UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN MOLECULAR APLICADA EN LAS FAMILIAS CON POLINEUROPATÍA AMILOIDÓTICA FAMILIAR (ENFERMEDAD DE ANDRADE) DEL FOCO BALEAR

TESIS DOCTORAL DE TERESA BOSCH ROVIRA

BARCELONA 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN MOLECULAR APLICADA EN LAS FAMILIAS CON POLINEUROPATÍA AMILOIDÓTICA FAMILIAR (ENFERMEDAD DE ANDRADE) DEL FOCO BALEAR

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

POR TERESA BOSCH ROVIRA

DIRECTOR: DR. MIGUEL MUNAR QUÉS

CODIRECTOR: PROF. CELESTINO REY- JOLY BARROSO

BARCELONA 2008

AGRADECIMIENTOS

A mi hija Núria y a mi marido Carlos, mis dos pilares fundamentales, por su apoyo incondicional, comprensión y infinita paciencia.

A mi Director de Tesis, Dr. Miguel Munar-Qués, una de las máximas autoridades mundiales de la PAF, por sus amplios conocimientos transmitidos, su ilusión, pasión por la perfección y que evidentemente sin su ayuda constante esta tesis no hubiera sido posible.

A mis padres y hermanas por su ilusión.

A mis jefes de Servicio la Dra. Concepción Villalonga y Dr. Jordi Forteza-Rey por su comprensión y apoyo.

A la Dra. Catalina Nadal, por su gran profesionalidad, ayuda diaria y apoyo en mi labor asistencial en el Hospital Son Dureta.

A mis amigas incondicionales Montse Llagostera y Olga Biesa por sus ánimos y paciencia al escuchar mis múltiples dudas.

A María Sastre, enfermera de Consultas Externas, por su ayuda profesional y personal en los pacientes con PAF.

A la Dra Catalina Munar-Bernat y al Dr. Francisco Forteza Albertí por los apoyos recibidos a través de sus Tesis Doctorales sobre la PAF en el foco balear.

A todos mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Son Dureta.

ÍNDICE

1. PLANTEAMIENTO DE LA TESIS **1**
1.1. Motivación 2
1.2. Tipo de trabajo 3
1.3. Planificación 3
1.4. Objetivos 4

2. INTRODUCCIÓN **6**
2.1. Identificación de la Polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) y su repercusión internacional 7
2.2. Consejo genético integral 8
2.2.1. Antes de la investigación molecular aplicada 8
2.2.2. A partir de la investigación molecular aplicada 9
2.3. La PAF en las Islas Baleares 9
2.3.1. El foco endémico balear de la PAF 9
2.3.2. Grupo de Estudio de la PAF en Mallorca 10
2.4. Trascendencia de la PAF en España 11
2.5. Etiopatogenia de la PAF y sus aplicaciones prácticas: investigación molecular aplicada 12
2.5.1. Mutación 12
2.5.2. Marcador bioquímico 13
2.5.3. Amiloide peculiar 14
2.6. Posteriores avances en la investigación molecular aplicada 14
2.6.1. Amiloidogénesis 14
2.6.2. Carga génica de la mutación: heterocigotos y homocigotos 15
2.6.3. Riesgo de transmisión de la mutación 16
2.6.4. Explicación de los casos aislados 16
2.6.5. Diagnóstico prenatal 17
2.6.6. Modelo experimental de la enfermedad: ratones transgénicos 17
2.6.7. Ratones *knock-out* (KO) 18
2.6.8. Estudio isotópico de las amiloidosis sistémicas 18

2.6.9. Afectación temprana del sistema nervioso autonómico cardíaco 19
2.6.10. Anticipación en la edad de inicio de la PAF 20
2.6.11. Trasplante hepático (TXH) 20
2.6.12. Trasplante hepático dominó (DTXH) 21
2.6.13. Aparición de PAF en los receptores de DTXH 22
2.6.14. Sustancia R1 22
2.6.15. Diagnóstico preimplantatorio 23
2.6.16. Estabilización de la TTRMet30 23
2.6.17. Desestructuración de los depósitos amiloideos 24
2.6.18. Silenciación del gen de la TTRMet30 25
2.6.19. Reducción de la síntesis hepática de la TTR mutada 25
2.6.20. Posible presentación de la amiloidosis senil sistémica (ASS) en los portadores añosos 25
2.6.21. Importancia de la microalbuminuria persistente en los portadores asintomáticos 26

3. MATERIAL Y MÉTODOS 28
3.1. Material: sujetos estudiados 29
3.2. Metodología: consejo genético integral 29
3.2.1. Conocimiento de la mutación del paciente 29
3.2.2. Entrevista con el paciente 30
3.2.3. Árbol genealógico familiar 30
3.2.4. Selección de candidatos para la investigación 30
3.2.5. Tipo de investigación molecular 31
3.2.5.1. Primera etapa 31
3.2.5.2. Segunda etapa 33
3.2.6. Estadística 34
3.2.7. Comunicación de los resultados 34
3.2.8. Informaciones a los portadores sobre los riesgos que su condición conlleva y conducta frente a los mismos 34
3.2.8.1. Posibilidad de padecer la PAF en el futuro 34

