

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AMILOIDE β 40 Y AMILOIDE β 42 EN EL LÍQUIDO AMNIÓTICO DE MUJERES EMBARAZADAS CON FETOS CON TRISOMIA 21

Saúl Villasmil ¹, Himara Mohamad ², Freddy Gonzales ³,
Carmen García ⁵, Ricardo Bello ⁶

RESUMEN: *Las personas con síndrome de Down (SD), debido a la trisomía del cromosoma 21, muestran una mayor expresión de los genes ubicados en este cromosoma, incluido el gen que codifica la proteína precursora β amiloide (β APP). La β APP se expresa normalmente en diferentes tejidos y entre sus subproductos metabólicos se encuentran los péptidos β amiloides de 40 y 42 aminoácidos ($A\beta$ 40 y $A\beta$ 42). Alrededor de los 40 años, la mayoría de las personas con SD presentan cambios neuropatológicos cerebrales y trastornos cognitivos similares a los de la enfermedad de Alzheimer (EA). Varias evidencias sugieren que $A\beta$ participa en la patogenia de la EA tanto en individuos con cariotipo normal como en individuos con SD. Estudios previos han determinado los niveles de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 en varios fluidos biológicos en adultos y niños con SD. Sobre la base de la posibilidad de que estas proteínas pudieran ser secretadas o excretadas por el feto en el líquido amniótico (LA), y ser utilizado como marcador bioquímico para diagnóstico de SD, se analizaron muestras de mujeres embarazadas con fetos con cariotipos normales y con trisomía 21 para determinar el contenido de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42. La hipótesis de trabajo fue que el LA de mujeres embarazadas con fetos con trisomía 21 tendría niveles más altos de estas proteínas $A\beta$. Las muestras se obtuvieron entre las semanas 14-20 de embarazo, no pudimos determinar la presencia de estas proteínas en el LA (indetectable). Estos hallazgos no descartan la posibilidad de que en las últimas etapas del embarazo, las proteínas $A\beta$ estén presentes en el LA, ya sea libres o en el medio intracelular. Nuestros hallazgos descartan la posibilidad de utilizar $A\beta$ como marcador bioquímico intrauterino para el diagnóstico de SD.*

PALABRAS CLAVE: *síndrome de Down, cromosoma 21, líquido amniótico, enfermedad de Alzheimer, amiloide, péptido beta-amiloide, proteína precursora amiloide β , PPA β , $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42*

ABSTRACT: *People with Down Syndrome (DS), due to trisomy of chromosome 21, show increased expression of the genes located on this chromosome including the gene that encodes for the amyloid β precursor protein (β APP). β APP is normally expressed in different tissues and among its metabolic by-products are the 40 and 42 amino acid β amyloid peptides ($A\beta$ 40 and $A\beta$ 42). Around the age of 40, most people with DS present brain neuropathological changes and cognitive disorders similar to those with Alzheimer's disease (AD). Several evidences suggest that $A\beta$ participates in the pathogenesis of AD both in individuals with normal karyotype and in individuals with DS. Previous studies have determined $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 levels in various biological fluids in adults and children with DS. Based on the possibility that these proteins could be secreted or excreted by the fetus into the amniotic fluid (AF), and be used as a biochemical marker for the diagnosis of DS, samples from pregnant women carrying fetuses with normal and trisomy 21 karyotypes were analyzed for $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 content. The working hypothesis was that AF from pregnant women with fetuses with Trisomy 21 would have higher levels of these $A\beta$ proteins. When samples were obtained between weeks 14-20 of pregnancy, we were unable to determine the presence of these proteins in AF (undetectable). These findings do not rule out the possibility that in the later stages of pregnancy, $A\beta$ proteins are present in AF, either free or in the intracellular medium. Our findings rule out the possibility of using $A\beta$ as an intrauterine biochemical marker for the diagnosis of DS.*

KEY WORDS: *Down Syndrome, chromosome 21, amniotic fluid, Alzheimer's Disease, amyloid, beta-amyloid peptide, amyloid β precursor protein, $PPA\beta$, $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42.*

