètica és invariable durant tota la vida, com per exemple, el risc a patir una malaltia. En canvi, alteracions al proteoma, que és la suma de totes les proteïnes d'una cèl·lula o d'un organisme, reflecteixen la condició d'aquest en un moment determinat (Gasser, 2009).

### **1.2.1 Desenvolupament de biomarcadors**

Un biomarcador pot tenir diverses utilitats: identificar el risc de desenvolupar una malaltia, confirmar el diagnòstic, cribatge epidemiològic, seguiment de la progressió de la malaltia i resposta al tractament. Però no tots els biomarcadors seran informatius per a totes aquestes aplicacions.

El "Group on Biological Markers of Alzheimer's Disease", per exemple, va proposar que el biomarcador ideal per a la MA hauria de ser: lligat a les característiques neuropatològiques fonamentals de la MA, validat en casos de MA confirmats neuropatològicament, capaç de detectar la MA de manera precoç i capaç de distingir-la d'altres demències. A més, la detecció d'aquest biomarcador hauria de ser no-invasiva, simple d'utilitzar i econòmica (Consensus report of the working group on: "molecular and biochemical markers of alzheimer's disease". the ronald and nancy reagan research institute of the alzheimer's association and the national institute on aging working group. 1998).

Per a l'establiment d'un biomarcador s'han d'avaluar els paràmetres següents: la sensibilitat, l'especificitat, la prevalença d'una malaltia en una població, el valor

predictiu positiu, i també, el valor predictiu negatiu. Per exemple, perquè un biomarcador sigui útil per al diagnòstic de la MA, hauria de presentar una sensibilitat i una especificitat superiors al 85 % i un valor predictiu positiu superior al 80 % (Shaw, *et al*, 2007). Probablement, la combinació de diferents biomarcadors proporcionarà més precisió al diagnòstic que la utilització d'un marcador únic (Clark, *et al*, 2006; Frank, *et al*, 2003; Thal, *et al*, 2006).

Per validar un biomarcador cal realitzar estudis independents a diferents centres i definir protocols estàndards per a la seva utilització.

### 1.2.2 Proteòmica, eina per trobar nous biomarcadors

La proteòmica permet analitzar extensament la composició proteica en una mostra biològica en un moment determinat (Zellner, *et al*, 2009). La proteòmica es divideix en dues àrees, una de dedicada a investigar perfils proteics i l'altra, a la proteòmica funcional. La primera descriu la totalitat del proteoma d'un organisme, incloent-hi diferents nivells d'expressió entre cèl·lules o fins i tot en relació amb una condició patològica d'interès. La proteòmica funcional estudia les modificacions post translacionals, l'activitat i les interaccions proteiques (McFarland, *et al*, 2008). Com a conseqüència, la proteòmica pot aportar patrons genètics i epigenètics característics sobre la patologia d'estudi (Zellner, *et al*, 2009).

Per identificar biomarcadors vàlids cal tenir en compte diversos factors. Primerament cal seleccionar el fluid biològic adequat. El líquid cerebrospinal és ideal per identificar biomarcadors per a les malalties neurodegeneratives a causa de la seva proximitat al sistema nerviós central (Shi, *et al*, 2009). Això no obstant, és més indicat localitzar biomarcadors en plasma, orina o saliva (Ray, *et al*, 2007), encara que aquests sistemes perifèrics poden estar influïts per altres processos. El segon factor que cal tenir en compte per a l'obtenció de resultats fiables és la preparació i la qualitat de la mostra (Thongboonkerd, 2007). Per exemple, els resultats de l'anàlisi de proteòmica de teixit cerebral poden variar en funció de la ràtio de neurones i de teixit de suport present a la mostra de cervell afectat (Nakamura, *et al*, 1990).

Actualment hi ha diverses tècniques per analitzar el proteoma, entre les quals les més utilitzades són: electroforesi en dues dimensions, electroforesi diferencial en gel (DIGE), espectrometria de masses en tàndem combinada amb cromatografia líquida multidimensional (MS/MS), marcatge amb isòtops estables i marcatge isobàric per

quantificació relativa i absoluta (iTRAQ) per espectrometria de masses (MS) (Zellner, *et al*, 2009). La combinació de dues o més tècniques d'anàlisi del proteoma proporcionaran resultats més fiables (Wu, *et al*, 2006).

Finalment, abans de la utilització clínica del biomarcador identificat mitjançant tècniques de proteòmica cal validar-lo. La tècnica més comuna per verificar i validar biomarcadors és l'ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") o, més recentment, la tècnica MAP ("bead-based multi-analyte profiling") (Olsson, *et al*, 2005), tot i que també s'utilitzen tècniques de proteòmica quantitativa basades en espectrometria de masses (MS) (Anderson, 2005; Pan, *et al*, 2005).

S'ha creat una base de dades d'accés lliure anomenada PRIDE (PRoteomics IDentifications) ([www.ebi.ac.uk/pride](http://www.ebi.ac.uk/pride)) per centralitzar, estandarditzar i fer públiques dades relacionades amb proteòmica. Així mateix, PRIDE també permet buscar modificacions post translacionals.

Relacionar els estudis de perfil proteic amb els estudis de perfil de RNA podria ser molt útil. Si per a un biomarcador s'observen els mateixos canvis a nivell d'RNA i de proteïna seria una prova vàlida per establir un biomarcador potencial per a una malaltia específica, incloent-hi les demències. Eines bioinformàtiques poden ajudar a identificar les característiques comunes, com també les interaccions entre proteïnes, les seves localitzacions subcel·lulars i la funció que realitzen a la malaltia (Zellner, *et al*, 2009).

### 1.2.3 Biomarcadors potencials per a la malaltia de Parkinson

Fins a la data d'avui, no hi ha cap biomarcador fiable per a la MP, excepte per a una minoria dels pacients que pateixen una forma monogènica de la malaltia. No hi ha marcadors que permetin mesurar objectivament la severitat i la taxa de progressió de la disfunció cel·lular i la neurodegeneració de la substància negra de la MP. Malgrat que són clínicament útils, les tècniques d'imatge, com la ressonància magnètica i el PET, són marcadors que reflecteixen només algunes conseqüències del procés de la malaltia (Gasser, 2009).

No obstant això, l'avenç al coneixement de les causes genètiques i moleculars de la MP són les bases per desenvolupar biomarcadors genòmics i proteòmics que podran ser útils per desenvolupar nous tractaments.

En referència a les tècniques d'imatge emprades per al diagnòstic de la MP, s'utilitza el PET amb 18F-fluorodopa i SPECT amb varietat de lligands que s'uneixen al

transportador de dopamina per identificar els dèficits colinèrgics característics de la malaltia (Jennings, *et al*, 2004). Els resultats obtinguts en el transportador de dopamina al nucli estriat presenten diferències que permeten diferenciar la MP de les DCL, mostrant els pacients amb MP més asimetria (Walker, *et al*, 2004).

El descobriment de mutacions determinades que causen formes monogèniques de la MP han permès determinar la causa de la malaltia en una part petita dels pacients. L'apartat 1.1.3 conté un resum de la informació relacionada amb les causes genètiques descobertes fins a l'actualitat que poden produir aquesta malaltia.

Moltes vies metabòliques han estat implicades en la MP, però la mesura de la concentració dels seus components proteics o de la seva activitat enzimàtica en teixits perifèrics ha produït resultats contradictoris (Gasser, 2009).

El desenvolupament de la genòmica i la proteòmica permet identificar un gran nombre de proteïnes i té el potencial d'accelerar el descobriment de biomarcadors que permetin diagnosticar de manera diferencial les diferents malalties neurodegeneratives. En un treball fet el 2006 per Abdi i col·laboradors es va estudiar el proteoma del líquid cerebroespinal de la MP, la DCL i la MA amb la intenció de trobar biomarcadors que permetessin distingir-les (Abdi, *et al*, 2006). Es van identificar més de 1.000 proteïnes al líquid cerebroespinal de pacients amb MP, DCL, MA i controls. Concretament, es van distingir prop de 1.000 proteïnes en adults sans, algunes de les quals variaven amb l'envelliment i segons la malaltia neurodegenerativa. A cada malaltia es van identificar 300 proteïnes que diferien dels controls i, aproximadament, 100 només es trobaven en una malaltia. Per a la MP es van identificar 72 proteïnes (Abdi, *et al*, 2006), de les quals es van confirmar tres proteïnes candidates a ser biomarcadors: la ceruloplasmina, la chromogranina B i ApoH. Tot i que, les dues primeres no presentaven suficient sensibilitat i especificitat de manera independent, l'ApoH sí que sembla ser un ferm candidat a biomarcador per diferenciar la MP dels controls i altres malalties neurodegeneratives (Abdi, *et al*, 2006).

### **1.2.4 Biomarcadors potencials per a la demència amb cossos de Lewy**

Actualment, els criteris diagnòstics de la DCL presenten una sensibilitat baixa i, fins al moment, no hi ha biomarcadors àmpliament acceptats que permetin distingir aquesta malaltia de les altres demències (Aarsland, *et al*, 2008).



S'ha testat la utilitat de l'electroencefalografia o EEG com a biomarcador per al diagnòstic diferencial de les demències. La recerca sobre les propietats diagnòstiques de l'EEG és escassa i cap estudi publicat no conté informació relativa a la sensibilitat i a l'especificitat. Tanmateix, estudis fets a un nombre baix de pacients revelen una disminució en el ritme de l'EEG en la DCL en comparació amb la MA (Briel, *et al*, 1999; Calzetti, *et al*, 2002; Crystal, *et al*, 1990). A més, hi ha dos estudis, un d'ells fet amb el grup més gran de pacients, en què no es detecten diferències entre l'EEG de pacients amb DCL i de pacients amb MA (Barber, *et al*, 2002; Londos, *et al*, 2003). Aquests resultats demostren que la utilització d'EEG no és acceptable com a biomarcador per distingir la DCL de la MA.

Fins al moment s'han elaborat pocs estudis genètics sobre la DCL, tot i que hi ha proves de la relació entre casos familiars de DCL i la seva càrrega genètica (Kurz, *et al*, 2006; Woodruff, *et al*, 2006). S'ha descrit una mutació al gen SNCA (Zarranz, *et al*, 2004) i dues al gen SNCB (Ohtake, *et al*, 2004). A més, s'han fet estudis d'APOE per a casos de DCL esporàdica (Borroni, *et al*, 2006; Singleton, *et al*, 2002). No obstant això, resultats no concloents i a vegades contradictoris permeten afirmar que, actualment, no hi ha marcadors genètics utilitzables com a biomarcadors per a la DCL.

El potencial dels biomarcadors presents al líquid cerebroespinal encara no ha estat gaire explotat en la DCL, tot i que ja s'han fet alguns estudis en les diferents isoformes del  $\beta$ -amiloide, tau i  $\alpha$ -sinucleïna (Gomez-Tortosa, *et al*, 2003; Tokuda, *et al*, 2006; Vanderstichele, *et al*, 2006). Per això, seran necessàries més comprovacions en el futur.

L'estudi d'Abdi i col·laboradors, revisat a l'apartat anterior, va identificar 101 proteïnes al líquid cerebroespinal característiques de la DCL (Abdi, *et al*, 2006). Dues lipoproteïnes, ApoC1 i ApoH, podrien ser potencials marcadors per a la DCL, tot i que ApoH també és una proteïna diferencial de la MP. Però, atès el reduït nombre de mostres per a aquesta malaltia utilitzat en aquest estudi, cal considerar aquests resultats amb prudència (Abdi, *et al*, 2006).

Nombroses tècniques noves de proteòmica estan emergent i en el futur poden ser útils per localitzar biomarcadors que permetin distingir la DCL de la MA.

També s'ha investigat la utilitat de tècniques en neuroimatge estructural (CT i MRI) i funcional (SPECT i PET) per al diagnòstic diferencial de les demències. Per exemple, amb MRI ("Magnetic Resonance Imaging") s'ha observat que en pacients amb DCL es preserva el volum de l'hipocamp i del lòbul temporal medial (Barber, *et al*, 2000; Burton, *et al*, 2002), mentre que en la MA s'observa una marcada atrofia de l'hipocamp

i del lòbul temporal medial. Però altres estudis troben un solapament més marcat entre la DCL i la MA (Whitwell, *et al*, 2007). Per tant, de moment MRI no és adequat com a biomarcador per distingir aquestes dues malalties (Aarsland, *et al*, 2008).

Mitjançant SPECT (“Single Photon Emission Computed Tomography”), utilitzat per avaluar el flux cerebral, es mesura la funció cortical i s’observa una hipoperfusió característica als lòbuls occipitals i parietals en la DCL (Lobotesis, *et al*, 2001). En alguns estudis més recents s’augmenta la sensibilitat i l’especificitat mitjançant la combinació de SPECT i MMSE (“Mini Mental State Examination”) (Hanyu, *et al*, 2006; Shimizu, *et al*, 2005), però en altres es van obtenir resultats menys significatius (Kemp, *et al*, 2007).

En la DCL és freqüent la disfunció autònoma del sistema cardiovascular i mitjançant l’escintigrafia  $^{123}\text{I}$ -MIBG es pot quantificar la innervació postganglionar simpàtica cardíaca. Estudis utilitzant aquest mètode han permès distingir la DCL de la MA amb una elevada sensibilitat i especificitat (Hanyu, *et al*, 2006; Wada-Isoe, *et al*, 2007; Yoshita, *et al*, 2006). A més, es postula que aquesta tècnica és més precisa que SPECT (Hanyu, *et al*, 2006; Wada-Isoe, *et al*, 2007) i els marcadors del líquid cerebrospinal (Wada-Isoe, *et al*, 2007). Si els resultats es confirmen en estudis més amplis, l’escintigrafia  $^{123}\text{I}$ -MIBG podria ser una eina útil en la discriminació entre la DCL i la MA.

La DCL presenta pèrdua del transportador de dopamina al nucli caudat i al putamen (Piggott, *et al*, 1999) i mitjançant PET o SPECT es detecta la pèrdua dopaminèrgica utilitzant lligands específics per al transportador de dopamina, com  $^{123}\text{I}$ - $\beta$ -CIT i  $^{123}\text{I}$ -FP-CIT. Tenint en compte una disminució en l’absorció del transportador de dopamina en la DCL, però no en la MA, un estudi multicèntric recent ha demostrat una sensibilitat del 78 % i una especificitat del 90 % en el diagnòstic de la DCL davant la MA mitjançant el lligand  $^{123}\text{I}$ -FP-CIT (McKeith, *et al*, 2007). Aquests resultats van permetre l’aprovació de la tècnica FP-CIT SPECT per l’Agència Europea per a l’Avaluació de Productes Medicinals (“European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”) per al diagnòstic diferencial de probable DCL versus la MA en el 2006.

### 1.2.5 Biomarcadors potencials per a l’atròfia multisistèmica

L’AMS és una malaltia rara i difícil de diagnosticar. Fins al moment, no es disposen de biomarcadors, tot i que les tècniques de neuroimatge poden ajudar al seu diagnòstic.

Per exemple, mitjançant MRI s'observa atrofia del putamen, dels peduncles cerebel·lars i del *pons*. A través de DWI ("diffusion-weighted imaging") es pot diferenciar l'AMS-P de la MP i dels controls, ja que posseeixen un coeficient de difusió regional aparent (rADC) elevat al putamen (Ito, *et al*, 2007; Seppi, *et al*, 2003).

En canvi, pacients en estadis inicials d'AMS-C poden ser diferenciats dels controls perquè posseeixen una elevada rADC al *pons* i al peduncle cerebel·lar (Kamm, *et al*, 2005). A més, PET utilitzant 18F-fluorodeoxiglucosa també serveix per diferenciar AMS-C de la MP, ja que s'observen canvis hipometabòlics en regions corticals de pacients amb AMS-C (Juh, *et al*, 2005; Lee, *et al*, 2008). La utilització SPECT permet detectar una disminució en la unió al transportador de dopamina tant a l'AMS com a la MP, però utilitzant SPECT amb <sup>123</sup>I-β-CIT permet distingir AMS-C de MP (Scherfler, *et al*, 2005).

A banda d'això, diversos estudis apunten que combinant l'ús del transportador de dopamina i el seu receptor o la perfusió amb lligands podria millorar el diagnòstic diferencial entre AMS i MP (El Fakhri, *et al*, 2006; Plotkin, *et al*, 2005).

Fins a l'actualitat no s'han descrit marcadors genètics que puguin ser utilitzats com a biomarcadors per a aquesta malaltia.

### 1.2.6 Biomarcadors potencials per a la malaltia d'Alzheimer

En l'última dècada s'han descobert molts possibles biomarcadors per a la MA. Entre els candidats es troben, per exemple, isoprostanes, tau, β-amiloide, sulfatides i homocisteïna; no obstant això, hi ha altres biomarcadors potencials com la proteïna precursora del β-amiloide, apolipoproteïna E, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, α1-antiquimotripsina, interleucina-6, receptor IL-6, la proteïna C reactiva i la proteïna C1q (Clark, *et al*, 2006; Frank, *et al*, 2003; Thal, *et al*, 2006).

ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) ([www.adni-info.org](http://www.adni-info.org)) és un programa d'investigació públic i privat dedicat a definir i validar biomarcadors, tant químics com de neuroimatge, per a la MA i per a la transició de problemes cognitius lleus a la MA.

Els biomarcadors potencials més estudiats són la proteïna tau i el β-amiloide al líquid cerebrospinal, mesurats mitjançant ELISA (Shaw, *et al*, 2007). La proteïna tau total és de dues a tres vegades superior al líquid cerebrospinal de pacients amb MA comparat amb individus control, possiblement per raó de l'alliberament de tau per part de les

neurones degenerades, dels cabdells neurofibril·lars i de les neurites distròfiques (Shaw, *et al*, 2007). D'altra banda, la massiva acumulació de  $\beta$ -amiloide 1-42 als cabdells neurofibril·lars i a les plaques senils sembla que és la causa de la disminució del 40 % dels nivells d'aquesta proteïna al líquid cerebroespinal en pacients amb MA (Shaw, *et al*, 2007). La mesura d'aquesta proteïna al líquid cerebroespinal pot ser utilitzada per testar nous fàrmacs. Tanmateix, la utilitat d'aquests dos biomarcadors per al diagnòstic precoç de la MA encara ha de ser corroborada (de Leon, *et al*, 2006; Hansson, *et al*, 2006).

L'estudi d'Abdi i col·laboradors, discutit a l'apartat 1.2.3 va identificar 136 proteïnes característiques de la MA al líquid cerebroespinal (Abdi, *et al*, 2006). Moltes proteïnes candidates a biomarcadors van ser estudiades en aquest i en altres treballs (Blennow, 2005; Carrette, *et al*, 2003; Puchades, *et al*, 2003; Zhang, *et al*, 2005). Mentre que algunes proteïnes estaven augmentades en la MA i altres disminuïdes, l'única proteïna identificada per igual en tots els estudis com a biomarcador és el precursor de l'ApoA-II. L'haptoglobulina també és un ferm candidat, tot i que també la presenten un 20 % dels casos de MP (Abdi, *et al*, 2006).

El dany oxidatiu és un procés estretament relacionat amb el desenvolupament de la MA. La peroxidació lipídica produeix isoprostanes específiques, com per exemple, 8, 12-iso-iPF<sub>2 $\alpha$</sub> -VI, que es troben a nivells elevats en orina, sang i líquid cerebroespinal de les persones que pateixen aquesta malaltia (de Leon, *et al*, 2006; Frank, *et al*, 2003; Skovronsky, *et al*, 2006). Aquests valors correlacionen amb els dèficits de memòria, els nivells de tau al líquid cerebroespinal, com també amb el nombre d'al·lels APOE4 (de Leon, *et al*, 2006; Frank, *et al*, 2003). Aquests fets suggereixen que 8, 12-iso-iPF<sub>2 $\alpha$</sub> -VI potser un marcador útil per a la MA. Les isoprostanes són mesurades al líquid cerebroespinal, a la sang i al teixit cerebral post mortem utilitzant cromatografia líquida/espectrometria de masses en tàndem amb pressió atmosfèrica i ionització química.

Fins al moment, els biomarcadors analitzats en aquest apartat són biomarcadors útils per al diagnòstic. Però també s'han descobert factors de risc per a la MA, dels quals els més estudiats són el genotip de l'APOE i la concentració d'homocisteïna en plasma (Shaw, *et al*, 2007; Thal, *et al*, 2006). Tanmateix, al no presentar suficient sensibilitat ni especificitat per distingir els malalts d'Alzheimer dels controls o d'altres malalties neurodegeneratives, no són útils pel diagnòstic precoç (Shaw, *et al*, 2007).

Tal com està resumit a l'apartat 1.1.6, les mutacions que causen la MA familiar representen biomarcadors específics per a les famílies afectades. La majoria són casos de debut precoç, provocats per gens amb herència autosòmica dominant, tot i això, només representen el 5 % dels casos de MA.

### 1.3 La Butirilcolinesterasa

Les colinesterases són enzims presents en teixits colinèrgics i no-colinèrgics, així com en plasma i en altres fluids corporals (Massoulie, *et al*, 1993). Se'n coneixen dues que es diferencien principalment segons la seva especificitat pel substrat, el comportament en excés de substrat i la susceptibilitat a inhibidors: l'acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) i la butirilcolinesterasa (BChE, E.C. 3.1.1.8), l'objecte d'estudi en aquest treball.

La BChE, també anomenada pseudocolinesterasa, és un enzim de tipus glicoproteic que pertany a la família de les serin-esterases. La BChE es sintetitza al fetge, s'allibera al torrent sanguini i es localitza a diferents òrgans corporals, com el fetge, l'intestí, el cor, el ronyó i el pulmó. Al cervell humà, la BChE es troba a totes les regions que reben innervació colinèrgica (Lane, *et al*, 2006), principalment a cèl·lules glials i a cèl·lules endotelials, però també a neurones sobretot de l'hipocamp, el tàlem i l'amígdala (Darvesh, *et al*, 1998; Darvesh i Hopkins, 2003).

#### 1.3.1 Primers estudis sobre butirilcolinesterasa

Durant molts anys els estudis de BChE es van centrar en el camp de l'anestèsia, a causa de l'ús de la succinilcolina com a relaxant muscular. L'activitat de la succinilcolina és eliminada per la BChE, però algunes variants genètiques redueixen l'activitat catalítica d'aquest enzim, i produeixen així una apnea prolongada en els pacients portadors d'aquestes variants (LEHMANN i RYAN, 1956).

A banda de la succinilcolina, BChE també metabolitza altres anestèsics, com el mivacurium. En aquest cas, una dieta rica en solanàcies és la causa de la inhibició de l'enzim, per raó del seu elevat contingut en glicoalcaloids (McGehee, *et al*, 2000).

#### 1.3.2 Funcions de la butirilcolinesterasa

A més a més de la seva participació en el metabolisme dels anestèsics, la BChE realitza diferents funcions, tot i que el seu paper fisiològic encara no està ben definit (Mack i Robitzki, 2000; Manoharan, *et al*, 2007). D'una banda, és un enzim destoxificador de compostos com organofosfats i carbamats (pesticides i insecticides), cocaïna, aspirina entre molts altres. De l'altra, també actua com a activador enzimàtic. Per exemple, l'heroïna és hidrolitzada per la BChE a 6-acetilmorfina, la qual és capaç

de travessar la barrera hematoencefàlica i altres enzims l'hidrolitzen a morfina al cervell. El bambuterol és convertit per aquesta colinesterasa a terbutalina, que és una substància amb efecte antiasmàtic. A més, la BChE s'utilitza com a marcador per a la funció del fetge.

La BChE té altres funcions anomenades no-clàssiques, intervenint per exemple en la proliferació cel·lular, en la morfogènesi i també en l'expressió d'AChE (Robitzki, *et al*, 1997). A més, la BChE presenta activitat aril acilamidasa amb funció fisiològica desconeguda, però capaç d'hidrolitzar el substrat sintètic o-nitroacetanilida. Aquesta activitat pot ser inhibida per serotonina a més a més de ser-ho pels inhibidors de colinesterases clàssics. Finalment, també s'ha detectat activitat peptidasa o amidasa en la BChE (Chatonnet i Masson, 1986). Tenint en compte que les colinesterases interaccionen amb peptidases així com amb altres enzims (Checler, *et al*, 1994), es pensa que part o tota l'activitat peptidasa de la BChE està relacionada amb els enzims associats a aquesta (Checler, *et al*, 1994). Per tant, a part de la coregulació colinèrgica, la BChE pot tenir funcions que depenen de la seva interacció amb altres proteïnes.

La funció de BChE al cervell no està ben definida, pot hidrolitzar acetilcolina però de manera menys eficient que l'AChE (Mesulam, *et al*, 2002; Mesulam, *et al*, 2002). L'expressió de BChE d'una manera diferencial i precisa en les diferents àrees cerebrals suggereix que aquest enzim podria exercir una funció definida al cervell (Manoharan, *et al*, 2007). Per exemple, BChE s'expressa de manera específica en diferents poblacions neuronals (Darvesh, *et al*, 1998; Darvesh, *et al*, 1998; Darvesh i Hopkins, 2003), és un coregulador de la transmissió colinèrgica (Darvesh, *et al*, 1998; Mesulam, *et al*, 2002) i sembla que està involucrat en el desenvolupament del sistema nerviós (Layer, 1991; Robertson i Mostamand, 1988). A més, les propietats bioquímiques de la BChE estan alterades en les malalties neurodegeneratives (Geula i Mesulam, 1989; Perry, *et al*, 1978).

Altres estudis demostren l'associació entre la BChE i la tripsina, on la BChE augmenta l'activitat proteolítica de la tripsina de manera concentració dependent (Darvesh, *et al*, 2001). Aquesta estimulació de la tripsina per part de la BChE presenta un perfil de saturació d'interacció proteïna-proteïna 1:1 entre tots dos enzims. Cal remarcar que aquesta observació té importància en la funció del sistema nerviós ja que la tripsina es troba al cervell humà i la seva sobreexpressió podria estar involucrada en el desenvolupament de la MA (Katona, *et al*, 2002).

Cal afegir que la BChE és capaç de prevenir la fibril·lització de monòmers de  $\beta$ -amiloide a formes tòxiques d'oligòmers i fibril·les (Diamant, *et al*, 2006). S'insistirà més en aquest mecanisme a l'apartat 1.3.10.

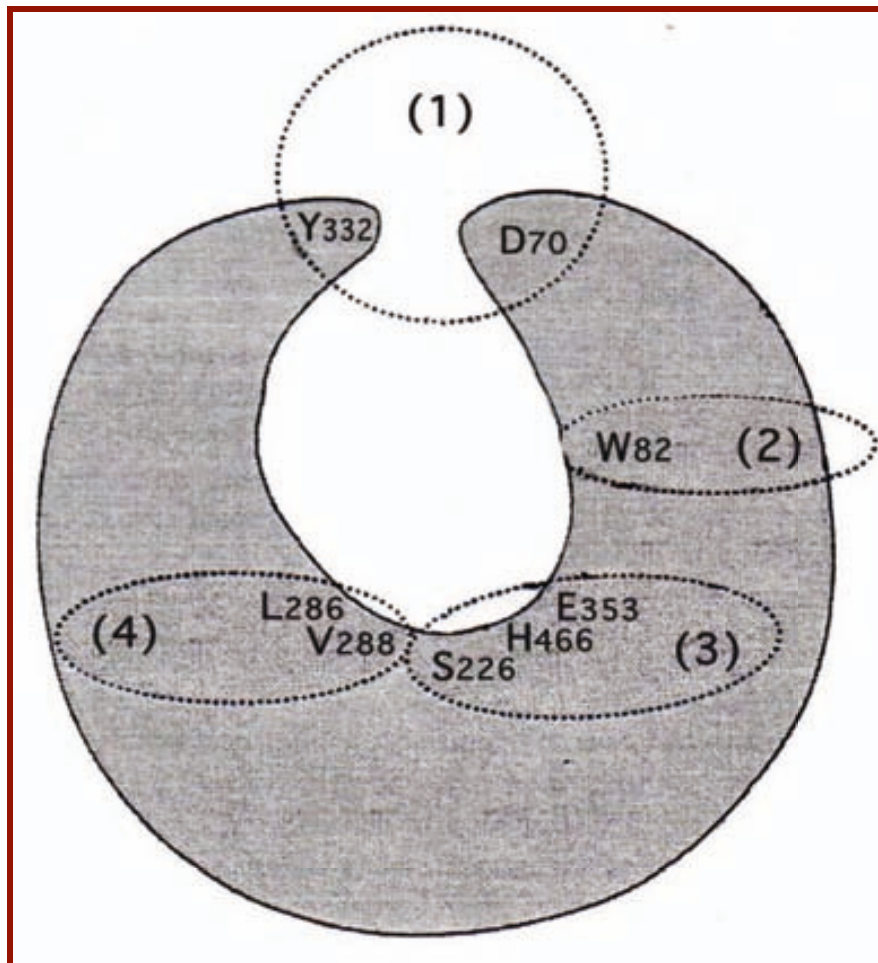
### 1.3.3 Estructura i mecanismes d'acció de la butirilcolinesterasa

Estructuralment, la BChE, similar a l'AChE, pertany a la família de proteïnes plegades  $\alpha/\beta$  caracteritzada per un " *$\beta$ -sheet*" central envoltat per  $\alpha$ -hèlixs (Millard i Broomfield, 1992).

La BChE i l'AChE comparteixen entre un 54-65 % d'homologia en la seqüència d'aminoàcids (Lane, *et al*, 2006; Valle, *et al*, 2008). Les diferències estructurals entre totes dues colinesterases, els confereixen l'especificitat per al substrat.

La subunitat catalítica de la BChE està formada per 574 aminoàcids i conté una tríada catalítica formada per la serina 226, la histidina 466 i l'àcid glutàmic 353 (figura 2) (Lockridge, *et al*, 1987). Per similitud amb l'AChE, la tríada catalítica és molt probable que es trobi a la part inferior de la gorja de 20 Å de profunditat. A més de la tríada catalítica, la gorja conté un lloc aniònic format pel triptòfan 82 amb capacitat d'unir el nitrogen quaternari de la colina (Vellom, *et al*, 1993). Els substrats són guiats cap al lloc actiu de la gorja per la interacció amb l'àcid aspàrtic 70 i la tirosina 332 (figura 2) que formen el lloc aniònic perifèric (Masson, *et al*, 1999). Finalment, la gorja conté un lloc d'unió acil format concretament per la lisina 286 i la valina 288 (figura 2), on el grup acil dels colin-esters és aguantat durant la catàlisi (Darvesh i Hopkins, 2003; Darvesh, *et al*, 2003). Les diferències principals entre la BChE i l'AChE són els residus aminoacídics situats a la part inferior de la gorja i el lloc d'unió acil que en el cas de l'AChE està format per dues fenilalanines (Nicolet, *et al*, 2003).





**Figura 2. Dominis funcionals de la proteïna.** (1) lloc aniónic perifèric (PAS), (2) lloc d'unió a la colina, (3) tríada catalítica, (4) lloc d'unió acil.

La BChE i l'AChE són glicoproteïnes, és a dir, enzims capaços d'unir covalentment carbohidrats complexos. En el cas de l'AChE, s'uneixen a tres aminoàcids diferents, i en el cas de la BChE, a nou asparagines. S'ha postulat que aquest procés pot participar en el plegament, la secreció, l'estabilitat i l'eliminació de les colinesterases (Millard i Broomfield, 1992; Nachon, *et al*, 2002).

La regió C-terminal de la BChE funciona com a domini de tetramerització i és la responsable de l'organització quaternària (Podoly, *et al*, 2009).

### 1.3.4 Butirilcolinesterasa durant el desenvolupament del sistema nerviós

Es colinesterases, l'AChE i la BChE, participen en la regulació de la proliferació cel·lular i en el creixement de les neurites durant el desenvolupament del sistema nerviós (Layer, 1991; Robertson i Mostamand, 1988; Soreq i Seidman, 2001). S'ha

trobat la BChE en axons, terminacions nervioses, cons de creixement i en cèl·lules que envolten els axons la qual cosa indica la seva possible funció en el creixement de neurites (Dubovy i Haninec, 1990).

Durant el desenvolupament postnatal del cervell, la BChE s'expressa transitòriament en moltes poblacions neuronals de diferents espècies incloent-hi aus, rosegadors, monos i humans (Layer, 1991; Robertson i Mostamand, 1988). En els rosegadors, la BChE és present a nivells baixos a pràcticament totes les neurones del cervell i a nivells elevats a les cèl·lules cuboïdals dels ventricles. L'expressió transitòria de la BChE en diverses poblacions neuronals i en cèl·lules no-neurals representen una evidència de la importància d'aquest enzim durant el desenvolupament del sistema nerviós (Darvesh, *et al*, 2003). Mentre que l'AChE sembla que participa en el desenvolupament neuronal augmentant la transmissió colinèrgica, encara queda per determinar si la BChE també exerceix un paper similar a través de l'activació dels receptors colinèrgics (Darvesh, *et al*, 2003).

### 1.3.5 Estructures moleculars de la butirilcolinesterasa

Igual que en l'AChE, hi ha diferents formes moleculars de la BChE (Darvesh, *et al*, 2003). Primerament, es troba la forma monomèrica i simètrica anomenada  $G_1$ . Dos monòmers units per un pont disulfit entre la cisteïna 571 de cadascun formen el dímer  $G_2$ . La forma globular  $G_4$  és la constituïda per dos dímers  $G_2$  units per interaccions hidrofòbiques. Aquestes tres formes moleculars ( $G_1$ ,  $G_2$  i  $G_4$ ) són simètriques, hidrofíliques i globulars i, principalment, es troben de manera soluble (Lockridge, *et al*, 1987). La forma molecular  $G_1$  és la predominant durant el desenvolupament del cervell; en canvi, al cervell madur principalment s'hi troba la forma  $G_4$ .  $G_1$  augmenta entre 30-60 % al còrtex cerebral de persones amb MA; a més, es troba a les plaques senils (Arendt, *et al*, 1992). És possible que aquest retorn a la forma  $G_1$  de BChE amb propietats bioquímiques alterades tingui un paper en la neurodegeneració (Darvesh, *et al*, 2003).

La forma tetramèrica ( $G_4$ ) es pot trobar unida a la membrana a través d'un ancoratge ric en prolina; en aquest cas és asimètrica i amfifílica (Massoulie, 2002; Perrier, *et al*, 2002). Quan el tetràmer de BChE està unit a la membrana a través d'un ancoratge triple-hèlix, no-catalític i ric en prolines de col·lagen (Col·lagen Q), el tetràmer s'anomena  $A_4$ ,

dos d'ells units  $A_8$  i tres constitueixen la forma  $A_{12}$  (Feng, *et al*, 1999; Massoulie, *et al*, 1993).

### 1.3.6 Distribució de la butirilcolinesterasa al cervell

Les colinesterases presenten una distribució diferencial al cervell humà. En algunes àrees, la BChE i l'AChE presenten una organització complementària i, en altres, coincideixen. La BChE s'expressa principalment a les neurones i als seus processos dendrítics d'àrees que duen a terme funcions cognitives (Manoharan, *et al*, 2007). En canvi, l'AChE es caracteritza per una distribució més àmplia i es troba principalment al neuròpil, encara que a l'hipocamp també s'expressa en neurones.

A l'amígdala i a l'hipocamp, la BChE s'expressa en neurones i en les dendrites proximals (Darvesh, *et al*, 1998), i és present en pràcticament totes les subdivisions de l'amígdala. A més, la seva distribució és significativament diferent de la de l'AChE en aquesta àrea, ja que l'AChE es troba principalment al neuròpil, mentre que la BChE es troba a les neurones i en els seus processos dendrítics. A l'hipocamp, la BChE, igual que l'AChE, es troba principalment a les neurones de la capa polimòrfica del gir dentat i piramidal. L'AChE es troba, a més, en el neuròpil. La distribució específica de la BChE en aquestes dues estructures suggereix que la BChE realitza funcions determinades incloent-hi la coregulació de la neurotransmissió colinèrgica i no colinèrgica (Darvesh, *et al*, 1998).

Al tàlem, la BChE s'ha identificat en neurones, sobretot al soma i a les dendrites proximals (Darvesh, *et al*, 2003). El patró de distribució de les colinesterases en aquesta regió pot ser complementari o solapat. Per això és possible que algunes neurones continguin tots dos enzims.

Les neurones del sistema nerviós perifèric també presenten BChE, com per exemple el sistema nerviós cardíac intrínsec (Darvesh, *et al*, 2001).

Al cervell humà, les cèl·lules glials, com els astròcits, la microglia i els oligodendròcits, alliberen AChE i BChE a l'espai extracel·lular quan són activades (Lane, *et al*, 2006). Glia positiva per AChE es troba àmpliament distribuïda per les capes corticals i subcorticals de la substància blanca; en canvi, només es troba glia positiva per BChE en les capes profundes corticals i subcorticals de la substància blanca (Wright, *et al*, 1993). Al cervell sense patologia, la ràtio de BChE/AChE positiva en glia és més elevada al còrtex entorinal i inferotemporal (regions susceptibles a la

patologia Alzheimer) que al còrtex somatosensorial i visual (regions poc afectades per la MA) (Wright, *et al*, 1993).

### 1.3.7 Distribució de butirilcolinesterasa al cervell amb malaltia d'Alzheimer

La MA es caracteritza per la denervació colinèrgica cortical del lòbul temporal i de les àrees límbiques i paralímbiques. En canvi, el sistema colinèrgic del tàlem i del nucli estriat queda pràcticament intacte (Lane, *et al*, 2006). La pèrdua neuronal severa produeix la reducció dràstica d'acetilcolina i d'AChE. En canvi, els nivells corticals de BChE augmenten i estan associats a les plaques senils, als cabdells neurofibril·lars així com als vasos que contenen  $\beta$ -amiloide (Geula i Mesulam, 1989; Geula, *et al*, 1994; Guillozet, *et al*, 1997). A més, s'han trobat productes derivats de la reactivitat de BChE a cabdells neurofibril·lars, tant intracel·lulars com extracel·lulars, també a neurites associades a les plaques senils i a axons i dendrites del neuròpil (Gomez-Ramos, *et al*, 1994; Perry, *et al*, 2003).