3.2.8.2. Posibilidad de presentación de la amiloidosis senil sistémica (ASS) en portadores añosos 35
3.2.8.3. Riesgo para los descendientes 35
3.2.8.4. Riesgo para la Comunidad 36
3.2.9. Alentadoras perspectivas terapéuticas para el futuro 36
3.2.9.1. Silenciamiento del gen mutado 37
3.2.9.2. Evitar la síntesis hepática del la TTRMet30 37
3.2.9.3. Evitar la disociación de la TTRMet30 37
3.2.9.4. Disminución progresiva de los depósitos de amiloide 37

4. RESULTADOS 38
4.1. Epidemiología global. Características generales de los familiares investigados y en especial de los portadores asintomáticos 39
4.1.1. Familias investigadas 39
4.1.1.1. Número 39
4.1.1.2. Generaciones por familia 39
4.1.1.3. Antecedentes familiares de PAF 39
4.1.1.4. Rastreo de familiares consanguíneos 40
4.1.2. Portadores asintomáticos 40
4.1.2.1. Número 40
4.1.2.2. Mutación 41
4.1.2.3. Distribución genealógica 41
4.1.2.4. Sexo 41
4.1.2.5. Origen de la mutación 41
4.1.2.6. Clasificación progenitores 41
4.1.2.7. Edad de rastreo 42
4.1.2.8. Portadores fallecidos 42
4.1.2.9. Demografía, incidencia y prevalencia 42
4.1.2.10. Portadores asintomáticos con depósito de amiloide 43
4.1.2.11. Portadores hijos de enfermos 43

4.1.2.12. Portadores hijos de progenitor portador 44
4.1.2.13. Porcentaje de portadores por paciente 44
4.1.2.14. Porcentaje de portadores por progenitor portador 45

4.1.3. Portadores que enferman: pacientes con PAF 46
4.1.3.1. Número 46
4.1.3.2. Edad de inicio 46
4.1.3.3. Penetrancia de la mutación 46
4.1.3.4. Anticipación de la edad de inicio 47
4.1.4. Trasplantados 47
4.1.4.1. Número 47
4.1.4.2. Edad de trasplante 47
4.1.4.3. Fallecidos 48
4.1.4.4. Supervivencia 48
4.1.4.5. Intervalo de edad de inicio de la PAF y en el momento del trasplante 48
4.2. Consecuencias de las informaciones 49
4.2.1. Investigación molecular en menores de edad 49
4.2.2. Diagnóstico temprano de la PAF 49
4.2.3. TXH en los primeros años de la PAF 49
4.2.4. Diagnóstico preimplantatorio 49
4.2.5. Reserva de semen 49
4.2.6. Diagnóstico diferencial entre PAF y ASS en portadores añosos 49
4.2.7. Beneficio para la Comunidad 49
4.2.8. Mejoría psicológica de los portadores 49

5. DISCUSIÓN 50
5.1. Aceptación de la investigación 51
5.2. Casos aislados 51
5.3. Simplificación de la investigación molecular 51
5.4. Actualización de conocimientos sobre la PAF 51

5.5. Información a las familias que rehúsan la investigación molecular 52
5.6. Investigaciones novedosas y exclusivas del foco balear 52
5.7. Intervalo libre de síntomas en los portadores con depósitos de amiloide 52
5.8. Investigaciones rutinarias discutibles en los portadores asintomáticos 53
5.9. Importancia pronóstica del tipo de mutación 53
5.10. Necesidad del TXH temprano 54
5.11. Posibilidad de presentación de la ASS en los portadores añosos 54
5.12. Conducta de los progenitores de los portadores menores de edad 54
5.13. Diagnóstico prenatal 54
5.14. Reserva de semen 55
5.15. Primer caso de diagnóstico preimplantatorio en la PAF 55
5.16. Posibilidad de nuevas variantes en el futuro 55
5.17. Problema de salud pública 55

6. CONCLUSIONES 56
Se incluyen 24 apartados

7. BIBLIOGRAFÍA 60
Se incluyen 91 referencias

1. PLANTEAMIENTO

1.1. MOTIVACIÓN

Durante mis años de Licenciatura no recuerdo haber recibido información sobre la Polineuropatía amiloidótica familiar (PAF). Estudié la amiloidosis en el capítulo correspondiente aunque sin profundizar en el tema.

En el año 2002, durante mi tercer año de adjunta en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Son Dureta de Palma de Mallorca, viví intensamente mi primer caso. Después de un laborioso estudio pude diagnosticar la enfermedad a una paciente de 25 años con cuadro clínico polimorfo de tres años de evolución. A propósito del mismo, revisé las primeras publicaciones sobre la PAF y actualicé mis conocimientos en Genética Clínica.