¹ Profesor Agregado. Licenciado en Bioanálisis. M.Sc Biología Molecular. Cátedra de Bioquímica. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: 0000-0002-4936-5292

² Profesor titular. Médico Cirujano. PhD Ciencias fisiológicas, Bioquímica. Cátedra de Bioquímica. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: 000-0003-0771-392x

³ Médico Cirujano. Especialista en Ginecología y Obstetricia. Centro Nacional de Genética Humana y Experimental. Instituto de Medicina Experimental. Facultad de

Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: 0000-0002-0485-6776

⁴ Profesor Agregado. Médico cirujano. Dr. Ciencias Biomédicas. Cátedra de Fisiopatología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: 0000-0002-7889-9445

⁵ Médico Cirujano. Especialista en Medicina Materno fetal y Ginecología y Obstetricia. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Massachusetts. ORCID: 000-0003-4565-4553.

Recibido: 08/01/2022

Aceptado: 26/02/2022

INTRODUCCIÓN

La anomalía cromosómica más común asociada con el retraso mental es la trisomía 21, la principal causa del síndrome de Down (SD)¹. La identificación y caracterización de los genes del cromosoma 21 (HSA21) ha sido de gran ayuda para comprender las bases moleculares de esta enfermedad. La secuencia del brazo largo de este cromosoma (21qHSA21) se definió completamente en el año 2000 y se identificaron los genes que contiene. Hay dos regiones de la HSA21, denominadas regiones críticas del síndrome de Down (DSCR1 y DSCR2), donde se agrupan los genes responsables del fenotipo de los pacientes con SD². Entre las proteínas codificadas por estos genes, podemos mencionar las siguientes: superóxido dismutasa (SOD1), cistationina beta sintasa (CBS), S100B, proteína precursora de β -amiloide (β APP) y β -secretasa BACE-2³.

El gen β APP se encuentra en la posición q21.3-22.05 del brazo largo del cromosoma 21^{4, 5}; este gen se expresa normalmente en numerosas

células y tejidos del cuerpo, incluidas las neuronas, las células del músculo liso de la pared vascular y las plaquetas^{1,6}.

Tres isoformas de β APP que contienen 695, 751 y 770 aminoácidos son el resultado del corte y empalme alternativo del ARNm de β APP y de diferentes modificaciones postraduccionales, las neuronas expresan principalmente la isoforma 695, mientras que el resto se expresa ampliamente por células no neuronales⁷. Las funciones que se han postulado para la β APP incluyen la inhibición de ciertas serina proteasas, el aumento de la adhesión celular al sustrato, los efectos neurotrópicos y otros efectos que promueven el crecimiento y las propiedades neuroprotectoras⁸.

El metabolismo de esta proteína produce, entre otros, los péptidos beta amiloides ($A\beta$) compuestos por 40 aminoácidos ($A\beta$ 40) y 42 aminoácidos ($A\beta$ 42)⁹. La β APP se escinde de dos formas. Primero por la vía α , $A\beta$ PP es hidrolizada por α -secretasa y luego por γ -secretasa; este proceso no produce $A\beta$ insoluble¹⁰. El segundo método es a

través de la vía β , la β APP es hidrolizada por la β -secretasa (BACE1) y luego por la γ -secretasa para producir $A\beta$ insoluble. Una pequeña cantidad de β APP se hidroliza mediante el segundo método^{11, 12, 13}.

La presencia de una copia adicional del gen β APP conduce a un aumento de los niveles de $A\beta$ en el cerebro del paciente con SD², así como a un acortamiento en la longitud de los axones o un cambio en la frecuencia a la que operan las neuronas, causando retraso mental en diferentes grados; en otros casos, puede causar una no disyunción en el momento de la segregación cromosómica¹⁴.

La mayor parte del $A\beta$ libre en los fluidos biológicos es de 40 aminoácidos ($A\beta$ 40). Sólo alrededor del 10% de $A\beta$ son 42 aminoácidos ($A\beta$ 42)¹⁵. Se han estudiado las concentraciones de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 en diversos líquidos, como el líquido cerebroespinal, el plasma, la orina y la saliva, donde se encuentran normalmente^{16,17}.