L'origen de la BChE present a les estructures patològiques característiques de la MA, sembla que resideix a les cèl·lules glials (Darvesh, *et al*, 2003), el tipus cel·lular significativament activat a la MA (Wright, *et al*, 1993).

Al còrtex cerebral de pacients amb MA, el nombre de plaques senils positives per BChE és significativament superior al present al cervell d'una persona gran sense demència, que conté plaques difuses benignes (Mesulam i Geula, 1994). L'activitat de BChE es detecta en plaques senils madures o en procés de maduració (Guillozet, *et al*, 1997; Mesulam i Geula, 1994). Aquesta observació permet suggerir que la BChE podria participar en la maduració de les plaques senils de la forma difosa i benigna a la forma madura, compacta i patològica (Darvesh, *et al*, 2003). Per tant, la presència de reactivitat per BChE diferencia l'acumulació de  $\beta$ -amiloide de l'envelliment normal a l'associat a demència (Lehmann, *et al*, 2000).

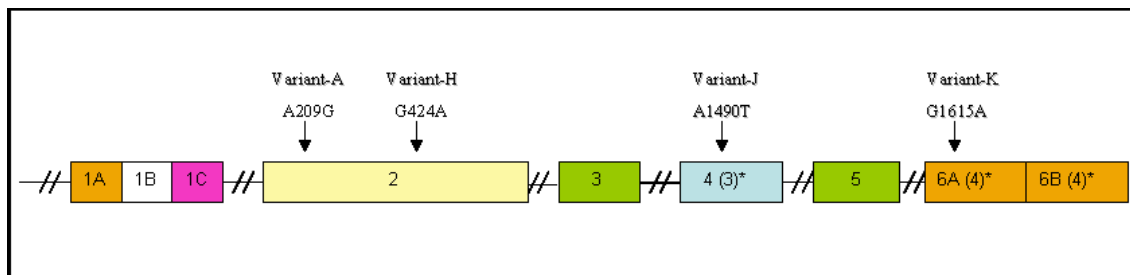
Al cervell normal, l'AChE és l'enzim principal implicat en la neurotransmissió colinèrgica i la BChE només té un paper de suport (Mesulam, *et al*, 2002). Al cervell de persones amb MA la ràtio entre BChE i AChE en les regions corticals augmenta de 0,2 en cervells normals a 11 en cervells amb MA (Lane i He, 2009). Aquest canvi és produït per la disminució de l'AChE en les sinapsis i per un augment de la BChE en la glia amb la progressió de la MA (Lane i He, 2009).

L'augment significatiu dels nivells de BChE al cervell de pacients amb MA contrasta amb la reducció d'aquest enzim al líquid cerebroespinal (Mesulam i Geula, 1994) i a les sinapsis observat mitjançant tomografia per emissió de positrons (PET) (Kuhl, *et al*, 2006). Els pacients amb MA i nivells alts o moderats de BChE al líquid cerebroespinal presenten una millor funció cognitiva que la resta dels malalts (Darreh-Shori, *et al*, 2006). Segons Darreh-Shori i col·laboradors, nivells elevats de BChE al líquid cerebroespinal estan condicionats per diferents factors, com per exemple el sexe, l'estatus d'ApoE o l'edat (Darreh-Shori, *et al*, 2009).

### 1.3.8 El gen de la butirilcolinesterasa

El gen BCHE està situat al cromosoma 3 (3q26), ocupa una regió cromosòmica de 70 kb i està format per sis exons. Fins al moment, a la literatura estan descrits quatre exons del gen BChE que constitueixen el transcrit majoritari del gen. Tanmateix, recentment s'han descobert dos exons addicionals que només es troben en variants de *splicing* (VS) minoritàries, fet que ha variat la numeració exònica (figura 3).

A part del transcrit majoritari, VS3, constituït per l'exó 1, 2, 4 i 6, s'han detectat tres VS més ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)). La VS1 i VS2 contenen una inserció de l'exó 5 i 3, respectivament, i la VS4 està formada per una part de l'exó 1 i els exons 4 i 6.



**Figura 3. Representació esquemàtica del gen de BChE amb els polimorfismes més freqüents.** \* indica el canvi de numeració dels exons; entre parèntesis, la numeració antiga.

### 1.3.9 Polimorfismes de la butirilcolinesterasa

Fins al moment s'han descrit més de 58 mutacions diferents al gen de la BChE, 55 de les quals es localitzen a la regió codificant (Souza, *et al*, 2005).

La variant-K de la BChE és la més comuna i es troba present a un terç de la població caucàsica i oriental. Es caracteritza pel canvi d'un únic nucleòtid a la posició 1615, concretament d'una guanina per una adenina. A conseqüència d'això una alanina és

substituïda per una treonina a la posició 539 de la proteïna (figura 3), situat al domini de tetramerització. Aquest canvi influeix directament sobre la capacitat d'hidròlisi de la variant-K de BChE que disminueix en sèrum un 33 % en comparació amb el genotip salvatge (Babaoglu, *et al*, 2004; Darvesh, *et al*, 2003). A més, cal destacar que el polimorfisme corresponent a la variant K està situat a la zona implicada en l'atenuació de la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide (Diamant, *et al*, 2006).

Hi ha diferents hipòtesis sobre si la variant-K és un factor de risc o un factor protector per la MA. D'una banda, la variant-K està situada a la regió C-terminal, que és essencial per a la tetramerització de BChE i per la seva capacitat d'atenuar la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide (Podoly, *et al*, 2009). D'altra banda, la variant-K és més inestable en comparació amb la forma no mutada, la qual cosa provoca la reducció de la seva activitat hidrolítica. Aquest fet comporta que l'acetilcolina és mantingui més temps i protegeixi de la MA (Podoly, *et al*, 2009).

En pacients portadors de la variant-K de la BChE la proteïna tau es fosforil·la de manera menys severa al còrtex temporal. Aquest descobriment pot tenir implicacions al tractament de les demències amb inhibidors de colinesterases (Ballard, *et al*, 2005).

La variant atípica de la BChE o la variant-A està situada al nucleòtid 209 (A209G), que canvia el codó 70 de GAT a GGT, resultant el canvi aminoacídic d'una asparagina a una glicina (D70G, figura 3). La substitució d'un aminoàcid àcid a un aminoàcid neutre al lloc aniònic de l'enzim pot provocar una disminució d'afinitat pels ésters de colina pel fet que l'asparagina-70 sembla que és un component important del lloc aniònic (McGuire, *et al*, 1989).

La variant-H de la BChE és una variant que redueix un 90 % l'activitat de l'enzim. Aquest polimorfisme també està situat a l'exó 2, concretament a la posició 424 i comporta el canvi d'una guanina per una adenina (G424A), responsable del canvi d'una valina per una metionina (V142M, figura 3).

A la posició 1490 de l'exó 4 (anteriorment anomenat exó 3) s'hi troba la variant-J, caracteritzada pel canvi nucleotídic d'una adenina per una timina (A1490T) i l'aminoacídic d'un àcid glutàmic per una valina (E497V, Figura 3). En aquest cas, el nombre de molècules de BChE circulants està disminuït un 66 % (Garry, *et al*, 1976), a més, aquest polimorfisme es troba associat a la variant-K.

La reduïda activitat de BChE deguda a la presència de les variants A, K, H i J produeix una taxa més lenta de progressió de la demència provocada per la MA o per la DCL (Manoharan, *et al*, 2007). Això no obstant, l'associació entre els polimorfismes de

la BChE i el desenvolupament i la progressió de les demències continua sent un tema d'investigació vigent.

### **1.3.10 La butirilcolinesterasa atenua la formació de fibril·les de $\beta$ -amiloide**

Al cervell de pacients amb MA, BChE colocalitza amb AChE a les plaques senils del còrtex cerebral. L'AChE sinàptica (AChE-S) promou l'agregació de  $\beta$ -amiloide in vitro (Bartolini, *et al*, 2003; Inestrosa, *et al*, 1996a; Inestrosa, *et al*, 1996b), augmenta la toxicitat del  $\beta$ -amiloide en cultius neuronals (Munoz i Inestrosa, 1999) i en ratolins transgènics induïx l'acumulació de plaques de  $\beta$ -amiloide (Rees, *et al*, 2005). Totes aquestes evidències suggereixen que l'AChE està involucrada en el procés de formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide.

Molts estudis han intentat localitzar el domini estructural específic de l'AChE-S que potencia la nucleació i la progressió del procés de formació de fibril·les. Una seqüència hidrofòbica situada prop del lloc d'unió aniònic perifèric (PAS "peripheral anionic binding site") interacciona directament amb el  $\beta$ -amiloide (De Ferrari, *et al*, 2001) i va ser proposat d'estar activament involucrat en l'acceleració de la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide (Inestrosa, *et al*, 1996b).

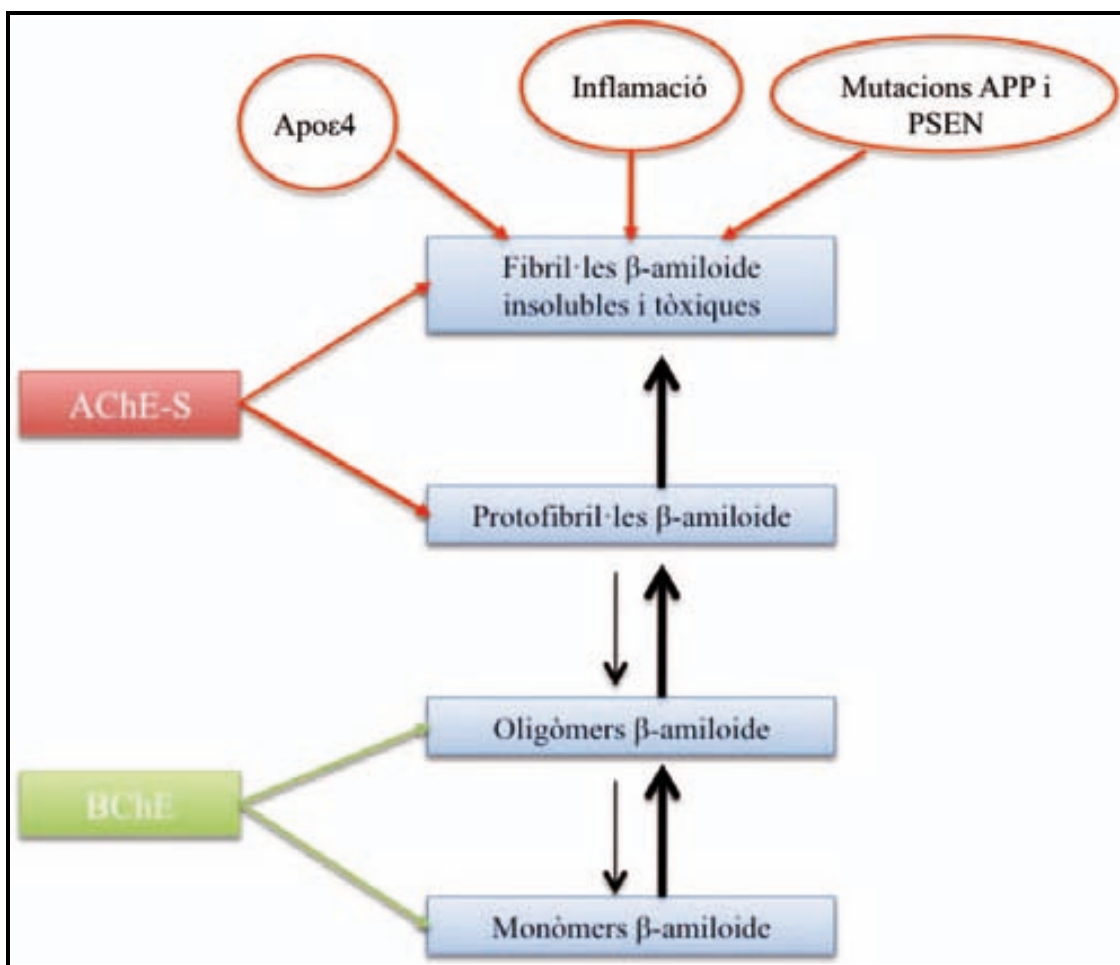
BChE també presenta una regió PAS que comparteix algunes propietats estructurals i fisicoquímiques amb la regió PAS d'AChE. El PAS de BChE conté només un dels quatre residus aromàtics que posseeix el PAS de l'AChE i presenta una propietat bioquímica inversa, principalment, l'activació de substrat, en lloc de la inhibició de substrat característica del PAS d'AChE (Diamant, *et al*, 2006).

Diversos estudis han demostrat que BChE allarga la fase de nucleació durant la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide in vitro i alenteix la fase de propagació (Diamant, *et al*, 2006). Els mateixos investigadors han demostrat que BChE actua com a modificador negatiu del procés de formació de fibril·les i, a més, és capaç de suprimir l'estimulació d'aquest procés provocat per AChE-S (Figura 4).

AChE promou la formació de fibril·les a través del domini hidrofòbic PAS, situat prop de la part superior del lloc actiu de la gorja. El domini PAS es troba lliure per formar complexos amb les fibril·les en creixement i, ajuden així en el procés de formació del  $\beta$ -amiloide (Alvarez, *et al*, 1997). En canvi, BChE inhibeix aquest procés a través del triptòfan 8 de la regió C-terminal del pèptid en un ambient polar (Diamant, *et*

## 1 Introducció

*al*, 2006). El triptòfan 8 pot formar complexos heteroaromàtics amb monòmers o oligòmers curts solubles de  $\beta$ -amiloide (Inouye, *et al*, 2006; Porat, *et al*, 2004). El residu aromàtic pot interferir en l'oligomerització i/o en l'estabilització de la cadena lateral de l'estructura " $\beta$ -sheet" i inhibir la propagació del procés de formació de fibril·les.



**Figura 4.** Esquema de la relació dels diferents factors que intervenen en la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide en la MA. El color verd indica atenuació en el procés de formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide, en canvi, el color vermell significa un impuls en aquest procés.

A cervell humà, AChE és vint vegades superior a BChE (Soreq i Zakut, 1990). En sang, el contrari, BChE és tres vegades més abundant que AChE (Loewenstein-Lichtenstein, *et al*, 1995). Aquestes diferències poden ser fisiològicament importants en el procés de formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide perquè hi pot haver comunicació continua entre el cervell i la circulació sanguínia (Basun, *et al*, 2002).



Tot i que s'ha demostrat que la BChE humana interacciona amb les fibril·les de  $\beta$ -amiloide per atenuar la seva formació, com també la seva extensió i ramificació (Podoly, *et al*, 2008), hi ha altres mecanismes que també explicarien la interacció entre la BChE i el  $\beta$ -amiloide. Per exemple, l'agregació del  $\beta$ -amiloide disminueix a causa de l'activitat associada entre la metalocarboxipeptidasa dependent de  $Zn^{2+}$  i la BChE (Bhanumathy i Balasubramanian, 1996). En àrees cerebrals afectades per a la MA els ions de  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  interaccionen amb pèptids de  $\beta$ -amiloide, el  $Zn^{2+}$  canvia l'estructura de la BChE i, contribueix d'aquesta manera a la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide (Jiang, *et al*, 2008). Finalment, la BChE pot tenir un paper en el metabolisme dels lípids. Una alteració en la composició lipídica de la membrana pot comportar un canvi en la integritat sinàptica i en la plasticitat o disminuir la tendència dels components de la membrana, com el gangliosid GM1, a fibril·litzar el  $\beta$ -amiloide (Ariga, *et al*, 2008).

Normalment es detecta una àmplia distribució d'AChE, BChE i la síntesi d'acetilcolina a les cèl·lules vasculars de l'endoteli (Kirkpatrick, *et al*, 2003). Per aquest motiu, canvis en el sistema vascular també poden contribuir a patir demència (Zlokovic, 2008). Les neurones colinèrgiques innerven els vasos sanguinis cerebrals (Toda i Okamura, 2003) i l'acetilcolina pot augmentar el flux de sang cerebral dilatant microvasos intracorticals. Però la disminució de neurones colinèrgiques disminueix aquest flux de sang i augmenta la deposició de  $\beta$ -amiloide als vasos (Roher, *et al*, 2002). Un nombre elevat d'oligòmers de  $\beta$ -amiloide, aterosclerosi, angiopatia amiloide cerebral, respostes vasculars neuroinflamatòries o una disminució de la innervació colinèrgica de la vasculatura cerebral pot produir una pèrdua de la regulació del flux sanguini cerebral, angiogènesi insuficient i hipoperfusió cerebral (Wu, *et al*, 2005).

### **1.3.11 Influència de la variant-K de la BChE en la formació de fibril·les de $\beta$ -amiloide**

Tal com ja s'ha mencionat, la BChE atenua la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide mitjançant la interacció de la proteïna de la BChE amb el  $\beta$ -amiloide soluble (Diamant, *et al*, 2006). Un segment de quaranta aminoàcids situat a la regió C-terminal de la molècula de la BChE és responsable de la inhibició de l'agregació de  $\beta$ -amiloide. Els inhibidors de colinesterases utilitzats per al tractament de la MA no afecten aquest procés, ja que la diana d'aquests fàrmacs es troba al centre catalític, el qual resta allunyat de la regió C-terminal (Liang, *et al*, 2009).

L'expressió de la BChE en presència de la variant-K disminueix, igual que l'acció catalítica, com també l'activitat antiagregant del  $\beta$ -amiloide (Lane i He, 2009). A més, el fet que aquest polimorfisme estigui situat a la regió C-terminal també pot comportar un canvi conformacional en aquesta regió i disminuir la capacitat d'atenuar la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide (Diamant, *et al*, 2006). Per aquests motius, la patologia relacionada amb la MA pot experimentar una acceleració en els malalts portadors de la variant-K, sobretot en presència d'altres factors com l'al·lel  $\epsilon 4$  de l'apoE, que acceleren la producció de  $\beta$ -amiloide i augmenten la vulnerabilitat a la toxicitat per  $\beta$ -amiloide (Lane, *et al*, 2008).

### 1.3.12 Inhibidors de colinesterases com a tractament en la malaltia d'Alzheimer

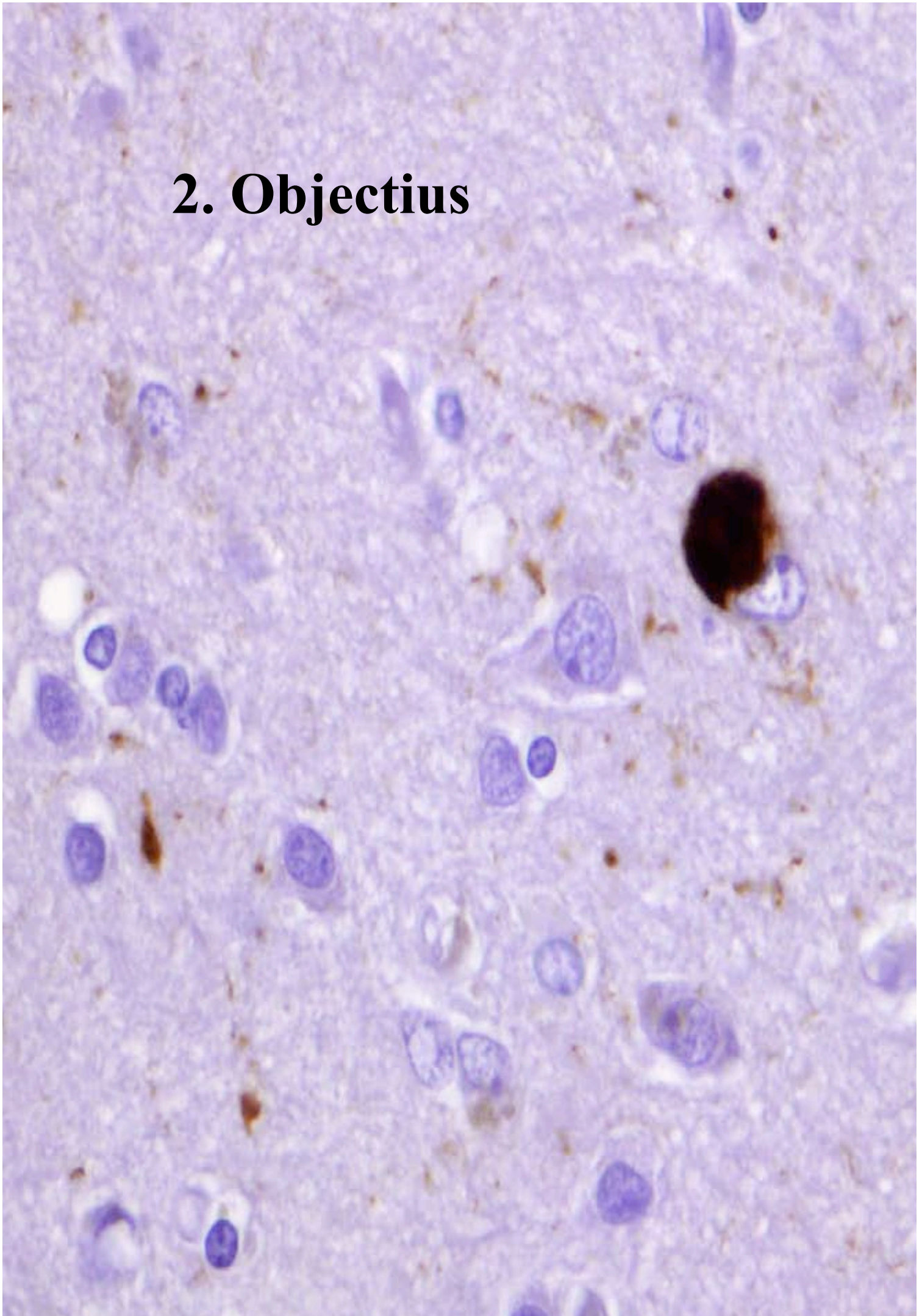
La BChE i l'AChE són els dos enzims que regulen l'acetilcolina al cervell humà (Mesulam, *et al*, 2002). A causa del marcat dèficit de la transmissió colinèrgica en la MA i la seva correlació amb dèficits de memòria i cognitius, aquests dos enzims són dianes en el tractament de la MA amb inhibidors de colinesterases (Lane, *et al*, 2006).

Primerament es van utilitzar inhibidors de l'AChE que prolongaven l'acció de l'acetilcolina a la sinapsi. Aquests fàrmacs només produïen efectes pal·liatius, però no alteraven el curs de la malaltia (Bailey i Lahiri, 2009).

Tal com ja s'ha mencionat anteriorment, al cervell humà AChE predomina mentre que BChE presenta nivells baixos. En canvi, al cervell de persones amb MA l'activitat enzimàtica està alterada, BChE augmenta i AChE disminueix (Perry, *et al*, 1978). Com que l'objectiu del tractament de la MA és augmentar l'acetilcolina, inhibir totes dues colinesterases en provoca un augment de l'acetilcolina. Aquest tractament serveix per reduir els símptomes i prolongar l'acció de l'acetilcolina a les sinapsis de les neurones colinèrgiques que encara són funcionals (Darreh-Shori, *et al*, 2009).

Recentment, inhibidors específics de la BChE també han estat desenvolupats i caracteritzats (Kamal, *et al*, 2006). Dos d'ells, *bisnorcymserine* i *phenethylnorcymserine*, augmenten els nivells d'acetilcolina i milloren la funció cognitiva en rates adultes (Greig, *et al*, 2005). Caldrà fer més estudis per identificar quin és el millor tractament.

## 2. Objectius





Els objectius d'aquest treball s'inscriuen dins de la línia d'investigació sobre mecanismes moleculars involucrats en la patogènesi de les sinucleïnopaties que es desenvolupa des de l'any 2003 al grup de recerca Patologia Molecular i Estructural del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Aquestes malalties, juntament amb la malaltia d'Alzheimer, es caracteritzen per una marcada afectació colinèrgica. En els últims anys, el coneixement sobre les colinesterases ha augmentat significativament. Per aquest motiu en aquest treball s'ha estudiat el paper de la butirilcolinesterasa en la demència amb cossos de Lewy pura, demència amb cossos de Lewy comú, malaltia de Parkinson i atròfia multisistèmica en comparació amb la malaltia d'Alzheimer i amb individus control. Concretament, s'ha analitzat el gen de la BChE i la seva expressió a nivell d'mRNA en cervells post mortem de les malalties anteriorment esmentades.

A causa del solapament dels símptomes entre la DCL i la MA, freqüentment la DCL es diagnostica de manera errònia, motiu pel qual no es pot aplicar el tractament adequat. Fins al moment, no s'ha descobert cap biomarcador genètic específic per al diagnòstic d'aquesta malaltia. Com a conseqüència, un altre objectiu, més ambiciós, era detectar un marcador específic per a les demències amb cossos de Lewy.

### **Objectius concrets**

1. Determinar els genotips corresponents a la variant-K de la BChE a totes les mostres de cervell diagnosticades neuropatològicament de DCLp, DCLc, MP, AMS, MA i controls, com també, a les mostres de sang procedents de MA, MP i AMS en comparació amb controls.
2. Estudiar els polimorfismes exònics a les mostres de cervell.
3. Caracteritzar el promotor de la BChE mitjançant seqüenciació.
4. Estudiar la freqüència genotípica dels polimorfismes descoberts a totes les mostres de cervell diagnosticades neuropatològicament de DCLp, DCLc, MP, AMS, MA i controls, així com, a les mostres de sang procedents de MA, MP i AMS en comparació amb controls.
5. Detectar un marcador específic per a les DCL mitjançant la combinació dels polimorfismes del promotor i la variant-K.

## 2. Objectius

---

6. Analitzar l'expressió de les quatre variants de *splicing* de BChE a nivell d'mRNA en diferents àrees cerebrals de DCLp, DCLc, MP, AMS, MA i mostres control per establir possibles diferències en el patró d'expressió de cada malaltia.
7. Determinar per immunohistoquímica la presència de BChE als cossos de Lewy. Concretament, s'han estudiat mostres de còrtex frontal i de nucli caudat a la DCLp, DCLc i a la MA.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing numerous blue-stained nuclei and several brown-stained structures. The brown-stained structures are irregular in shape and size, some appearing as small dots and others as larger, more complex shapes. The blue-stained nuclei are scattered throughout the field, with some showing prominent nucleoli. The overall appearance is that of a tissue section stained with hematoxylin and eosin (H&E), where the blue color highlights the nuclei and the brown color highlights specific cellular or extracellular components.

### **3. Materials i mètodes**





### **3.1 Mostres**

#### **3.1.1 Mostres de teixit**

El Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona i el Banc de Cervells de l'Hospital Universitari de Bellvitge ens van cedir mostres congelades de teixit de còrtex frontal, nucli caudat, cerebel i còrtex temporal.

En aquest estudi es van incloure mostres de vint-i-cinc cervells amb MA que mostraven un gran nombre de plaques senils i cabdells neurofibril·lars però no CL, de dotze cervells amb DCLp amb abundants CL però sense plaques senils ni cabdells neurofibril·lars, de vint-i-quatre cervells amb DCLc que presentaven tots tres tipus de lesions (plaques senils, cabdells neurofibril·lars i CL). A més, es van analitzar cinc cervells amb MP amb presència de patologia tipus Lewy únicament al tronc de l'encèfal, sis cervells amb AMS que presentaven inclusions citoplasmàtiques gials i vint-i-cinc cervells control sense lesions neuropatològiques significatives (vegeu l'annex).

A més, mostres congelades de còrtex frontal, còrtex temporal, còrtex parietal, nucli caudat, amígdala, nucli òptic basal de Meynert, substància negra i cerebel van ser obtingudes de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Finalment, còrtex frontal i parietal de fetus provinents del Banc de Teixits de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP) de Badalona també van ser incloses en l'estudi.

A banda, el Banc de Teixits de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP) de Badalona ens va cedir mostres congelades de teixits perifèrics, concretament de pell, pulmó, pròstata, ronyó, melsa, cor, fetge, múscul, mama, úter, testicle i sang.

#### **3.1.2 Mostres de sang per a l'estudi poblacional**

Es van obtenir mostres de sang perifèrica de pacients amb MA i individus control de la població corresponent a l'àrea sanitària del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP) de Badalona. Es van incloure 230 pacients amb MA (rang d'edat: 46 a 86 anys; mitjana 71,1 anys; desviació estàndard: 8,3; proporció de dones a homes: 1:1,6) i 160 individus control (rang d'edat: 45 a 91 anys; mitjana 68,8 anys; desviació estàndard: 8,9; proporció de dones a homes: 1: 1,5). Tots ells pertanyien a la població local i van ser diagnosticats al Servei de Neurologia del HUGTIP segons el criteri

### 3. Materials i mètodes

---

DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) i NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association).

#### 3.1.3 Mostres de sang de pacients amb malaltia de Parkinson i atròfia multisistèmica

Totes les mostres de sang perifèrica per a l'extracció de DNA van ser obtingudes a la Unitat de Trastorns del Moviment del Servei de Neurologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. La sang va ser extreta de vint-i-tres pacients amb MP (rang d'edat: 60 a 83 anys; mitjana d'edat: 70,7 anys; desviació estàndard: 8,7; proporció de dones a homes: 1:1,25) diagnosticats segons els criteris de *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*. Vint-i-un pacients amb AMS (rang d'edat: 52 a 76 anys; mitjana d'edat 59,2 anys; desviació típica: 5,9; proporció de dones a homes: 1:0,6) van ser diagnosticats segons els criteris establerts per Quinn també a la Unitat de Trastorns del Moviment del Servei de Neurologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Catorze d'aquestes mostres corresponien a pacients amb AMS de tipus parkinsonià (rang d'edat: 52 a 76 anys; mitjana d'edat 60 anys; desviació estàndard: 6,7; proporció de dones a homes: 1:0,1) i les set restants eren de tipus cerebel·lar (rang d'edat: 53 a 65 anys; mitjana d'edat 57,8 anys; desviació estàndard: 4,8; proporció de dones a homes: 1:5).

### 3.2 Extracció d'àcids nucleics i proteïnes

L'extracció d'RNA i de DNA a partir de teixit es va dur a terme mitjançant el TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich). El reactiu TRI-REAGENT® combina fenol i tiocianat de guanidina en una solució monofase que inhibeix de forma efectiva l'activitat RNasa. En canvi, les proteïnes totals es van obtenir a partir de teixit homogeneïtzat en un tampó específic per a aquesta finalitat.

#### 3.2.1 Extracció d'RNA

*Homogeneïtzació:* 100 mg de teixit van ser homogeneïtzats en 1 mL de TRI-REAGENT® en un tub Eppendorf d'1,5 mL mitjançant el Pellet Pestle® (Sigma-Aldrich).

*Separació de fases:* els homogeneïtzats es van incubar durant 5 minuts a temperatura ambient i posteriorment se'ls va afegir 100 µL de 1-bromo-3-cloropropà (Sigma-Aldrich). La mescla es va agitar per inversió durant 15 segons i es va incubar durant 15 minuts a temperatura ambient. Es va centrifugar a 12.000 g durant 10 minuts a 4 °C per separar la fase aquosa que contenia l'RNA de la interfase que contenia el DNA.

*Precipitació de l'RNA:* la fase aquosa va ser transferida a un tub Eppendorf nou. Les fases restants van ser guardades a 4 °C fins a la seva utilització. L'RNA va ser precipitat amb 500 µL d'isopropanol, es va incubar 10 minuts a temperatura ambient i centrifugar a 12.000 g durant 8 minuts (4 °C).

*Rentats de l'RNA:* després d'eliminar-ne el sobrenedant, el sediment (*pellet*) es va rentar amb 1 mL d'etanol al 75 % i centrifugar a 7.500 g durant 5 minuts (4 °C).

*Solubilització de l'RNA:* el sediment es va assecat a temperatura ambient durant 5 minuts i va ser resuspès en 60 µL d'aigua tractada amb DEPC (Invitrogen).

*Quantificació de l'RNA:* l'RNA es va quantificar mesurant-ne l'absorbància a 260 nm, la seva puresa es va comprovar mitjançant les ràtios a 260 i 280 nm i la seva integritat, a través d'una electroforesi en un gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi o SybrSafe (Invitrogen). Les mostres d'RNA es van guardar a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

### 3.2.2 Extracció de DNA

#### a- Extracció de DNA a partir de mostres de teixit

*Precipitació del DNA:* es van afegir 300 µL d'etanol absolut per cada mL de TRI-REAGENT® inicial al tub amb la interfase i la fase orgànica. Es va mesclar per inversió i es va incubar durant 2–3 minuts a temperatura ambient. El DNA va sedimentar per centrifugació a 2.000 g durant 5 minuts a 4 °C.

*Rentats del DNA:* el sobrenedant de fenol-etanol va ser eliminat i el sediment (que contenia el DNA) va ser rentat dues vegades amb 0,1 M de citrat de sodi en un 10 % d'etanol, es va utilitzar 1 mL per cada mil·lilitre de TRI-REAGENT® inicial. Cada rentat consistia a incubar el sediment durant 30 minuts a temperatura ambient, barrejant-lo periòdicament i a centrifugar a 2.000 g durant 5 minuts (4 °C). Posteriorment, es va afegir 1,5 mL d'etanol al 75 % i es va incubar 20 minuts a temperatura ambient, barrejant periòdicament; finalment, es va centrifugar 5 minuts a 2.000 g (4 °C).

### 3. Materials i mètodes

*Solubilització del DNA:* es va assecat el sediment a temperatura ambient i es va dissoldre en 300 µL NaOH 8 mM pipetejant repetidament. El material insoluble es va eliminar mitjançant centrifugació a 12.000 g durant 10 minuts. Es va recuperar el DNA dissolt en el sobrenedant i es va transferir a un tub nou. El DNA es va guardar a 4 °C.

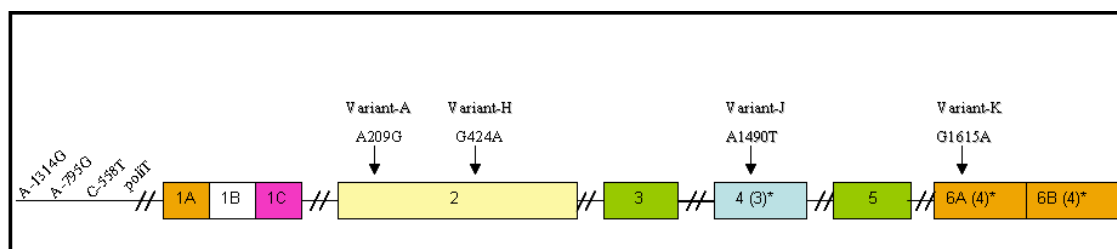
#### b- Extracció de DNA a partir de sang

Es van mesclar per inversió 200 µL de sang amb 300 µL de tampó de lisi (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, 0,5 M sacarosa i 1 % Triton X-100) i 200 µL de iodur de sodi (NaI, Bio101 inc.). Després d'una incubació de 5 minuts a temperatura ambient, es va aplicar la barreja a una columna que contenia filtres GF/c. Es va centrifugar a 12.500 rpm durant un minut a 4 °C. A continuació es van fer tres rentats amb 200 µL de tampó de rentat (70 % etanol, 100 mM NaCl i 10 mM Tris) i un quart, amb 20 µL aigua lliure de DNases i RNases (Sigma-Aldrich).

Per l'elució del DNA es van dur a terme dues centrifugacions més amb 80 µL d'aigua lliure de DNases i RNases (Sigma-Aldrich) cada una. El DNA es va guardar a 4 °C.

### 3.3 Genotipat

La detecció de polimorfismes addicionals a les variants genotípiques ja descrites en el gen de BChE es va fer mitjançant la seqüenciació del seu promotor. Els diferents polimorfismes van ser estudiats en DNA extret de cervell de 25 pacients amb MA, 12 DCLp, 24 DCLc, 5 MP, 6 AMS i en 25 controls, com també, a mostres de DNA de sang de 230 pacients amb MA, 23 amb MP, 21 amb AMS i 160 individus control. Les variants descrites i polimorfismes descoberts al promotor (figura 5) es van estudiar mitjançant PCR mutació específica, PCR i digestió enzimàtica o PCR i analitzador genètic.



**Figura 5. Representació esquemàtica del gen de BChE amb les variants i polimorfismes estudiats. \*** indica el canvi de numeració dels exons, entre parèntesis la numeració antiga.

### 3.3.1 PCR i seqüenciació

*PCR (polymerase chain reaction):* la seqüència promotora de BChE està constituïda per 2.293 parells de bases (pb). Per a la seva seqüenciació es van dissenyar tres reaccions de PCR diferents: en la PCR1 es va amplificar un producte de 838 pb (situat entre els nucleòtids -1.869 i -1031), en la PCR2 un producte de 837 pb (-1.152 i -315) i en la PCR3 un fragment de 688 pb (-457 i +231). Les condicions de la PCR van ser les següents: 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 200 µM de cada dNTP (Ecogen), 2 pmol de cada encebador (taula 1), 1 unitat d'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) i aproximadament 30 ng de DNA en un volum final de 15 µl. Els programes de PCR utilitzats constaven d'una desnaturalització inicial de 5 minuts a 95 °C, seguit per una desnaturalització de 40 segons a 95 °C; posteriorment un temps d'unió de 40 segons a una temperatura de 58 °C per la PCR1 i 60 °C per a les PCR 2 i 3, a continuació 90 segons a 72 °C, i una extensió final de 7 minuts a 72 °C. La PCR1 es va fer amb 30 cicles i les PCR 2 i 3, amb 35 cicles.