En el año 2003 asistí a una conferencia sobre la PAF del Dr. Munar-Qués "personalidad de referencia internacional sobre la enfermedad" según la Prof. María M.J. Saraiva, que incrementó aún más mi interés por la misma. Por ello inicié mi colaboración con el Grupo de Estudio de la PAF en Mallorca dirigido por él, aportando los datos de los enfermos atendidos y de sus familiares. A partir de entonces profundicé en el estudio bibliográfico y revisé los casos de PAF atendidos anteriormente en el Hospital Son Dureta.

Debido a mi progresivo interés por la enfermedad, a principios de 2006 me dirigí al Dr. Munar-Qués para plantearle la posibilidad de preparar un trabajo de investigación sobre la PAF como tema de mi Tesis doctoral bajo su dirección. Éste aceptó encantado la dirección del trabajo y consideró que el tema podría ser *la investigación molecular aplicada en las familias con PAF* porque a pesar de los constantes avances en la misma y su gran interés para ese colectivo, en nuestro país se le presta poca atención tanto a nivel de la Asistencia Primaria, Secundaria y Terciaria no llevándose a cabo el consejo genético integral que permite detectar los portadores asintomáticos, darles informaciones de gran trascendencia y conocer su epidemiología. Además, aunque se han publicado excelentes aportaciones sobre la investigación molecular , apenas se han dedicado al consejo genético, salvo en el aspecto preventivo y a los portadores asintomáticos.

Para comenzar el trabajo puso a mi disposición su amplia casuística de los familiares de los pacientes del foco balear, recogida por el citado Grupo de Estudio desde que en 1986 se inició la investigación molecular, en la que figuraban mis aportaciones desde 2003. Además me ofreció su importantísimo

fondo bibliográfico sobre la PAF, incluyendo algunos trabajos de revisión inéditos de gran interés.

1.2. TIPO DE TRABAJO

Se trata de un estudio descriptivo de los familiares consanguíneos asintomáticos del foco balear de Polineuropatía amiloidótica familiar (PAF), detectados por el citado Grupo de Estudio desde el comienzo de 1986 hasta el 31-12-2006, siguiendo un protocolo de actuación similar en cada familia, realizado atendiendo a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki. Dicho protocolo es el citado consejo genético integral, constantemente actualizado con las sucesivas aportaciones de la investigación molecular aplicada.

Existían tres estudios de la investigación molecular en ese foco, entonces llamado foco mallorquín. En 1989 Munar-Bernat, en su Tesis doctoral (1), había analizado la investigación del marcador bioquímico de la mutación TTRMet30. Destacó su trascendencia para el diagnóstico específico de los pacientes y la detección de los portadores asintomáticos después del estudio epidemiológico de 20 pacientes y 99 familiares consanguíneos (de los que el 46% fueron portadores) y además expuso la conducta a seguir frente a los estos últimos. Posteriormente se realizaron dos estudios restringidos a los familiares consanguíneos, presentados en sendos Congresos (2,3), donde se analizó la epidemiología global de los portadores asintomáticos y la citada conducta.

1.3. PLANIFICACIÓN

Debido a lo expuesto consideramos que el título idóneo para la Tesis sería **Investigación molecular aplicada en las familias con Polineuropatía amiloidótica familiar (Enfermedad de Andrade) del foco balear.**

Se diseñó la división del trabajo en los seis capítulos clásicos de toda Tesis doctoral: introducción, material y métodos, resultados, discusión, conclusiones y bibliografía. Se acordó incluir los siguientes ítems en dichos capítulos:

- Introducción. Identificación de la PAF y su repercusión internacional. Consejo genético integral antes y después de la investigación molecular aplicada. PAF en las Islas Baleares incluyendo el foco endémico balear y el Grupo de Estudio de la PAF. Trascendencia de la PAF en España.

Etiopatogenia de la PAF aclarada mediante la investigación molecular (genómica y proteómica) y los posteriores avances de la investigación molecular aplicada.

- Material y métodos. Sujetos estudiados a través de las historias clínicas de los probandos y los progenitores enfermos o portadores de las diferentes familias y las de los portadores investigados de cada una. Metodología mediante el consejo genético integral sistematizado: conocimiento de la mutación del paciente, entrevista con él para recoger los datos sobre la familia, elaboración del árbol genealógico, selección de candidatos para la investigación, tipo de investigación molecular realizada, comunicación de resultados, informaciones a los portadores sobre los riesgos que su condición conlleva para ellos, sus descendientes y la Comunidad junto con la conducta ante los mismos y las alentadoras perspectivas terapéuticas, farmacológicas y génicas.
- Resultados. Epidemiología de los portadores con todas sus características. Importantes consecuencias de las informaciones recibidas por los mismos.
- Discusión. Problemas científicos y críticos planteados.
- Conclusiones. Resumen de los datos más destacados del trabajo de investigación.
- Bibliografía. Publicaciones seleccionadas.

1.4. OBJETIVOS

1) Actualizar los conocimientos sobre la PAF y la investigación molecular aplicada.
2) Sistematizar el protocolo de actuación, o sea, las sucesivas etapas del consejo genético integral, constantemente actualizado, ante cada paciente y sus familiares consanguíneos.
3) Conocer la epidemiología global de los portadores asintomáticos del foco balear, o sea, sus características generales y las consecuencias de las informaciones recibidas sobre los riesgos que su condición conlleva y la conducta frente a los mismos.