Estos péptidos se han cuantificado en el plasma de pacientes con SD,

encontrándose niveles aumentados de $A\beta$ 40 tanto en jóvenes como en adultos con SD en comparación con su control; cuando se determinó $A\beta$ 42 en jóvenes con SD, las concentraciones fueron similares a las de los controles¹⁸. Se ha encontrado un aumento de $A\beta$ 40 en la orina de pacientes con SD¹⁹, así como en el plasma.

Las concentraciones de estas proteínas en la etapa intrauterina no se han estudiado en profundidad. Bartha et al 2005²⁰ llevaron a cabo un estudio en sangre del cordón umbilical de fetos con Trisomía 21, no encontrando diferencia significativa en los niveles de $A\beta$ 42 al compararlos con sus controles con cariotipo normal, no apoyando la hipótesis de que este amiloide pudiera estar relacionado con la gravedad del daño cerebral en los recién nacidos con SD; por el contrario, niveles elevados de este péptido en fetos sin SD favorecen un papel fisiológico de estos péptidos durante el desarrollo cerebral.

Alrededor de los 40 años, los individuos con SD presentan cambios neuropatológicos cerebrales y

trastornos cognitivos similares a los de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) ²¹.

La EA es un trastorno degenerativo crónico y progresivo y es la causa más común de demencia. Se caracteriza clínicamente por la pérdida de funciones cognitivas como la memoria, el razonamiento, la abstracción y el lenguaje ²². Los avances en la investigación han permitido una comprensión detallada de la patogénesis molecular de los signos distintivos de la enfermedad, es decir, placas compuestas por β amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares, compuestos por tau hiperfosforilada ²³.

Varias evidencias sugieren que $A\beta$ participa en la patogenia de la EA, tanto en individuos con cariotipo normal como en individuos con SD³. Por esta razón, los niveles de $A\beta$ en varios fluidos biológicos de pacientes con la EA se han estudiado extensamente. Niels A. y col. (1999)²⁴, informaron de un aumento de $A\beta$ 42 en el líquido cerebroespinal en pacientes con EA, lo que sugiere que podría utilizarse como marcador bioquímico para diagnosticar la

enfermedad^{25, 26}. Tanto $A\beta$ 40 como $A\beta$ 42 se han estudiado en la saliva y se han encontrado niveles aumentados de $A\beta$ 42 en pacientes con EA²⁷; sin embargo, otros ensayos no han podido detectar estas proteínas en este líquido²⁸.

Con base en la posibilidad de que el $A\beta$ pudiera ser secretado o excretado por el feto en el líquido amniótico (LA) durante la etapa intrauterina, y que presumiblemente los niveles de $A\beta$ serían mayores en muestras de gestantes con fetos con Trisomía 21, analizamos los niveles de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 en el LA de gestantes con fetos con cariotipo normal y en muestras de LA de gestantes con fetos con Trisomía 21. Pudiéndose utilizar como otro marcador bioquímico para diagnóstico temprano del SD.

El LA se forma muy temprano en la gestación. Pasada la novena semana, la cavidad amniótica está completamente formada, y el LA que rodea al feto con la que mantiene un intercambio constante. La cantidad de LA es el resultado del equilibrio entre su producción y eliminación y al ser de origen fetal contiene todas las

características e información del feto. En el primer trimestre el origen del LA está en el corion, las membranas amnióticas y la piel fetal provocando que su composición sea muy similar a la del líquido extracelular. A las 12 semanas, los riñones fetales comienzan a ser funcionales y la producción de orina fetal contribuye principalmente a la composición del LA, y a las 22 semanas de gestación comienza la queratinización de la piel fetal, disminuyendo su contribución a la composición del LA, pasando prácticamente a su composición al sistema urinario, seguida de secreciones bronquiales y transmembrana^{29,30,31}.