**Taula 1. Encebadors utilitzats per seqüenciar el promotor.**

	Seqüència (5' → 3')	Fragment a seqüenciar
BChEprom1UA	TGATAGGCTGACCGTATGCT_____	<u>1</u>
BChEprom2UA	TCTCTTGGAAGCAGTTGACAT_____	<u>2</u>
BChEprom2UB	AGATACATATCAGAGACATCCATT_____	<u>3</u>
BChEpromS6	CCATTATAGCTTCAATCTGTGC_____	<u>2</u>
BChEprom1L	ACCTCATCAGATGAGAAAGC_____	<u>1</u>
BChEprom2L	GAAGAGATCACTCTCATCCC_____	<u>3</u>

Purificació del producte de PCR: prèviament a la seqüenciació, cada producte de PCR va ser purificat amb l'ExoSap-IT kit (GE Healthcare) per eliminar-ne restes d'encebadors i dNTP de la reacció de PCR. A 5 µL de producte de PCR s'hi van afegir 2 µL d'ExoSap-IT, es van incubar a 37 °C durant 15 minuts perquè actuessin les exonucleasas i les fosfatases alcalines seguida per una inactivació a 80 °C durant 15 minuts.

Reacció de seqüenciació: la seqüenciació es va dur a terme en un seqüenciador ABI PRISM™ 3100 (Perkin Elmer). Les reaccions de seqüenciació tenien un volum final de 7,5 µL i contenien 3 µL de BigDye (BigDye™ Terminator vs 1,1 Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer), 10 pmol/µL d'encebador i 4 µL del producte de PCR purificat. El

### 3. Materials i mètodes

---

programa de seqüenciació començava amb una desnaturalització de 4 minuts a 95 °C, seguida de 30 cicles de 10 segons a 95 °C, 5 segons a la temperatura específica dels encebadors utilitzats en la reacció (vegeu l'apartat anterior) i 90 segons a 60 °C.

*Precipitació:* els productes de seqüenciació es van precipitar mitjançant 0,125 M EDTA i etanol, i es van resuspendre en 20 µL de formamida Hi Di (AbiPrism; Perkin Elmer) després de fer un rentat amb etanol del 75 % i d'assecar els productes de seqüenciació. Posteriorment, es van desnaturalitzar les mostres durant 2 minuts a 95 °C i es van posar immediatament en gel, on es van mantenir durant un mínim de 5 minuts. Finalment, les mostres s'han examinat a l'analitzador genètic ABI PRISM™ 3100 (Perkin Elmer). Els resultats van ser examinats amb el programa Sequence Scanner software versió 1,0 (Applied Biosystems).

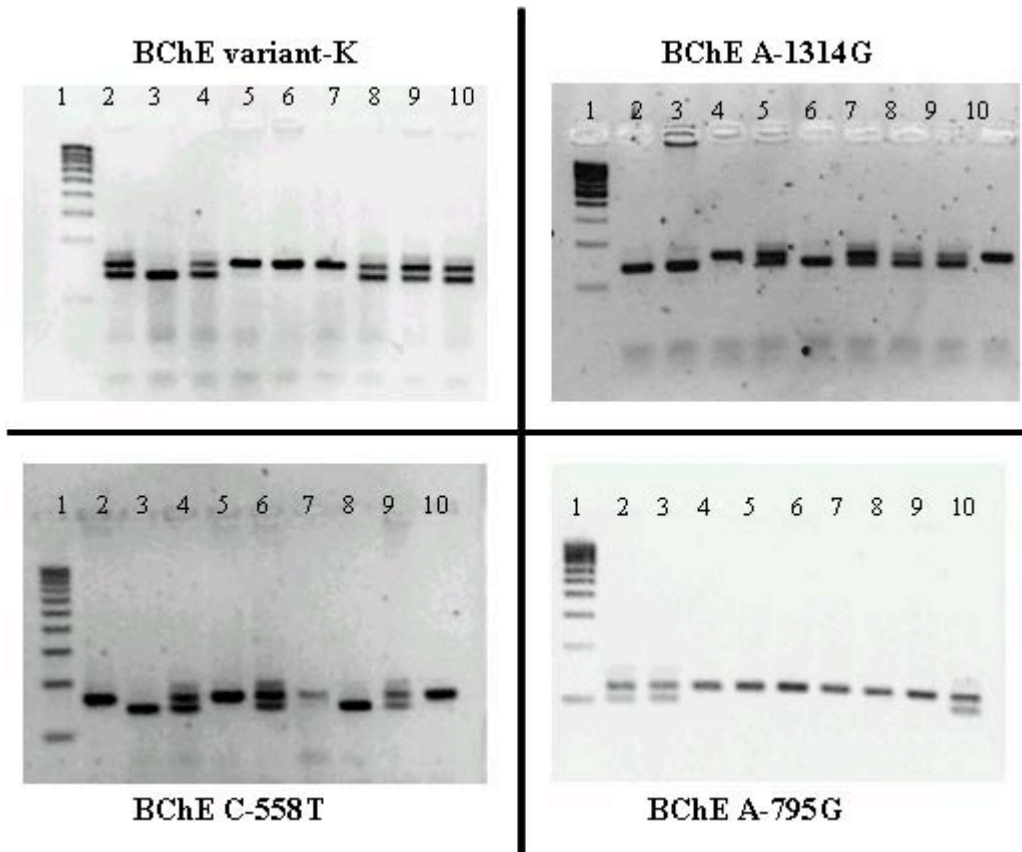
#### 3.3.2 Anàlisi de polimorfismes

##### a- PCR mutació específica

La PCR mutació específica consisteix en una PCR amb tres encebadors per a cada polimorfisme, un dels quals conté la mutació i és 20 parells de bases més llarg. Així s'obtenen fragments de diferents mides corresponents a tots dos al·lels, fàcilment distingibles per electroforesi. Aquest mètode s'ha utilitzat per genotipar els següents polimorfismes del promotor: A-1314G, A-795G, C-558T i la variant-K present a l'exó 6.

Les condicions de la PCR van ser les següents: 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 200 µM de cada dNTP (Ecogen), 2 pmol de cada encebador (4 pmol del BChE-1314G) (taula 2), 1 unitat d'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) i aproximadament 30 ng de DNA en un volum final de 15 µl. Els programes de PCR utilitzats s'especifiquen a la taula 3. Després de la reacció de PCR, els productes obtinguts van ser separats en gels d'agarosa d'alta resolució (Ecogen) al 3 % i fotografiats amb el sistema de captura d'imatge MiniBisPro (DNR) per determinar el genotip de cada mostra estudiada.

A la figura 6 s'observen exemples dels quatre polimorfismes analitzats mitjançant aquesta tècnica. Els dos possibles fragments de la variant-K estaven representats per fragments de 169 pb (al·lel W o al·lel salvatge) i 149 pb (al·lel K), el polimorfisme A-1314G per fragments de 153 pb (al·lel A) i 133 pb (al·lel G), el polimorfisme A-795G per fragments de 124 pb (al·lel A) i 104 pb (al·lel G) i el polimorfisme C-558T per fragments de 145 pb (al·lel T) i un 125 pb (al·lel C).



**Figura 6.** Anàlisi de la variant- K i dels polimorfismes del promotor A-1314G, A-795G i C-558T de la BChE en un gel d'agarosa d'alta resolució al 3%. Variant-K: carril 1: marcador de pes molecular, carrils 3, 5, 6 i 7: genotip WW, carrils 2, 4, 8, 9 i 10: genotip WK i carril 3 genotip KK. BChE A-1314G: carril 1: marcador de pes molecular, carrils 2, 3 i 6: genotip GG; carrils 4 i 10: genotip AA i carrils 5, 7, 8 i 9: genotip AG. BChE C-558T: carril 1: marcador de pes molecular, carrils 2, 5, 7 i 10: genotip TT, carrils 4, 6, 9: genotip TC i carrils 3 i 8: genotip CC. BChE A-795G: carril 1: marcador de pes molecular, carrils 4, 5, 6, 7, 8 i 9: genotip AA, carrils 2, 3 i 10: genotip AG.

### b- PCR i digestió

Les variants A i H de l'exó 2 i la variant J de l'exó 4 s'han estudiat digerint el producte de PCR amb l'enzim de restricció corresponent.

Les reaccions de PCR contenen 1,7 mM de  $MgCl_2$  (Ecogen), 200  $\mu M$  de cada dNTP (Ecogen), 2 pmol de cada encebador (taula 2), 1 unitat d'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) i aproximadament 30 ng de DNA en un volum final de 15  $\mu L$ . Els programes de PCR utilitzats s'especifiquen a la taula 3.

La variant-A de BChE es va estudiar a partir d'un producte de PCR de 174 pb. Després de la digestió enzimàtica amb MboI (Fermentas) durant la nit a 37 °C, l'al·lel A s'identificava per la presència de tres fragments de 104, 45 i 25 pb; i l'al·lel G (mutat), per la presència de dos fragments de 129 i 45 pb.

### 3. Materials i mètodes

Per avaluar la variant-H de BChE el fragment de PCR resultant de 210 pb s'ha digerit amb HphI (Fermentas) durant la nit a 37 °C. L'al·lel G es caracteritzava per dos fragments de 106 i 77 pb, i l'al·lel T (mutat) per dos fragments de 132 i 77 pb.

La variant-J es va analitzar a partir d'un producte de PCR de 177 pb després de la digestió amb RsaI (Fermentas) durant tres hores a 37 °C (Bartels, *et al*, 1992). El fragment sense digerir representava l'al·lel A i dos fragments de 117 i 60 pb s'obtenien en presència de l'al·lel T (mutat).

#### c- PCR i analitzador genètic

Entre les posicions -215 i -221/-222 del promotor de BChE hi ha 7 o 8 timines (T) seguides. Per analitzar el nombre de T que presenta cada mostra es va fer una PCR amb els encebadors BChE poliT-U i BChE poliT-L (Taula 2), el primer marcat amb el fluorocrom FAM per poder detectar els fragments obtinguts per fluorescència.

Les condicions de la PCR van ser les següents: 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 200 µM de cada dNTP (Ecogen), 2 pmol de cada encebador, 1 unitat d'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) i aproximadament 300 ng de DNA en un volum final de 15 µl. El programa de PCR utilitzat s'especifica a la taula 3.

2 µL del producte de PCR, d'una mida de 196 pb, juntament amb 10 µL formamida Hi-Di i 0,5 µL de ROX (Applied Biosystems) van ser aplicats a l'analitzador genètic ABI PRISM™ 3100 (Perkin Elmer). Els resultats van ser examinats amb el programa Peak Scanner software versió 1,0 (Applied Biosystems).

**Taula 2. Encebadors utilitzats per a la determinació dels polimorfismes.**

<b>BChE A-1314G</b>	Seqüència (5'→ 3')
BChE-1314G	TACACAAAAGGTACAGAATACAC
BChE-1314A	TTATGTAATAACAAGTTAGTTACACAAAAGGTACAGAATACAT
BChE-1314U	TCTTGAACTCCCAGACTGAAGCA
<b>BChE A-795G</b>	
BChE -795G	TAATCTTCTGTAAGTGATAGCC
BChE -795A	TTCTCAATGCAATATATTCTTAATCTTCTGTAAGTGATAGCT
BChE -795U	AAGTGCTCCACCTGCAAATATTA
<b>BChE C-558T</b>	
BChE -558L	TGTCCTGATATGTATCTCCTT
BChE -558TL	TATTCATTTTATTTTTCCTGTCTTGACCAGAAAATTTGTGGT
BChE -558CS	TCTTGACCAGAAAATTGTGGC
<b>BChE poliT</b>	



BChEpoliT-U	[FAM] TCAATAATAGCACTACTTTAGAATGA
BChEpoliT-L	AGGTAGTCTTCTAAGAATGAAGA
<b>BChE variant-A</b>	
BChE 2U1	ACCTCTTGGTAGACTTCGATTCAA
BChE 2L1	TAAAGATGATGTTAAAGTTTGAAAAG
<b>BChE variant-H</b>	
BChE 2U2	TCCAGGAGTGAGTGAGTTTG
BChE 2L2	AGTTTGGAGGATCGGTGTTC
<b>BChE variant-J</b>	
BChE ex3U	GGAATCCAAATGAGACTCAGA
BChE ex3L	CAGACACACCTGTCATTTC
<b>BChE variant-K</b>	
BChE ex4U	CTGTACTGTGTAGTTAGAGAAATTGGC
BChE ex4K	ATGGAATCCTGCTTTCCACTCCCATTCCGT
BChE ex4W	ATCATGTAATTGTTCCAGCGTAGGAATCCTGCTTTCCACTCCCATTCTCC

**Taula 3. Programes de PCR utilitzats per a l'anàlisi dels polimorfismes.**

	nombre de cicles	desnaturalització inicial	desnaturalització	unió	extensió
BChE A-1314G	34	95 °C, 5'	95 °C, 40"	62 °C, 30"	72 °C, 45"
BChE A-795G	36	95 °C, 5'	95 °C, 40"	57 °C, 40"	72 °C, 45"
BChE C-558T	36	95 °C, 5'	95 °C, 40"	57 °C, 40"	72 °C, 40"
BChE polyT	30	95 °C, 5'	95 °C, 40"	57 °C, 40"	72 °C, 50"
BChE variant-A	35	95 °C, 5'	95 °C, 30"	50 °C, 30"	72 °C, 45"
BChE variant-H	32	95 °C, 5'	95 °C, 30"	51 °C, 30"	72 °C, 45"
BChE variant-J	35	95 °C, 5'	95 °C, 40"	55 °C, 60"	72 °C, 1'30"
BChE variant-K	35	95 °C, 5'	95 °C, 40"	62 °C, 40"	72 °C, 50"

#### **d- Anàlisi estadística per analitzar els polimorfismes**

Les freqüències al·lèliques i genotípiques van ser calculades mitjançant el recompte d'al·lels i genotips.

Es van fer dos tipus d'anàlisi estadística segons la mida de la mostra. Primerament, es van calcular les distribucions al·lèliques i genotípiques de les mostres diagnosticades neuropatològicament, els grups de les quals estaven formats per un nombre reduït d'individus.

### 3. Materials i mètodes

---

La diferència entre la mitjana dels genotips va ser avaluada utilitzant el test t Student. Valors  $p < 0,05$  van ser considerats resultats estadísticament significatius.

El test  $\chi^2$  va ser utilitzat per fer l'anàlisi preliminar de la distribució al·lèlica i genotípica al grup de pacients amb diagnòstic clínic de MA en comparació amb el grup control. La desviació de les freqüències al·lèliques i genotípiques en equilibri Hardy-Weinberg va ser calculada emprant el test  $\chi^2$  observat–esperat estàndard. El risc de patir la MA segons els diferents al·lells o genotips va ser estimat mitjançant regressió logística amb correccions per sexe i edat de debut dels pacients amb MA i per sexe i edat dels controls.

Les combinacions genotípiques van ser obtingudes combinant tots els genotips possibles de cada polimorfisme del promotor de BChE juntament amb la variant-K. La distribució malaltia–específica va ser testada mitjançant una anàlisi de correspondència (CORRESPONDENCE, Version 1.1, Data Theory Scaling Group (DTSS), Faculty of Social and Behavioral Sciences, Leiden University, Holanda). Aquest test s'utilitza per analitzar les relacions de dependència i independència d'un conjunt de variables categòriques a partir d'una taula de contingència des d'un punt de vista gràfic. Les taules de contingència obtingudes van permetre avaluar la relació entre les diferents combinacions genotípiques i les malalties i revelar la proporció de cada combinació genotípica present a totes les malalties i als controls. Només van ser analitzades les combinacions genotípiques presents específicament a la DCLp i/o DCLc, així com les combinacions genotípiques específiques per a la MA.

L'anàlisi de correspondència en dues dimensions va ser utilitzada com a tècnica efectiva per analitzar taules de dos eixos, incloent-hi com a categories les combinacions genotípiques (files) i les diferents malalties (columnes).

Totes les anàlisis estadístiques van ser fetes amb el programa SPSS per a Windows (versió 17.01, SPSS Inc.).

#### **3.4 Determinació de l'expressió relativa per a PCR a temps real**

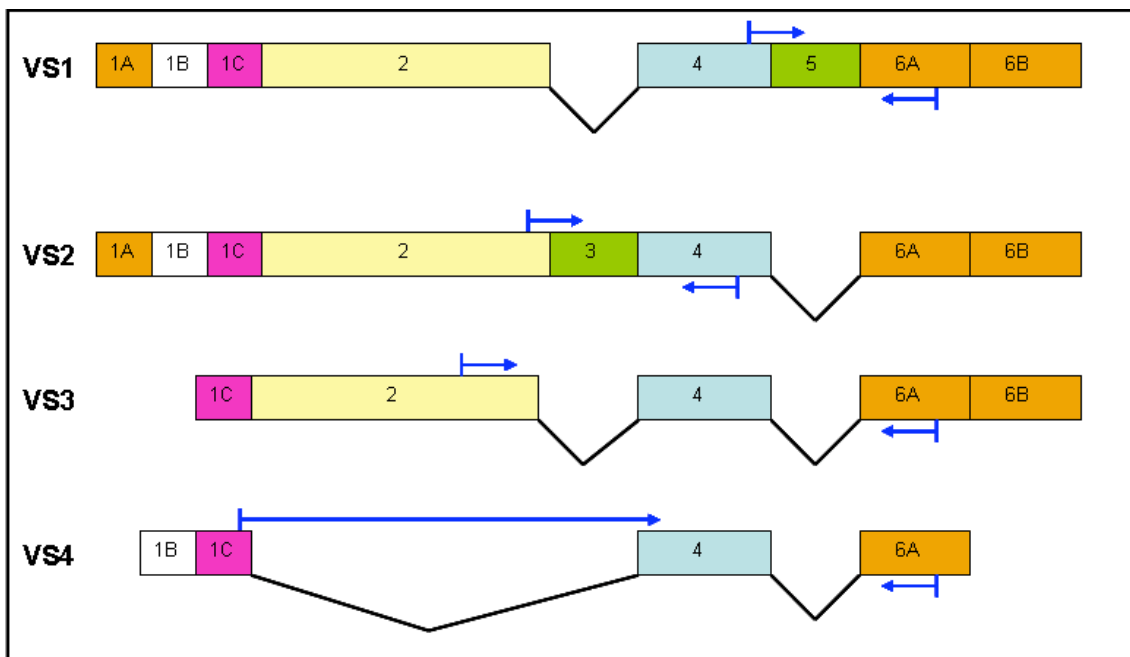
L'expressió relativa de les diferents variants de *splicing* (VS) de BChE es va fer per a PCR a temps real en dos passos: a partir del cDNA obtingut després de la reacció de retrotranscripció es realitzava la PCR a temps real.

### 3.4.1 Transcripció inversa

La síntesi de cDNA es va dur a terme mitjançant el kit “Ready-To-Go™ You- Prime First – Strand Beads” (GE Healthcare). Després de desnaturalitzar 2 µg d’RNA a 65 °C durant deu minuts, aquests es van incubar juntament amb 3 ng/µL d’encebadors aleatoris en un volum final de 32 µL al tub amb les “first-strand beads” a 37 °C durant una hora. El cDNA resultant es va guardar a –20 °C.

### 3.4.2 Disseny d’encebadors variant de *splicing* específics

El transcrit majoritari (VS3) de l’enzim BChE conté quatre exons (1, 2, 4 i 6), tal com s’observa a la figura 7. Les altres tres VS, fins al moment no estan descrites a la literatura biomèdica, però la seva seqüència es troba a la pàgina web: [www.genecards.org](http://www.genecards.org) i la seva estructura està representada a la figura 7.



**Figura 7.** Representació esquemàtica de les 4 VS de BChE. Les fletxes blaves indiquen la situació dels encebadors utilitzats.

Per estudiar la presència de les VS en les mostres de cervell es van dissenyar encebadors específics per a cada VS (taula 4) i es van estandaritzar els programes de PCR presents a la taula 5. Cada parella d’encebadors amplifica una única VS.

### 3. Materials i mètodes

**Taula 4. Encebadors utilitzats per amplificar les VS de BChE i  $\beta$ -actina.**

VS	Encebador	Seqüència 5'-3'	Mida fragment
VS1	BChE 4/5U08RNA	GAA ATG ACA GGC TGA GGA GT	259 pb
	BChE 6L08RNA	GCC TTG ATC TAA AGG AAA AT	
VS2	BChE 2/3U08RNA	GCA AAA TAT GGC TGT TCT TCC T	220 pb
	BChE 4L08RNA	TCG ACA TTG TTG AGC ACG TA	
VS3	BChE 2U	GAGTAGATCCATAGTGAAACGG	261 pb
	BChE 6LRNA	CAGCGATGGAATCCTGCTTT	
VS4	BChE 1C/4U09RNA	CAG AGA ATC GGG AAT CCA AAT	227 pb
	BChE6LRNA	CAGCGATGGAATCCTGCTTT	
$\beta$ .actina	$\beta$ .act2U	TCTACAATGAGCTGCGTGTG	229 pb
	$\beta$ .act3L	TAGATGGGCACAGTGTGGGT	

**Taula 5. Programes de PCR utilitzats per amplificar les VS de BChE.**

	nombre de cicles	desnaturalització inicial	desnaturalització	unió	extensió
BChE-VS1	40	95 °C, 5'	95 °C, 40"	58 °C, 40"	72 °C, 50"
BChE-VS2	40	95 °C, 5'	95 °C, 40"	60 °C, 40"	72 °C, 50"
BChE-VS3	38	95 °C, 5'	95 °C, 40"	55 °C, 40"	72 °C, 50"
BChE-VS4	38	95 °C, 5'	95 °C, 40"	58 °C, 40"	72 °C, 50"

#### 3.4.3 PCR a temps real

L'expressió relativa de les diferents VS de BChE es va determinar mitjançant el Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Austràlia).

L'anàlisi de l'expressió relativa de les diferents VS de BChE es va dur a terme emprant encebadors específics per a cada una d'elles. Per al disseny d'aquests encebadors es van tenir en compte els paràmetres següents:

1. Els productes de PCR no podien superar els 260 pb de longitud.
2. Els encebadors havien d'estar situats en diferents exons per evitar la possible co-amplificació amb DNA.
3. Almenys un encebador havia de ser VS específic.
4. La seqüència de l'encebador no podia contenir cap polimorfisme conegut.

La  $\beta$ -actina es va utilitzar com a gen de referència per normalitzar els resultats de la PCR a temps real (vegeu la seqüència dels encebadors emprats a la taula 4).

Amb la finalitat de minimitzar la formació de dímers pels encebadors, que sobretot podrien interferir als resultats en el cas d'amplificar transcrits minoritaris, es va utilitzar el kit per a PCR a temps real QuantiTect SYBR Green (QiaGen, Hilden, Germany). Les reaccions amb un volum final de 15  $\mu$ L contenien 7,5  $\mu$ L de 2x QuantiTect SYBR Green, 16 pmol de cada encebador i 1  $\mu$ L de cDNA. El programa de PCR emprat s'iniciava amb una desnaturalització de 15 minuts, seguida per 40 cicles de 30 segons a 95  $^{\circ}$ C, 30 segons d'anellament a 56  $^{\circ}$ C i una extensió estàndard a 72  $^{\circ}$ C, al final de la qual s'adquirien les dades de fluorescència. Totes les reaccions de PCR finalitzaven en una anàlisi de fusió ("melting") de 50 a 99  $^{\circ}$ C per determinar l'especificitat del producte (figura 8). A més, aquest s'anализava mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa per comprovar la mida del producte obtingut.

Mitjançant la PCR a temps real es van estudiar els nivells d'expressió relativa de VS3 i VS4. Aquests experiments es van dur a terme en cDNA de MA, DCLp, DCLc, MP, AMS i de controls provinents de: còrtex frontal, còrtex temporal, nucli caudat i cerebel.

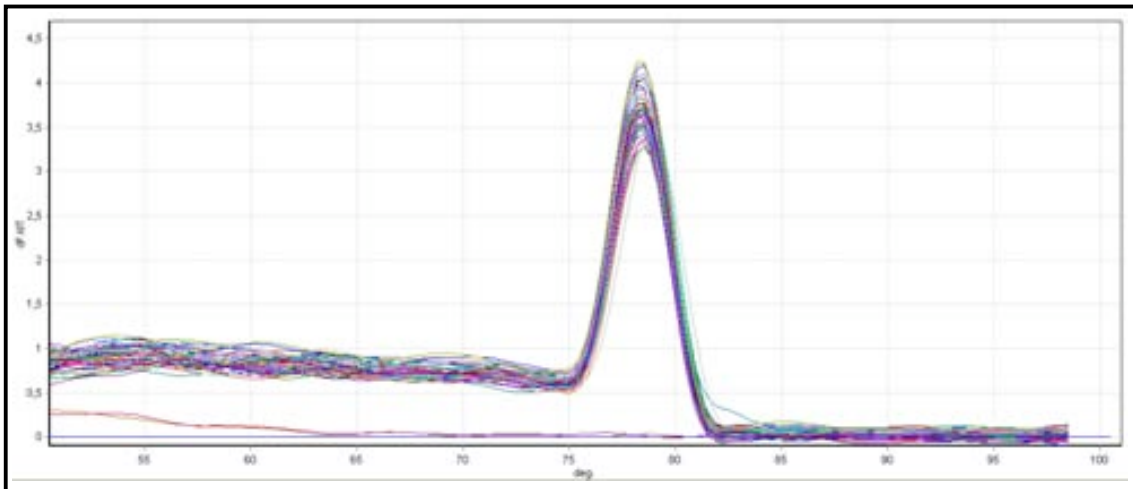


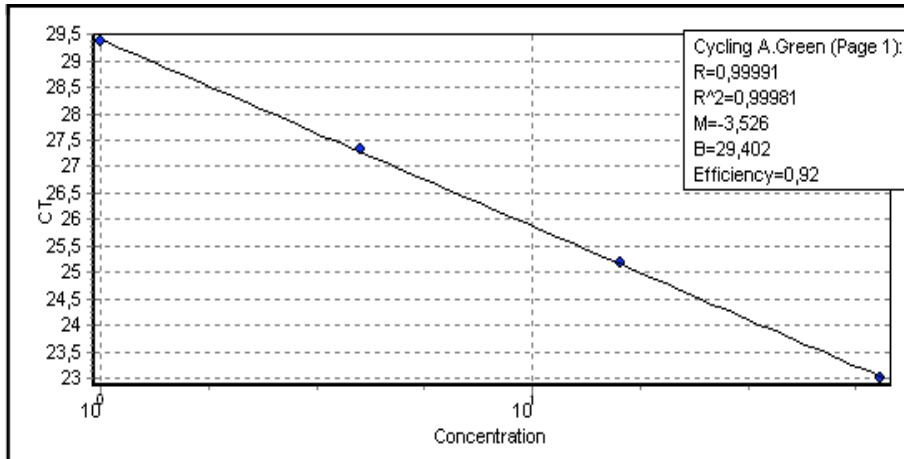
Figura 8. Exemple del gràfic l'anàlisi de fusió ("melting") de VS3 de BChE proporcionat pel software del Rotor Gene 6000.

#### 3.4.4 Mètode delta delta Ct

El mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , o també anomenat  $\Delta\Delta Ct$ , és utilitzat per calcular els canvis relatius dels nivells d'expressió gènica determinats per PCR a temps real, permet concretar les diferències en la concentració de les diferents mostres i està basat en la normalització amb un gen de referència. La validesa del mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  està condicionada a les eficiències d'amplificació aproximadament iguals del gen diana i del gen de referència (Livak i Schmittgen, 2001). Per aconseguir eficiències similars entre el gen d'interès i el

### 3. Materials i mètodes

gen de referència es van testar diferents parelles d'encebadors i diferents temperatures d'anellament. Com que les eficiències de la PCR poden variar a cada experiment (Schefe, *et al*, 2006), es van incloure corbes estàndard, obtingudes a partir de la dilució d'un mateix cDNA control a cada experiment i no tan sols a l'inicial. Només els experiments que presentaven eficiències similars juntament amb una corba estàndard correcta ( $R > 0,99$  i  $R^2 > 0,99$ ) van ser analitzats (figura 9).



**Figura 9.** Exemple de corba estàndard, on es veu reflectida l'eficiència de la PCR i els valors de  $R > 0,99$  i  $R^2 > 0,99$ .

El Rotor-Gene 6.000 proporciona el valor Ct de cada mostra, que és el cicle on la fluorescència de la mostra sobrepassa un valor determinat (*threshold*) per sobre de la fluorescència base (Bustin, *et al*, 2005). Utilitzant el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , les dades obtingudes són presentades com el canvi (*fold change*) en l'expressió gènica normalitzada a un gen de referència endogen i relatiu a un control (Livak i Schmittgen, 2001). A les mostres control,  $\Delta\Delta Ct$  és igual a 0 i  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  és 1; per tant, per definició, l'expressió del gen que s'ha d'estudiar es considera 1 per al grup control. Les mostres problema es van analitzar segons la malaltia, es va calcular la mitjana dels  $\Delta Ct$  de les mostres d'un mateix grup i, a partir d'aquest valor, el  $\Delta\Delta Ct$  i el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (figura 10). Aquest últim reflecteix el canvi de l'expressió respecte dels controls. Un resultat es considera estadísticament significatiu quan el canvi d'expressió és inferior a 0,5 (representa una disminució de l'expressió) o quan és superior a 1,5 (representa un augment de l'expressió). Per a considerar un resultat significatiu, el valor màxim de la desviació estàndard també ha de ser inferior a 0,5 en cas d'una disminució significativa de l'expressió o en cas d'un augment de l'expressió el valor mínim de la desviació estàndard també ha de ser superior a 1,5.

$$\Delta Ct = (Ct_{mostra} - Ct_{\beta-actina})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{malaltia} - \Delta Ct_{controls}$$

$$\text{Canvi exp.}^1 = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Figura 10. Fórmules utilitzades per calcular els canvis d'expressió.** <sup>1</sup> Canvi d'expressió per a cada malaltia.

### 3.4.5 Coamplificació de VS1 i VS2

A causa dels nivells baixos d'expressió de VS1 i VS2 en cervell no va ser possible quantificar aquestes dues VS per PCR a temps real. Per obtenir informació sobre canvis en la seva expressió relativa, es van coamplificar VS1 i VS2 en una mateixa reacció de PCR.

Les condicions de la PCR van ser les següents: 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 200 μM de cada dNTP (Ecogen), 2 pmol de cada encebador (BChE 2/3URNA, BChE 4/5URNA i BChE 4L08RNA, taula 4), 1 unitat d'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) i 1 μL de cDNA en un volum final de 15 μL. El programa de PCR constava d'una desnaturalització inicial de 5 minuts a 95 °C, seguit per 40 cicles d'una desnaturalització de 40 segons a 95 °C, un temps d'unió de 40 segons a 58 °C, i l'elongació de 50 segons a 72 °C.

Els productes de PCR van ser separats per electroforesi en un gel del 2 % d'agarosa estàndard (Ecogen) i fotografiat amb la càmera MiniBisPro (DNR). La intensitat de fluorescència dels fragments es va analitzar amb els programes Gel Capture (DNR) i Gel Quant (DNR). Amb aquest mètode és possible estimar els canvis relatius d'expressió de VS1 respecte a VS2 en les diferents malalties i àrees cerebrals.

### 3.4.6 Anàlisi estadística per analitzar l'expressió de les VS1 i VS2 de BChE

El test PostHoc Dunnet per a la comparació múltiple va ser utilitzada per determinar diferències significatives entre la mitjana d'un grup control i la mitjana d'altres grups mitjançant una anàlisi de variància. Aquest test s'utilitza quan l'ANOVA refusa la hipòtesi d'igualtat de les mitjanes. El seu objectiu és identificar grups amb mitjanes significativament diferents del grup de referència o control. Per a cada parella (un grup a analitzar i el control) el test de Dunnet calcula el valor estadístic  $t_{\text{observat}}$ . Aquest valor és comparat amb el valor crític de la taula de Dunnet. Aquest valor crític depèn de la

### 3. Materials i mètodes

---

mida del grup, el nombre de grups que es compararan amb els controls i el nivell de significació del test.

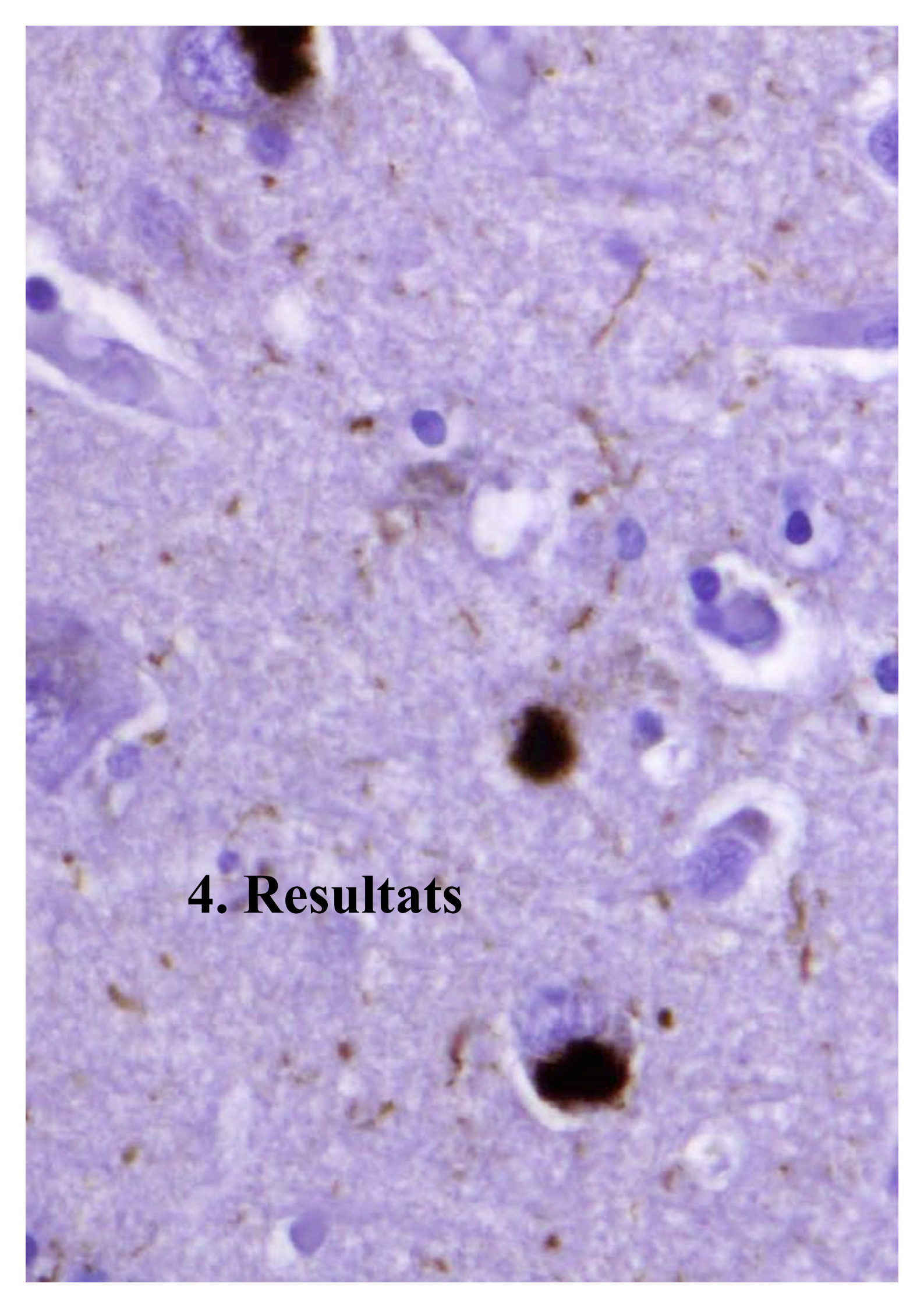
L'anàlisi estadística es va fer amb el programa SPSS per a Windows (versió 17.01, SPSS Inc.).

#### 3.5 Immunohistoquímica

Talls de 5 µm de gruix de blocs de parafina de còrtex frontal i nucli caudat de dues mostres amb DCLp, 4 DCLc i 3 MA (vegeu l'annex) van ser emprats per a l'estudi d'immunohistoquímica amb l'equip automàtic de Ventana per a immunohistoquímica (Ventana, Benchmark XT, Tucson, EUA). Després de desemascarar l'antigen amb àcid fòrmic 90 %, l'anticòs anti-BChE (Atlas Antibodies) va ser usat a la dilució 1:20 i l'anticòs monoclonal anti- $\alpha$ -sinucleïna (Novocastra) a la dilució 1:30. Els anticossos secundaris provenien del còctel d'anticossos secundaris del kit Ultraview Universal DAB (Ventana, Benchmark XT, Tucson, USA) optimitzat per l'aparell de Ventana Biomedical Systems i compatible amb anticossos primaris de conill i ratolí.

Per a la tinció doble es van utilitzar els anticossos primaris anti- $\alpha$ -sinucleïna (1:30, Novocastra) i anti-BChE (1:20, Atlas Antibodies). La detecció del primer anticòs es va fer amb el kit Ultraview Universal DAB (Ventana, Benchmark XT, Tucson, EUA) i l'equip automàtic de Ventana. El segon pas consistia en la incubació de l'altre anticòs primari seguit de la seva localització mitjançant el kit Ultraview Red (Ventana, Benchmark XT, Tucson, EUA), el qual utilitza un còctel d'anticossos marcats amb fosfatasa alcalina.



A microscopic image of tissue, likely a histological section, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue shows a dense population of cells with purple nuclei and pinkish cytoplasm/extracellular matrix. There are several prominent dark brown, circular or oval structures scattered throughout the field, which could be artifacts, pigments, or specific cellular inclusions. The overall appearance is that of a cellular, possibly glandular or epithelial, tissue.