4) Comparar los resultados con los obtenidos en las escasas publicaciones dedicadas a ese colectivo en los focos endémicos mundiales más importantes.
5) Discutir diversos problemas científicos y críticos que se han planteado.
6) Hacer hincapié en los logros y alentadoras perspectivas para el futuro de los portadores asintomáticos.

2. INTRODUCCIÓN

Antes de entrar en materia y para conocer los fundamentos de mi trabajo, considero obligado exponer una revisión de los conocimientos sobre la PAF o Enfermedad de Andrade desde su descubrimiento hasta la actualidad.

2.1. IDENTIFICACIÓN DE LA POLINEUROPATÍA AMILOIDÓTICA FAMILIAR (PAF) Y SU REPERCUSIÓN INTERNACIONAL

En diversos municipios del norte de Portugal y en especial en la localidad pesquera de Póvoa de Varzim, era muy frecuente desde muchas generaciones, una enfermedad generalmente familiar conocida como *doença dos pèzinhos* (enfermedad de los pies pequeños), porque se reducían a medida que progresaba la enfermedad.

En 1939 el neurólogo portugués Corino Andrade, atendió a una paciente de dicha localidad y comprobó un cuadro clínico completamente desconocido para él a pesar de su sólida formación, por lo que sospechó que se trataba de una nueva enfermedad. Por ello inició un laborioso estudio de 74 enfermos de dicha zona, cuyos resultados publicó en 1952 (4) describiendo de modo magistral esa entidad nosológica como una amiloidosis sistémica hereditaria cuya manifestación predominante era la afectación del sistema nervioso periférico sensitivo, motor y autonómico. Demostró la existencia de amiloide en diversos órganos y tejidos previa tinción con Rojo Congo y examen con luz polarizada. A través de los árboles genealógicos sospechó el mecanismo hereditario autosómico dominante de heterocigotos comprobando el 70% de casos con antecedentes familiares y 30% de casos aislados. El comienzo era tardío, a partir de los 20 años, no tenía tratamiento y su evolución era fatal con supervivencia media de 10 años. Debido a esas características recibió el nombre de Polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) y por la trascendencia científica de la aportación, el epónimo de Enfermedad de Andrade.

A partir de dicha descripción se diagnosticaron pacientes en diversos países destacando los de Brasil (5,6,7), Japón (8), Suecia (9) y el aumento de la casuística portuguesa (10). Posteriormente se describieron en otros países entre ellos España, destacando las publicaciones de Munar-Qués quien describió el foco endémico mallorquín de la PAF (11,12).

2.2. CONSEJO GENÉTICO INTEGRAL

En Genética Clínica, se denomina consejo genético (13,14,15,16,17,18) al conjunto de entrevistas de los clínicos con los miembros de las familias afectadas por una enfermedad genética, enfermos y familiares consanguíneos. Su objetivo es recoger los datos de éstos, explicarles el mecanismo etiopatogénico y proporcionarles informaciones que son del máximo interés respecto al diagnóstico, pronóstico, tratamiento y para los familiares consanguíneos sobre los riesgos que conlleva su condición junto con la conducta frente a los mismos, todo ello expuesto de modo asequible a la cultura de los interesados.

Debe hacerse hincapié en que el consejo genético, en muchas ocasiones sólo se ha restringido al tipo de herencia y los riesgos de la transmisión de la mutación a sus descendientes; ese tipo de consejo es sólo una parte del consejo genético denominado integral o global por Munar-Qués, que el Grupo de Estudio de la PAF ha protocolizado desde su creación, para la investigación de los familiares consanguíneos de los enfermos con PAF.

En este consejo genético se han producido extraordinarios cambios a partir de la investigación molecular aplicada.

2.2.1. Antes de la investigación molecular aplicada

En la PAF una vez conocida su naturaleza hereditaria, era preceptivo informar a los pacientes de la progresión constante de la sintomatología y la ausencia de tratamiento curativo pudiendo sólo indicar terapéutica sintomática. La alteración psicológica subsiguiente era extraordinariamente profunda y en alguna ocasión se llegó a la autólisis.

En cuanto a los familiares consanguíneos debían ser informados del riesgo de padecer la enfermedad en el futuro y la posibilidad de transmitir la mutación al 50% de sus descendientes en cada gestación. Por este motivo los familiares quedaban angustiados y deprimidos porque si aparecía la enfermedad, no tenía remedio y por otra parte no podían saber si sus hijos eran o no portadores. La conducta del médico se restringía a aconsejarles la no procreación si querían evitar el riesgo de transmisión, lo que suponía una frustración familiar muy importante y por ello, mucho enfermos seguían teniendo descendencia.

La situación era aún peor en los pacientes que seguían con la PAF sin diagnosticar, por lo que no se conocía la naturaleza hereditaria del proceso y como consecuencia, no se prestaba atención alguna a sus familiares.