MÉTODOS

Muestras

La amniocentesis se realizó en el Centro Nacional de Genética Humana y Experimental de la Universidad Central de Venezuela. La prueba se realizó entre las semanas 14 y 20 de embarazo, según lo determinado por una ecografía. En este ensayo se incluyeron las muestras de LA de 20 gestantes con cariotipo normal y 8

muestras de LA de gestantes con fetos con trisomía 21, diagnosticadas mediante análisis del cariotipo del cultivo celular del líquido amniótico. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante de las células de LA y sedimento se almacenaron en el congelador (-60) hasta el momento de medir el péptido y determinar el A β 40 y el A β 42. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos antes de que ingresaran al estudio.

Determinación de β amiloide utilizando el método E.L.I.S.A

El E.L.I.S.A. Para la detección de A β 40 y A β 42 se utilizó el kit -fabricado por Biosource-. En este kit, se ha fijado un anticuerpo monoclonal específico para el N-terminal de Hu A β (beta amiloide humano) en las paredes de los orificios de la placa. De esta manera, las Muestras o Patrones con una concentración conocida de Hu A β se colocan y se incuban con el anticuerpo de conejo específico para el extremo C-terminal de un A β 40 o un A β 42. Esta secuencia es detectada por un anticuerpo marcado con peroxidasa.

Después de eliminar el anticuerpo que no ha podido unirse, se agrega la solución de sustrato de peroxidasa para desarrollar el color. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de $Hu A\beta_{40}$ o 42 que está presente en la muestra original. Se utilizaron controles apropiados para validar la eficacia del kit.

Financiamiento

Este trabajo de investigación fue financiado por el CDCH-UCV bajo el Proyecto N° PI 09-00-5655-2004.

RESULTADOS

Los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en las muestras de LA procedentes de mujeres embarazadas (semanas 14 a 20 de gestación) portadoras de un feto con cariotipo normal o portadoras de un feto con trisomía 21 no eran detectables o estaban por debajo del límite de detección del método utilizado en el presente estudio.

DISCUSIÓN

El síndrome de Down (SD) es la patología genética más frecuente. Afecta a 1 de cada 800 bebés recién

nacidos. Aproximadamente entre un 90% y un 95% de todos los casos de SD se atribuyen a una trisomía en el cromosoma 21. Algunas otras causas que vale la pena mencionar son las trisomías parciales y las translocaciones robertsonianas³². El mecanismo para explicar cómo una copia adicional del cromosoma 21 contribuye a la patología del síndrome de Down sigue bajo investigación. Sin embargo, existen varios indicios de que el síndrome de Down puede definirse como una "enfermedad de dosificación genética". Esto significa que el exceso de determinadas proteínas, codificadas por genes en el cromosoma adicional, altera algunas vías bioquímicas que son importantes para el desarrollo y la función adecuados de las estructuras afectadas en el síndrome de Down³³.

Los amiloides están formados por pares de láminas β intermoleculares repetitivas que forman una estructura cruzada de láminas β . Esta estructura permite que los amiloides crezcan reclutando la misma proteína. Los amiloides tienen el potencial de auto-replicarse y pueden adaptarse al

medio ambiente, causando transmisibilidad de célula a célula, infectividad priónica y toxicidad³⁴. La repetición de cristal unidimensional en amiloide proporciona un marco para los polimorfismos, también están muy ordenados y se asocian con muchas enfermedades, incluida la enfermedad de Alzheimer (EA) ³⁵.

Además del retraso mental, que está presente en todas las personas con SD; La trisomía 21 se asocia con más de 80 rasgos clínicos que incluyen cardiopatía congénita, estenosis o atresia duodenal, ano imperforado, enfermedad de Hirschprung, hipotonía muscular y EA de inicio temprano ².

La evidencia que se deriva de varias fuentes - genéticas, entre ellas - sugiere que la A β participa en la patogénesis de la EA ³⁶, además, la hipótesis de que la EA tiene una base genética surgió de la observación de que prácticamente todos los sujetos con trisomía 21 que sobreviven 40 años o más desarrollan lesiones histopatológicas típicas de la EA³⁷. Estos cambios patológicos parecen estar relacionados con la pérdida progresiva de funciones cognitivas y

conductuales observadas después de los 35 años ³⁸.