## **4. Resultats**



## 4.1 Caracterització dels polimorfismes de BChE

### 4.1.1 Caracterització dels polimorfismes exònics de BChE en mostres post mortem

#### a- Variant-K de BChE (G1615A)

El polimorfisme de la BChE més estudiat és la variant-K i està situat a la posició 1.615 del gen on comporta el canvi d'una guanina per una adenina. En el present treball aquesta variant s'ha analitzat mitjançant PCR mutació específica a les mostres, enumerades a la llista de l'annex. Tot i que la hipòtesi inicial de trobar una acumulació de l'al·lel K a la MA es va corroborar (0,38 en la MA vs 0,13 en controls,  $p = 0,058$ ), l'acumulació va ser més pronunciada a les sinucleïnopaties (0,42 a la DCLp, 0,62 a la DCLc, 0,3 a la MP i 0,5 a l'AMS vs 0,13 als controls,  $p = 0,009$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,089$  i  $p = 0,013$ , respectivament).

A la taula 6 es pot observar la distribució dels tres genotips de la variant-K de BChE en les diferents malalties i els controls. L'anàlisi genotípica del polimorfisme va revelar que els dos genotips portadors de l'al·lel K, els genotips KW i KK, es trobaven sobrerrepresentats a ambdues DCL i a l'AMS en comparació amb els controls. A la DCLc i l'AMS la freqüència de tots tres genotips era del 33 % aproximadament. En canvi, a la MA la freqüència del genotip KK presentava un augment similar a l'obtingut a les DCL i a l'AMS, però la freqüència del genotip KW era similar als controls (taula 6).

**Taula 6. Distribució al·lèlica i genotípica de la variant-K de BChE.** <sup>1</sup>n: nombre de mostres; <sup>2</sup>p: valor p obtingut a partir del test t de Student entre cada malaltia i controls.

Malaltia	n <sup>1</sup>	Freqüències genotípiques			p <sup>2</sup>
		WW	KW	KK	
DCLp	12	0,58	0,17	0,25	0,145
DCLc	24	0,38	0,29	0,33	0,003
MP	5	0,40	0,60	0,00	<0,001
AMS	6	0,33	0,33	0,33	0,008
MA	25	0,62	0,08	0,30	0,047
C	25	0,87	0,09	0,04	

### **b- Variant–A de BChE (A209G)**

L'al·lel G de la variant–A va ser trobat amb freqüències molt baixes a les malalties amb cossos de Lewy i a la MA (0,08 a la DCLp, 0,04 DCLc, 0,2 a la MP i 0,04 a la MA vs 0 als controls;  $p = 0,34$ ,  $p = 0,917$ ,  $p = 0,123$  i  $p = 0,897$ , respectivament). A l'AMS totes les mostres estudiades presentaven el genotip salvatge (AA). A més, cal remarcar que no es va detectar cap homozigot GG.

### **c- Variant–H de BChE (G424A) i variant–J de BChE (A1490T)**

Cap d'aquestes dues variants genètiques de BChE van ser detectades en les mostres incloses al present estudi.

#### **4.1.2 Caracterització dels polimorfismes del promotor de BChE**

L'anàlisi mutacional del promotor de la BChE va revelar la presència de quatre polimorfismes no descrits fins al moment. Tres d'ells eren substitucions d'un únic nucleòtid: el canvi d'una A per una G a la posició –1314 (figura 11), el canvi d'una A per una G a la posició –795 (figura 11) i el canvi d'una C per una T a la posició –558 (figura 11).

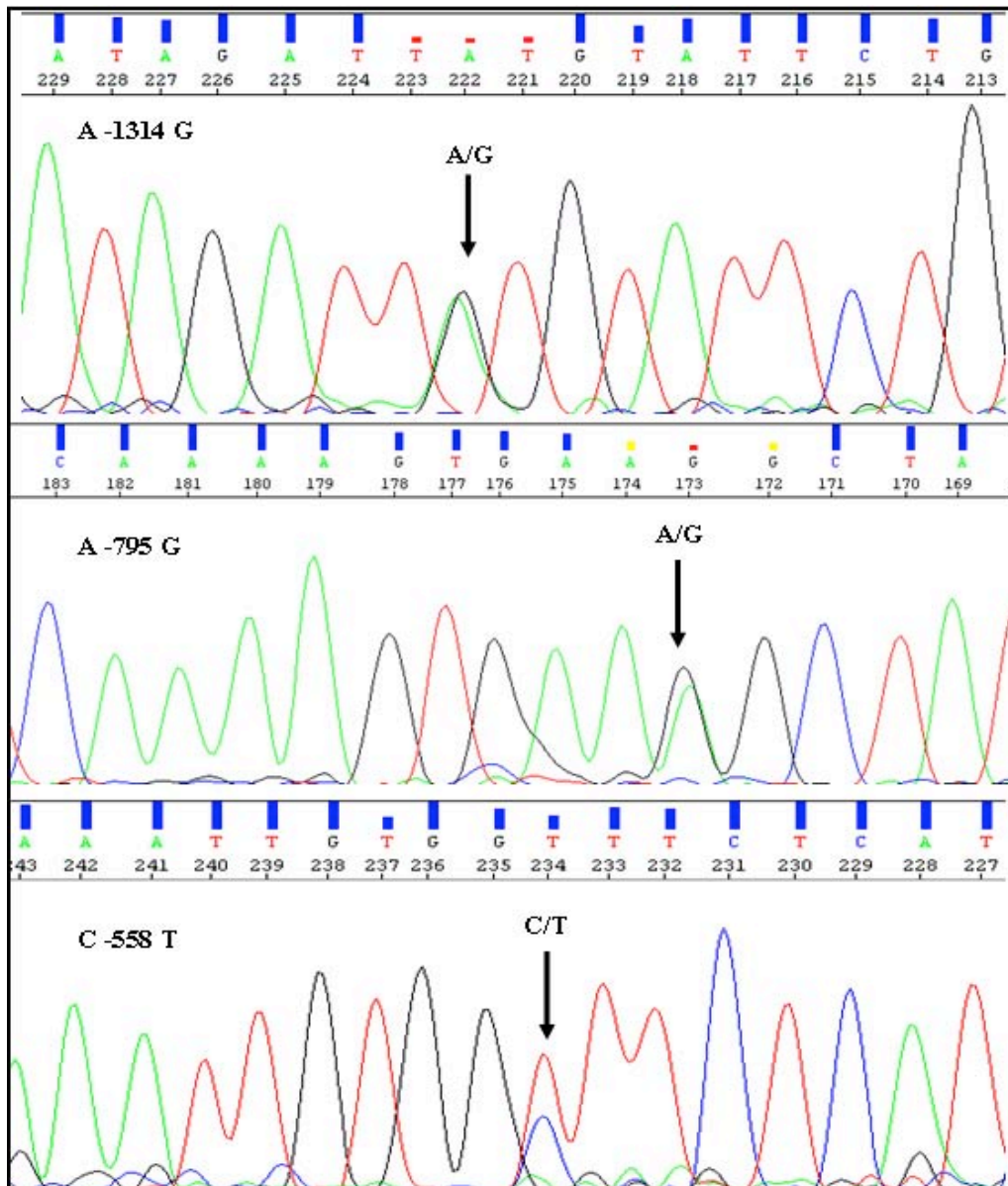
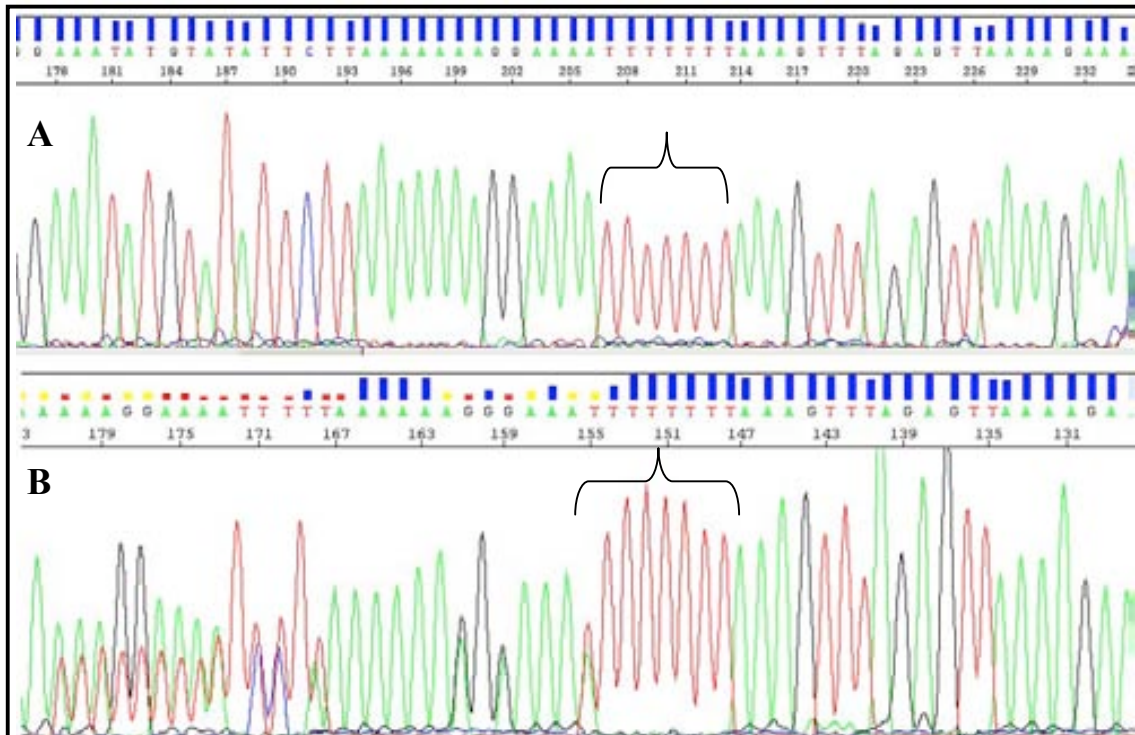


Figura 11. Detecció dels polimorfismes (A) A -1314 G, (B) A -795 G i (C) C -558 T per seqüenciació. La fletxa indica la situació de cada polimorfisme.

El quart polimorfisme corresponia a una seqüència poliT de longitud variable entre les posicions -221/-222 i -215. Es van identificar dos al·lels diferents, un de constituït per set timines seguides (figura 12A) i l'altre per vuit (figura 12B). A més, es va observar que l'al·lel 8T de la poliT del promotor de BChE segregava conjuntament amb l'al·lel K de la variant-K de BChE situada a l'exó 4. La cosegregació també ha estat descrita per altres variants de la BChE.



**Figura 12. Polimorfisme poli T. A- Mostra homocigota (7T seguides); B- Mostra heterocigota (7T / 8T) per aquest polimorfisme.** El fragment va ser seqüenciat amb un encebador revers, o *L*, i per aquest motiu s'observa un solapament de la seqüència a l'esquerra (*up-stream*) del polimorfisme.

Per determinar si algun dels polimorfismes trobats presentaven una associació específica amb les sinucleïnopaties o la MA es van determinar les seves freqüències al·lèliques i genotípiques a les mostres de cervell de DCLp, DCLc, MP, AMS, MA i controls (annex). Posteriorment, es van analitzar mostres de sang obtingudes de pacients amb diagnòstic clínic de MA, MP, AMS i controls.

Inicialment, els polimorfismes van ser analitzats independentment i a continuació en conjunt, en forma de combinacions genotípiques.

### **a- Polimorfisme A-1314G**

L'al·lel A del polimorfisme A-1314G presentava certa sobrerepresentació principalment a l'AMS, la MP i la MA, però no estava acumulat a la DCLp i a la DCLc, en comparació amb els controls (0,58 a l'AMS, 0,6 a la MP, 0,59 a la MA, 0,37 a la DCLp, 0,5 a la DCLc vs 0,4 als controls;  $p = 0,323$ ,  $p = 0,287$ ,  $p = 0,418$ ,  $p = 0,781$ ,  $p = 0,566$ , respectivament).

Es va trobar una acumulació del genotip AA especialment important en el cas de la MA i la MP, on la seva freqüència era aproximadament tres vegades més alta que als

controls (0,38 en la MA, 0,40 en la MP vs 0,13 controls;  $p = 0,012$  i  $p = 0,02$ , respectivament). En canvi, la DCLp, la DCLc, l'AMS i els controls presentaven freqüències similars (0,16 a la DCLp, 0,21 a la DCLc, 0,17 AMS vs 0,13 als controls;  $p = 0,298$ ,  $p = 0,13$  i  $p = 0,335$ , respectivament).

### **b- Polimorfisme A-795G**

Un altre polimorfisme descobert al promotor de BChE és el situat a la posició -795 i es caracteritza pel canvi nucleotídic d'una A per una G. L'al·lel G es trobava a una freqüència molt baixa a tots els grups (0,08 a la DCLp, 0,17 a la DCLc, 0,1 a la MP, 0,08 a l'AMS, 0,14 a la MA vs 0,02 als controls;  $p = 0,449$ ,  $p = 0,087$ ,  $p = 0,223$  i  $p = 0,712$ ,  $p = 0,1$ , respectivament).

Encara que les freqüències dels genotips portadors de l'al·lel G era més alta a les sinucleïnopaties i a la MA que als controls (0,17 a la DCLp, 0,33 a la DCLc, 0,17 a l'AMS, 0,2 a la MP i 0,23 a la MA vs 0,04 als controls;  $p = 0,262$ ,  $p = 0,023$ ,  $p = 0,291$ ,  $p = 0,181$  i  $p = 0,105$ , respectivament), la seva acumulació significativa es va observar únicament a la DCLc.

### **c- Polimorfisme C-558T**

L'anàlisi del polimorfisme C-558T no va revelar diferències importants en les freqüències de l'al·lel C a la DCLp, a la DCLc, a l'AMS, a la MA i als controls (0,33 a la DCLp, 0,44 a la DCLc, 0,33 a l'AMS i 0,25 a la MA vs 0,33 als controls;  $p = 0,980$ ,  $p = 0,675$ ,  $p = 0,99$  i  $p = 0,782$ , respectivament), únicament es trobava augmentat a la MP (0,7 vs 0,33 als controls,  $p = 0,07$ ).

El genotip CC s'acumulava principalment a la MP (0,6 a la MP vs 0,27 als controls,  $p = 0,031$ ). En canvi, a la DCLp aquest genotip presentava una freqüència molt baixa en comparació amb la DCLc, l'AMS i els controls (0,08 a la DCLp vs 0,21 a la DCLc, 0,16 a l'AMS i 0,27 als controls,  $p = 0,029$ ,  $p = 0,438$  i  $p = 0,018$ , respectivament). A la MA, només una desena part de les mostres eren portadores del genotip CC (0,11 a la MA vs 0,27 als controls,  $p = 0,024$ ).

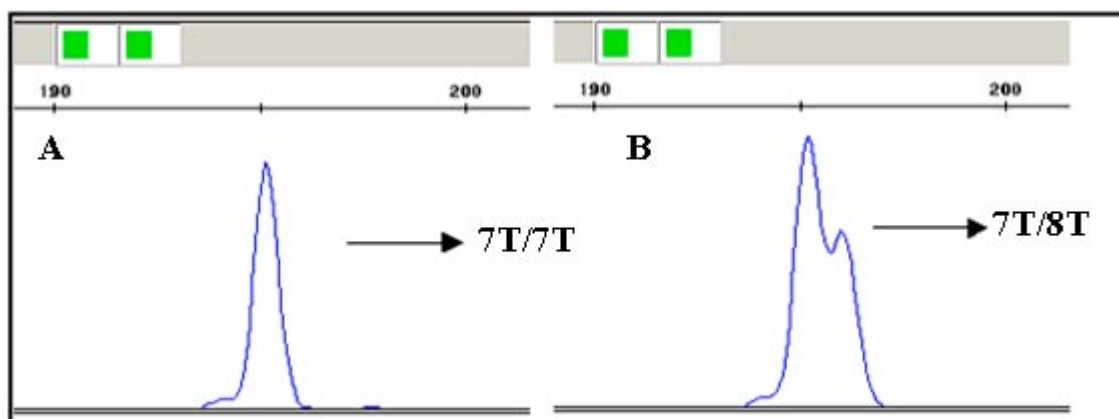
Al contrari, la freqüència del genotip CT es trobava augmentada pràcticament tres vegades a la DCLp en comparació amb els controls (0,5 a la DCLp vs 0,18 als controls,  $p = 0,022$ ), i més de dues vegades en la DCLc (0,45 a la DCLc vs 0,18 als controls,  $p = 0,05$ ). A la MA, la MP, l'AMS i als controls no es van detectar diferències de les

## 4. Resultats

freqüències del genotip CT del polimorfisme C-558T (0,27 a la MA, 0,2 a la MP i 0,33 a l'AMS vs 0,18 als controls;  $p = 0,28$ ,  $p = 0,81$  i  $p = 0,091$ , respectivament).

### d- Polimorfisme poliT

El quart polimorfisme caracteritzat al promotor estava situat entre les posicions -221/-222 i la -215 i estava constituït per dos al·lels, un de 7T i l'altre de 8T. Aquest polimorfisme va ser estudiat a través de l'analitzador genètic i en cas d'homozigosi (7T/7T) s'obtenia un pic de 195 pb (figura 13A). En canvi, en cas d'heterozigosi (7T/8T) es detectaven dos pics, un de 195 pb corresponent a l'al·lel 7T i un altre de 196 pb corresponent a l'al·lel 8T (figura 13B).



**Figura 13. Anàlisi de la poliT a les mostres a través de l'analitzador genètic. A:** Imatge corresponent a una mostra homozigota. **B:** Imatge corresponent a una mostra heterozigota.

Les freqüències de l'al·lel 8T eren molt baixes en tots els grups analitzats: 0,08 a la DCLp, 0,15 a la DCLc, 0,1 a la MP, 0,08 a l'AMS, 0,11 a la MA vs 0,04 als controls ( $p = 0,653$ ,  $p = 0,132$ ,  $p = 0,439$ ,  $p = 0,688$ ,  $p = 0,511$ , respectivament).

Les freqüències dels genotips portadors de l'al·lel 8T (7T/8T i 8T/8T) eren aproximadament dues vegades superiors a les sinucleïnopaties i a la MA en comparació amb els controls, tot i que aquestes diferències no eren significatives (0,25 a la DCLc, 0,17 a la DCLp, 0,2 a la MP, 0,17 a l'AMS i 0,19 a la MA vs 0,09 als controls;  $p = 0,245$ ,  $p = 0,591$ ,  $p = 0,438$ ,  $p = 0,537$  i  $p = 0,421$ , respectivament). Mostres homozigotes (8T/8T) només es van trobar a la DCLc, encara que en un percentatge baix (4,4%).



## **4.2 Combinacions genotípiques de BChE**

Un dels objectius d'aquest treball era detectar un marcador específic per a les DCL. A causa que l'anàlisi dels genotips de BChE no revelava diferències importants entre les malalties incloses en aquest treball, es va estudiar la distribució, la freqüència i l'especificitat de combinacions genotípiques resultants dels quatre polimorfismes del promotor per ordre d'aparició a la seqüència (A-1314G, A-795G, C-558T i poliT) i la variant-K. Com a resultat, es van descobrir combinacions genotípiques específiques per a les DCL. En l'anàlisi de correspondència realitzada a les mostres post mortem s'ha exclòs la MP i l'AMS a causa del nombre reduït de mostres disponibles.

### **4.2.1 Correspondència entre el diagnòstic clínic i neuropatològic**

Primerament, es va analitzar la correspondència entre el diagnòstic clínic i neuropatològic de les mostres obtingudes del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els pacients amb MA presentaven una coincidència del 100 % entre el diagnòstic clínic i el neuropatològic. En canvi, el 42 % dels pacients amb DCLp van rebre el diagnòstic clínic corresponent a DCL i al cas de la DCLc, només van rebre diagnòstic de DCL el 17 % dels casos. Del 83 % dels pacients de DCLc restants, el 74 % dels casos van ser diagnosticats com a MA i el 26 % com a altres tipus de demències. Aquest resultat corrobora la necessitat de marcadors diagnòstics addicionals per augmentar l'especificitat diagnòstica per a la DCL, sobretot quan a banda de la patologia relacionada amb l' $\alpha$ -sinucleïna també presenten canvis neuropatològics corresponents a la malaltia d'Alzheimer.

### **4.2.2 Combinacions genotípiques en mostres post mortem**

#### **a- Anàlisi de correspondència**

Les combinacions genotípiques dels quatre polimorfismes del promotor i la variant-K van ser analitzades mitjançant un anàlisi de correspondència, els resultats del qual es troben al gràfic de correspondència (figura 14) per una banda i, per l'altra, a la taula de correspondència (taula 7). En representar els resultats en un gràfic de correspondència com un diagrama de quatre quadrants es va observar una ubicació molt diferent per a les DCL, la MA i els controls (figura 14). El grup control es trobava situat al quadrant negatiu de la primera dimensió i al quadrant positiu de la segona. En canvi, la DCLc i la DCLp es situaven al quadrant negatiu d'ambdues dimensions i la MA al quadrant

#### 4. Resultats

positiu de la primera dimensió i al quadrant negatiu de la segona. Aquestes diferències representaven la distribució de combinacions genotípiques específiques en els diferents grups i indicaven que els tres grups es podien diferenciar genèticament per les combinacions genotípiques de BChE.

**Taula 7. Taula de correspondència obtinguda a partir de les mostres amb diagnòstic neuropatològic.**

Combinació genotípica	C	MA	DCLc	DCLp	Marge actiu
1 AAAACC77KK	0	2	0	0	2
2 AAAACC77KW	0	0	1	0	1
3 AAAACC77WW	0	0	0	1	1
4 AAAACC78KW	1	0	0	0	1
5 AAAATC77KK	0	0	0	1	1
6 AAAATC77WW	2	1	0	0	3
7 AAAATT77KK	0	1	0	0	1
8 AAAATT77WW	0	5	0	0	5
9 AAAGCC78KK	0	0	2	0	2
10 AAAGCC78KW	0	0	1	0	1
11 AAAGCC88KK	0	0	1	0	1
12 AAAGTT78KK	0	1	0	0	1
13 AGAACC77KK	1	0	0	0	1
14 AGAACC77WW	1	0	0	0	1
15 AGAATC77KK	0	2	2	0	4
16 AGAATC77KW	0	0	2	1	3
17 AGAATC77WW	5	0	2	2	9
18 AGAATT77KW	0	0	1	0	1
19 AGAATT77WW	5	5	3	1	14
20 AGAGTC77KW	0	0	1	0	1
21 AGAGTC78KK	0	2	3	1	6
22 AGAGTC78KW	0	2	0	0	2
23 GGAACC77WW	0	1	0	0	1
24 GGAATC77WW	2	0	1	0	3
25 GGAATT77KW	0	0	1	1	2
26 GGAATT77WW	5	3	3	3	14
27 GGAGCC78KW	1	0	0	0	1
28 GGAGTC78KK	0	0	0	1	1
29 GGAGTT77WW	0	1	0	0	1
<b>Marge actiu</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>85</b>

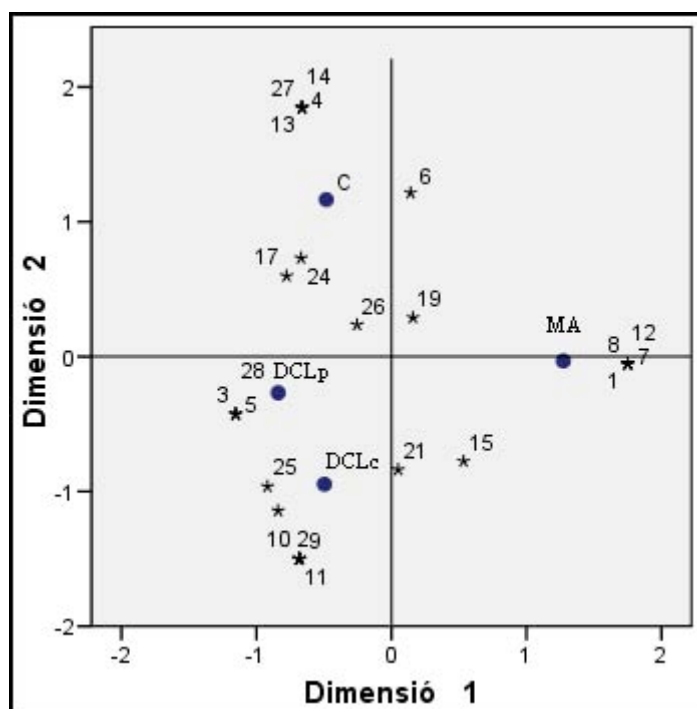


Figura 14. Gràfic de correspondència obtingut pels quatre grups. ● representa cada una de les malalties estudiades; \* representa les combinacions genotípiques trobades en les mostres post mortem.

### b- Combinacions genotípiques freqüents

Primerament, l'anàlisi general va revelar la presència de 29 combinacions genotípiques diferents en les 85 mostres estudiades (taula 7). La majoria d'elles (69 %) eren presents només en una o dues mostres i la seva freqüència era molt baixa (1 % i 2 %). Les combinacions genotípiques més freqüents eren la número 19 i la 26. La número 26, constituïda pels genotips homozigots salvatges de tots els polimorfismes, representava el 17,6 % de tota la mostra analitzada, i es trobava amb una freqüència similar en tots els grups (taula 7). La combinació número 19 també present en el 17,6% de les mostres, estava constituïda per genotips molt similars (taula 7). Per tant, el 35,2% de les mostres d'aquest estudi eren portadores de les dues combinacions genotípiques més freqüents. Una altra combinació genotípica freqüent era la número 17 i es va detectar a tots els grups excepte a la MA (taula 7).

Al contrari dels controls però també de la MA, les DCL, tant la DCLp com la DCLc, eren les malalties més heterogènies en relació amb la genètica de BChE (39 % d'heterogeneïtat en controls, 46 % en la MA vs 58 % en la DCLc i 75 % en la DCLp; taula 7). Cal destacar que la MA es caracteritzava per més combinacions genotípiques específiques (números 1, 7, 8, 12, 22, 23 i 29), però de prop per la DCLc (números 2, 9,

## 4. Resultats

10, 11, 18 i 20). En canvi, els controls i la DCLp només es distingien per 4 i 3 combinacions genotípiques, respectivament (taula 7).

### c- Combinacions genotípiques malaltia específiques

L'anàlisi dels resultats en dependència de la malaltia va revelar dues combinacions genotípiques específiques importants.

Primerament, la combinació genotípica AAAATT77WW es caracteritzava per una freqüència relativament alta del 19 % i per la seva especificitat per la MA (taula 8). La combinació genotípica AAAATT77KK també es trobava només a la MA, encara que la seva freqüència amb un 3,8 %, era molt més baixa.

**Taula 8. Distribució de les dues combinacions genotípiques específiques més freqüents en mostres de pacients diagnosticats neuropatològicament.**

Malaltia	n	AAAATT77WW	AAAGCC8+K+
DCLc	24	0	0,17
DCLp	12	0	0
MA	26	0,19	0
C	23	0	0

L'al·lel 8T de la poliT, descoberta al promotor de BChE, cosegrega amb l'al·lel K. Aquest fet permetia relacionar les combinacions genotípiques 9-11 (taula 7) i definir-les com una única combinació genotípica, AAAGCC8+K+. D'una banda, aquesta era específica per a la DCLc i per l'altra, la segona combinació malaltia específica més freqüent (16,7 %; taula 8).

Encara que a la DCLp es van detectar tres combinacions genotípiques específiques (números 3, 5 i 28; taula 7), les seves freqüències eren baixes a causa que només les presentaven un pacient en cada cas. Només quatre combinacions genotípiques específiques van ser trobades als controls (números 4, 13, 14 i 27; taula 7), però, igual que a la DCLp, només un pacient n'era portador.

### d- Combinació genotípica poliT-77 i variant K-KW

L'anàlisi de totes les combinacions genotípiques possibles a partir de només dos polimorfismes, va revelar la coocurrència específica dels genotips poliT77/KW a les

DCL. Mentre que aquesta combinació genotípica es trobava absent en pacients amb MA i en controls, la seva freqüència era del 25 % a la DCLc (sis portadors del genotip 77/KW de vint-i-quatre pacients analitzats) i del 17 % en la DCLp (dos portadors del genotip 77/KW de dotze pacients analitzats), la qual cosa constitueix una freqüència de 22 % per a ambdues DCL (taula 9).

**Taula 9. Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques de la variant-K/poliT de BChE en les diferents malalties i controls.**

Malaltia	n	77/WW	77/KW	8+/KW	77/KK	8+/KK
DCLc	24	0,45	0,25	0,0	0,15	0,1
DCLp	12	0,58	0,17	0,0	0,08	0,17
MA	26	0,47	0,0	0,1	0,26	0,16
C	23	0,87	0,0	0,09	0,04	0,0

### **4.2.3 Combinacions genotípiques en pacients amb malaltia d'Alzheimer, malaltia de Parkinson i atròfia multisistèmica**

#### **4.2.3.1 Anàlisi de les combinacions genotípiques en pacients amb malaltia d'Alzheimer**

Per confirmar les freqüències i l'especificitat de les combinacions genotípiques detectades en l'anàlisi de les mostres post mortem es va fer l'estudi a 223 pacients diagnosticats com a probable o possible MA i a 160 individus control.

Els pacients amb MA van ser diagnosticats entre els anys 1998 i 2002 a l'Hospital Germans Trias i Pujol. Tenint en compte que l'última revisió dels criteris per al diagnòstic clínic de les DCL es va establir l'any 2005 (McKeith, *et al*, 2005), era probable que entre el 20 i el 40 % d'aquests pacients amb MA estiguessin diagnosticats erròniament i en realitat patissin DCL.

**a- Anàlisi de correspondència**

En aquest cas, només es van analitzar dos grups d'individus, els pacients amb MA i els controls. Per aquest motiu no es van poder representar els resultats en un gràfic de correspondència, però sí en una taula de correspondència (taula 10).

**Taula 10. Taula de correspondència obtinguda per les mostres amb diagnòstic clínic.**

Combinació genotípica		C	MA	Marge actiu
1	AAAACC77KW	2	7	9
2	AAAACC77WW	3	2	5
3	AAAACC78KK	0	1	1
4	AAAATC77KW	0	4	4
5	AAAATC77WW	1	5	6
6	AAAATT77KK	0	1	1
7	AAAATT77WW	5	5	10
8	AAAGCC77WW	1	0	1
9	AAAGCC78KK	1	5	6
10	AAAGCC78KW	1	4	5
11	AAAGCC88KK	1	1	2
12	AAAGCC88KW	0	1	1
13	AAAGTC78KW	6	4	10
14	AGAACC77KK	1	0	1
15	AGAACC77KW	2	2	4
16	AGAACC77WW	1	0	1
17	AGAATC77KK	1	0	1
18	AGAATC77KW	23	24	47
19	AGAATC77WW	20	24	44
20	AGAATC78KW	3	0	3
21	AGAATT77KW	1	2	3
22	AGAATT77WW	25	32	57
23	AGAGTC77KW	1	0	1
24	AGAGTC77WW	1	0	1
25	AGAGTC78KW	7	19	26
26	AGAGTT77WW	0	1	1
27	AGAGTT78KW	0	1	1
28	GGAATT77KW	4	2	6
29	GGAATT77WW	49	76	125
<b>Marge actiu</b>		<b>160</b>	<b>223</b>	<b>383</b>

### b- Combinacions genotípiques freqüents

Els resultats de l'anàlisi de correspondència obtinguts a partir dels pacients amb MA i el grup control es van representar en una taula de contingència (taula 10). Tenint en compte que les combinacions genotípiques inclouen cinc polimorfismes, va ser sorprenent trobar només 29 combinacions genotípiques diferents (de les 243 combinacions genotípiques possibles) a la mostra formada per 383 individus (taula 10). El 61 % de les combinacions genotípiques trobades en aquests individus coincidien amb les combinacions genotípiques de les mostres post mortem.

Les cinc combinacions genotípiques més freqüents van ser: la combinació número 29 amb una freqüència del 32 % (34 % a la MA i 30 % als controls), la combinació 22 amb una freqüència del 15 % (14 % a la MA i 15 % als controls), la número 18 amb una freqüència del 12 % (11 % a la MA i 14 % als controls), la combinació 19 amb una freqüència de l'11 % (11 % a la MA i 12,5 % als controls) i, finalment, la combinació número 25 amb una freqüència del 7 % (8 % a la MA i 4 % als controls; taula 10).

Quatre d'aquestes combinacions genotípiques més freqüents també ho eren a la mostra post mortem (taula 11). Encara que la freqüència de GGAATT77WW era del doble en la mostra de pacients en comparació amb les mostres post mortem, tres d'aquestes combinacions mantenien les seves freqüències en ambdós grups de mostres (taula 11).

**Taula 11. Combinacions genotípiques més freqüents a les mostres amb diagnòstic clínic i a les mostres post mortem.**

Combinació genotípica	Núm. taula 10	Freqüència	Núm. taula 7	Freqüència
GGAATT77WW	29	32 %	26	16 %
AGAATT77WW	22	15 %	19	16 %
AGAATC77KW	18	12 %	16	3,5 %
AGAATC77WW	19	11 %	17	10 %
AGAGTC78KW	25	7 %	21	7 %

Aquests resultats corroboraven que els resultats inicials eren consistents i vigents per a la població analitzada.

### c- Combinacions genotípiques malaltia específiques

Les combinacions genotípiques prèviament detectades com a específiques per la DCL i per la MA en les mostres post mortem, es van trobar amb una freqüència més baixa als casos clínics. La freqüència de la combinació genotípica AAAATT77WW era només del 2,2 % en la MA i a més, la mateixa combinació genotípica també va ser detectada en un 3,1 % dels controls (taula 10).

Les combinacions genotípiques 9-12 de la taula 10 coincidien amb les combinacions genotípiques de les mostres post mortem i van ser definides igualment com la combinació genotípica comuna AAAGCC8+K+. Aquesta combinació es trobava amb una freqüència del 4,9 % al grup de MA i 1,8 % als controls (taula 12).

**Taula 12. Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques que havien estat establertes com a específiques a l'estudi de mostres post mortem en funció de la malaltia en pacients amb diagnòstic clínic.**

Malaltia	n	AAAATT77WW	AAAGCC8+K+
MA	223	0,02	0,05
C	160	0,03	0,02

Tenint en compte que els pacients amb MA van ser diagnosticats clínicament aproximadament vuit anys enrere, abans de l'establiment el 2005 de les noves bases per al diagnòstic de les DCL (McKeith, *et al*, 2005), les històries clíniques dels onze pacients portadors de la combinació genotípica AAAGCC8+K+ van ser revisades. Totes elles presentaven símptomes compatibles amb el diagnòstic clínic de probable DCL. Si, a més, es considera que entre 20-40 % dels pacients amb MA tenen un diagnòstic erroni i, en realitat pateixen DCL (Aarsland, *et al*, 2008), la freqüència de la combinació genotípica AAAGCC8+K+ augmentaria del 12 % fins al 24 %.

La concordança observada entre la presència de la combinació genotípica i el possible diagnòstic clínic indicava que la combinació genotípica AAAGCC8+K+ podria ser específica per a la DCL. Per tant, la combinació genotípica AAAGCC8+K+ podria tenir cert valor per al diagnòstic diferencial d'aquesta malaltia, almenys entre el 12 i el 24 % dels pacients.



### d- Combinació genotípica poliT-77 i variant K-KW

L'anàlisi de la coocurrència de la variant-K i el genotip de la poliT va revelar unes freqüències similars del genotip poliT-77/KW als dos grups, 19 % per a la MA i 20 % per al grup control (taula 13).

**Taula 13. Distribució i freqüències de les combinacions genotípiques variant-K/poliT de BChE en MA i controls.**

Malaltia	n	77/WW	77/KW	8+/KW	77/KK	8+/KK
MA	223	0,63	0,19	0,11	0,004	0,004
C	160	0,65	0,2	0,11	0,01	0,01

Tot i això, les històries clíniques dels 42 pacients portadors del genotip 77/KW van ser revisades i tots presentaven símptomes compatibles amb el diagnòstic de probable DCL. Això significava que el genotip 77/KW estaria absent en pacients amb MA, encara que estigués present en individus no afectats per una malaltia neurodegenerativa. Tenint en compte, a més, que entre el 20-40 % del grup de pacients amb MA són pacients amb DCL però amb un diagnòstic erroni (Aarsland, *et al*, 2008), la sensibilitat diagnòstica del genotip 77/KW augmentaria fins a més del 50 %. Per confirmar la sensibilitat i establir la seva especificitat amb exactitud, grups més amplis de pacients amb un diagnòstic de DCL haurien de ser analitzats.

#### 4.2.3.2 Anàlisi de les combinacions genotípiques en pacients amb malaltia de Parkinson i d'atròfia multisistèmica

Els polimorfismes presents al promotor de BChE, com també la variant-K van ser genotipats en divuit mostres de sang de malalts de Parkinson i dinou mostres de sang de pacients amb AMS procedents de la Unitat de Trastorns del Moviment del Servei de Neurologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. En pertànyer al grup de les sinucleïnopaties, mostres amb aquests diagnòstics es van incloure a l'estudi per determinar la possible especificitat diagnòstica de les combinacions genotípiques AAAGCC8+K+ i 77/KW.

**a- Anàlisi de correspondència**

Per ampliar la informació sobre la possible influència genètica de BChE, els quatre grups de pacients, MA, AMS, MP i controls, es van analitzar en conjunt. L'anàlisi dels quatre grups de malalties va permetre l'obtenció del gràfic de correspondència representat en quatre quadrants (figura 15) i de la taula de correspondència (taula 14). En aquest es mostra una clara diferenciació entre MA, AMS i controls i entre MP, AMS i controls (figura 15). El grup control estava situat al quadrant positiu d'ambdues dimensions i AMS al quadrant negatiu de la primera dimensió i al quadrant positiu de la segona. En canvi, MP s'emplaçava al quadrant negatiu d'ambdues dimensions i la MA al quadrant positiu de la primera dimensió i al quadrant negatiu de la segona (figura 15). Encara que es trobaven en diferents quadrants de la primera dimensió, les mostres corresponents a MP compartien el 92 % de les combinacions genotípiques trobades amb MA. Com ja ha estat mencionat anteriorment, entre el 20 i 40 % de la mostra amb MA podien ser pacients amb DCL diagnosticats erròniament. El fet que MP i DCL pertanyen al grup de les sinucleïnopaties, explicaria l'esmentat solapament en la distribució de les combinacions genotípiques de BChE.