2.2.2. A partir de la investigación molecular aplicada

Afortunadamente y como se verá más adelante, su situación ha cambiado radicalmente desde que disponemos de la investigación molecular (genómica y proteómica). En los enfermos, se ha logrado el diagnóstico específico y temprano, el tratamiento etiopatogénico y constantemente se comunican alentadoras terapéuticas farmacológicas y génicas.

Por otra parte pueden detectarse los portadores asintomáticos y aconsejarles debidamente respecto a los riesgos que su condición conlleva para ellos, sus descendientes, la comunidad y también el modo de actuar frente a los mismos.

Para la eficiencia de ese consejo genético, es preceptiva la constante actualización de conocimientos sobre la investigación molecular aplicada, epidemiología y clínica de la PAF porque como consecuencia de sus contínuos avances se va modificando e incrementando progresivamente la información a proporcionar a ambos colectivos respecto a la etiopatogenia, pronóstico, prevención, diagnóstico temprano, tratamiento, perspectivas terapéuticas, etc.

Por otra parte, el informador debe tener amplios conocimientos de psicología y psicosomática, mucho tacto y paciencia, para ayudar debidamente a los enfermos y portadores en su situación anímica frente a los múltiples problemas derivados de su condición: personales, familiares, laborales y de modo especial a los pacientes en los que debido a la edad de comienzo de la PAF ya no es posible el tratamiento etiopatogénico.

2.3. LA PAF EN LAS ISLAS BALEARES

2.3.1. El foco endémico balear de la PAF

En Mallorca se ha comprobado una importante casuística de PAF desde el año 1976 en que Munar-Qués diagnosticó el primer caso de modo prospectivo. Sin embargo, dicho autor pudo demostrar mediante investigación retrospectiva, el primer paciente con PAF que había sido estudiado por él en 1952 y diagnosticado de siringomielia lumbosacra familiar (11,12).

Debido al progresivo aumento de pacientes diagnosticados en la isla, la serie fue denominada foco mallorquín (19). Posteriormente a raíz de haberse

sumado tres familias de la isla de Menorca, el nombre adecuado es foco balear (20). En la actualidad es el quinto foco endémico más destacado en el mapa epidemiológico mundial de la PAF sólo superado por el extraordinario contingente de Portugal y los más reducidos de Japón, Suecia y Brasil (21).

2.3.2. Grupo de Estudio de la PAF en Mallorca

En 1987 el Dr Munar-Qués, invitado por el profesor Andrade, participó en unas Jornadas de Trabajo sobre la PAF en Oporto. Éste le aconsejó la creación de un Grupo de Estudio parecido a su “Centro de Estudos de Paramiloidose”, que con el tiempo podría convertirse en referente para la investigación de la PAF en España.

Por este motivo el mismo año fundó dicho grupo con su habitual colaborador, el inmunogenetista Dr. Viader-Farré y diversos médicos e investigadores básicos interesados en la PAF. Sus objetivos fueron la coordinación de las actividades asistenciales e investigadoras con los médicos y la progresiva implantación de las técnicas de biología molecular en la PAF (proteómica y genómica) que habían comenzado en el año anterior para la investigación de la mutación y su marcador bioquímico, debido a la colaboración de los Drs. Pedro P. Costa y María JM Saraiva, referentes mundiales de la PAF.

El Grupo ha sido pionero en España de la investigación molecular de la PAF, que permite el diagnóstico específico de enfermos y la detección de los portadores asintomáticos. Conocedores de esas posibilidades, médicos del sector público y privado de las Islas Baleares y once comunidades autónomas peninsulares han remitido pacientes para su estudio, muestras de pacientes y familiares para la investigación molecular y recabado información sobre la Medicina preventiva, curativa y paliativa. Por estos motivos el Grupo se ha convertido en el Centro de referencia que auguraba el profesor Andrade y figura en el registro de Centros de Estudios Genéticos para Enfermedades Hereditarias de la Asociación Española de Genética Humana, siendo el único dedicado exclusivamente a la PAF.

Sus múltiples actividades (22) se incrementan anualmente y demuestran que está llevando a cabo una eficiente labor para los enfermos y sus familiares consanguíneos además de destacadas aportaciones científicas nacionales e internacionales.

2.4. TRASCENDENCIA DE LA PAF EN ESPAÑA

Aunque esa entidad nosológica está incluída entre las Enfermedades Raras (23), por ser su prevalencia menor de cinco enfermos por diez mil personas en las diversas comunidades autónomas, interesa mucho al clínico porque es una enfermedad emergente en nuestro país, aumenta progresivamente el número de enfermos diagnosticados, especialmente desde las primeras publicaciones con los avances diagnósticos basados en la investigación molecular (11,12).