Es difícil no atribuir el síndrome de Alzheimer que desarrollan directamente con el desequilibrio de dosificación de genes de β APP³⁹, porque todo el cromosoma se triplica en pacientes con trisomía 21. Sin embargo, este problema se resolvió con la evaluación de un paciente con translocación SD, en la que se duplicó la región que determina este síndrome en la porción distal del cromosoma 21, pero el punto de corte fue telomérico al gen β APP. Este individuo no desarrolló evidencia definitiva de deterioro del comportamiento y en el estudio post mortem no se encontraron depósitos cerebrales de A β ni otras lesiones ^{40,41}.

Normalmente, A β 40 y A β 42 se pueden detectar en diferentes fluidos biológicos, como el líquido cerebroespinal, la orina y el plasma^{16,17}. En EA y SD, la cuantificación de A β 40 y A β 42 se ha utilizado como marcador biológico ⁴².

La certeza del diagnóstico clínico de EA es bastante variable (60 a 95%), de ahí la búsqueda de otros

análisis para discriminar inequívocamente a los pacientes con esta enfermedad. Es factible utilizar la combinación de varios marcadores biológicos para obtener una mejor precisión diagnóstica; por ejemplo, la relación entre $A\beta_{40}$ / $A\beta_{42}$ en combinación con la determinación de los niveles de tau, una proteína citoesquelética anormalmente fosforilada en la EA y que en el líquido cerebrospinal ha tenido una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica en la EA ^{42,43, 44}.

Los $A\beta$ se han cuantificado en diferentes fluidos biológicos de individuos con SD. Mehta et al., 2003¹⁸ determinaron $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en plasma de individuos con SD y encontraron que los niveles de $A\beta_{40}$ en pacientes jóvenes y adultos tenían una concentración similar con respecto a su control, cuando determinaron $A\beta_{42}$ en los jóvenes no hubo diferencia con sus controles; sin embargo, los niveles de $A\beta_{42}$ fueron más altos en los SD viejos que en los controles o los SD jóvenes. Por otro lado, se ha encontrado un aumento de $A\beta_{40}$ en la orina de pacientes con SD¹⁹.

Los estudios encontraron que el $A\beta$ es consistentemente más alto entre las personas con síndrome de Down; sin embargo, el vínculo entre los péptidos $A\beta$ ($A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$) y la EA entre el SD fue inconsistente⁴⁵.

El análisis de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en la etapa intrauterina ha sido poco estudiado. Bartha y col. 2005 ²⁰ analizaron solo $A\beta_{42}$ en sangre del cordón umbilical de fetos con trisomía 21, sin encontrar diferencias significativas en los niveles de $A\beta_{42}$ con sus controles, lo que también indica que en algunas muestras de plasma no se pudo determinar $A\beta$. En este mismo trabajo, los autores no pudieron detectar $A\beta_{42}$ en 3 muestras de LA, sin embargo, el número de muestra fue pequeño.

En nuestro estudio, determinamos la concentración de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en muestras de LA de mujeres embarazadas con fetos con trisomía 21 y de mujeres embarazadas con fetos de cariotipo normal. Estas muestras se recolectaron entre las semanas 14-20 de gestación, por ser una etapa en la que existe menos riesgo de afectar el embarazo al utilizar un método invasivo como la

amniocentesis. Además, en esta etapa de la gestación, es bien conocido el aporte que tiene el feto en la composición del LA a través de algunas secreciones como: digestiva, renal, respiratoria y el intercambio directo a través de la piel que recién comienza a queratinizarse ⁴⁶.