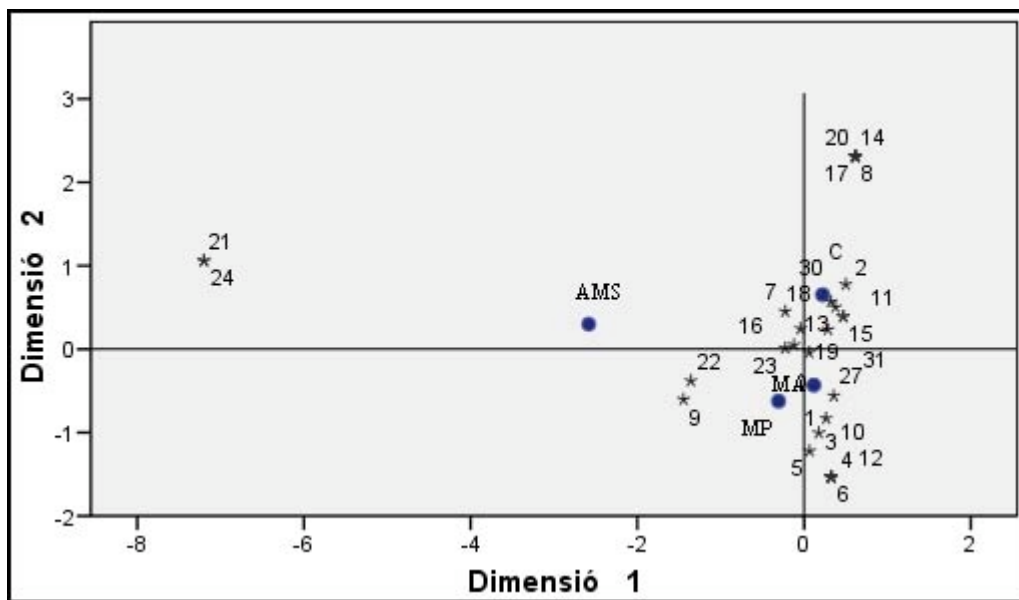


Figura 15. Gràfic de correspondència obtingut pels quatre grups. ● representa cada una de les malalties estudiades; \* representa les combinacions genotípiques trobades en les mostres amb diagnòstic clínic.

Taula 14. Taula de correspondència obtinguda per les mostres amb diagnòstic clínic.

Combinació genotípica		C	MA	AMS	MP	Marge actiu
1	AAAACC77KW	2	7	0	1	10
2	AAAACC77WW	3	2	0	0	5
3	AAAACC78KK	0	1	0	0	1
4	AAAATC77KW	0	4	0	0	4
5	AAAATC77WW	1	5	0	2	8
6	AAAATT77KK	0	1	0	0	1
7	AAAATT77WW	5	5	1	0	11
8	AAAGCC77WW	1	0	0	0	1
9	AAAGCC78KK	1	5	2	1	9
10	AAAGCC78KW	1	4	0	1	6
11	AAAGCC88KK	1	1	0	0	2
12	AAAGCC88KW	0	1	0	0	1
13	AAAGTC78KW	6	4	0	1	11
14	AGAACC77KK	1	0	0	0	1
15	AGAACC77KW	2	2	0	0	4
16	AGAACC77WW	1	0	0	1	2
17	AGAATC77KK	1	0	0	0	1
18	AGAATC77KW	23	24	3	3	53
19	AGAATC77WW	20	24	1	0	45
20	AGAATC78KW	3	0	0	0	3
21	AGAATT77KK	0	0	1	0	1
22	AGAATT77KW	1	2	1	1	5
23	AGAATT77WW	25	32	5	6	68
24	AGAATT78WW	0	0	1	0	1
25	AGAGTC77KW	1	0	0	0	1
26	AGAGTC77WW	1	0	0	0	1
27	AGAGTC78KW	7	19	0	1	27
28	AGAGTT77WW	0	1	0	0	1
29	AGAGTT78KW	0	1	0	0	1
30	GGAATT77KW	4	2	0	1	7
31	GGAATT77WW	49	76	6	4	135
<b>Marge actiu</b>		<b>160</b>	<b>223</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>427</b>

### **b- Combinacions genotípiques freqüents**

Les combinacions genotípiques obtingudes estan representades a la taula de contingència (taula 14). Concretament, es van trobar dotze combinacions genotípiques diferents per a la MP i nou per a l'AMS, corresponent a una heterogeneïtat del 52 % i 43 %, respectivament.

Encara que dos de les cinc combinacions genotípiques més freqüents analitzades en la taula 11, estaven pràcticament absents en la MP i l'AMS, la distribució no ha canviat substancialment respecte de l'anàlisi fet a les taules 10 i 12.

### **c- Combinacions genotípiques específiques**

Les combinacions genotípiques números 9 i 10 de la taula 14 corresponen a la combinació AAAGCC8+K+, identificada com a específica per a la DCL. Dos dels 21 pacients amb AMS (9,5 %) i dos dels 23 pacients amb MP (8,6 %) eren portadors d'aquesta combinació genotípica.

La MP presentava la combinació 77/KW en el 26 % dels casos, sent aquest percentatge amb un 19 % lleugerament inferior als pacients amb AMS. És interessant remarcar que aquesta freqüència era similar a la detectada als controls (20 %) i a la MA (19 %). Però tal com s'ha mencionat anteriorment, tots els pacients amb MA portadors d'aquesta combinació presentaven almenys un símptoma compatible amb DCL. Com a conseqüència, aquest percentatge augmentaria fins a un 40-80 % en els individus amb DCL, tenint en compte que entre el 20-40 % dels pacients amb DCL tenen un diagnòstic erroni. Encara que aquestes freqüències indiquen que la combinació 77/KW no es pot utilitzar com a marcador diagnòstic, no es pot descartar que juntament amb un dels símptomes específics de DCL permeti el diagnòstic diferencial. Per poder verificar aquesta hipòtesi, cal fer estudis detallats que correlacionin les dades clíniques amb les genètiques.

D'una banda, caldria verificar aquestes freqüències en grups de pacients i controls més amplis, així com en grups diagnosticats més recentment, i d'altra part, corroborar que la combinació genotípica AAAGCC8+K+ pot ser útil per al diagnòstic diferencial de DCL i MA, i no com a marcador diagnòstic independent.

### 4.3 Variants de *splicing* de BChE

#### 4.3.1 Variants de *splicing* de BChE a nivell de RNA

El gen de BChE codifica per a un transcrit majoritari, la variant de *splicing* 3 (VS3), i tres transcrits minoritaris: VS1, VS2 i VS4.

VS3 està format per quatre exons que inicialment van rebre una numeració exònica consecutiva de l'1 al 4 (número d'accés NCBI: NG\_009031.1; 31-01-2010). Com es pot observar a la figura 16, aquesta numeració ha variat amb el descobriment de les altres VS, i ara corresponen als exons 1, 2, 4 i 6. La seqüència codificant (CDS) comença a la posició 11.433 situada a l'exó 2 de la seqüència NCBI amb el número d'accés: NG\_009031.1 i acaba a la posició 69.084, situada a l'inici de l'exó 6.

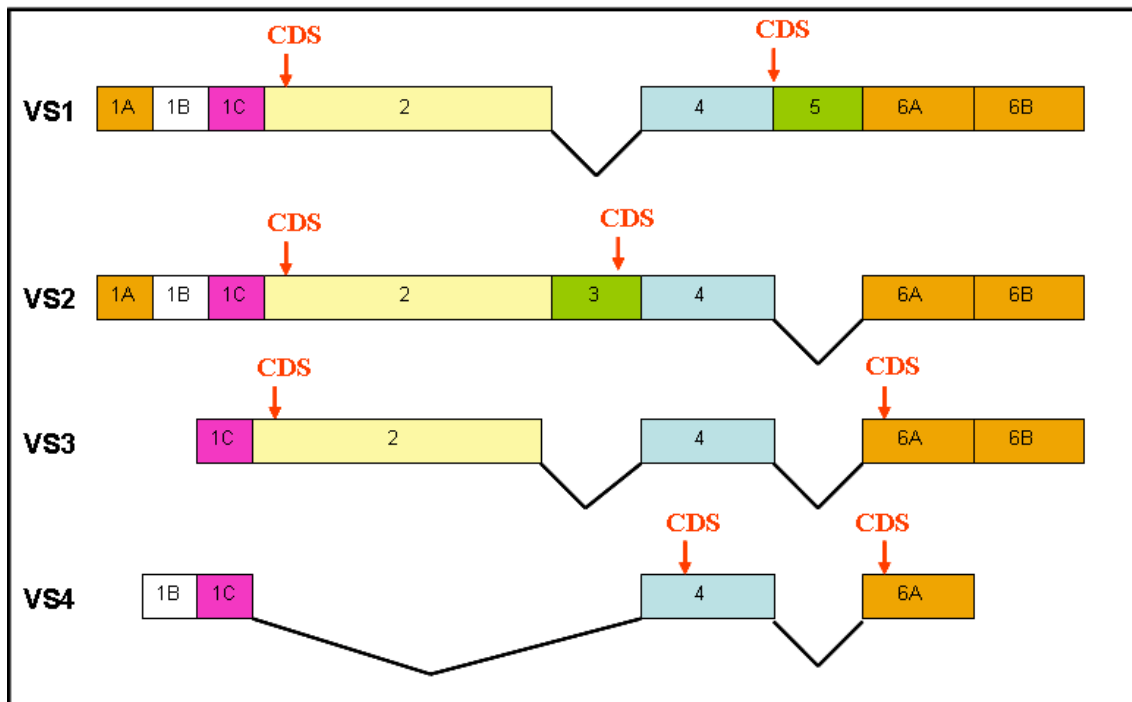


Figura 16. Estructura dels quatre RNA i les seves seqüències codificants (CDS) corresponents.

Els mRNA de VS1 i VS2 tenen una estructura similar a VS3, però inclouen l'exó 1 complet i, a més, un exó extra de 79 pb, que en el cas de VS1 és l'exó 5 i en el cas de VS2 és l'exó 3 (figura 16).

Finalment, VS4 es caracteritza per la deleció completa dels exons 2, 3 i 5. Com a conseqüència, conté part de l'exó 1, l'exó 4 complet i part del 6. La seva seqüència

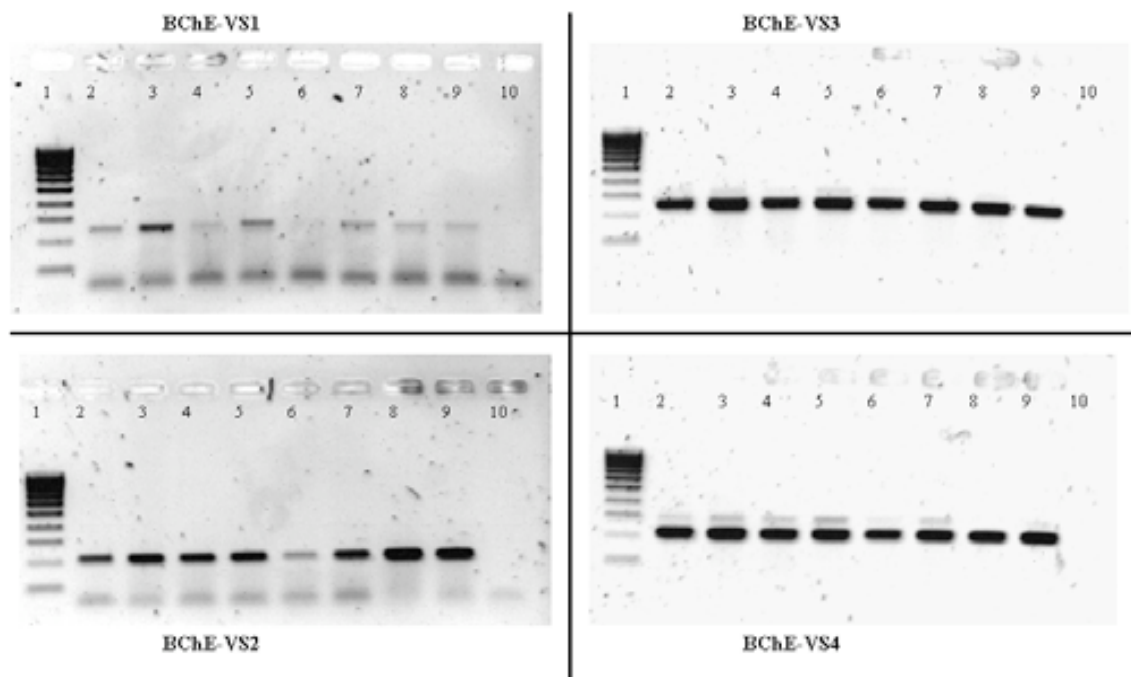
## 4. Resultats

codificant és la més curta, comença a l'exó 4 i, similar al transcrit majoritari, acaba a l'exó 6.

Per testar la presència de les quatre VS de BChE en diferents teixits, es van fer dos tipus de PCR: una pretenia coamplificar 3 VS i l'altra, s'amplificava cada una de les VS en experiments independents mitjançant encebadors específics per a cada variant de *splicing*.

Amb els encebadors BChE 2U i BChE 6L es va intentar amplificar alhora les tres VS, VS1, VS2 i VS3, que estaven compreses en aquesta seqüència. Els fragments esperats eren de 259 pb per a la VS3 i 338 pb si el fragment contenia l'exó 3 o el 5. Després de diversos experiments no es va aconseguir la seva coamplificació, fet que indicava que VS1 i VS2 podrien ser transcrits minoritaris.

D'altra banda, les quatre VS es van amplificar en PCR diferents, cadascuna amb els encebadors específics (figura 17). Tot i que la mida dels fragments obtinguts coincidia amb la longitud esperada per a cada fragment, la seva identitat va ser confirmada per seqüenciació.



**Figura 17.** Separació dels productes de PCR específics per a cada VS en gels d'agarosa. Carril 1: marcador de pes molecular; carrils 2 i 3: controls; carrils 4 i 5: DCLc; carrils 6 i 7: DCLp; carrils 8 i 9: MA i carril 10: blanc.

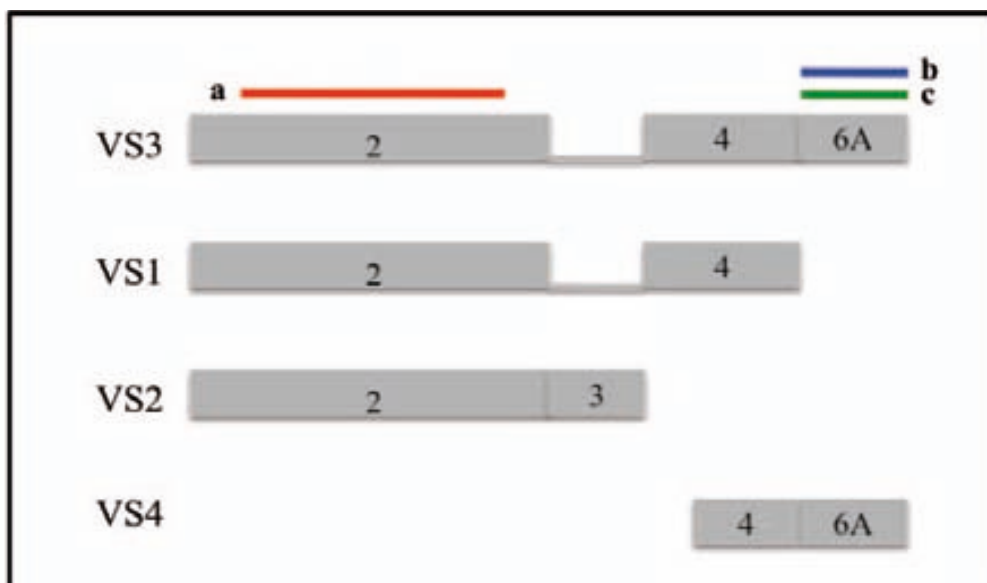
### 4.3.2 Variants de *splicing* de BChE a nivell proteic

Fins al moment no s'ha investigat si els mRNA corresponents als transcrits minoritaris es tradueixen a proteïnes. Amb la finalitat d'analitzar la possible seqüència aminoacídica de cada transcrit, es va utilitzar el programa "Translator" disponible a la pàgina web [www.justbio.com](http://www.justbio.com). Els resultats indiquen que els quatre transcrits donarien lloc a proteïnes diferents. A la figura 18 es representa l'estructura proteica primària potencial corresponent a cadascuna d'elles.

La proteïna madura corresponent al transcrit majoritari, VS3, estaria formada per 574 aminoàcids, VS1 per 534 aminoàcids, VS2 per 497 aminoàcids i, finalment, VS4 per 64 aminoàcids.

A la figura 18 s'assenyalen els dominis funcionals de la proteïna per sobre de la seqüència del transcrit majoritari. La regió corresponent a l'exó 2, situat a l'N-terminal, conté la gorja amb el seu lloc d'unió aniónic perifèric (PAS "*peripheral anionic binding site*"). La regió C-terminal de la proteïna conté dos dominis funcionals: el domini responsable de la tetramerització de la BChE i la zona encarregada de l'atenuació de la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide.

Les proteïnes corresponents als transcrits VS1 i VS2 contindrien el lloc actiu de la BChE, però a causa de la inclusió alternativa dels exons 3 o 5, en ambdues, s'introduiria un codó STOP prematur, produint proteïnes truncades amb regions C-terminal diferents al transcrit majoritari. Per aquest motiu, els mancaria el domini de tetramerització i la regió encarregada d'inhibir la formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide. A més, la inclusió de l'exó 3 a la VS2 té com a resultat una seqüència aminoacídica pròpia per a aquesta variant proteica de BChE. Finalment, VS4, la proteïna més petita, contindria els dominis que falten a les altres dues VS, però hi mancaria el lloc actiu de l'enzim.



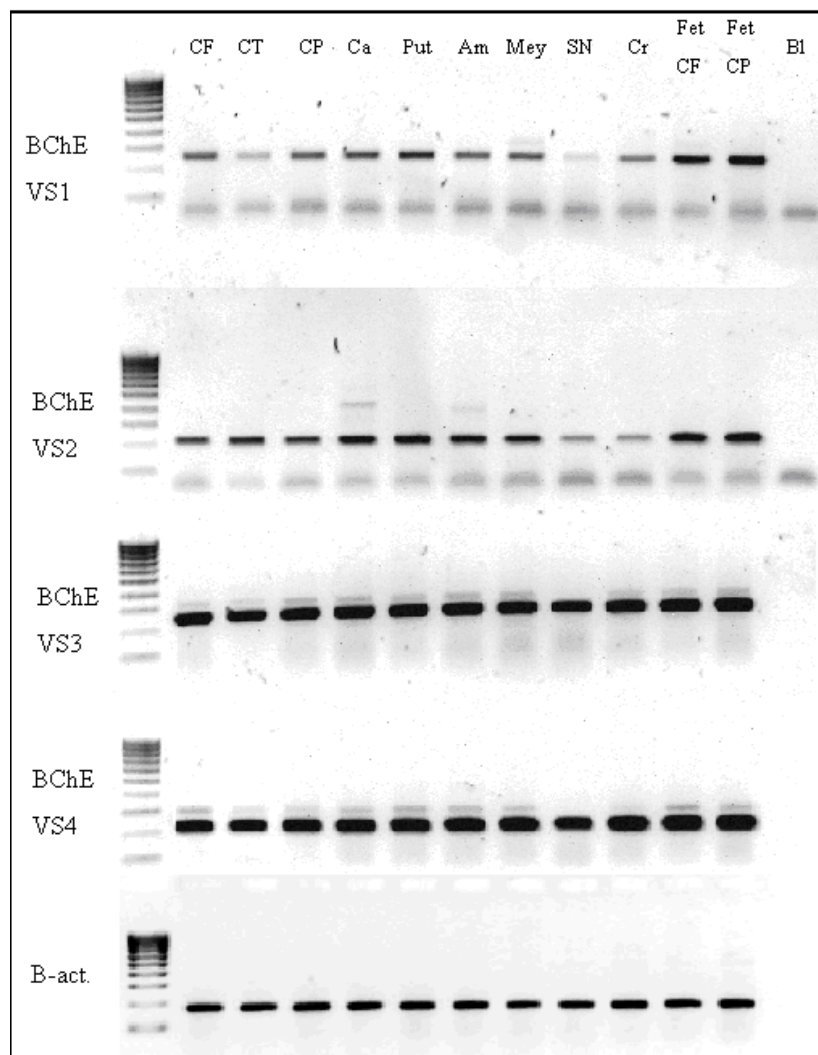
**Figura 18. Estructura proteica potencial de les VS de BChE.** Sobre la proteïna majoritària, VS3, s'indiquen els dominis funcionals de BChE. a- lloc actiu de la BChE (PAS), b- regió C-terminal atenua el procés de formació de fibril·les de  $\beta$ -amiloide i c- domini de tetramerització de la BChE. Els números corresponen a la numeració exònica recent.

### 4.4 Expressió de les variants de *splicing* de BChE

#### 4.4.1 Expressió de les variants de *splicing* de BChE en diferents àrees cerebrals

L'expressió relativa de les quatre VS de BChE es va comparar per PCR en nou àrees cerebrals procedents d'un cervell adult i en dues àrees de fetus (figura 19). Les variants de *splicing* VS3 i VS4 s'expressaven a nivells constants en totes les àrees cerebrals. En canvi, els nivells de VS1 i VS2 eren considerablement més baixos i la seva expressió era diferencial en les diferents àrees cerebrals. La menor expressió de VS2 es va trobar a la substància negra i al cerebel. L'expressió de la VS1 era encara més variable, amb nivells més elevats al fetus, baixos al còrtex temporal i molt baixos a la substància negra.





**Figura 19.** Expressió de totes les VS de BChE en diferents àrees cerebrals. S'ha inclòs la  $\beta$ -actina com a control de càrrega. CF: còrtex frontal; CT: còrtex temporal; CP: còrtex parietal; Ca: nucli caudat; Am: amígdala; Mey: nucli basal de Meynert; SN: substància negra; Cr: cerebel; Fet CF: còrtex frontal de fetus; Fet CP: còrtex parietal de fetus; Bl: blanc.

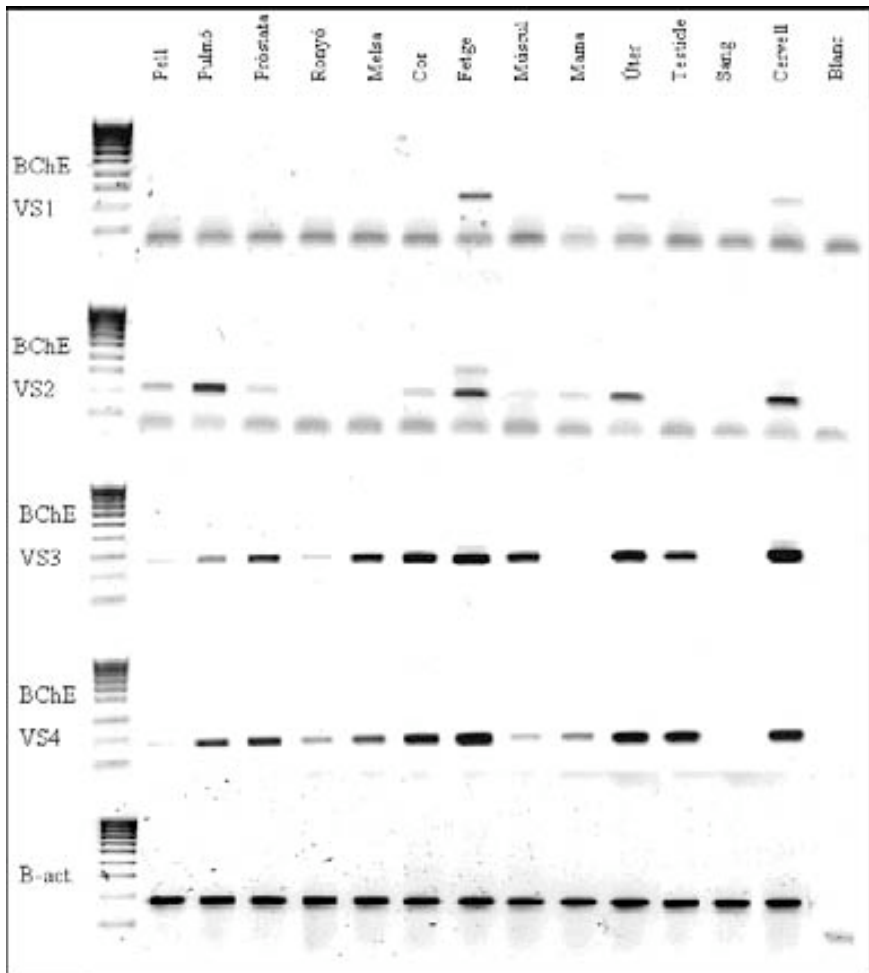
#### 4.4.2 Expressió de les variants de *splicing* de BChE en teixits no neuronals

A més, s'ha analitzat l'expressió de BChE, a diferents teixits no neuronals. Mitjançant PCR es va comparar l'expressió a la pell, el pulmó, la pròstata, el ronyó, la melsa, el cor, el fetge, el múscul, la mama, l'úter, el testicle, la sang i com al control de la PCR al còrtex frontal de cervell. Cada VS s'expressava en teixits determinats (figura 20).

La VS1 es trobava únicament al fetge i l'úter i en ambdós òrgans a nivells més alts que al cervell. La VS2 també s'expressava a aquests teixits, però a més es trobava al pulmó i a nivells baixos a la pell, la pròstata, el cor i la mama. L'estudi de les VS

## 4. Resultats

majoritàries, VS3 i VS4, va revelar que encara que VS3 no es detectava a la mama, ambdues VS s'expressaven en tots els teixits analitzats excepte a la sang, on no es va poder detectar l'expressió de cap de les VS. Els nivells d'expressió de VS3 eren baixos al pulmó i molt baixos al ronyó i la pell. Els nivells més baixos de VS4 van ser detectats a la mama, el ronyó, el múscul i la pell.



**Figura 20.** Expressió de totes les VS de BChE en diferents teixits no neuronals. S'hi ha inclòs la  $\beta$ -actina com a control de càrrega.

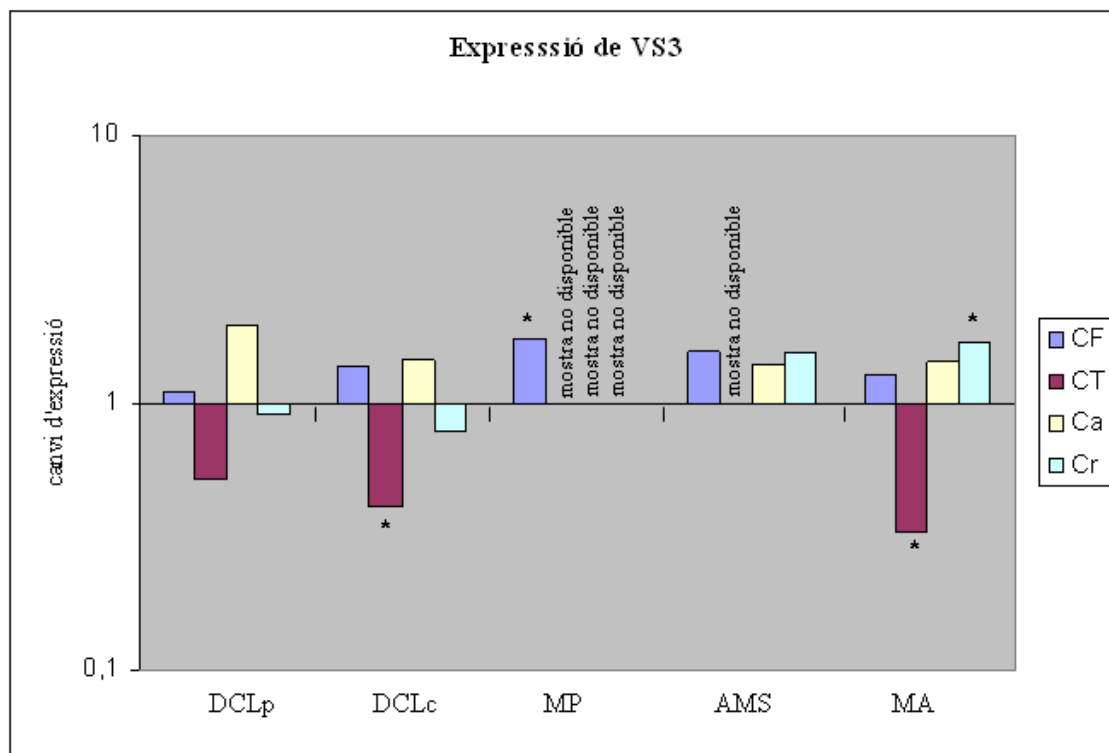
#### **4.5 Anàlisi de l'expressió relativa de les variants de *splicing* de BChE en diferents àrees cerebrals**

L'expressió relativa de dues variants de *splicing* de BChE, VS3 i VS4, s'ha determinat mitjançant PCR a temps real amb encebadors específics per a cada variant de *splicing* i el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El resultat d'aquest reflecteix el canvi d'expressió relativa normalitzat amb un gen de referència endogen en relació amb un grup control. Valors al voltant d'1 indiquen que no hi ha canvis d'expressió de l'mRNA analitzat en el grup a estudiar respecte el grup control. En canvi, valors inferiors a 0,5 representen una disminució significativa de l'expressió al grup d'estudi; i al contrari, valors superiors a 1,5 revelen un augment significatiu de l'expressió en aquest grup en comparació amb el grup control.

La marcada acumulació dels genotips WK i KK a les diferents malalties estudiades indicava que la BChE podria estar involucrada de manera específica en el seu desenvolupament. Tenint en compte que la variant-K de la BChE comporta la disminució del nombre de molècules de BChE circulants en sang, es va estudiar la seva expressió a nivell d'mRNA al còrtex frontal, còrtex temporal, nucli caudat i cerebel, tant de la VS majoritària, VS3, com de les minoritàries, VS1, VS2 i VS4.

##### **4.5.1 Expressió de VS3**

A la DCLp el transcrit majoritari de BChE no presentava cap canvi d'expressió estadísticament significatiu. Tot i això, s'observava certa disminució d'aquesta VS al còrtex temporal, així com, un augment d'expressió de VS3 al nucli caudat amb una elevada desviació estàndard (còrtex frontal: 1,10 (0,75–1,60); còrtex temporal: 0,52 (0,38–0,71); nucli caudat: 1,95 (0,96–3,98); cerebel: 0,91 (0,75–1,10); figura 21).



**Figura 21.** Expressió de VS3 de BChE en el còrtex frontal (CF), còrtex temporal (CT), nucli caudat (Ca) i cerebel (Cr) a totes les malalties estudiades. El canvi de l'expressió es representa en escala logarítmica. \*: resultat estadísticament significatiu ( $< 0,5$  o  $> 1,5$ )

Tal com es pot veure a la figura 21, a la DCLc l'expressió de VS3 estava significativament disminuïda al còrtex temporal (0,41 (0,35–0,48)). Al nucli caudat es va trobar una elevada desviació estàndard (1,44 (0,96–3,98)), similar a la també detectada a la mateixa àrea cerebral a les altres malalties estudiades. No es van detectar canvis significatius d'expressió al còrtex frontal ni al cerebel (1,38 (1,22–1,57) i 0,79 (0,63–1,00), respectivament; figura 21).

En el cas de la MP només va ser possible estudiar mostres de còrtex frontal per la manca de disponibilitat de mostra a les altres àrees cerebrals. A l'àrea estudiada es va trobar un augment significatiu de l'expressió de VS3 (1,73 (1,59–1,88), figura 21).

A l'AMS no es va trobar cap canvi significatiu de l'expressió de VS3, tot i que s'observava cert augment de l'expressió a totes les àrees analitzades (còrtex frontal 1,56 (1,37–1,78); nucli caudat 1,40 (0,68–2,84); i cerebel 1,54 (0,92–2,56), figura 21).

Finalment, VS3 presentava una disminució de l'expressió significativa al còrtex temporal dels individus amb MA i un augment, també significatiu, al cerebel (0,33 (0,26–0,43) i 1,66 (1,5–1,83), respectivament; figura 21). Al nucli caudat s'observava una tendència a un augment de l'expressió, però presentava una desviació estàndard

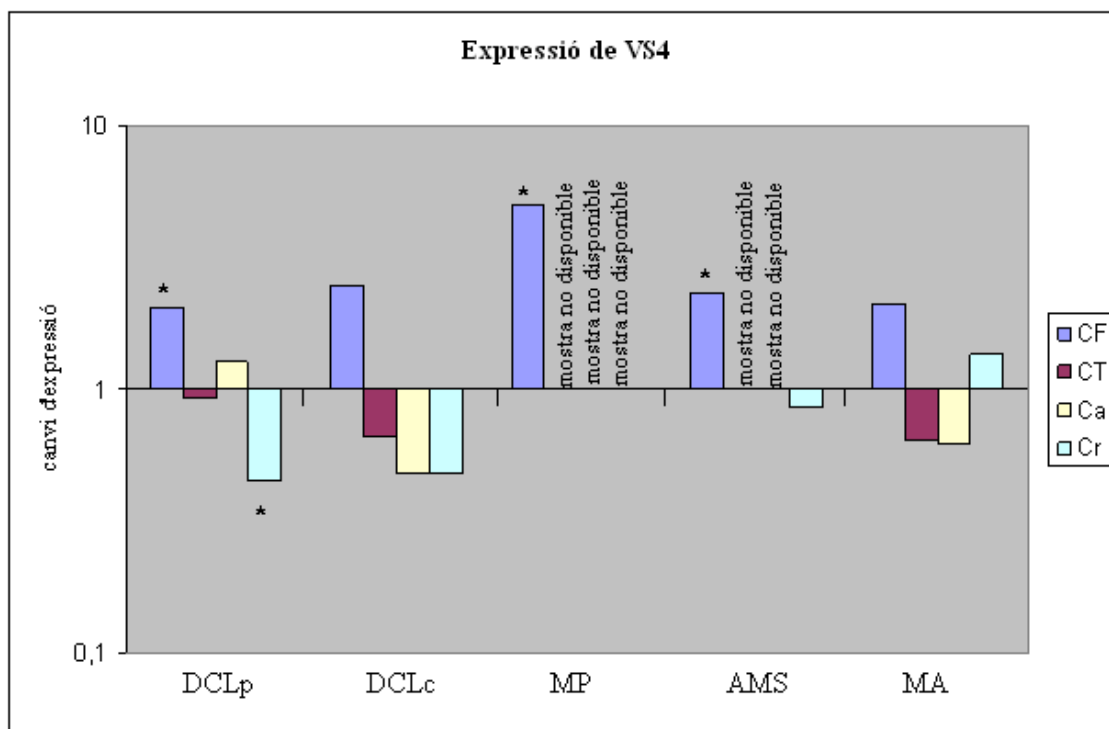
molt marcada (1,42 (0,79–2,55)). El còrtex frontal no mostrava canvis d'expressió (1,28 (1,26–1,29), figura 21).

En general, les malalties amb cossos de Lewy i la MA es caracteritzaven per una marcada disminució de l'expressió de VS3 al còrtex temporal. Es va observar un cert augment, tot i que no significatiu degut a una important desviació estàndard en la majoria dels casos al còrtex frontal i al nucli caudat (figura 21).

#### 4.5.2 Expressió de VS4

La VS4 de BChE és el transcrit més curt i la variant de *splicing* més abundant després de la VS3.

A la DCLp, l'expressió de VS4 de BChE presentava un augment al còrtex frontal (2,06 (1,70–2,50)) i una disminució al cerebel (0,45 (0,42–0,48); figura 22). Al còrtex temporal i al nucli caudat no es van observar canvis significatius d'expressió (0,93 (0,79–1,47) i 1,28 (0,83–1,38), respectivament).



**Figura 22.** Expressió de VS4 de BChE en el còrtex frontal (CF), còrtex temporal (CT), nucli caudat (Ca) i cerebel (Cr) a totes les malalties estudiades. El canvi de l'expressió es representa en escala logarítmica. \*: resultat estadísticament significatiu ( $< 0,5$  o  $> 1,5$ ).

A la DCLc l'expressió de VS4 estava augmentada, encara que no significativament, al còrtex frontal (2,48 (1,27–4,87)). Al nucli caudat, al cerebel i al còrtex temporal es va

detectar certa disminució de l'expressió de VS4, però tampoc significativa (0,48 (0,44–1,91); 0,48 (0,32–0,72); 0,66 (0,47–1,10), respectivament; figura 22).

L'expressió de VS4 al còrtex frontal de la MP presentava un augment molt marcat (5,03 (4,42–5,72)). A l'AMS, la VS4 es sobreexpressava al còrtex frontal, i el cerebel no mostrava canvis d'expressió significatius (2,32 (2,13–2,53); 0,85 (0,78–0,92), respectivament).

Tot i que no es van detectar canvis significatius d'expressió de VS4 a la MA aquesta es trobava augmentada al còrtex frontal i presentava una tendència a la disminució de l'expressió al còrtex temporal i al nucli caudat (còrtex frontal: 2,11 (1,15–3,83); còrtex temporal: (0,64 (0,32–0,77); nucli caudat: 0,62 (0,29–0,75); cerebel: (1,35 (0,92–1,98); figura 22).