Antes de 1988 sólo se habían diagnosticado 14 enfermos pero a partir de entonces el número de pacientes ha superado los 350 (unos publicados y otros inéditos) encabezados por los del foco endémico balear que en la actualidad ascienden a 159 y 74 procedentes de once comunidades autónomas peninsulares estudiadas por dicho Grupo de Estudio. Como consecuencia las contribuciones nacionales e internacionales de los autores españoles tanto en revistas como en los congresos dedicados a la PAF y al trasplante hepático (TXH) en la misma, han aumentado significativamente y por otra parte se han presentado las primeras tres Tesis Doctorales sobre la enfermedad (1,24,25).

Además, a pesar de las citadas informaciones, es poco conocida y por ser plurisintomática se confunde con procesos neurológicos y extraneurológicos por lo que unos pacientes quedan sin diagnosticar y otros se diagnostican en estadíos muy avanzados en los que ya no es posible indicar el tratamiento etiopatogénico con el trasplante hepático. Obviamente en los primeros casos, por no sospecharse la naturaleza hereditaria, no se presta atención a los familiares consanguíneos. En los casos diagnosticados, a pesar de su naturaleza hereditaria, en muchas ocasiones tampoco se les presta la adecuada atención.

La PAF constituye un problema de salud pública para las comunidades autónomas afectadas, tanto en los enfermos no trasplantados como en los trasplantados, por lo que merece la máxima atención de las autoridades sanitarias. En los que no pueden ser trasplantados, se acentúa, debido a la evolución progresiva y subsiguiente aparición de múltiples discapacidades, minusvalías y complicaciones que originan acusados problemas socioeconómicos y elevados costes sanitarios y de Seguridad Social.

En los trasplantados, sigue siendo un problema sanitario debido al coste del trasplante, tratamiento con fármacos inmunosupresores de por vida, revisiones

periódicas, posibles problemas del injerto que en ocasiones requieren retrasplante y sobre todo la posible aparición de amiloidosis ocular y amiloidosis senil sistémica (ASS), a ello debe sumarse el cuidado de las discapacidades y minusvalías residuales de la PAF en los pacientes trasplantados en estadíos avanzados (26).

Por otra parte contribuye al problema de salud pública, el ser una enfermedad heredodegenerativa de mecanismo autosómico dominante con un número de portadores que oscila entre el 50% y el 100% con los consiguientes riesgos para ellos, sus descendientes y la Comunidad.

2.5. ETIOPATOGENIA DE LA PAF Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS: INVESTIGACIÓN MOLECULAR APLICADA

Desde su identificación seguía sin conocerse el origen de la PAF. Afortunadamente entre 1978 y 1984 la investigación molecular (proteómica y genómica) dejó aclarada la etiopatogenia de la PAF al describir primero la amiloide peculiar (27), posteriormente el marcador bioquímico de la mutación (28,29) y finalmente la mutación (30,31,32). Como consecuencia, desde entonces pudo lograrse el diagnóstico específico de los pacientes y la detección de los portadores asintomáticos.

Las investigaciones complementarias de la Física, Bioquímica e Inmunología incrementaron los datos sobre los tres componentes citados que resumimos a continuación.

2.5.1. Mutación

La PAF es debida a una mutación simple o puntual en el codón de uno o los dos alelos del gen de una proteína denominada transtirretina (TTR) transportadora de la tiroxina y el retinol. Dicho gen radica en el cromosoma 18, si se afecta a un alelo será heterocigoto y homocigoto si afecta a los dos.

Como consecuencia, la PAF quedó etiquetada como enfermedad monogénica que figura entre las más de 5.000 conocidas y el reducido grupo de las que tienen aclarada etiopatogenia.

En las citadas descripciones, la mutación codificaba la síntesis de una TTR anormal en la que se había sustituído una valina por metionina en posición 30 cuya sigla era TTRMet30, que en la moderna terminología ha pasado a TTRVal30Met. Posteriormente, debido a los progresos en genómica, ha

aumentado de modo exponencial el número de mutaciones amiloidogénicas todas localizadas en los exones 2, 3 y 4 habiéndose identificado hasta la fecha más de ochenta (33) de las que la primera antes citada es con gran diferencia la más frecuente (34).

Además, junto con ese grupo se han descrito otras mutaciones de la TTR no amiloidogénicas: Gly6Ser, His90Asn, Pro102Arg, Arg104His, Ala109Thr y Ala119Met (34). Por otra parte se ha comprobado que en los casos de dos heterocigotos compuestos, uno con las variantes Val30Met y Arg104His y el otro Val30Met y Ala119Met, las variantes no amiloidogénicas tienen un efecto protector evitando o disminuyendo la expresión del gen de la variante Val30Met (35).

2.5.2. Marcador bioquímico

La TTR normal o nativa es un tetrámero constituído por cuatro monómeros de 127 aminoácidos. La TTR anómala sintetizada o variante de la TTR, constituye el marcador bioquímico de la mutación (28,29) que como se ha comentado previamente, se caracteriza por la sustitución de uno de los aminoácidos por otro en una de las cuatro cadenas de 127 que la forman.

Como consecuencia del progresivo aumento de las mutaciones han aparecido sus respectivos marcadores bioquímicos que son las nuevas variantes. Debe señalarse que se han descrito dos familias con la variante TTR∆Val122 en la que no se sigue la regla antes citada, produciéndose aquí la delección del aminoácido Val122 y por tanto dicha variante cuenta sólo con 126 aminoácidos (36).