CONCLUSIONES

En conclusión, los niveles de A β 40 y A β 42 en las muestras de LA provenientes de mujeres embarazadas (semanas 14 a 20 de gestación) portadoras de un feto con cariotipo normal o portadoras de un feto con Trisomía 21 no se detectaron o estuvieron por debajo del límite de detección de la método utilizado en este estudio. Estos hallazgos no descartan la posibilidad de que en las últimas etapas del embarazo, las proteínas A β estén presentes en el LA, libres o en el medio intracelular. Nuestro hallazgo en LA descarta la posibilidad de utilizar A β como marcador bioquímico intrauterino en el diagnóstico de SD.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro Nacional de Genética Humana y Experimental de la UCV por el procesamiento primario de las muestras utilizadas. A los profesores de la Cátedra de Bioquímica de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Facultad de Medicina de la UCV por su paciencia y+|+ buenos consejos.

REFERENCIAS

1. Hattori M, Fujiyama A, Tailor T, Watanabe H, Yada T, Park H.S, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature*. 2000;405:311-319.
2. Sommer CA, Henrique-Silva F. Trisomy 21 and Down syndrome - A short review. *Trissomia do 21 e Síndrome de Down: uma breve revisão*. *Braz. J. Biol.* 2008;68(2):447-452.
3. Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2012; 724904:1-10.
4. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 1987;235 (4791):877-880.

5. Wiseman FK, Pulford LJ, Barkus C, et al. Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid- β deposition independently of an extra copy of APP [published correction appears in Brain. 2019 Jun 1;142(6):e25]. Brain. 2018; 141(8): 2457-2474.
6. Verwey N.A, van der Flier W.M, Blennow K, Clark C, Sokolow S, De Deyn P.P, et al. A worldwide multicentre comparison of assays for cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. Ann Clin Biochem. 2009;46 (Pt 3): 235-240.
7. Roses A. Perspective: On the metabolism of lipoprotein E and the Alzheimer disease. Exp. Neurol. 1995;132 (2):149-156.
8. Murphy R.M. Peptide Aggregation in neurodegenerative disease. Annu.Rev. Biomed Eng. 2002; 4:155-174.
9. Murphy MP, LeVine H 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. J Alzheimers Dis. 2010; 19(1):311-323.
10. Kojro E, Fahrenholz F. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. Subcell Biochem. 2005; 38:105-27.
11. Chow Vivian W, Mattson Mark P, Wong Philip C, Gleichmann and Marc. An Overview of APP Processing Enzymes and Products Neuromolecular Med. 2010; 12(1): 1-12.
12. Espinoza J, Villasmil S, Mohamad H. Cambios anatomopatológicos cerebrales En: La Enfermedad de Alzheimer. Cap. 3. México: Editorial Trillas. 2011; 45-70.
13. Wolozin B. A fluid connection: Cholesterol and A β . Proc Natl Acad Sci. 2001; 98(10):5371-5373.
14. Díaz-Hernández DJ, Torres-Gómez IP, Arango-Martínez AM, Manrique-Hernández RD, Gallo-Bonilla JE. Aspectos genómicos, transcriptómicos y del diagnóstico en el síndrome de Down. Med. Lab. 2020; 24(1):37-6.
15. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. Nature. 2018; 554: 249-254.
16. Sancesario G, Bernardini S. AD biomarker discovery in CSF and in alternative matrices. Clin Biochem. 2019; 72: 52-57.
17. Gleeurup H, Hasselbalch S, and Simonsen A. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: A Systematic. Review. Disease Markers. 2019;4761054:1-11.
18. Mehta PD, Mehta SP, Fedor B, Patrick BA, Emmerling M, Dalton AJ. Plasma amyloid beta protein 1-42 levels are increased in old Down Syndrome but not in young Down Syndrome. Neurosci Lett. 2003;342(3):155-158.
19. Ghiso J, Calero M, Matsubara E, et al. Alzheimer's soluble amyloid beta is a

normal component of human urine. *FEBS Lett.* 1997; 408(1):105-108.

20. Bartha JL, and Soothill PW. Plasma amyloid B protein 1-42 levels in fetuses with Down síndrome. *Early Human Development* 2005;81 (4):351-354.