L'elevada desviació estàndard observada en les diferents malalties i àrees estudiades, il·lustra l'heterogeneïtat de les malalties incloses en l'estudi. Canvis en els nivells d'expressió de les VS de BChE sembla que juguen un paper determinat en el desenvolupament d'aquestes malalties només en determinats subgrups de pacients. Genotips definits dels polimorfismes detectats en el promotor de BChE podrien modificar l'eficiència de la transcripció del gen, i causarien diferències en els distints nivells d'expressió i per això, serien responsables de les àmplies desviacions estàndard.

### 4.5.3 Coamplificació VS1 i VS2

L'expressió de les dues variants de *splicing* minoritàries, VS1 i VS2, no podia ser avaluada per PCR a temps real a causa de la seva baixa expressió. Per poder valorar canvis relatius a la seva expressió, van ser coamplificades en una mateixa reacció de PCR i es va determinar la ràtio entre totes dues.

Al còrtex frontal i al cerebel es van observar canvis significatius en les ràtios VS2/VS1 en les malalties amb cossos de Lewy en comparació amb els controls. Concretament al còrtex frontal, la DCLp, la DCLc i la MP presentaven una ràtio significativament superior als controls (0,69 ± 0,15 a la DCLp, 0,64 ± 0,34 a la DCLc, 0,74 ± 0,23 a la MP vs als controls 0,42 ± 0,19; p = 0,04, p = 0,049 i p = 0,027, respectivament). L'augment de la ràtio VS2/VS1 en les malalties amb cossos de Lewy en comparació amb els controls indicava que en aquestes malalties o augmentava l'expressió de VS2 o disminuïa l'expressió de VS1, sent el resultat d'ambdós canvis un augment relatiu de VS2 respecte VS1. En canvi, al cerebel la ràtio VS2/VS1 era

superior als controls que a la DCLp i a la DCLc ( $0,34 \pm 0,2$  a la DCLp,  $0,27 \pm 0,12$  a la DCLc vs  $0,58 \pm 0,21$  als controls;  $p = 0,039$  i  $p = 0,027$ , respectivament), la qual cosa indica el contrari, un augment relatiu de VS1 respecte de VS2, ja sigui per un increment de VS1 o una disminució de VS2.

A banda, cal remarcar que set mostres del còrtex frontal i sis de cerebel no expressaven VS2. Totes aquestes estaven distribuïdes de manera similar en tots els grups analitzats incloent-hi els controls i no consten a les mitjanes de les ràtios.

Al còrtex temporal, així com, al nucli caudat no s'han observat diferències significatives en la ràtio VS2/VS1 en cap dels grups estudiats (DCLp, DCLc, AMS, MP i MA) en comparació amb els controls.

### **4.6 Influència dels polimorfismes de BChE sobre l'expressió del gen**

Tal com s'ha mencionat a l'apartat anterior, els diferents genotips del promotor podrien influir directament sobre els nivells d'expressió de BChE. Per aquest motiu, l'expressió de les mostres control va ser estudiada en dependència dels genotips corresponents als polimorfismes A-1314G i C-558T. Només es van analitzar aquests dos polimorfismes del promotor de BChE perquè les freqüències dels seus genotips minoritaris eren superiors a 0,2 als controls. Es van comparar els nivells d'expressió de les mostres que presentaven el genotip homozigot mutat (el més freqüent en ambdós casos), amb els nivells d'expressió de les mostres que presentaven almenys un al·lel salvatge (taula 15).

Per cada VS es van trobar diferències d'expressió en dependència del genotip en una àrea cerebral específica. La VS3 es sobreexpressava en presència dels genotips C+ del polimorfisme C-558T en el nucli caudat i la VS4 en presència dels genotips A+ del polimorfisme A-1314G en el cerebel (taula 15).

Per aquests motius es van reanalitzar les dades d'expressió de VS3 en nucli caudat i de VS4 en cerebel per a cada malaltia.

**Taula 15. Canvis dels nivells d'expressió de BChE en funció del genotip A+ del polimorfisme A-1314G i del genotip C+ del polimorfisme C-558T. \* resultat estadísticament significatiu.**

	Polimorfisme A-1314G		Polimorfisme C-558T	
	GG	A+	TT	C+
VS3-CF	1	1,23 (1,02-1,49)	1	1,34 (1,05-1,73)
VS3-CT	1	0,99 (0,77-1,27)	1	1,20 (1,18-1,21)
VS3-Ca	1	0,39 (0,19-0,81)	1	2,29 (1,73-3,04)*
VS3-Cr	1	1,69 (1,35-2,10)	1	0,94 (0,87-1,02)
VS4-CF	1	0,96 (0,72-1,28)	1	0,95 (0,54-1,68)
VS4-CT	1	1,13 (0,71-1,79)	1	0,72 (0,52-0,98)
VS4-Ca	1	0,49 (0,16-1,55)	1	0,79 (0,52-1,20)
VS4-Cr	1	2,26 (1,9-2,67)*	1	0,85 (0,79-0,92)

S'ha reportat que la variant-K de BChE comporta una disminució del 33 % del nombre de molècules circulants en sang (Altamirano, *et al*, 2000). Per aquest motiu, es va estudiar si la variant-K influïa en els nivells d'expressió del gen. Com que el nombre de controls portadors d'almenys un al·lel K era molt reduït, es va fer l'anàlisi en funció del genotip en cada una de les malalties. Els resultats van revelar que ni el genotip KK ni el KW influïen en els nivells d'expressió de VS3 i VS4 en cap de les malalties.

### 4.6.1 Expressió de VS3 en el nucli caudat en dependència del polimorfisme C-558T

Tal com ja s'ha mencionat a l'apartat anterior, en el nucli caudat es va observar una sobreexpressió de VS3 als individus control portadors dels genotips C+ del polimorfisme C-558T. Per estudiar la possible influència d'aquests genotips sobre l'expressió de VS3 en el nucli caudat també en les DCL i en la MA, es van reanalitzar els resultats de l'expressió (taula 16).

Al contrari dels controls, a la MA es va detectar una disminució significativa de l'expressió de VS3 als individus portadors del genotip C+ en aquesta àrea. En canvi, a les DCL no es van trobar variacions significatives d'expressió en dependència dels diferents genotips d'aquest polimorfisme.



**Taula 16. Canvis en els nivells d'expressió de VS3 en el nucli caudat en dependència del genotip C+ del polimorfisme C-558T. \* resultat estadísticament significatiu.**

	<b>Polimorfisme C-558T</b>	
	<b>TT</b>	<b>C+</b>
DCLp	1	1,06 (0,83-1,35)
DCLc	1	1,29 (0,76-2,17)
MA	1	0,25 (0,14-0,45)*
Controls	1	2,29 (1,73-3,04)*

#### 4.6.2 Expressió de VS4 en cerebel en dependència del polimorfisme A-1314G

Una anàlisi similar es va fer per a la quarta variant de *splicing* de BChE, VS4, perquè, en aquest cas, s'havien detectat canvis significatius als controls portadors dels genotips A+ pel polimorfisme A-1314G al cerebel. A la MA es va observar una marcada sobreexpressió de VS4 als individus portadors dels genotips A+, la qual era el doble que als controls (taula 17). Però, igual que en el cas anterior, a les DCL no es van observar canvis d'expressió en funció del genotip.

**Taula 17. Canvis en els nivells d'expressió de VS4 en el cerebel en dependència del genotip A+ del polimorfisme A-1314G. \* resultat estadísticament significatiu.**

	<b>Polimorfisme A-1314G</b>	
	<b>GG</b>	<b>A+</b>
DCLp	1	1,55 (1,10-2,19)
DCLc	1	0,61 (0,38-0,97)
MA	1	4,49 (3,95-5,11)*
Controls	1	2,26 (1,90-2,67)*

#### 4.7 Anàlisi de l'expressió de BChE en dependència de les combinacions genotípiques

Per determinar la possible funcionalitat de les combinacions genotípiques específiques, AAAATT77WW per a la MA i AAAGCC8+K+ i 77/KW per a les DCL, els nivells d'expressió de VS3 i VS4 de BChE s'han analitzat en el còrtex frontal en els portadors d'aquestes combinacions en comparació amb els no portadors.

Es va observar un augment significatiu de l'expressió de VS3 i de VS4 a les mostres de MA portadores de la combinació genotípica AAAATT77WW en comparació amb la resta de mostres de MA (1,97 (1,50-2,55) i 3,64 (2,92-4,53), respectivament; figura 23).

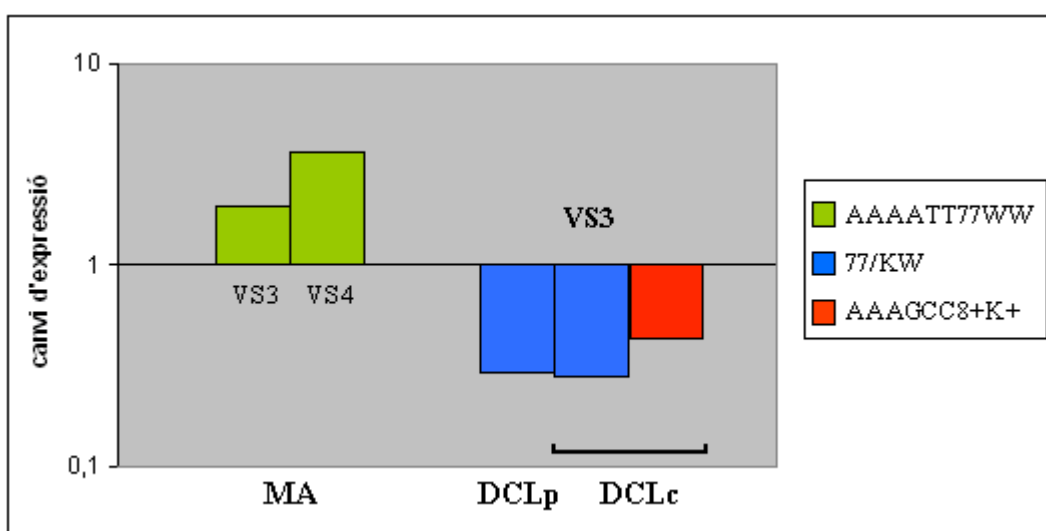


Figura 23. Canvis d'expressió significatius de VS3 i VS4 de BChE a mostres portadores de les combinacions genotípiques específiques.

Les mostres amb DCLp portadores dels genotips 77/KW mostraven una disminució significativa de VS3 en comparació amb la resta de les mostres de DCLp, però no presentaven canvis d'expressió de VS4 (0,28 (0,26-0,31) i 1,20 (1,04-1,39); figura 23).

L'expressió de VS3 en DCLc va ser avaluada en tres grups diferents, els portadors de la combinació AAAGCC8+K+, els portadors de 77/KW i la resta de les mostres de DCLc. Les mostres d'aquesta malaltia portadores de la combinació AAAGCC8+K+ presentaven una disminució significativa de l'expressió de VS3, tot i que aquesta era molt més marcada a les mostres portadores de la combinació 77/KW (0,42 (0,38-0,47) i 0,27 (0,18-0,43), respectivament; figura 23). Aquestes dues combinacions genotípiques no provocaven variacions en l'expressió de VS4 en comparació amb les mostres

d'aquesta malaltia no portadores d'aquestes combinacions (1,02 (0,58–1,80) i 0,91 (0,55–1,52), respectivament).

Finalment, és interessant resumir que les combinacions específiques per a les DCL provocaven una disminució significativa de VS3 i que, en canvi, la combinació trobada per a la MA era responsable d'un augment significatiu de l'expressió de VS3 i VS4.

#### **4.8 Localització de BChE per immunohistoquímica**

L'estudi immunohistoquímic s'ha fet en mostres de còrtex frontal i de nucli caudat corresponents a dos cervells de DCLp, quatre de DCLc i tres de MA emprant anticossos de BChE (Atlas Antibodies) i  $\alpha$ -sinucleïna (Novocastra). L'anàlisi microscòpic va revelar diferents graus de positivitat per a BChE que es van definir per un camp d'alta resolució de la manera següent: (-) negatiu: no s'observa positivitat per a BChE, (+) lleu: d'una a dues cèl·lules presenten positivitat, (++) moderat: de tres a quatre cèl·lules presenten positivitat, (+++) sever: més de quatre cèl·lules presenten positivitat i (++++) molt sever: nombroses cèl·lules presenten positivitat (taula 18).

BChE mostrava positivitat epitelial a les parets dels vasos sanguinis i s'observava principalment a les mostres del nucli caudat (figura 24A).

En general, el còrtex frontal presentava poca positivitat per a BChE (taula 18). Tres de les nou mostres estudiades en aquesta àrea eren negatives per BChE (figura 24B). En aquest cas, només es podien observar els pigments neuronals. Independentment de la malaltia, quatre dels nou casos presentaven positivitat lleu i dos moderada.

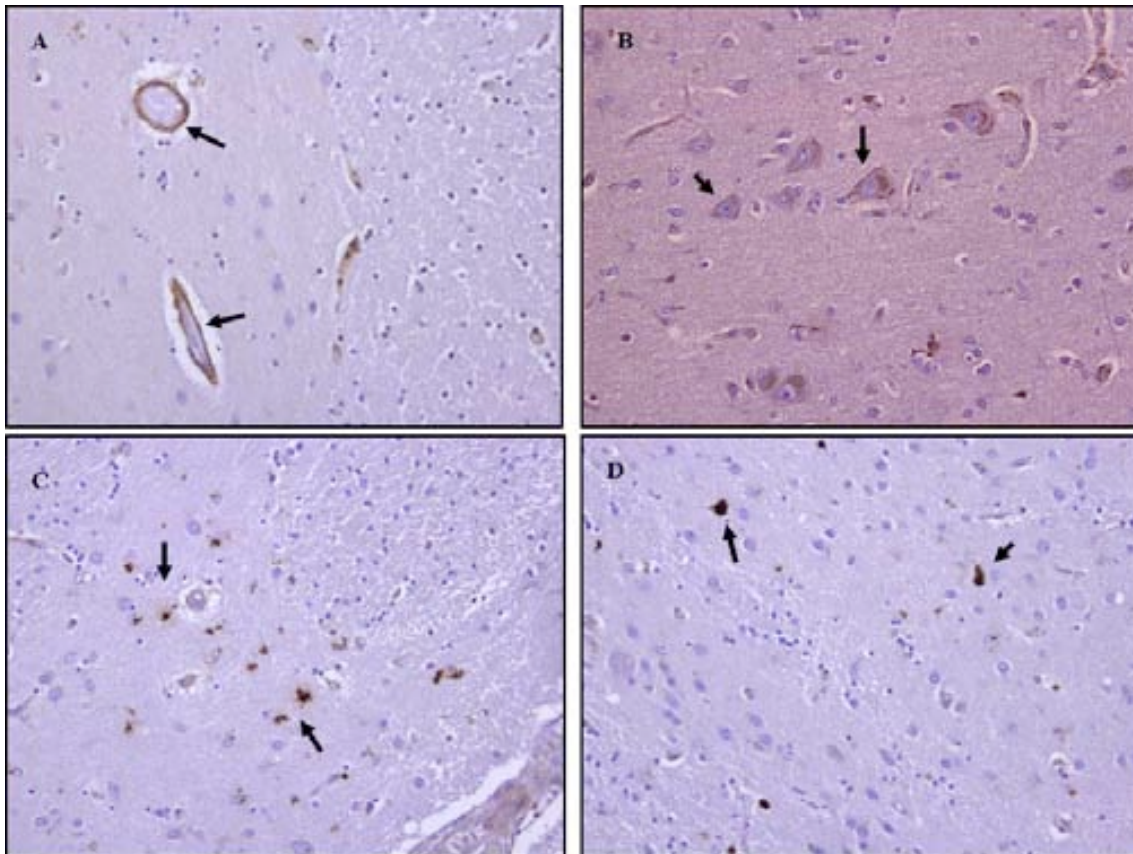
	Mostres <sup>1</sup>	BChE CF <sup>2</sup>	BChE Ca <sup>3</sup>	$\alpha$ -sinucleïna CF <sup>4</sup>	$\alpha$ -sinucleïna Ca <sup>5</sup>

#### 4. Resultats

DCLp	7	+	+	+++	+ / +++
	9	++	+	-	+
DCLc	13	+	++++	+++	+++
	18	+	++	+ / +++	++
	22	-	+++	+++ / +++++	++ / ++++
	25	-	+	+	+
MA	48	+	++	-	-
	50	++	+++	-	-
	52	-	++	-	-

**Taula 18. Resultats de la immunohistoquímica de BChE i  $\alpha$ -sinucleïna.** <sup>1</sup>Mostres: numeració de les mostres corresponents a les citades a l'annex. <sup>2</sup>BChE CF: mostres de còrtex frontal estudiades amb l'anticòs BChE. <sup>3</sup>BChE Ca: mostres del nucli caudat estudiades amb l'anticòs BChE. <sup>4</sup> $\alpha$ -sinucleïna CF: mostres de còrtex frontal estudiades amb l'anticòs  $\alpha$ -sinucleïna. <sup>5</sup> $\alpha$ -sinucleïna Ca: mostres de nucli caudat estudiades amb l'anticòs  $\alpha$ -sinucleïna.

Al nucli caudat tres dels quatre casos de DCLc i tots els casos estudiats de MA presentaven positivitat per BChE moderada, severa o molt severa en forma de grànuls fins (figura 24D) o grànuls densos (figura 24C). A la figura 24D les fletxes assenyalen estructures positives per BChE amb un aspecte compatible amb cossos d'inclusió. A causa del nombre baix de mostres de DCLp analitzades, no es podia generalitzar que hi hagués poca positivitat per BChE, encara que els dos casos de DCLp estudiats presentaven positivitat lleu (taula 18).



**Figura 24. Detecció de BChE en talls de teixit parafinat mitjançant immunohistoquímica.** A: mostra de nucli caudat que presenta positivitat epitelial (20x); les fletxes assenyalen vasos sanguinis positius per a BChE. B: mostra de còrtex frontal negativa per BChE (40x); les fletxes indiquen els pigments neuronals. C: mostra de nucli caudat amb positivitat molt severa per BChE (20x); les fletxes indiquen la positivitat granular fina per BChE. D: mostra de nucli caudat amb positivitat moderada per BChE (20x); les fletxes assenyalen la positivitat granular intensa per BChE.

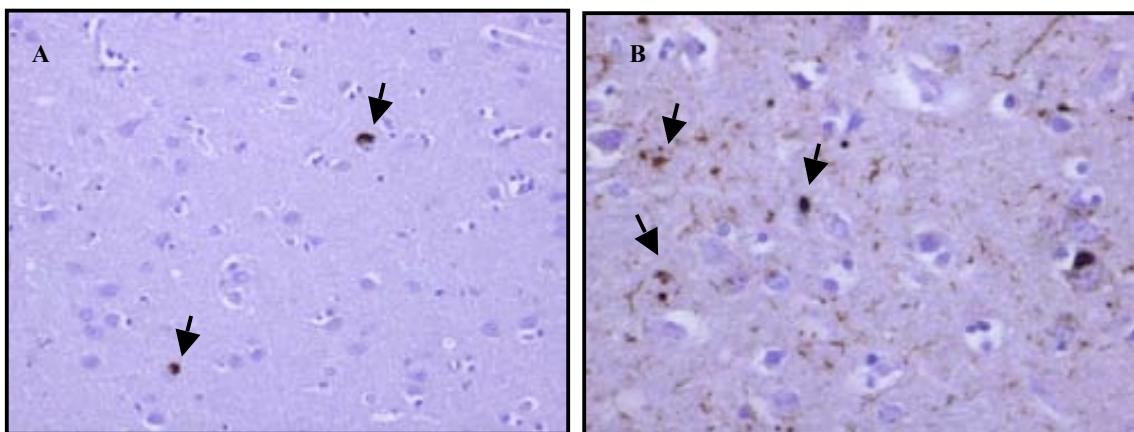
A causa de l'aparença i la localització dels grànuls densos de BChE, es va a investigar la colocalització de BChE i  $\alpha$ -sinucleïna mitjançant doble immunomarcatge per a ambdues proteïnes.

Per fer el doble immunomarcatge, calia estandarditzar la tinció immunohistoquímica amb l'anticòs  $\alpha$ -sinucleïna. Segons els criteris establerts per McKeith el 2005 es distingeixen quatre estadis corresponents a diferents graus d'afectació per patologia relacionada amb  $\alpha$ -sinucleïna: estadi 1 (lleu o +): cossos de Lewy i neurites de Lewy disperses, estadi 2 (moderat o ++): més d'un cos de Lewy per camp d'alta resolució i alguna neurita, estadi 3 (sever o +++): més de quatre cossos de Lewy i estadi 4 (molt sever o ++++): molts cossos de Lewy i neurites de Lewy.

La tinció amb l'anticòs  $\alpha$ -sinucleïna era negativa a la MA, però positiva a la DCLp i DCLc. Similar a la BChE, es van obtenir resultats molt heterogenis per les diferents

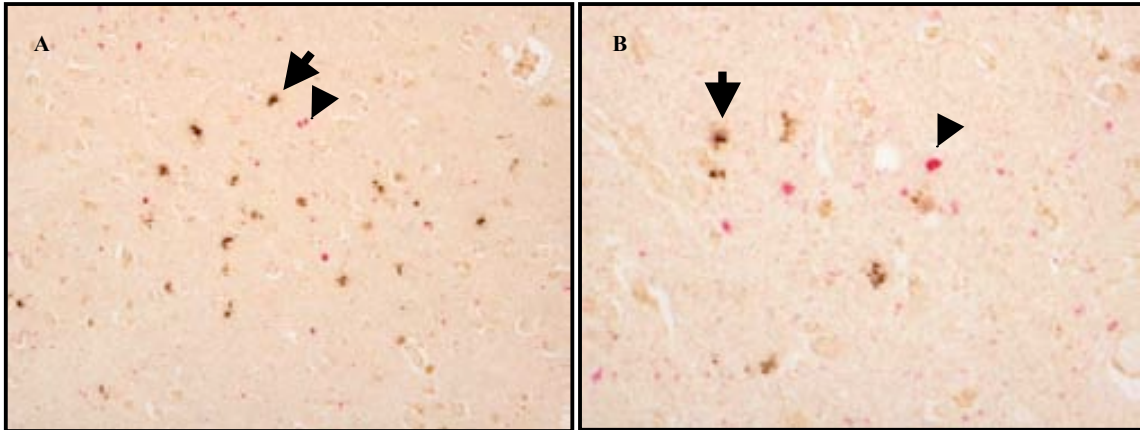
#### 4. Resultats

mostres corresponents als grups de DCLp i DCLc (taula 18). A la figura 25A es mostra un exemple amb positivitat moderada corresponent a l'estadi 2 segons els criteris de McKeith. En canvi, la mostra de la figura 25B corresponia a un estadi 4 de McKeith perquè presentava positivitat molt marcada.



**Figura 25. Detecció d' $\alpha$ -sinucleïna en talls de teixit parafinat mitjançant immunohistoquímica.** Mostres que presenten canvis relacionats amb la patologia d' $\alpha$ -sinucleïna corresponent a (A) l'estadi 2 segons McKeith (20x) i (B) a l'estadi 4 segons McKeith (40x).

La immunohistoquímica amb doble marcatge permet la detecció simultània de dos antígens en un mateix tall de teixit. La combinació d'una tinció de peroxidasa-DAB amb el cromogen vermell de fosfatasa (Fast Red) permetia visualitzar a la vegada l'anticòs de BChE de color marró i l'anticòs d' $\alpha$ -sinucleïna de color vermell i proporcionava un contrast excel·lent.  $\alpha$ -sinucleïna es localitzava als cossos de Lewy i les imatges mostraven clarament que BChE i  $\alpha$ -sinucleïna no colocalitzaven. Aquesta observació permetia concloure que BChE no es trobava als cossos de Lewy (figura 26).



**Figura 26. Detecció simultània de BChE i  $\alpha$ -sinucleïna mitjançant immunohistoquímica amb doble marcatge.** La fletxa indica positivitat per a BChE (color marró) i el cap de la fletxa indica positivitat per a  $\alpha$ -sinucleïna (color vermell). A: mostra DCLc amb positivitat severa per BChE (20x). B: mostra DCLc amb positivitat severa per BChE (40x).

A microscopic image showing several cells with blue-stained nuclei and brown-stained cytoplasmic inclusions. The background is a light, textured surface. The text "5. Discussió" is overlaid on the image.

## **5. Discussió**





En el present treball s'ha fet una extensa caracterització genètica del gen de BChE en les sinucleïnopaties.

A la primera part del treball es van analitzar els polimorfismes de BChE més freqüents a totes les mostres de cervell disponibles de DCLp, DCLc, MP, AMS, MA i controls.

La determinació de la freqüència de l'al·lel K de BChE va permetre establir la freqüència d'aquest al·lel als individus control de la nostra regió sanitària que correspondria a un 18,1 %, una mica més alt que l'11,1 % obtingut en un estudi realitzat en controls de l'Hospital Marqués de Valdecilla de Santander (Mateo, *et al*, 2008). Aquest percentatge també és lleugerament major que en altres poblacions caucàsiques, com per exemple, la britànica, que és d'un 12,0 % (Evans i Wardell, 1984) i la dels Estats Units, que és d'un 12,8 % (Bartels, *et al*, 1992). En canvi, la freqüència de l'al·lel K varia considerablement en altres poblacions, com per exemple a la població turca, amb una freqüència molt elevada del 26,6 % (Babaoglu, *et al*, 2004) o a la brasilera, amb una freqüència extremadament baixa, que és del 2,0 % (Alcantara, *et al*, 1990). La població japonesa presenta amb un 17,5 % una freqüència similar a la de les poblacions caucàsiques (Yamamoto, *et al*, 1999).

En aquest estudi es va detectar una marcada acumulació de l'al·lel K en totes les sinucleïnopaties (42,0 % DCLp, 62,0 % DCLc, 30,0 % MP i 50,0 % AMS), però també a la MA (38,0 % MA). Això indicava que la variant-K de la BChE podria influir en al desenvolupament d'aquestes malalties. En nombrosos articles s'ha descrit la variant-K de la BChE com un factor de risc a desenvolupar la MA, especialment en presència de l'al·lel ApoE4 (Ghebremedhin, *et al*. 2007, Lehmann, *et al*. 2001), però altres autors han postulat que la variant-K podria ser un factor protector (Alvarez-Arcaya, *et al*, 2000; Podoly, *et al*, 2009). A més, s'ha vist que aquesta variant en homozigosi està acumulada en el 8 % dels pacients afectats per la DCL, els quals sembla que tindran una resposta millor als inhibidors de colinesterases degut a la disminució del 33 % de l'activitat de BChE (Lane i He, 2009; Singleton, *et al*, 1998). Els mateixos investigadors també proposen que podria ser útil un cribatge poblacional d'aquest polimorfisme per predir quins individus tindran millor resposta als fàrmacs. En estudis fisiològics s'han descrit que en relació amb la disminució de la seva activitat, la variant-K comporta una disminució del 33 % del nombre de molècules circulants en sèrum (Holmes, *et al*, 2005). Tanmateix, fins al moment no s'han estudiat els nivells d'expressió d'mRNA al cervell.

A més a més de la variant-K, en el present estudi s'han analitzat tres altres polimorfismes exònics situats al gen de la BChE. Mentre que les variants H i J no s'han trobat a la nostra població, la variant-A estava present en un percentatge molt baix. S'ha descrit que diferents variants genètiques de la BChE poden ser factors de risc per a altres malalties. La variant-A, per exemple, està associada a l'apnea (Yen, *et al*, 2003) i portadors homozigots d'aquesta variant poden patir una apnea prolongada després de l'administració d'anestèsics com la succinilcolina o el mivacurium (Zelinski, *et al*, 2007). La freqüència d'homozigosi en la població americana és del 0,04 % i augmenta al 4 % en cas d'heterozigositat (Li, *et al*, 2006). A més, la freqüència d'heterozigosi en la població europea és del 3,3 % (McGuire, *et al*, 1989). En relació amb la variant-J, els nivells de BChE en sèrum i la duració de l'apnea per la succinilcolina estan inversament correlacionats. La disminució de dos terços de molècules d'enzim circulant provocada per aquesta variant causa major susceptibilitat i fa que els individus portadors siguin més susceptibles a una apnea prolongada per la succinilcolina (Bartels, *et al*, 1992). L'absència de les variants-H i J, així com, les baixes freqüències de la variant-A a la nostra població sembla que són degudes al fet que aquests polimorfismes influeixen en altres trastorns no relacionats amb la neurodegeneració.

En diversos estudis està ben documentat que el canvi d'un únic nucleòtid a la regió del promotor d'un gen pot afectar dràsticament l'activitat transcripcional (Artiga, *et al*, 1998). En altres casos, s'han associat polimorfismes del promotor d'un gen determinat amb el risc de patir una malaltia en concret. El gen d'ApoE, per exemple, està associat com a important factor de risc a desenvolupar la MA. En el promotor d'aquest gen s'han trobat diversos polimorfismes i dos d'ells (A-491T i T-291G) poden alterar els nivells de transcripció d'ApoE. L'al·lel -491T va ser associat a una disminució de la transcripció, mentre que el -219G l'augmentava (Artiga, *et al*, 1998). Recentment, s'ha establert que el genotip -491AA en presència del al·lel APOE4 augmenta el risc de patir la MA 4,37 vegades (Xin, *et al*, 2010). A l'interleucina-10 s'han trobat diversos polimorfismes al promotor i tres d'ells, G-1082A, T-819C i C-592A, estan en desequilibri de lligament. A partir dels tres polimorfismes resulten tres haplotips GCC, ACC i ATA; els dos primers es troben principalment en pacients amb MA, tot i que de manera no significativa (Scassellati, *et al*, 2004). En el cas de la MP s'ha estudiat la possible associació de tres polimorfismes situats en el promotor del gen HOMER1 (rs4704559, rs10942891, rs4704560). De tots tres, l'al·lel A del polimorfisme

rs4704559 sembla que és un marcador de susceptibilitat a patir símptomes psicòtics en pacients amb MP (De Luca, *et al*, 2009).

Fins al moment només s'ha publicat un estudi genètic relacionat amb el promotor de BChE (Jbilo, *et al*, 1994a). Tenint en compte els treballs discutits en el paràgraf anterior, la falta de dades sobre el promotor de BChE i l'acumulació dels genotips portadors de l'al·lel K a les nostres mostres, es va estudiar la seqüència del promotor de BChE. Com a resultat es van identificar quatre polimorfismes nous. La manca de coneixement sobre la genètica de les DCL (McKeith, *et al*, 2005) i la possible implicació de la BChE en el desenvolupament d'aquestes malalties justificaven la caracterització dels polimorfismes del promotor de BChE a totes les mostres incloses en aquest estudi.

El promotor de BChE té una longitud de cinc quilobases situades a la regió 5' del gen i està constituït pel 66 % d'adenines i timines, similar al 62 % de la regió codificant, i no conté cap TATA *box* ni CAAT *box* en aquesta regió (Jbilo, *et al*, 1994a). Però elements reguladors potencials *upstream* del lloc d'inici de transcripció, com AP1 entre les posicions -68 i -73 (5'-GAATCA-3') i Oct-1 de la -401 a la -408 van ser localitzats a la seva seqüència. També es van descobrir quatre llocs d'unió a topoisomerases situats entre les posicions -233 i -247 (5'-TATGTATATTCTTAA-3'), entre la -610 i la -627 (5'-GTGTCTCTTTTATAGAGT-3'), entre les posicions -828 i -844 (5'-CTGCAAATATTAATACA-3') i entre la -1.634 i la -1.650 (5'-CCTGCTTTTATTGATTT-3'). A més, es va identificar una seqüència repetitiva Alu de 333pb, emplaçada entre les posicions -1.324 i -1.656, flanquejada a ambdós costats per una repetició de set nucleòtids (CCTTTTC) (Jbilo, *et al*, 1994a). Fins al moment, només s'ha descrit un polimorfisme en el promotor de BChE. Està situat a la posició -116 i comporta el canvi d'una guanina per una adenina (Furtado-Alle, *et al*, 2008). El genotip -116A es troba freqüentment relacionat amb la variant-K i està associat amb un baix índex de massa corporal. Cal afegir que aquest polimorfisme no s'ha estudiat en relació amb les sinucleïnopaties, o amb altres malalties neurodegeneratives.

Els quatre polimorfismes del promotor de BChE identificats en aquest treball localitzats per ordre de més distància a menys del lloc d'inici de la transcripció són: A-1314G, A-795G, C-558T i un polimorfisme amb un nombre variable de T situat entre les posicions -222 i -215. El genotip AA del polimorfisme A-1314G es trobava acumulat tres vegades a la MA i a la MP en comparació amb els individus control. La freqüència dels genotips G+ del polimorfisme A-795G era molt baixa en controls.

Encara que la seva freqüència estava augmentada a les sinucleïnopaties i a la MA, la seva acumulació era significativa únicament a la DCLc. En l'estudi posterior, la freqüència dels genotips G+ del polimorfisme A-795G era similar en MA, MP i controls. En canvi, en un grup de pacients amb AMS va disminuir la presència dels genotips G+. Caldrà fer estudis de grups de pacients més amplis per definir la possible importància dels genotips G+ del polimorfisme A-795G en el desenvolupament d'aquestes malalties.

El genotip CT del polimorfisme C-558T presentava una acumulació important en la DCLp així com en la DCLc. Per determinar la possible associació d'aquest polimorfisme amb la DCL, ja sigui com a factor de risc o com a indicador de la progressió de la malaltia, caldrà analitzar un grup de pacients amb el diagnòstic clínic d'aquesta malaltia. Per la manca de pacients d'aquestes característiques no hem pogut fer aquest estudi.

Finalment, l'al·lel més freqüent de la seqüència polimòrfica poliT contenia 7T seguides. Mentre que entre 17-25 % dels pacients que patien alguna sinucleïnopatia o la MA eren portadors de l'al·lel 8T, només el 9 % dels controls el presentaven. A més, s'ha detectat la cosegregació dels al·lells 8T i K de la variant-K, és a dir, l'al·lel 8T només es troba en un cromosoma portador de l'al·lel K. Fins al moment, es desconeixen quines implicacions pot tenir aquest fet, però podria tenir a veure amb la incidència de la malaltia o en la seva evolució.

Tenint en compte l'estructura del promotor de BChE cal destacar que cap dels polimorfismes descrits aquí no es troben dins de cap element regulador conegut ni dins de la seqüència Alu. Tanmateix, el polimorfisme A-1314G s'emplaça a 10 pb de l'inici de la seqüència Alu i els polimorfismes A-795G i C-558T estan aproximadament a 50 pb d'un lloc d'interacció d'una topoisomerasa. També la seqüència poliT situada entre les posicions -221/-222 i -215 es troba a només 10 pb d'un lloc d'interacció d'una topoisomerasa. Encara que els diferents polimorfismes per separat poden no alterar l'eficiència de la transcripció, certes combinacions dels diferents genotips podrien causar canvis en l'afinitat dels diferents factors que intervenen en el complex procés de la transcripció gènica. Aleshores, com a resultat es podrien detectar canvis en els nivells d'expressió del gen BChE.

Un dels objectius d'aquest treball era la recerca de possibles biomarcadors diagnòstics per les sinucleïnopaties. Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels polimorfismes descoberts al promotor de BChE no van permetre l'establiment d'un

marcador específic. Per aquest motiu, es van analitzar les diferents combinacions genotípiques resultants d'aquests quatre polimorfismes del promotor juntament amb la variant-K i se'n van estudiar les freqüències i la distribució en els diferents grups de malalties.

En els últims anys s'ha començat a fer l'anàlisi de combinacions genotípiques constituïdes per genotips de polimorfismes presents en un únic gen o en diferents gens. Un exemple és el factor de risc de la MA postulat per Vural i col·laboradors on la presència de l'al·lel A a la posició -308 del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) juntament amb l'al·lel A de la posició -1082 del promotor de la interleucina-10 (IL-10) augmentaven 6,5 vegades el risc de patir aquesta malaltia (Vural, *et al*, 2009). Els al·lells A de TNF- $\alpha$  i de IL-10 per separat també augmentaven el risc però de manera més lleugera (Vural, *et al*, 2009). També Costa-Mallen i col·laboradors van descriure una combinació genotípica formada per un polimorfisme A/G de la monoaminoxidasa B (MAO-B) situat a l'intró 13 del gen localitzat al cromosoma X i Taq1A i Taq1B del receptor de la dopamina D2 (DR2D), que, combinats, augmentaven el risc de patir la MP (Costa-Mallen, *et al*, 2000).

Segons Paisán-Ruiz i col·laboradors, no ha de ser ignorada informació d'al·lells que es troben a una baixa freqüència en estudis genòmics a gran escala i amb p-valors astringents. Aquests podrien esdevenir importants factors de risc (Paisan-Ruiz, *et al*, 2009). Concretament, els investigadors van estudiar múltiples al·lells minoritaris del gen LRRK2 i van veure que combinacions determinades d'aquests al·lells predisposaven el risc de patir la MP esporàdica (Paisan-Ruiz, *et al*, 2009).

Una limitació de la majoria d'estudis genètics poblacionals són els grups control que s'utilitzen. Aquests poden incloure persones encara no afectades per la malaltia en qüestió en lloc de persones amb risc baix de patir la malaltia (Paisan-Ruiz, *et al*, 2009). Però la primera part de l'estudi està basat en mostres amb diagnòstic neuropatològic, on les mostres control van ser examinades per neuropatòlegs i no presentaven lesions neuropatològiques significatives. A més, l'edat de la mort dels individus era similar a la dels malalts. La bona caracterització dels controls representa un valor afegit en aquest treball.