Existen tres fuentes básicas e independientes de la variante. El hígado sintetiza la cantidad más importante (98%) que circula por el torrente sanguíneo, o sea la variante sistémica. Otra fuente son los plexos coroideos que sintetizan alrededor del 1%, esta variante queda restringida al compartimento subaracnoideo debido a la barrera hemato-encefálica. La tercera fuente es la retina, cuya variante se limita al compartimento ocular por la existencia de la barrera hemato-retiniana (37).

Tanto la mutación como la variante se encuentran en la sangre de los enfermos y en un porcentaje de los familiares consanguíneos sanos que por este motivo se denominan portadores asintomáticos (29).

2.5.3. Amiloide peculiar

En los enfermos, la variante de la TTR que circula por el torrente sanguíneo se deposita en los espacios intercelulares de órganos o tejidos para formar la amiloide típica de la PAF.

La amiloide de las amiloidosis sistémicas está constituída por el componente P inespecífico (10%) común a los cuatro tipos conocidos y el componente proteico fibrilar (90%) que es específico para cada uno de ellos. El componente fibrilar está formado por fibrillas lineales, no ramificadas, que forman láminas torsionadas betaplegadas por lo que se incluyen dentro de las betafibrilosis (38).

En los enfermos con PAF (27), la variante TTR depositada en los órganos o tejidos constituye el componente fibrilar de la amiloide (AF de familiar o AH de hereditaria) y difiere completamente de la amiloide de la amiloidosis secundaria o reactiva a diversos procesos (AA), de la amiloidosis inmunoglobulínica (39) mal llamada primaria, ligada a discrasias de células plasmáticas (AL) y de la relacionada con la hemodiálisis crónica (Abeta2microglobulina).

Debido a que el componente P es una glucoproteína, esa fracción hidrocarbonada explica la tinción similar al almidón en los cuatro tipos descritos y por tanto que el diagnóstico de amiloide previa tinción por Rojo Congo sea inespecífico. Para solucionar este problema los inmunólogos han creado el estudio histoinmunoquímico por medio de anticuerpos frente a los respectivos componentes fibrilares de esas amiloidosis por lo que en la amiloide detectada por el Rojo Congo es posible el diagnóstico específico del tipo de amiloide: AF, AL, AA o Abeta2microglobulina (40,41).

2.6. POSTERIORES AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN MOLECULAR APLICADA

Basados en los datos expuestos se han realizado múltiples aportaciones por grupos de investigación multidisciplinares que han enriquecido el conocimiento de la PAF y han proporcionado importantes herramientas de gran trascendencia para los enfermos y portadores asintomáticos.

2.6.1. Amiloidogénesis

Se han hecho importantes aportaciones sobre la misma de gran utilidad para fundamentar la terapéutica de la PAF.

Se lanzó la hipótesis de que las proteínas amiloidogénicas, tienen la posibilidad de experimentar un cambio conformacional que origina un intermediario amiloidogénico capaz de convertirse en amiloide. Posteriormente se demostró en estudios *in vitro* que una vez sufrido el cambio conformacional de la proteína amiloidogénica, la progresiva disociación de ésta era un requisito indispensable para la formación de amiloide pasando el tetrámero primero a dos dímeros y al final a cuatro monómeros que originaban las fibrillas de la misma (42).

Además se ha proporcionado una valiosa aportación complementaria de un estudio también *in vitro* sobre los monómeros resultantes de la disociación, que sufren una polimerización originando al principio monómeros no fibrilares que después pasan a protofilamentos y al final se convierten en fibrillas inmaduras que probablemente son las precursoras de las que se encuentran en las fibrillas rígidas, maduras y más largas, típicas de la amiloide de los modelos *in vivo* (43).

Por otra parte, se ha publicado un estudio *in vivo* en enfermos con PAF TTRMet30, portadores asintomáticos y controles sanos, sometidos a biopsia del nervio sural, que han aportado interesantes datos sobre esa alteración previa a la formación de amiloide. En los portadores, la densidad de las fibras nerviosas era normal lo mismo que en los controles, pero en los enfermos la densidad disminuía proporcionalmente al grado de afectación neurológica. Tanto en los enfermos como en los portadores comprobaron por estudio histoinmunoquímico la existencia de agregados no fibrilares de TTR, no congofílicos, que eran de origen citotóxico, en cambio en los enfermos existía además el depósito de fibrillas de amiloide teñidas con Rojo Congo. Como consecuencia se concluye que en la fase previa a la disociación existen unos agregados no fibrilares de TTR no congofílicos, que probablemente serían las formas preamiloidogénicas de la TTR mutada descritas *in vitro* (44).

2.6.2. Carga génica de la mutación: heterocigotos y homocigotos

Desde el primer trabajo del Profesor Andrade se consideró que los pacientes y familiares eran heterocigotos, lo que quedó demostrado al estudiar la mutación.