21. Head E, Lott I.T. Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol* 2004;17(2):95-100.

22. Masliah E, Licastro F. Pérdida neuronal y sináptica, gliosis reactiva, respuesta microglial e inducción de la cascada del complemento en la enfermedad de Alzheimer. En: Clark CM, Trojanowski JQ eds. *Neurodegenerative demencias: características clínicas y patológicas mecanismos*. 1ª ed. New York: McGraw-Hill; 2000: 131-146.

23. Blennow K, de León M, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006; 368(9533):387-403.

24. Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol.* 1999; 56(6):673-680.

25. Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:151-170.

26. Sunderland T, Mirza N, Putnam KT, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid1-42 and tau in control subjects at risk for Alzheimer's disease: the effect of APOE epsilon4 allele. *Biol Psychiatry.* 2004; 56 (9): 670-676.

27. M. Lee M, Guo JP, Kennedy K, McGeer EG, McGeer PL. A Method for Diagnosing Alzheimer's Disease Based on Salivary Amyloid- β Protein 42 Levels. *J Alzheimers Dis.* 2017; 55(3):1175-1182.

28. Lau H-C, Lee I-K, Ko P-W, Lee H-W, Huh J-S, Cho W-J, et al. Non-Invasive Screening for Alzheimer's Disease by Sensing Salivary Sugar Using *Drosophila* Cells Expressing Gustatory Receptor (Gr5a) Immobilized on an Extended Gate Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (EG-ISFET) Biosensor. *PLoS ONE.* 2015; 10: e0117810.

29. Ross MG, Brace RA; National Institute of Child Health and Development Workshop Participants. National Institute of Child Health and Development Conference summary: amniotic fluid biology--basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med.* 2001;10(1):2-19.

30. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol.* 1997; 40(2):280-289.

31. Moore K. The developing human: Clinically oriented embryology. In Moore KL, Persaud TVN eds. *Before we are*

Born: Essentials of Embriology and Birth Defects. Philadelphia: WB Saunders: 1999. p 106-209.

32. Plaiasu V. Down Syndrome - Genetics and Cardiogenetics. *Maedica (Buchar)* 2017;12(3):208-213.

33. Annerén G, Edman B. Down syndrome--a gene dosage disease caused by trisomy of genes within a small segment of the long arm of chromosome 21, exemplified by the study of effects from the superoxide-dismutase type 1 (SOD-1) gene. *APMIS Suppl.* 1993;40:71-79.

34. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature.* 2016; 539(7628):227-235.

35. Greenwald J, Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure.* 2010;18(10):1244-1260.

36. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71(5):362-381.

37. Mullan, M. y Crawford, F. Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993;16(10):398-403.

38. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's

disease locus. *Science.* 1995; 269(5226):973-977.

39. Rosenberg, R. Translational research on the way to effective therapy for Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2005;62: 1186-1192.

40. Balanzat, C. Amiloidosis y enfermedad de Alzheimer. En: *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.* Madrid: Editorial Medica Panamerican; 1998. p179-188.

41. Mohamad H. Hipotesis sobre la patogenia. En: *La Enfermedad de Alzheimer.* Cap. 5. México: Editorial Trillas; 2011. p90-110.

42. Shoji, M. Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front. Biosci,* 2002;7(1):997-1006.

43. Small, D. Alzheimer's disease biomarkers: their value in diagnosis and clinical trials. *Front. Biosci.* 2002;7(1):986-988.

44. Mohamad H. Epidemiologia y manifestaciones clínicas. En: *La Enfermedad de Alzheimer.* Cap.2. México: Editorial Trillas; 2011. p29-44.

45. Petersen Melissa E. and O'Bryant Sid E. Blood-based biomarkers for Down syndrome and Alzheimer's disease: A systematic review. *Developmental Neurobiology.* 2019;79(7):699-710.

46. Waddington SN, Buckley SM, David AL, Peebles DM, Rodeck CH, Coutelle C.

Fetal gene transfer. Curr Opin Mol Ther.
2007;9(5):432-438.

CORRESPONDENCIA

Saúl Villasmil Bastidas. Dirección: Instituto de
Medicina Experimental. Teléfono:
04166062722 (0212-6053601). Dirección de
correo electrónico: saul.villasmil@ucv.ve.