Tal i com ja s'ha esmentat, la DCL és la segona causa més freqüent de demència en la vellesa (Jellinger, 2003). Una dificultat real a l'hora de fer un diagnòstic correcte de la DCL és la variabilitat fenotípica en dependència de si presenten patologia Alzheimer o si només contenen cossos de Lewy. La presència d'un elevat percentatge de patologia

MA és la causa dels símptomes característics de la MA que sovint condueixen al diagnòstic clínic erroni de la DCL (Kraybill, *et al*, 2005). Actualment per al diagnòstic clínic de la DCL s'utilitzen els criteris que McKeith va establir el 2005 basats en característiques clíniques dels pacients (McKeith, *et al*, 2005) on el diagnòstic clínic és de possible o probable DCL segons els símptomes. Amb l'ús d'aquestes bases s'aconsegueix una especificitat elevada al diagnòstic clínic (90–99 %), però la sensibilitat és relativament baixa (18–83 %) (Litvan, *et al*, 2003; Lopez, *et al*, 2002; Luis, *et al*, 1999; McKeith, *et al*, 2000). Cal afegir que, fins al moment, no hi ha biomarcadors àmpliament acceptats que permetin distingir aquesta malaltia de les altres demències (Aarsland, *et al*, 2008).

En relació amb la correspondència entre el diagnòstic clínic i neuropatològic de les mostres utilitzades en aquest estudi, és important remarcar el 100 % de coincidència al diagnòstic al cas de la MA, però només el 42 % de pacients amb DCLp i el 17 % de DCLc van ser diagnosticats com a DCL. La majoria d'aquests casos van rebre el diagnòstic clínic de MA.

Atès l'augment de l'esperança de vida als països rics, és previsible un augment significatiu de la prevalença de les malalties neurodegeneratives en els pròxims anys. Entre els 60–65 anys aproximadament l'1 % de la població pateix alguna demència, aquest percentatge augmenta fins al 10–35 % en persones majors de 85 anys. A partir dels 80 anys afecta més els homes que a les dones (Kester i Scheltens, 2009). Actualment a l'Estat espanyol més de 800.000 persones presenten algun tipus de demència i la previsió és que el 2025 aquesta xifra augmenti fins a 1.200.000 persones. Aquests resultats demostren una vegada més la importància de disposar d'un diagnòstic precís i primerenc d'una banda, i de trobar nous tractaments i millorar els actuals de l'altra.

Amb l'objectiu d'intentar descobrir algun marcador útil per al diagnòstic precís de les sinucleïnopaties, es va seguir el present treball analitzant les diferents combinacions genotípiques obtingudes a partir dels polimorfismes de BChE en cada mostra. La distribució de les diferents combinacions genotípiques en un diagrama de contingència indicaven clarament que la genètica de BChE és diferent en la DCLc, la MA i els controls. Com que ambdues malalties posseïen combinacions genotípiques específiques, podria ser possible diferenciar-les mitjançant la determinació de les combinacions genotípiques mencionades.

El 69 % de les combinacions genotípiques presents a les mostres post mortem només es trobaven en l'1 % o el 2 % dels casos. Tanmateix, els principals descobriments que ens va aportar l'anàlisi de les combinacions genotípiques va ser la detecció de la combinació AAAGCC8+K+ específica per a la DCLc i la AAATT77WW específica per a MA.

La combinació AAAATT77WW es va localitzar en el 19 % dels casos de MA post mortem i no es va trobar en cap altra malaltia ni en controls. Cal destacar que les mostres de MA portadores de la combinació AAAATT77WW presentaven un augment de l'expressió significatiu d'ambdues VS majoritàries, VS3 i VS4, en còrtex frontal en comparació amb les mostres no-portadores d'aquesta combinació genotípica. Aquest augment era més pronunciat en el cas de VS4. La sobreexpressió de VS3 podria estar relacionada amb un augment de la hidròlisi d'acetilcolina en el còrtex frontal d'aquesta malaltia. VS4 és una proteïna curta, però conté dos dominis funcionals, un dels quals és responsable de la tetramerització de BChE. Si la seva sobreexpressió augmenta la formació de tetràmers defectuosos seguit per l'alteració de la seva activitat, s'haurà de determinar en estudis posteriors.

L'estudi fet a partir de pacients amb MA va revelar un nombre molt baix de portadors de la combinació genotípica AAAATT77WW, concretament el 2,2 %. Aquesta disminució podria ser deguda a les característiques dels dos grups de mostres. Mentre que les mostres post mortem disposaven d'un diagnòstic definitiu, basat en els canvis neuropatològics en els cervells afectats, els pacients van ser diagnosticats seguint criteris diagnòstics que avaluen els símptomes presents en cada un d'ells. Tenint en compte, a més, que els pacients es van diagnosticar fa més de vuit anys, durant els quals s'han establert nous criteris diagnòstics per la DCL, la freqüència real d'aquesta combinació genotípica de MA s'hauria de determinar en un grup de pacients amb un diagnòstic recent.

El fet que aquesta combinació es va trobar també en un 3 % de les mostres control no és necessàriament contradictori, ja que aquests individus control en el moment de fer l'estudi no estaven afectats per la malaltia o no en presentaven els símptomes clínics. Tanmateix, no es pot descartar la possibilitat que aquests individus desenvolupin la malaltia en un futur (Paisan-Ruiz, *et al*, 2009). Tot i això, la dràstica disminució de les freqüències de la combinació AAAATT77WW fins molt per sota del 10 % no permet utilitzar aquesta combinació genotípica com a biomarcador.



D'altra banda, el 17 % de les mostres amb DCLc eren portadores de la combinació AAAGCC8+K+, que no estava present en els altres grups analitzats. Aquesta podia ser molt útil per al diagnòstic diferencial de la DCL, que actualment és erroni amb freqüència a causa del solapament simptomatològic entre aquesta malaltia i la MA. Cal destacar que les mostres portadores de AAAGCC8+K+ presentaven una disminució significativa de l'expressió de VS3 en el còrtex frontal, però no mostraven canvis en VS4 en comparació amb la resta de mostres de DCLc no portadores de la combinació específica. Per determinar quin efecte produeix la dràstica disminució de VS3 en aquests pacients amb DCL caldran noves investigacions.

A l'estudi poblacional fet a partir de pacients amb diagnòstic clínic, la combinació genotípica AAAGCC8+K+ va ser detectada únicament en un 5 % dels casos de MA. La revisió dels diagnòstics clínics dels onze pacients portadors de la combinació genotípica va revelar que tots ells presentaven símptomes compatibles amb el diagnòstic clínic de DCL possible o probable. Els pacients inclosos en aquest treball van ser diagnosticats entre el 1998 i el 2002. Des d'aleshores els criteris diagnòstics de la DCL han variat i, per tant, és possible que entre el 20–40 % dels pacients no patissin MA, sinó DCL. Això significaria que la combinació genotípica AAAGCC8+K+ estaria present en el 14–28 % dels pacients amb DCL. Tal com ja s'ha mencionat anteriorment, la DCL és una malaltia molt heterogènia. D'una banda, encara no s'han detectat gens responsables del desenvolupament de la malaltia i, de l'altra, neuropatològicament es distingeixen dos tipus de DCL. Aquests fets indiquen que és molt difícil descobrir un únic biomarcador útil per al diagnòstic de la malaltia. Per això, la combinació AAAGCC8+K+, tot i que es troba en un percentatge baix, podria ser un biomarcador vàlid per detectar almenys entre una cinquena i una quarta part de tots els pacients. Per tant, podria ser una nova eina útil per al diagnòstic diferencial de la DCL. Aquesta permetria un diagnòstic més àgil, econòmic i precís d'aquesta malaltia. Tot i això, per demostrar definitivament i confirmar que la combinació genotípica AAAGCC8+K+ és un biomarcador genètic per a la DCL cal validar tots aquests resultats a un major nombre de mostres i en poblacions procedents de diferents àrees geogràfiques.

Un altre resultat significatiu que cal destacar és la coocurrència dels genotips KW de la variant-K i el genotip 7/7 de la poliT descoberta al promotor de BChE. Aquesta es trobava en el 22 % de les DCL i en cap cas ni en els controls ni en la MA. 77/KW, igual que AAAGCC8+K+, provoca una disminució, però encara més pronunciada, de l'expressió de VS3 en el còrtex frontal de la DCL, però no de VS4. Tot això indica que

les combinacions genotípiques no només són malaltia específiques, sinó que, a més, modifiquen l'expressió de BChE al cervell.

En l'estudi posterior es va localitzar la combinació genotípica 77/KW en un 19 % dels pacients amb MA. La revisió de les històries clíniques dels 42 pacients amb MA 77/KW va revelar que la majoria d'elles presentaven símptomes compatibles amb DCL possible o probable. Com que entre el 20–40 % dels pacients podrien patir DCL, la freqüència de la combinació 77/KW augmentaria fins al 40–80 % en aquest grup de pacients. Però la combinació 77/KW també va ser detectada amb freqüències similars, tant a la MP, a l'AMS com als controls. La presència de la combinació en controls es podria explicar suposant que alguns d'ells estiguessin predisposats a desenvolupar la malaltia en un futur. Tanmateix, a causa de la seva àmplia distribució, no es pot utilitzar 77/KW com a marcador diagnòstic.

Tenint en compte totes les dades discutides anteriorment juntament amb l'elevada sensibilitat diagnòstica que presenta, sembla plausible proposar l'algoritme diagnòstic següent (figura 27). Als pacients diagnosticats com a probable o possible MA o probable o possible DCL, se'ls realitzarà una extracció de sang i es genotiparan els polimorfismes del promotor de BChE, així com la variant-K. L'avaluació dels genotips obtinguts permetran confirmar el diagnòstic de DCL en el cas de ser portadors de la combinació genotípica AAAGCC8+K+ (figura 27). En el cas de ser portadors d'altres combinacions genotípiques, caldrà fer proves complementàries, com per exemple EEG, neuroimatge estructural (CT i MRI) o neuroimatge funcional (SPECT i PET) (figura 27). A més, un estudi recent recomana la utilització de SPECT i escintigrafia MIBG per millorar el diagnòstic de DCL (Tateno, *et al*, 2009).

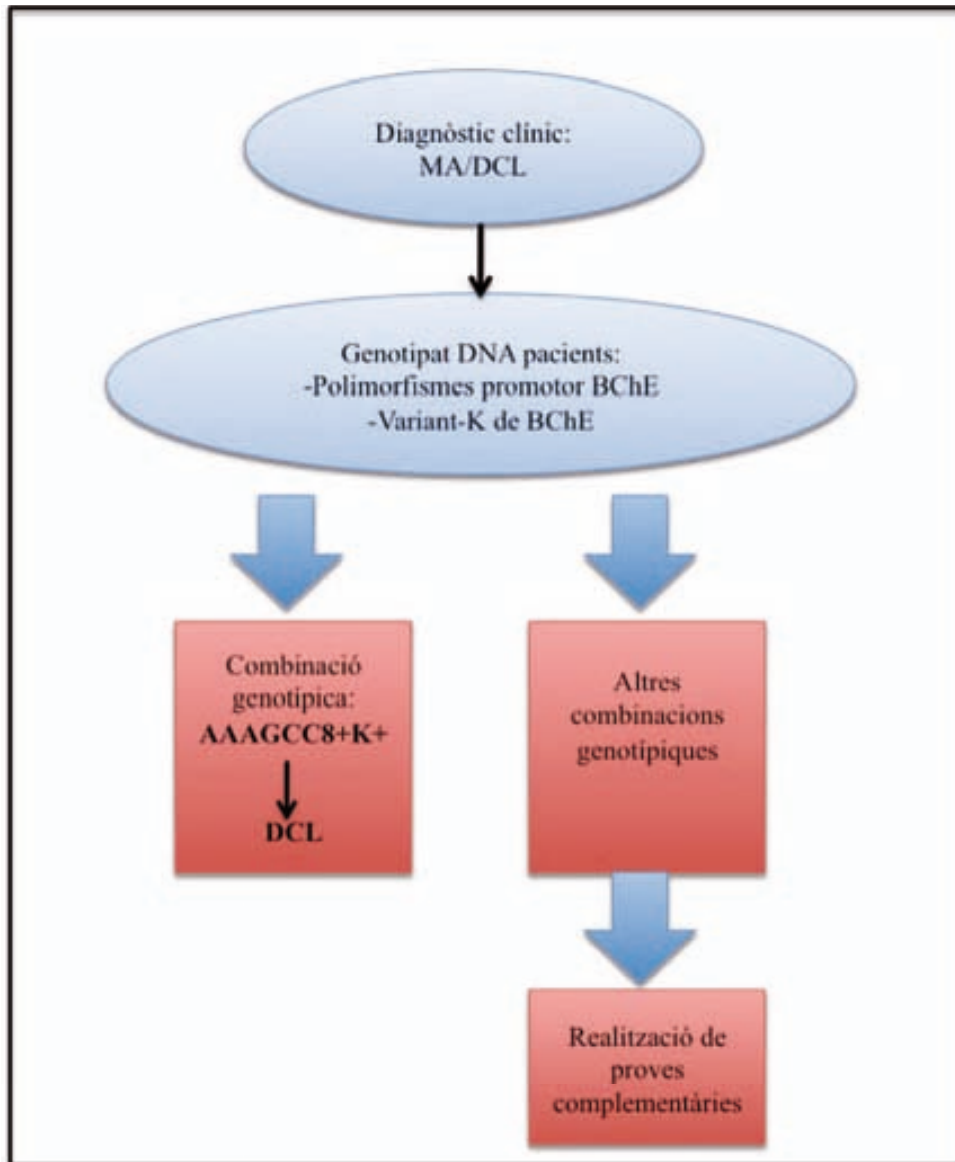


Figura 27. Proposta d'un logaritme diagnòstic derivat dels resultats obtinguts del genotipat de BChE.

Actualment no es disposen de biomarcadors per a les DCL que permetin diferenciar aquesta malaltia de la resta de demències (Aarsland, *et al*, 2008). A més, els criteris per al diagnòstic de la DCL presenten una sensibilitat baixa. L'algoritme diagnòstic proposat aquí seria un biomarcador vàlid i ajudaria a diagnosticar correctament almenys una part dels malalts amb DCL. A més, cal destacar que aquest mètode és ràpid, econòmic i fàcil de realitzar ja que només es necessita una mostra de sang i un laboratori amb l'equipament bàsic per a fer l'extracció de DNA i el seu genotipatge. En canvi, els altres tests utilitzats actualment per al diagnòstic de la DCL, com les proves

de neuroimatge són cars i sovint amb resultats no conclouents per diagnosticar aquestes malalties.

Similarment al gen AChE (Grisaru, *et al*, 1999) o a altres gens implicats en les sinucleïnopaties (Beyer, *et al*, 2008) del gen de BChE també es generen diferents transcrits mitjançant el *splicing* alternatiu. Les seqüències de les VS de BChE estan descrites a la web: [www.genecards.org](http://www.genecards.org), la qual recull una àmplia informació sobre un gran nombre de gens estudiats.

VS3 és la variant de *splicing* majoritària, dona lloc a la proteïna que més s'ha estudiat i la seva seqüència codificant està formada pels exons 2, 4 i 6. VS1 a part d'aquests tres exons presenta la inserció de l'exó 5, el qual conté un codó STOP prematur al seu inici. El resultat de la traducció de l'mRNA corresponent seria una proteïna truncada, formada pels exons 2 i 4. VS2 es caracteritza per la inserció d'un altre exó addicional, l'exó 3, que també conté un codó STOP, llavors la seqüència codificant estaria constituïda per la regió corresponent als exons 2 i 3. Finalment, hi ha una quarta variant, VS4, que és la més curta i la seva seqüència codificant està formada per part de l'exó 4 i el 6.

La proteïna majoritària de BChE, corresponent al transcrit VS3, està constituïda per 574 aminoàcids i conté a la regió N-terminal el lloc actiu de BChE o també anomenat PAS. En aquesta part és on s'hidrolitza l'acetilcolina. A la regió C-terminal s'ha localitzat el domini de tetramerització de BChE, que és l'encarregat de constituir les formes G<sub>4</sub>. En aquesta mateixa part de la proteïna es troba, a més, la regió responsable d'atenuar el procés de formació de fibril·les del  $\beta$ -amiloide i el polimorfisme corresponent a la variant-K.

L'expressió de l'mRNA de VS3, analitzada per PCR a temps real en còrtex frontal, còrtex temporal, nucli caudat i cerebel, va revelar una expressió diferencial en les diferents àrees i malalties, amb una disminució especial de l'expressió al còrtex temporal tant en la DCLc com en la MA. Aquests resultats indiquen que BChE podria exercir funcions específiques en les diferents àrees cerebrals estudiades, i que la seva disfunció podria estar implicada en el desenvolupament de les diferents malalties. La marcada disminució de VS3 al còrtex temporal té lloc justament en les dues malalties relacionades amb patologia d'Alzheimer, la MA i la DCLc. Aquesta àrea es caracteritza per una marcada denervació colinèrgica en la MA (Lane, *et al*, 2006), que podria tenir lloc també a la DCLc.

La proteïna derivada del transcrit de VS4 està constituïda només per 64 aminoàcids i conté els dominis de tetramerització i d'atenuació del procés de formació de fibril·les del  $\beta$ -amiloide, però hi manca el lloc actiu de BChE. Encara que la traducció d'aquesta variant proteica no s'ha investigat, en nombrosos estudis *in vitro* s'han utilitzat pèptids sintètics per analitzar els processos de tetramerització i atenuació de formació de  $\beta$ -amiloide. Diamant i col·laboradors van crear un pèptid sintètic de 41 aminoàcids corresponent a la regió C-terminal i van observar que aquest era capaç de suprimir el procés de formació de fibril·les de manera dosi dependent (Diamant, *et al*, 2006). La similitud entre el pèptid sintètic i VS4 ens permet predir que aquesta variant s'encarrega d'inhibir la formació de  $\beta$ -amiloide que, segons altres estudis, és major en dímers i tetràmers que en monòmers (Podoly, *et al*, 2009).

Tenint en compte els estudis anteriorment mencionats, VS4 podria ser una forma protectora sobretot enfront de la MA, ja que inhibiria la formació de fibres de  $\beta$ -amiloide i no hidrolitzaria acetilcolina, la qual cosa permetria que aquesta restés més temps a l'espai presinàptic. Principalment, crida l'atenció l'augment d'expressió de VS4 observat al còrtex frontal a la DCLp, a la MP i a l'AMS, en comparació amb els controls. Curiosament, justament aquestes tres malalties no presenten canvis neuropatològics relacionats amb patologia  $\beta$ -amiloide, sinó relacionats amb patologia  $\alpha$ -sinucleïna. Però també a la MA s'ha observat un augment d'expressió de VS4, el qual no era significatiu a causa d'un rang de desviació estàndard molt ampli. D'una banda, aquesta dada corrobora que la MA està constituïda per un grup de malalties on diferents mecanismes moleculars són responsables del desenvolupament de canvis neuropatològics similars. Tot i que els individus portadors de la combinació genotípica AAAATT77WW es caracteritzen per la sobreexpressió d'aquesta variant de *splicing*, hi ha un altre grup de mostres que presenta una sobreexpressió de VS4 encara més pronunciada, però independent del genotip de BChE. Aquests dos grups d'expressió corresponen aproximadament a la meitat de les mostres, mentre la resta de les mostres exhibeixen nivells d'expressió de VS4 fins a deu vegades inferiors. D'altra banda, pel grup de baixa expressió de VS4, els seus nivells disminuïts podrien representar un factor de risc de patir la MA. El fet que dos grups de pacients tinguin nivells elevats de VS4, a més, indica que altres factors intervenen en l'augment de la formació del  $\beta$ -amiloide.

A més a més, en l'expressió de VS4 s'ha observat una desviació estàndard elevada en la majoria d'àrees cerebrals i malalties estudiades. Aquest fet es podria explicar per l'existència de diferents grups d'expressió causats per la presència de factors genètics capaços de modificar l'expressió de VS4 o també, l'eficiència del *splicing* alternatiu. A més, l'elevada desviació estàndard juntament amb els resultats obtinguts reforcen el fet que totes les malalties aquí estudiades presenten molta heterogeneïtat i mostren una variabilitat alta entre pacients d'una mateixa malaltia. Aquesta heterogeneïtat ja s'aprecia als resultats de l'expressió de VS3 i VS4 en funció de les combinacions genotípiques específiques (AAAGCC8+K+, 77/KW o AAAATT77WW), on es distingeixen uns nivells d'expressió clarament diferenciats entre els individus portadors d'alguna combinació i la resta de pacients de la mateixa malaltia.

Les proteïnes derivades dels transcrits VS1 i VS2 són més curtes que el transcrit complet (534 aminoàcids i 497 aminoàcids, respectivament), posseeixen el lloc actiu de BChE, però els manca la regió encarregada de l'atenuació del procés de formació de fibril·les del  $\beta$ -amiloide, així com el domini de tetramerització de BChE. Tant VS1 com VS2 són transcrits d'expressió molt baixa, així que es van estimar canvis d'expressió relatius entre tots dos en els diferents grups. Dades recollides al web [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) apunten que els mRNA corresponents a aquestes dues variants de *splicing* poden patir una degradació mitjançant *nonsense mediated decay*, un mecanisme cel·lular que evita la síntesi de proteïnes no funcionals. Tanmateix, els nostres resultats indiquen que els mRNA d'ambdós transcrits són detectables almenys durant cert temps. Tanmateix, es van detectar canvis a la ràtio VS2/VS1, que era major al còrtex frontal de DCLp, DCLc i MP que als controls. L'augment d'aquesta ràtio correspondria a un augment relatiu de VS2 en aquestes malalties, ja sigui a causa d'un increment de l'expressió del mateix VS2 o a una disminució de VS1. En el cas que es transcrivís l'mRNA a proteïna VS2, aquesta estaria constituïda per la seqüència corresponent a l'exó 2 que conté el lloc actiu de la proteïna i la seqüència corresponent a l'exó 3. Com que només aquesta variant proteica conté l'exó 3, aquest exó addicional podria provocar canvis estructurals a la proteïna VS2, de tal manera que el seu lloc actiu hidrolitzés més eficaçment l'acetilcolina. A més, cal afegir que a VS1 i VS2 els manca el domini de tetramerització necessari per generar les formes  $G_4$  i potser per aquest motiu, les formes  $G_1$  es degraden amb més facilitat i són més difícils de detectar. Cal afegir que al cerebel la ràtio VS2/VS1 era inferior a la DCLp i DCLc que als controls. Per tant, tots els resultats obtinguts en aquest experiment corroboren una vegada més la presència i probablement

també la funció diferencial de BChE en les diferents àrees cerebrals i la seva influència en el desenvolupament de les diferents malalties.

És important destacar que set mostres de còrtex frontal i sis de cerebel no expressaven VS2, fet que reforça dues observacions fetes anteriorment: les malalties aquí estudiades són molt heterogènies, i els RNA de les formes minoritàries podrien traduir-se i exercir alguna funció.

L'anàlisi d'expressió de les diferents VS de BChE en nou àrees cerebrals procedents d'un individu control i de dues àrees corticals de fetus va revelar nivells similars de VS3 i VS4 a totes les àrees cerebrals. En canvi, l'expressió de VS1 i VS2 estava especialment disminuïda a la substància negra. A més, VS1 s'expressava menys al còrtex temporal i VS2 al cerebel. Els estudis realitzats fins a l'actualitat analitzen la distribució de la variant de *splicing* majoritària de BChE, VS3, sense tenir en compte les tres variants de *splicing* addicionals, i reporten que VS3 s'expressa principalment a les neurones d'àrees relacionades amb funcions cognitives (Manoharan, *et al*, 2007).

Ambdues àrees cerebrals de fetus estudiades presentaven nivells elevats de les quatre VS de BChE. Els resultats obtinguts per a VS3 concorden amb estudis previs on es postulava que BChE apareixia de manera primerenca al desenvolupament, fins i tot abans que els transcrits d'AChE (Jbilo, *et al*, 1994b). Altres investigacions realitzades en embrions de pollastre concretaven que BChE apareixia just abans de l'última mitosi i seguidament s'expressava AChE, la qual cosa suggereix que BChE podria participar en l'expressió d'AChE (Boopathy i Layer, 2004; Layer, 1991).

L'anàlisi de l'expressió de les quatre VS de BChE en diferents teixits no neuronals va revelar un patró d'expressió determinat per a cada VS. Mentre que en sang no es va poder detectar l'mRNA de cap de les quatre VS, al fetge es van trobar els nivells més elevats de mRNA de totes les VS. Aquests resultats concorden amb la literatura, on es postula que la proteïna de BChE és sintetitzada al fetge. Posteriorment, la proteïna és alliberada al torrent sanguini, on no sembla expressar-se al nivell d'mRNA (Chatonnet i Lockridge, 1989).

A més, VS3 s'expressava a tots els teixits inclosos en l'estudi, excepte a la mama, i a nivells baixos a la pell i el ronyó. En canvi, VS1 només es detectava a l'úter; VS2 a l'úter i el pulmó i a nivells més baixos a la pell, la pròstata, el cor i la mama. Finalment, VS4 s'expressava a tots els teixits, però a nivells baixos a la mama, el ronyó, el múscul i la pell. Aquests resultats indiquen que VS1 i VS2 tienen una funció relacionada, com també VS3 i VS4, ja que la seva distribució de l'expressió és similar. A més, les dues

VS minoritàries presenten un patró d'expressió teixit específic que també aquí sembla que indica que poden exercir alguna funció determinada i que possiblement aquests mRNA són traduïts a proteïna.

Per finalitzar aquest treball, es va fer immunohistoquímica per determinar la presència de BChE als cossos de Lewy. Aquests cossos d'inclusió van ser localitzats mitjançant  $\alpha$ -sinucleïna i la possible colocalització de BChE va ser analitzada utilitzant mètodes de doble tinció. La positivitat epitelial observada ja va ser descrita per Darvesh i col·laboradors (Darvesh, *et al*, 2003), que també apunten que BChE es troba associada primerament a les cèl·lules glials, així com a les cèl·lules endotel·lials i a les neurones (Darvesh, *et al*, 2003; Greig, *et al*, 2005).

El procés de formació de plaques de  $\beta$ -amiloide està constituït per tres etapes de maduració, a l'etapa inicial hi ha dipòsits difusos de  $\beta$ -amiloide. Però la inserció de BChE a les plaques esdevé anys després de la primera etapa i sembla que participa en la maduració dels dipòsits de  $\beta$ -amiloide inerts a plaques compactes associades amb degeneració neurítica i demència (Guillozet, *et al*, 1997). Com a conseqüència, l'expressió de BChE augmenta substancialment a la MA, a més, BChE també es troba als cabdells neurofibril·lars i als vasos amb angiopatia amiloide (Guillozet, *et al*, 1997). A la DCL, la formació dels cossos de Lewy també té lloc en diverses etapes. Aquesta similitud podria indicar la possible localització de BChE també en aquests cossos d'inclusió. Tanmateix, el doble immunomarcatge amb BChE i  $\alpha$ -sinucleïna va revelar que aquestes dues proteïnes no colocalitzen i, per tant, que BChE no es troba als cossos de Lewy.

Les sinucleïnopaties, similarment a altres malalties neurodegeneratives, són molt heterogènies i cada malaltia posseeix unes elevades variabilitats genotípica i fenotípica. Sovint, un elevat percentatge de DCL és diagnosticat clínicament com a MA i, com a conseqüència, no s'aplica el tractament adequat.

Aquesta tesi pretén col·laborar en el diagnòstic correcte de la DCL mitjançant la utilització de la combinació genotípica específica AAAGCC8+K+, identificada en una part dels pacients que pateixen aquesta malaltia. D'aquesta manera es contribueix a avançar una mica més en el coneixement de les sinucleïnopaties i el paper que hi juga la BChE. Per garantir la utilització de la combinació genotípica com a biomarcador en la pràctica clínica, aquesta ha estat patentada amb el títol "Genetic marker for the diagnosis of dementia with Lewy bodies" (número de sol·licitud: P1589EP01).





**6. Conclusions**



1. L'al·lel K de la variant-K de la BChE es troba acumulat a la DCLp, a la DCLc, a la MP, a l'AMS i a la MA en comparació amb els controls.
2. Els polimorfismes descoberts en el promotor de BChE juguen un paper determinat en el desenvolupament de la DCL, ja sigui com a marcadors genètics o com a moduladors dels nivells d'expressió d'aquest enzim.
3. Les mostres post mortem de DCLc, MA i controls es poden distingir a partir de la seva genètica en el locus de BChE.
4. Els pacients amb MA, AMS i els controls també es distingeixen a partir de la seva genètica en el locus de BChE.
5. La combinació genotípica AAAGCC8+K+ està formada pels polimorfismes descoberts al promotor juntament amb la variant-K, és específica per a la DCL i pot ser una eina útil en el diagnòstic diferencial del 14-28 % de pacients que pateixen aquesta malaltia.
6. L'expressió d'mRNA de VS3 i VS4 en el còrtex frontal, el còrtex temporal, el nucli caudat i el cerebel presenta un patró d'expressió característic a cada una de les sinucleïnopaties i a la MA.
  - 6.1 L'expressió de VS3 està marcadament disminuïda en el còrtex temporal de pacients amb DCLc i MA.
  - 6.2 VS4 està sobreexpressada en el còrtex frontal de totes les sinucleïnopaties.
7. Els portadors de les combinacions genotípiques específiques, AAAATT77WW en MA així com AAAGCC8+K+ en DCL constitueixen subgrups de cada una de les dues malalties.
  - 7.1 El subgrup de MA que es distingeix per la combinació genotípica AAAATT77WW sobreexpressa VS3 i VS4.
  - 7.2 El subgrup de DCL constituït pels portadors de la combinació genotípica

## 6. Conclusions

---

AAAGCC8+K+ està caracteritzat per una disminució de l'expressió de VS3.

7.3 En el subgrup de DCL que conté els portadors de 77/KW, l'expressió de VS3 està marcadament disminuïda.

8. Tots els resultats obtinguts en aquesta tesi corroboren l'elevada heterogeneïtat característica de totes aquestes malalties.
9. BChE no es troba als cossos de Lewy.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing numerous blue-stained nuclei and brown-stained areas. The blue staining highlights the nuclei of various cells, while the brown staining indicates the presence of certain pigments or structures within the tissue. The overall appearance is that of a dense cellular structure with significant staining contrast.

# **Referències bibliogràfiques**



Consensus report of the working group on: "molecular and biochemical markers of alzheimer's disease". the ronald and nancy reagan research institute of the alzheimer's association and the national institute on aging working group. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 109-16.

Aarsland D, Kurz M, Beyer M, Bronnick K, Piepenstock Nore S, Ballard C. Early discriminatory diagnosis of dementia with lewy bodies. the emerging role of CSF and imaging biomarkers. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008; 25: 195-205.

Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 293-348.

Abele M, Burk K, Schols L, Schwartz S, Besenthal I, Dichgans J, et al. The aetiology of sporadic adult-onset ataxia. *Brain* 2002; 125: 961-8.

Alcantara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Picheth G, Vieira MM. Frequency of the CHE1\*K allele of serum cholinesterase in a sample from southern brazil. *Hum Hered* 1990; 40: 386-90.

Alvarez-Arcaya A, Combarros O, Llorca J, Sanchez-Guerra M, Berciano J, Fernandez-Viadero C, et al. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic alzheimer's disease in women. *Acta Neurol Scand* 2000; 102: 350-3.

Alvarez A, Opazo C, Alarcon R, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol* 1997; 272: 348-61.

Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. *J Neurochem* 2000; 74: 869-77.

Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Aldudo J, et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 1998; 421: 105-8.

## Referències bibliogràfiques

---

Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde". *Clin Anat* 1995; 8: 429-31.

Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* 2005; 563: 23-60.

Arendt T, Bruckner MK, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms. *Neurochem Int* 1992; 21: 381-96.

Ariga T, McDonald MP, Yu RK. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of alzheimer's disease--a review. *J Lipid Res* 2008; 49: 1157-75.

Babaoglu MO, Ocal T, Bayar B, Kayaalp SO, Bozkurt A. Frequency and enzyme activity of the butyrylcholinesterase K-variant in a turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 59: 875-7.

Bailey JA, Lahiri DK. A novel effect of rivastigmine on presynaptic proteins and neuronal viability in a neurodegeneration model of fetal rat primary cortical cultures and its implication in alzheimer's disease. *J Neurochem* 2009.

Ballard C, Morris C, Kalaria R, McKeith I, Perry R, Perry E. The k variant of the butyrylcholinesterase gene is associated with reduced phosphorylation of tau in dementia patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 19: 357-60.

Barber R, McKeith I, Ballard C, O'Brien J. Volumetric MRI study of the caudate nucleus in patients with dementia with lewy bodies, alzheimer's disease, and vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 406-7.

Barber R, Ballard C, McKeith IG, Gholkar A, O'Brien JT. MRI volumetric study of dementia with lewy bodies: A comparison with AD and vascular dementia. *Neurology* 2000; 54: 1304-9.

Bartels CF, James K, La Du BN. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1104-14.



Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 407-16.

Basun H, Nilsberth C, Eckman C, Lannfelt L, Younkin S. Plasma levels of Abeta42 and Abeta40 in alzheimer patients during treatment with the acetylcholinesterase inhibitor tacrine. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002; 14: 156-60.

Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, et al. Unified staging system for lewy body disorders: Correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 613-34.

Beyer K, Ariza A. Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: Commonalities and differences. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 965-74.

Beyer K, Domingo-Sabat M, Lao JJ, Carrato C, Ferrer I, Ariza A. Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in lewy body diseases. *Neurogenetics* 2008; 9: 15-23.

Bhanumathy CD, Balasubramanian AS. Evidence for a zn(2+)-binding site in human serum butyrylcholinesterase. *Biochem J* 1996; 315 ( Pt 1): 127-31.

Blennow K. CSF biomarkers for alzheimer's disease: Use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 661-72.

Boopathy R, Layer PG. Aryl acylamidase activity on acetylcholinesterase is high during early chicken brain development. *Protein J* 2004; 23: 325-33.

Borroni B, Grassi M, Costanzi C, Archetti S, Caimi L, Padovani A. APOE genotype and cholesterol levels in lewy body dementia and alzheimer disease: Investigating genotype-phenotype effect on disease risk. *Am J Geriatr Psychiatry* 2006; 14: 1022-31.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-59.

Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121-34.

## Referències bibliogràfiques

---

Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K. Stanley fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 2006; 21: 2042-51.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197-211.

Braak H, Muller CM, Rub U, Ackermann H, Bratzke H, de Vos RA, et al. Pathology associated with sporadic parkinson's disease--where does it end? *J Neural Transm Suppl* 2006; (70): 89-97.

Briel RC, McKeith IG, Barker WA, Hewitt Y, Perry RH, Ince PG, et al. EEG findings in dementia with lewy bodies and alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 401-3.

Brouwers N, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of alzheimer's disease: An update. *Ann Med* 2008; 40: 562-83.

Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 2005; 93: 769-92.

Bullock R, Lane R. Executive dyscontrol in dementia, with emphasis on subcortical pathology and the role of butyrylcholinesterase. *Curr Alzheimer Res* 2007; 4: 277-93.

Burn DJ, Jaros E. Multiple system atrophy: Cellular and molecular pathology. *Mol Pathol* 2001; 54: 419-26.

Burton EJ, Karas G, Paling SM, Barber R, Williams ED, Ballard CG, et al. Patterns of cerebral atrophy in dementia with lewy bodies using voxel-based morphometry. *Neuroimage* 2002; 17: 618-30.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601.

Calzetti S, Bortone E, Negrotti A, Zinno L, Mancina D. Frontal intermittent rhythmic delta activity (FIRDA) in patients with dementia with lewy bodies: A diagnostic tool? *Neurol Sci* 2002; 23 Suppl 2: S65-6.

Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, et al. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of alzheimer's disease. *Proteomics* 2003; 3: 1486-94.

Chatonnet A, Masson P. Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase? *Biochimie* 1986; 68: 657-67.

Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 1989; 260: 625-34.

Checler F, Grassi J, Vincent JP. Cholinesterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities. *J Neurochem* 1994; 62: 756-63.

Chrysostome V, Tison F, Yekhlief F, Sourgen C, Baldi I, Dartigues JF. Epidemiology of multiple system atrophy: A prevalence and pilot risk factor study in aquitaine, france. *Neuroepidemiology* 2004; 23: 201-8.

Clark CM, Pratico D, Shaw LM, Leight S, Xie SX, Gu A, et al. Commentary on "optimal design of clinical trials for drugs designed to slow the course of alzheimer's disease." biochemical biomarkers of late-life dementia. *Alzheimers Dement* 2006; 2: 287-93.

Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Interleukin-1A (-889) genetic polymorphism increases the risk of multiple system atrophy. *Mov Disord* 2003; 18: 1385-6.

Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. Genetic polymorphism of dopamine D2 receptors in parkinson's disease and interactions with cigarette smoking and MAO-B intron 13 polymorphism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 535-7.

Crystal HA, Dickson DW, Lizardi JE, Davies P, Wolfson LI. Antemortem diagnosis of diffuse lewy body disease. *Neurology* 1990; 40: 1523-8.

## Referències bibliogràfiques

---

Darreh-Shori T, Brimijoin S, Kadir A, Almkvist O, Nordberg A. Differential CSF butyrylcholinesterase levels in alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 326-33.

Darreh-Shori T, Modiri N, Blennow K, Baza S, Kamil C, Ahmed H, et al. The apolipoprotein E varepsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiol Aging* 2009.

Darvesh S, Hopkins DA. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 2003; 463: 25-43.

Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 131-8.

Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 1998; 393: 374-90.

Darvesh S, Kumar R, Roberts S, Walsh R, Martin E. Butyrylcholinesterase-mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin. *Cell Mol Neurobiol* 2001; 21: 285-96.

Darvesh S, MacDonald SE, Losier AM, Martin E, Hopkins DA, Armour JA. Cholinesterases in cardiac ganglia and modulation of canine intrinsic cardiac neuronal activity. *J Auton Nerv Syst* 1998; 71: 75-84.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.

De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 2001; 40: 10447-57.

de Leon MJ, DeSanti S, Zinkowski R, Mehta PD, Pratico D, Segal S, et al. Longitudinal CSF and MRI biomarkers improve the diagnosis of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 394-401.

De Luca V, Annesi G, De Marco EV, de Bartolomeis A, Nicoletti G, Pugliese P, et al. HOMER1 promoter analysis in parkinson's disease: Association study with psychotic symptoms. *Neuropsychobiology* 2009; 59: 239-45.

Diamant S, Podoly E, Friedler A, Ligumsky H, Livnah O, Soreq H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8628-33.

Dubovy P, Haninec P. Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo. *Int J Dev Neurosci* 1990; 8: 589-602.

El Fakhri G, Habert MO, Maksud P, Kas A, Malek Z, Kijewski MF, et al. Quantitative simultaneous (99m)tc-ECD/123I-FP-CIT SPECT in parkinson's disease and multiple system atrophy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 87-92.

Evans RT, Wardell J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a caucasian population. *J Med Genet* 1984; 21: 99-102.

Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham JM, Massoulie J, Sanes JR. Genetic analysis of collagen Q: Roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 1999; 144: 1349-60.

Ferman TJ, Boeve BF. Dementia with lewy bodies. *Neurol Clin* 2007; 25: 741,60, vii.

Forno LS. Concentric hyalin intraneuronal inclusions of lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): Relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Soc* 1969; 17: 557-75.

Frank RA, Galasko D, Hampel H, Hardy J, de Leon MJ, Mehta PD, et al. Biological markers for therapeutic trials in alzheimer's disease. proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 521-36.

Furiya Y, Hirano M, Kurumatani N, Nakamuro T, Matsumura R, Futamura N, et al. Alpha-1-antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to multiple system atrophy (MSA). *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 138: 178-81.

## Referències bibliogràfiques

---

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact* 2008; 175: 115-8.

Gai WP, Pountney DL, Power JH, Li QX, Culvenor JG, McLean CA, et al. Alpha-synuclein fibrils constitute the central core of oligodendroglial inclusion filaments in multiple system atrophy. *Exp Neurol* 2003; 181: 68-78.

Garry PJ, Dietz AA, Lubrano T, Ford PC, James K, Rubinstein HM. New allele at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 1976; 13: 38-42.

Gasser T. Genomic and proteomic biomarkers for parkinson disease. *Neurology* 2009; 72: S27-31.

Gerlach M, Hendrich A, Hueber R, Jost W, Winkler J, Woitalla D, et al. Early detection of parkinson's disease: Unmet needs. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 137-9.

Geula C, Mesulam M. Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of alzheimer's disease. *Brain Res* 1989; 498: 185-9.

Geula C, Greenberg BD, Mesulam MM. Cholinesterase activity in the plaques, tangles and angiopathy of alzheimer's disease does not emanate from amyloid. *Brain Res* 1994; 644: 327-30.

Gomez-Ramos P, Bouras C, Moran MA. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brains of aged and alzheimer's disease patients. *Brain Res* 1994; 640: 17-24.

Gomez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz MJ, Cantarero S, Cemillan C, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1218-22.

Gosal D, Ross OA, Toft M. Parkinson's disease: The genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol* 2006; 13: 616-27.

Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and

lowers alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 17213-8.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. Eur J Biochem 1999; 264: 672-86.

Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC, Mesulam MM. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. Ann Neurol 1997; 42: 909-18.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: A follow-up study. Lancet Neurol 2006; 5: 228-34.

Hanyu H, Shimizu S, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T, et al. Differentiation of dementia with lewy bodies from alzheimer's disease using mini-mental state examination and brain perfusion SPECT. J Neurol Sci 2006; 250: 97-102.

Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, et al. Distribution, type, and origin of parkin mutations: Review and case studies. Mov Disord 2004; 19: 1146-57.

Hernandez D, Paisan Ruiz C, Crawley A, Malkani R, Werner J, Gwinn-Hardy K, et al. The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of parkinson's disease but not other neurodegenerative diseases. Neurosci Lett 2005; 389: 137-9.

Holmes C, Ballard C, Lehmann D, David Smith A, Beaumont H, Day IN, et al. Rate of progression of cognitive decline in alzheimer's disease: Effect of butyrylcholinesterase K gene variation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76: 640-3.

Inestrosa NC, Alvarez A, Calderon F. Acetylcholinesterase is a senile plaque component that promotes assembly of amyloid beta-peptide into alzheimer's filaments. Mol Psychiatry 1996a; 1: 359-61.

Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. Neuron 1996b; 16: 881-91.

## Referències bibliogràfiques

---

Infante J, Llorca J, Berciano J, Combarros O. Interleukin-8, intercellular adhesion molecule-1 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and the risk for multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2005; 228: 11-3.

Inouye H, Sharma D, Goux WJ, Kirschner DA. Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. *Biophys J* 2006; 90: 1774-89.

Ito M, Watanabe H, Kawai Y, Atsuta N, Tanaka F, Naganawa S, et al. Usefulness of combined fractional anisotropy and apparent diffusion coefficient values for detection of involvement in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 722-8.

Jbilo O, Toutant JP, Vatsis KP, Chatonnet A, Lockridge O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. *J Biol Chem* 1994a; 269: 20829-37.

Jbilo O, L'Hermite Y, Talesa V, Toutant JP, Chatonnet A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. *Eur J Biochem* 1994b; 225: 115-24.

Jellinger KA. Formation and development of lewy pathology: A critical update. *J Neurol* 2009; 256 Suppl 3: 270-9.

Jellinger KA. A critical reappraisal of current staging of lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 1-16.

Jellinger KA. Alzheimer 100--highlights in the history of alzheimer research. *J Neural Transm* 2006; 113: 1603-23.

Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord* 2003; 18 Suppl 6: S2-12.

Jennings DL, Seibyl JP, Oakes D, Eberly S, Murphy J, Marek K. (123I) beta-CIT and single-photon emission computed tomographic imaging vs clinical evaluation in parkinsonian syndrome: Unmasking an early diagnosis. *Arch Neurol* 2004; 61: 1224-9.



Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of abeta. *Neuron* 2008; 58: 681-93.

Juh R, Pae CU, Lee CU, Yang D, Chung Y, Suh T, et al. Voxel based comparison of glucose metabolism in the differential diagnosis of the multiple system atrophy using statistical parametric mapping. *Neurosci Res* 2005; 52: 211-9.

Kamal MA, Klein P, Yu QS, Tweedie D, Li Y, Holloway HW, et al. Kinetics of human serum butyrylcholinesterase and its inhibition by a novel experimental alzheimer therapeutic, bisnorcymserine. *J Alzheimers Dis* 2006; 10: 43-51.

Kamm C, Healy DG, Quinn NP, Wullner U, Moller JC, Schols L, et al. The fragile X tremor ataxia syndrome in the differential diagnosis of multiple system atrophy: Data from the EMSA study group. *Brain* 2005; 128: 1855-60.

Katona G, Berglund GI, Hajdu J, Graf L, Szilagyi L. Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J Mol Biol* 2002; 315: 1209-18.

Kemp PM, Hoffmann SA, Tossici-Bolt L, Fleming JS, Holmes C. Limitations of the HMPAO SPECT appearances of occipital lobe perfusion in the differential diagnosis of dementia with lewy bodies. *Nucl Med Commun* 2007; 28: 451-6.

Kester MI, Scheltens P. Dementia: The bare essentials. *Pract Neurol* 2009; 9: 241-51.

Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, et al. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial parkinson's disease: Clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* 2005; 128: 2786-96.

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sci* 2003; 72: 2111-6.

Kosaka K, Yoshimura M, Ikeda K, Budka H. Diffuse type of lewy body disease: Progressive dementia with abundant cortical lewy bodies and senile changes of varying degree--a new disease? *Clin Neuropathol* 1984; 3: 185-92.

## Referències bibliogràfiques

---

Kraybill ML, Larson EB, Tsuang DW, Teri L, McCormick WC, Bowen JD, et al. Cognitive differences in dementia patients with autopsy-verified AD, lewy body pathology, or both. *Neurology* 2005; 64: 2069-73.

Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18: 106-8.

Kuhl DE, Koeppe RA, Snyder SE, Minoshima S, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo butyrylcholinesterase activity is not increased in alzheimer's disease synapses. *Ann Neurol* 2006; 59: 13-20.

Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, et al. Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat* 2006; 27: 686-95.

Kurz MW, Larsen JP, Kvaloy JT, Aarsland D. Associations between family history of parkinson's disease and dementia and risk of dementia in parkinson's disease: A community-based, longitudinal study. *Mov Disord* 2006; 21: 2170-4.

Lane R, Feldman HH, Meyer J, He Y, Ferris SH, Nordberg A, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to alzheimer's disease. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 289-98.

Lane RM, He Y. Emerging hypotheses regarding the influences of butyrylcholinesterase-K variant, APOE epsilon 4, and hyperhomocysteinemia in neurodegenerative dementias. *Med Hypotheses* 2009; 73: 230-50.

Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006; 9: 101-24.

Layer PG. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 7-33.

Lee PH, An YS, Yong SW, Yoon SN. Cortical metabolic changes in the cerebellar variant of multiple system atrophy: A voxel-based FDG-PET study in 41 patients. *Neuroimage* 2008; 40: 796-801.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009; 373: 2055-66.

Lehmann DJ, Nagy Z, Litchfield S, Borja MC, Smith AD. Association of butyrylcholinesterase K variant with cholinesterase-positive neuritic plaques in the temporal cortex in late-onset alzheimer's disease. *Hum Genet* 2000; 106: 447-52.

Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet* 1956; 271: 124.

Leverenz JB, Umar I, Wang Q, Montine TJ, McMillan PJ, Tsuang DW, et al. Proteomic identification of novel proteins in cortical lewy bodies. *Brain Pathol* 2007; 17: 139-45.

Leverenz JB, Hamilton R, Tsuang DW, Schantz A, Vavrek D, Larson EB, et al. Empiric refinement of the pathologic assessment of lewy-related pathology in the dementia patient. *Brain Pathol* 2008; 18: 220-4.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-7.

Li B, Duysen EG, Saunders TL, Lockridge O. Production of the butyrylcholinesterase knockout mouse. *J Mol Neurosci* 2006; 30: 193-5.

Liang D, Blouet JP, Borrega F, Bon S, Massoulie J. Respective roles of the catalytic domains and C-terminal tail peptides in the oligomerization and secretory trafficking of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *FEBS J* 2009; 276: 94-108.

Lincoln SJ, Ross OA, Milkovic NM, Dickson DW, Rajput A, Robinson CA, et al. Quantitative PCR-based screening of alpha-synuclein multiplication in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13: 340-2.

## Referències bibliogràfiques

---

Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, et al. Movement disorders society scientific issues committee report: SIC task force appraisal of clinical diagnostic criteria for parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003; 18: 467-86.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in europe: A collaborative study of population-based cohorts. neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology* 2000; 54: S4-9.

Lobotesis K, Fenwick JD, Phipps A, Ryman A, Swann A, Ballard C, et al. Occipital hypoperfusion on SPECT in dementia with lewy bodies but not AD. *Neurology* 2001; 56: 643-9.

Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 1987; 262: 549-57.

Loewenstein-Lichtenstein Y, Schwarz M, Glick D, Norgaard-Pedersen B, Zakut H, Soreq H. Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in 'atypical' BCHE carriers. *Nat Med* 1995; 1: 1082-5.

Londos E, Passant U, Brun A, Rosen I, Risberg J, Gustafson L. Regional cerebral blood flow and EEG in clinically diagnosed dementia with lewy bodies and alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 2003; 36: 231-45.

Lopez OL, Becker JT, Kaufer DI, Hamilton RL, Sweet RA, Klunk W, et al. Research evaluation and prospective diagnosis of dementia with lewy bodies. *Arch Neurol* 2002; 59: 43-6.

Luis CA, Barker WW, Gajjaraj K, Harwood D, Petersen R, Kashuba A, et al. Sensitivity and specificity of three clinical criteria for dementia with lewy bodies in an autopsy-verified sample. *Int J Geriatr Psychiatry* 1999; 14: 526-33.

Mack A, Robitzki A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: An antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog Neurobiol* 2000; 60: 607-28.

Manoharan I, Kuznetsova A, Fisk JD, Boopathy R, Lockridge O, Darvesh S. Comparison of cognitive functions between people with silent and wild-type butyrylcholinesterase. *J Neural Transm* 2007; 114: 939-45.

Maraganore DM, Wilkes K, Lesnick TG, Strain KJ, de Andrade M, Rocca WA, et al. A limited role for DJ1 in parkinson disease susceptibility. *Neurology* 2004; 63: 550-3.

Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, et al. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1223-31.

Masson P, Xie W, Froment MT, Levitsky V, Fortier PL, Albaret C, et al. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1433: 281-93.

Massoulie J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 2002; 11: 130-43.

Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31-91.

Mateo I, Llorca J, Infante J, Rodriguez-Rodriguez E, Berciano J, Combarros O. Gene-gene interaction between 14-3-3 zeta and butyrylcholinesterase modulates alzheimer's disease risk. *Eur J Neurol* 2008; 15: 219-22.

McFarland MA, Ellis CE, Markey SP, Nussbaum RL. Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent alpha-synuclein protein interactions. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 2123-37.

McGehee DS, Krasowski MD, Fung DL, Wilson B, Gronert GA, Moss J. Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *Anesthesiology* 2000; 93: 510-9.

## Referències bibliogràfiques

---

McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, Van der Spek AF, et al. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 953-7.

McKeith I, O'Brien J, Walker Z, Tatsch K, Booij J, Darcourt J, et al. Sensitivity and specificity of dopamine transporter imaging with 123I-FP-CIT SPECT in dementia with lewy bodies: A phase III, multicentre study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 305-13.

McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, et al. Dementia with lewy bodies. *Lancet Neurol* 2004; 3: 19-28.

McKeith IG, Ballard CG, Perry RH, Ince PG, O'Brien JT, Neill D, et al. Prospective validation of consensus criteria for the diagnosis of dementia with lewy bodies. *Neurology* 2000; 54: 1050-8.

McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with lewy bodies: Third report of the DLB consortium. *Neurology* 2005; 65: 1863-72.

McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, et al. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 1996; 47: 1113-24.

Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and alzheimer brain. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 88-93.

Mesulam MM, Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol* 1994; 36: 722-7.

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002; 110: 627-39.

Metzler-Baddeley C. A review of cognitive impairments in dementia with lewy bodies relative to alzheimer's disease and parkinson's disease with dementia. *Cortex* 2007; 43: 583-600.

Millard CB, Broomfield CA. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 1280-6.

Munoz FJ, Inestrosa NC. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of abeta peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett* 1999; 450: 205-9.

Nachon F, Nicolet Y, Viguié N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: Expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem* 2002; 269: 630-7.

Nakamura S, Kawamata T, Akiguchi I, Kameyama M, Nakamura N, Kimura H. Expression of monoamine oxidase B activity in astrocytes of senile plaques. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 419-25.

Neef D, Walling AD. Dementia with lewy bodies: An emerging disease. *Am Fam Physician* 2006; 73: 1223-9.

Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 2003; 278: 41141-7.

Nishie M, Mori F, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 546-54.

Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang YL, Hara Y, et al. Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 176-83.

## Referències bibliogràfiques

---

Nishimura M, Kawakami H, Komure O, Maruyama H, Morino H, Izumi Y, et al. Contribution of the interleukin-1beta gene polymorphism in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2002; 17: 808-11.

Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 298-309.

Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, et al. Beta-synuclein gene alterations in dementia with lewy bodies. *Neurology* 2004; 63: 805-11.

Olsson A, Vanderstichele H, Andreasen N, De Meyer G, Wallin A, Holmberg B, et al. Simultaneous measurement of beta-amyloid(1-42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem* 2005; 51: 336-45.

Ozawa T. Morphological substrate of autonomic failure and neurohormonal dysfunction in multiple system atrophy: Impact on determining phenotype spectrum. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 201-11.

Ozawa T. Pathology and genetics of multiple system atrophy: An approach to determining genetic susceptibility spectrum. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 531-8.

Ozawa T, Takano H, Onodera O, Kobayashi H, Ikeuchi T, Koide R, et al. No mutation in the entire coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1999; 270: 110-2.

Paisan-Ruiz C, Washecka N, Nath P, Singleton AB, Corder EH. Parkinson's disease and low frequency alleles found together throughout LRRK2. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 391-403.

Pan S, Zhang H, Rush J, Eng J, Zhang N, Patterson D, et al. High throughput proteome screening for biomarker detection. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 182-90.

Papp MI, Lantos PL. The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. *Brain* 1994; 117 ( Pt 2): 235-43.



Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and shy-drager syndrome). *J Neurol Sci* 1989; 94: 79-100.

Perrier AL, Massoulie J, Krejci E. PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 2002; 33: 275-85.

Perry E, McKeith I, Ballard C. Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with lewy bodies. *Neurology* 2003; 60: 1852-3.

Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1978; 4: 273-7.

Piggott MA, Marshall EF, Thomas N, Lloyd S, Court JA, Jaros E, et al. Striatal dopaminergic markers in dementia with lewy bodies, alzheimer's and parkinson's diseases: Rostrocaudal distribution. *Brain* 1999; 122 ( Pt 8): 1449-68.

Plotkin M, Amthauer H, Klaffke S, Kuhn A, Ludemann L, Arnold G, et al. Combined 123I-FP-CIT and 123I-IBZM SPECT for the diagnosis of parkinsonian syndromes: Study on 72 patients. *J Neural Transm* 2005; 112: 677-92.

Podoly E, Shalev DE, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett ER, Ben Assayag E, Wilgus H, et al. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally-derived risks for alzheimer's pathology. *J Biol Chem* 2009.

Podoly E, Bruck T, Diamant S, Melamed-Book N, Weiss A, Huang Y, et al. Human recombinant butyrylcholinesterase purified from the milk of transgenic goats interacts with beta-amyloid fibrils and suppresses their formation in vitro. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 232-6.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-7.

Porat Y, Mazor Y, Efrat S, Gazit E. Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: A potential role for heteroaromatic interactions. *Biochemistry* 2004; 43: 14454-62.

## Referències bibliogràfiques

---

Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, Andreasen N, Blennow K, Davidsson P. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 118: 140-6.

Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 2007; 13: 1359-62.

Rees TM, Berson A, Sklan EH, Younkin L, Younkin S, Brimijoin S, et al. Memory deficits correlating with acetylcholinesterase splice shift and amyloid burden in doubly transgenic mice. *Curr Alzheimer Res* 2005; 2: 291-300.

Robertson RT, Mostamand F. Development of 'non-specific' cholinesterase-containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. *Brain Res* 1988; 469: 43-60.

Robitzki A, Mack A, Chatonnet A, Layer PG. Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. *J Neurochem* 1997; 69: 823-33.

Roher AE, Weiss N, Kokjohn TA, Kuo YM, Kalback W, Anthony J, et al. Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in alzheimer's disease. *Biochemistry* 2002; 41: 11080-90.

Scassellati C, Zanardini R, Squitti R, Bocchio-Chiavetto L, Bonvicini C, Binetti G, et al. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2004; 356: 119-22.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med* 2006; 84: 901-10.

Scherfler C, Seppi K, Donnemiller E, Goebel G, Brenneis C, Virgolini I, et al. Voxel-wise analysis of [<sup>123</sup>I]beta-CIT SPECT differentiates the parkinson variant of multiple system atrophy from idiopathic parkinson's disease. *Brain* 2005; 128: 1605-12.

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: A cross-sectional study. *Lancet* 1999; 354: 1771-5.

Schrag A, Wenning GK, Quinn N, Ben-Shlomo Y. Survival in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2008; 23: 294-6.

Seppi K, Schocke MF, Esterhammer R, Kremser C, Brenneis C, Mueller J, et al. Diffusion-weighted imaging discriminates progressive supranuclear palsy from PD, but not from the parkinson variant of multiple system atrophy. *Neurology* 2003; 60: 922-7.

Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 295-303.

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: 754-60.

Shi M, Caudle WM, Zhang J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. *Neurobiol Dis* 2009; 35: 157-64.

Shimizu S, Hanyu H, Kanetaka H, Iwamoto T, Koizumi K, Abe K. Differentiation of dementia with lewy bodies from alzheimer's disease using brain SPECT. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 20: 25-30.

Singleton AB, Gibson AM, Edwardson JA, McKeith IG, Morris CM. Butyrylcholinesterase K: An association with dementia with lewy bodies. *Lancet* 1998; 351: 1818.

Singleton AB, Wharton A, O'Brien KK, Walker MP, McKeith IG, Ballard CG, et al. Clinical and neuropathological correlates of apolipoprotein E genotype in dementia with lewy bodies. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002; 14: 167-75.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. Alpha-synuclein locus triplication causes parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.

Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 151-70.

## Referències bibliogràfiques

---

Soma H, Yabe I, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H. Heredity in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2006; 240: 107-10.

Sone M, Yoshida M, Hashizume Y, Hishikawa N, Sobue G. Alpha-synuclein-immunoreactive structure formation is enhanced in sympathetic ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2005; 110: 19-26.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 294-302.

Soreq H, Zakut H. Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: Putative relationship to organophosphorous poisoning. *Pharm Res* 1990; 7: 1-7.

Souza RL, Mikami LR, Maegawa RO, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab* 2005; 84: 349-53.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998; 251: 205-8.

Stavitsky K, Brickman AM, Scarmeas N, Torgan RL, Tang MX, Albert M, et al. The progression of cognition, psychiatric symptoms, and functional abilities in dementia with lewy bodies and alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 1450-6.

Tateno M, Kobayashi S, Saito T. Imaging improves diagnosis of dementia with lewy bodies. *Psychiatry Investig* 2009; 6: 233-40.

Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, Klunk WE, Weiner MW, Zetterberg H, et al. The role of biomarkers in clinical trials for alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2006; 20: 6-15.

Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 3881-90.

Tiraboschi P, Salmon DP, Hansen LA, Hofstetter RC, Thal LJ, Corey-Bloom J. What best differentiates lewy body from alzheimer's disease in early-stage dementia? *Brain* 2006; 129: 729-35.

Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 271-324.

Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 162-6.

Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11282-6.

Valle AM, Radic Z, Rana BK, Whitfield JB, O'Connor DT, Martin NG, et al. The cholinesterases: Analysis by pharmacogenomics in man. *Chem Biol Interact* 2008; 175: 343-5.

Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, Sindic C, Ivanoiu A, et al. Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1472-80.

Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S, Taylor P. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 1993; 32: 12-7.

Vural P, Degirmencioglu S, Parildar-Karpuzoglu H, Dogru-Abbasoglu S, Hanagasi HA, Karadag B, et al. The combinations of TNFalpha-308 and IL-6 -174 or IL-10 -1082 genes polymorphisms suggest an association with susceptibility to sporadic late-onset alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009; 120: 396-401.

Wada-Isoe K, Kitayama M, Nakaso K, Nakashima K. Diagnostic markers for diagnosing dementia with lewy bodies: CSF and MIBG cardiac scintigraphy study. *J Neurol Sci* 2007; 260: 33-7.

## Referències bibliogràfiques

---

Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1998; 249: 180-2.

Walker Z, Costa DC, Walker RW, Lee L, Livingston G, Jaros E, et al. Striatal dopamine transporter in dementia with lewy bodies and parkinson disease: A comparison. *Neurology* 2004; 62: 1568-72.

Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, et al. Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 japanese patients. *Brain* 2002; 125: 1070-83.

Wenning GK, Stefanova N. Recent developments in multiple system atrophy. *J Neurol* 2009; 256: 1791-808.

Wenning GK, Jellinger KA. The role of alpha-synuclein in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 129-40.

Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W. Multiple system atrophy. *Lancet Neurol* 2004; 3: 93-103.

Wenning GK, Wagner S, Daniel S, Quinn NP. Multiple system atrophy: Sporadic or familial? *Lancet* 1993; 342: 681.

Whitwell JL, Weigand SD, Shiung MM, Boeve BF, Ferman TJ, Smith GE, et al. Focal atrophy in dementia with lewy bodies on MRI: A distinct pattern from alzheimer's disease. *Brain* 2007; 130: 708-19.

Woodruff BK, Graff-Radford NR, Ferman TJ, Dickson DW, DeLucia MW, Crook JE, et al. Family history of dementia is a risk factor for lewy body disease. *Neurology* 2006; 66: 1949-50.

Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neurological cholinesterases in the normal brain and in alzheimer's disease: Relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol* 1993; 34: 373-84.

Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 2006; 5: 651-8.

Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, et al. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in alzheimer disease. *Nat Med* 2005; 11: 959-65.

Wullner U, Abele M, Schmitz-Huebsch T, Wilhelm K, Benecke R, Deuschl G, et al. Probable multiple system atrophy in a german family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 924-5.

Xin XY, Ding JQ, Chen SD. Apolipoprotein E promoter polymorphisms and risk of alzheimer's disease: Evidence from meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 2010.

Yamamoto Y, Yasuda M, Mori E, Maeda K. Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon4 allele of the apolipoprotein gene in japanese patients with alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 94-6.

Yen T, Nightingale BN, Burns JC, Sullivan DR, Stewart PM. Butyrylcholinesterase (BCHE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an australian population. *Clin Chem* 2003; 49: 1297-308.

Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 1990; 87: 257-63.

Yoshita M, Taki J, Yokoyama K, Noguchi-Shinohara M, Matsumoto Y, Nakajima K, et al. Value of 123I-MIBG radioactivity in the differential diagnosis of DLB from AD. *Neurology* 2006; 66: 1850-4.

Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes parkinson and lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55: 164-73.

## Referències bibliogràfiques

---

Zelinski T, Coghlan G, Mauthe J, Triggs-Raine B. Molecular basis of succinylcholine sensitivity in a prairie hutterite kindred and genetic characterization of the region containing the BCHE gene. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 210-6.

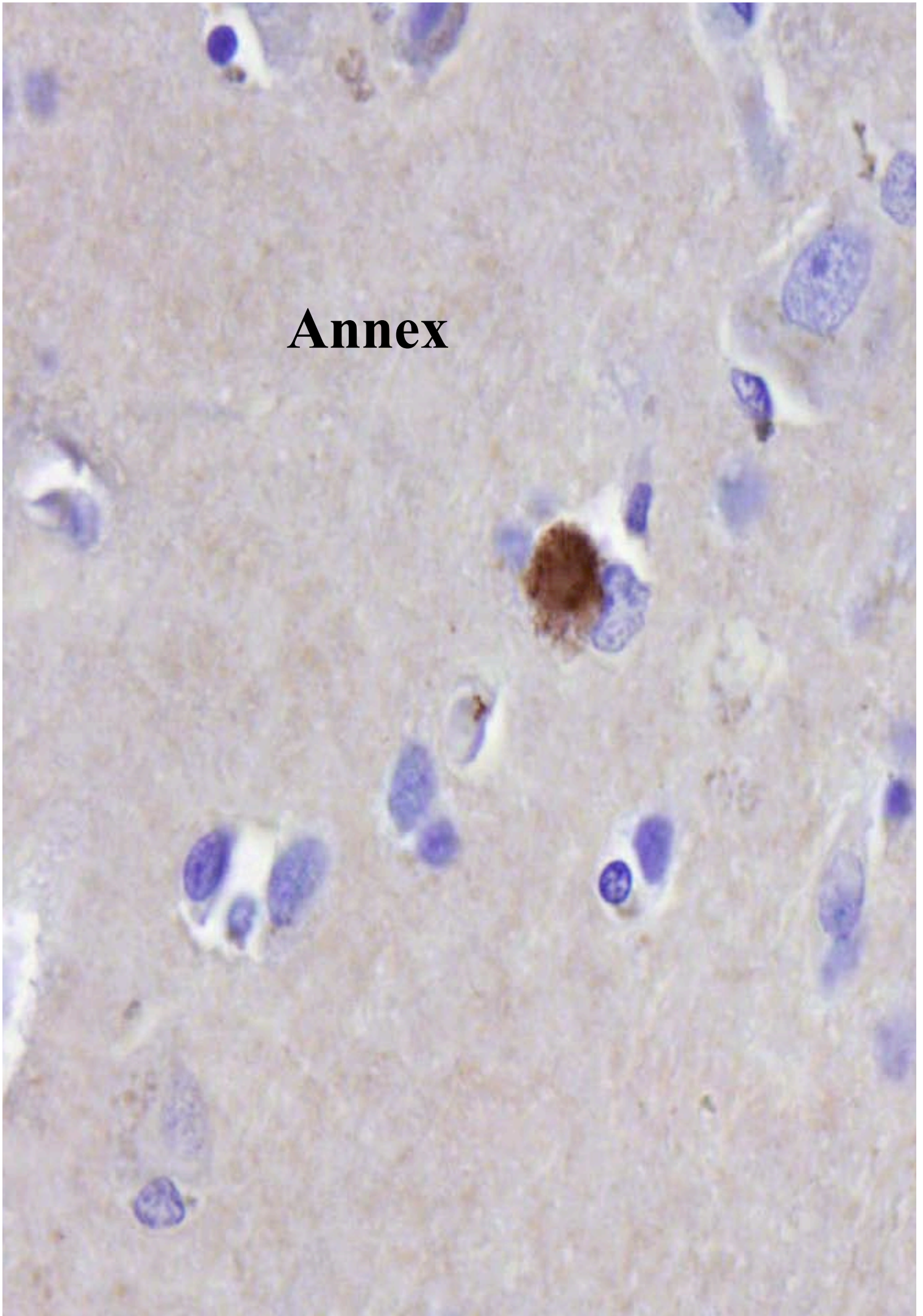
Zellner M, Veitinger M, Umlauf E. The role of proteomics in dementia and alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 181-95.

Zhang J, Goodlett DR, Quinn JF, Peskind E, Kaye JA, Zhou Y, et al. Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid from patients with alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 2005; 7: 125,33; discussion 173-80.

Zlokovic BV. New therapeutic targets in the neurovascular pathway in alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2008; 5: 409-14.



# Annex



## Característiques de les mostres amb diagnòstic neuropatològic

	diagnòstic neuropatològic	diagnòstic clínic	temps post mortem	estadis MA <sup>1</sup>	Br&Br <sup>2</sup>	sexe	edat mort	CF <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	Ca <sup>5</sup>	Cr <sup>6</sup>
1	DCLp <sup>7</sup>	DCL	6:00		A	D <sup>14</sup>	71	X	X	X	X
2	DCLp	MA	3:30		A	D	72	X	X	X	X
3	DCLp	Parkinsonisme	7:45		B	H <sup>15</sup>	85	X	X	X	X
4	DCLp	DCL	16:30		A	H	81	X	X	X	X
5	DCLp	DCL	8:00		A	H	60	X	X	X	X
6	DCLp	Parkinsonisme	8:30		A	D	70	X	X	X	X
7	DCLp	Park. atípic, demència	17:00	II	C	H	82	X #		#	
8	DCLp	DCL	6:45	II	B	H	83	X			
9	DCLp	DCL	8:15	0	A	H	64	X #		#	
10	DCLp	Parkinsonisme, demència	7:45	0	A	H	72	X			
11	DCLp	MP	3:30	I	A	H	73	X			
12	DCLp	MA	11:00	II	C	D	80	X			
13	DCLc <sup>8</sup>	MP, demència	4:50	V	C	H	84	X #	X	X	X
14	DCLc	MA	15:00			D	77	X	X	X	X
15	DCLc	Demència	18:00	V/VI	C	D	90	X	X	X	X
16	DCLc	MP, demència	6:45	IV	C	D	82	X	X	X	X
17	DCLc	DCL	7:45	III	B	D	78	X	X	X	X
18	DCLc	MA	13:00	V	C	D	78	X #	X	#	X
19	DCLc	DCL	9:00	VI	C	H	76	X	X	X	X
20	DCLc	MA	4:00	V		D	80	X	X	X	X
21	DCLc	MA	8:00	VI, CLc <sup>12</sup>	C	H	78	X			

	diagnòstic neuropatològic	diagnòstic clínic	temps post mortem	estadis MA <sup>1</sup>	Br&Br <sup>2</sup>	sexe	edat mort	CF <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	Ca <sup>5</sup>	Cr <sup>6</sup>
22	DCLc	MA	7:00	IV, CLc	C	H	78	X #		#	
23	DCLc	MA	6:30	VI, CLc	C	H	81	X			
24	DCLc	MA	14:30	IV, CLc	B	D	77	X			
25	DCLc	DCL	5:00	VI, CLc	C	H	90	X #		#	
26	DCLc	MA	12:00	II, CLc	C	D	88	X			
27	DCLc	MA	4:15	VI, CLc	C	D	87	X			
28	DCLc	MA		VI		D	91	X			
29	DCLc	MP, demència		V		H	78	X			
30	DCLc	MA		V		D	87	X			
31	DCLc	MA		V		D	76	X			
32	DCLc	Demència frontotemporal		V		D	64	X			
33	DCLc	MA		VI		H	68	X			
34	DCLc	DCL		VI		H	70	X			
35	DCLc	MA		VI		D	84	X			
36	DCLc	MA		V		H	76	X			
37	MP <sup>9</sup>	MP	4:30	CF sense CL <sup>13</sup>		D	70	X			
38	MP	MP	3:30	CF amb CL		D	79	X			
39	MP	MP	5:30	CF amb CL		H	71	X			
40	MP	MP, deteriorament cognitiu	12:30	CF amb CL		H	76	X			
41	MP	MP	27:30	CF sense CL		D	78	X			
42	AMS <sup>10</sup>		9:30			D	68	X		X	X
43	AMS		12:00			H	49	X		X	X
44	AMS		6:00			D	69	X		X	X
45	AMS		18:00			H	59	X		X	X

	diagnòstic neuropatològic	diagnòstic clínic	temps post mortem	estadis MA <sup>1</sup>	Br&Br <sup>2</sup>	sexe	edat mort	CF <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	Ca <sup>5</sup>	Cr <sup>6</sup>
46	AMS		5:30			H	52	X		X	X
47	AMS		11:00			H	60	X		X	X
48	MA <sup>11</sup>	MA	6:15	VI	C	D	77	X #	X	X #	X
49	MA	MA	3:30	VI	C	D	81	X	X	X	X
50	MA	MA	6:00	VI	C	D	83	X #	X	X #	X
51	MA	MA	6:30	VI	C	D	85	X	X	X	X
52	MA	MA	6:30	VI	C	H	67	X #	X	X #	X
53	MA	MA	7:30	VI	C	H	67	X	X	X	X
54	MA	MA	2:30	VI	C	H	67	X	X	X	X
55	MA	MA	7:30	VI	C	H	72	X	X	X	X
56	MA	MA	5:40	VI	C	H	61	X			
57	MA	MA	5:30	VI	C	H	85	X			
58	MA	MA	14:00	VI	C	D	73	X			
59	MA	MA	4:30	VI	C	D	61	X			
60	MA	MA	12:00	VI	C	D	85	X			
61	MA	MA	7:00	VI	C	H	72	X			
62	MA	MA	4:00	VI	C	H	89	X			
63	MA	MA	13:00	VI		D	83	X			
64	MA	MA	5:00	VI		D	95	X			
65	MA	MA	2:00	VI		D	82	X			
67	MA	MA	9:30	VI		D	77	X			
68	MA	MA	8:15	VI		H	75	X			
69	MA	MA	5:00	VI		H	82	X			
70	MA	MA	5:00	VI		H	93	X			

	diagnòstic neuropatològic	diagnòstic clínic	temps post mortem	estadis MA <sup>1</sup>	Br&Br <sup>2</sup>	sexe	edat mort	CF <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	Ca <sup>5</sup>	Cr <sup>6</sup>
71	MA	MA	10:00	VI		H	81	X			
72	MA	MA	15:00	VI		D	80	X			
73	MA	MA	13:00	VI		H	80	X			
74	controls		10:00			H	75	X			
75	controls		7:00			D	49	X			
76	controls		11:00			D	82	X			
77	controls		17:00			H	63	X			
78	controls		21:00			D	80	X			
79	controls		7:00			H	79	X			
80	controls							X			
81	controls							X			
82	controls							X			
83	controls							X			
84	controls							X			
85	controls		5:40			H	55	X	X	X	X
86	controls		7:05			H	59	X	X	X	X
87	controls		6:25			H	59	X	X	X	X
88	controls		7:35			H	49	X	X	X	X
89	controls		8:00			D	66	X	X	X	X
90	controls		7:00			D	49	X	X	X	X
91	controls		7:00			H	79	X	X	X	X
92	controls		13:00			H	70	X	X	X	X
93	controls		12:00			H	71	X	X		
94	controls		2:30			D	69	X	X		

	diagnòstic neuropatològic	diagnòstic clínic	temps post mortem	estadis MA <sup>1</sup>	Br&Br <sup>2</sup>	sexe	edat mort	CF <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	Ca <sup>5</sup>	Cr <sup>6</sup>
95	controls		4:00			D	65	X	X	X	X
96	controls		9:35			D	47	X	X	X	X
97	controls		4:00			H	58		X		X
98	controls		5:45			H	85		X	X	X

<sup>1</sup> estadis MA dels cabdells neurofibril·lars (I-VI) segons Braak i Braak.

<sup>2</sup> Br&Br: estadis MA de les plaques amiloides (A-C) segons Braak i Braak.

<sup>3</sup> CF: còrtex frontal

<sup>4</sup> CT: còrtex temporal

<sup>5</sup> Ca: nucli caudat

<sup>6</sup> Cr: cerebel

<sup>7</sup> DCLp: demència amb cossos de Lewy pura

<sup>8</sup> DCLc: demència amb cossos de Lewy comú

<sup>9</sup> MP: malaltia de Parkinson

<sup>10</sup> AMS: atròfia multisistèmica

<sup>11</sup> MA: malaltia d'Alzheimer

<sup>12</sup> CLc: cossos de Lewy corticals

<sup>13</sup> CL: cossos de Lewy

<sup>14</sup> D: dona

<sup>15</sup> H: home

X: mostres disponibles

#: mostres utilitzades per a immunohistoquímica