En 1988 (45) se describieron los dos primeros homocigotos con la variante TTRMet30, o sea con los dos alelos mutados, porque sus progenitores eran

heterocigotos y cada uno les había transmitido el alelo mutado. Posteriormente se describieron otros casos todos con la misma variante, entre los que estaban los dos primeros españoles (46) siendo en total 14 enfermos y 3 portadores. Los datos clínicos de los 14 pacientes permiten concluir que la doble carga génica no origina un cuadro clínico más agresivo que en los heterocigotos, por otra parte los 3 restantes homocigotos se mantenían asintomáticos a los 59, 62 y 72 años respectivamente.

2.6.3. Riesgo de transmisión de la mutación

Basados en los árboles genealógicos se aceptaba desde el Profesor Andrade (4) que el mecanismo hereditario de la PAF era autosómico dominante de heterocigotos, lo que suponía un progenitor heterocigoto y otro sano. Siguiendo las leyes de la citada herencia, en esos casos existía el riesgo de transmitir la mutación al 50% de los descendientes en cada gestación.

Desde que conocemos la posibilidad de que la carga génica de los progenitores sea simple o doble, varía el riesgo de transmitir la mutación a los descendientes. Si uno es heterocigoto y el otro sano, en cada gestación el riesgo es del 50%; si ambos son heterocigotos el riesgo se eleva al 75% de los que 25% serían homocigotos y 50% heterocigotos y en el caso de que uno sea homocigoto y el otro sano, el riesgo es del 100% pues el primero necesariamente transmite un alelo mutado a todos los descendientes.

2.6.4. Explicación de los casos aislados

Los criterios para diagnosticar un caso aislado de PAF son la demostración de la enfermedad confirmada en el paciente y la negatividad de antecedentes familiares de PAF o proceso compatible con ella (enfermos probablemente afectos).

Como hemos comentado previamente, fueron descritas por el Dr. Andrade (4) y se sospechaba la existencia de la enfermedad en algún descendiente, que no era conocida por la familia o no se había diagnosticado por haber fallecido antes de presentar el cuadro florido o se había confundido con otros procesos (47).

Esos casos constituyen una de las mayores dificultades para el diagnóstico de PAF, pues el clínico, debido al nombre de la enfermedad, sólo la tiene presente en pacientes con antecedentes familiares. Desde que disponemos de la investigación molecular esos casos han quedado perfectamente explicados

al comprobar que uno de los ascendientes era portador asintomático y el otro sano.

Puede plantearse el problema de que uno de los ascendientes haya fallecido pero si el resultado del rastreo es positivo en el que vive, queda aclarado el origen, en cambio si es negativo sólo podemos concluir que el fallecido posiblemente era el portador. Obviamente en los casos en que ambos progenitores han fallecido es imposible aclarar el origen de la mutación.

2.6.5. Diagnóstico prenatal

Se trata de la detección de portadores asintomáticos “in útero”. Se ha planteado en gestaciones en que uno de los progenitores es portador asintomático heterocigoto y según nuestras informaciones sólo se ha realizado en un reducido número de casos (48, 49, 50). El método más utilizado ha sido el análisis del ADN previa amniocentesis y cultivo de los amniocitos, porque la investigación de la TTRMet30 del líquido amniótico está expuesto a contaminación de la sangre materna si ella es portadora y además es muy bajo el nivel de la misma.

Unas veces los interesados desean conocer el resultado para proceder en caso de positividad a la interrupción voluntaria del embarazo (IVE), pero en otros sólo tienen interés en comprobar cuanto antes si han transmitido la mutación al feto.

2.6.6. Modelo experimental de la enfermedad: ratones transgénicos

Investigadores japoneses crearon un modelo experimental de PAF en el ratón que constituye una herramienta de gran interés científico y práctico (51). Para ello realizaron la inoculación en el embrión, de la porción del cromosoma 18 que codifica la metionina 30 y lograron ratones transgénicos productores de TTRMet30. En éstos, a partir de los 6 meses aparecen depósitos de amiloide en las vellosidades intestinales; a los 12 meses se comprueba su incremento y además depósito en los glomérulos renales; a los 24 meses los depósitos son similares a los de los pacientes con PAF salvo los plexos coroideos y el sistema nervioso periférico y autonómico que no están afectados.

Actualmente y como se había previsto, esos ratones son utilizados por diversos grupos de investigadores para estudiar la amiloidogénesis y los métodos para evitarla o retardarla.

Posteriormente se han logrado otros tipos de ratones transgénicos que comentaremos en diferentes apartados, unas veces en ratones normales y otras en ratones *knock-out* (KO).

2.6.7. Ratones *knock-out* (KO)

Son ratones a los que mediante una laboriosa tecnología que utiliza células madre embrionarias, se ha logrado anular un determinado gen por lo que queda silenciado y por tanto no se expresa, de ahí su nombre de ratones noqueados. Como consecuencia se han convertido en una importante herramienta para el estudio de muchas enfermedades hereditarias monogénicas.

Últimamente han adquirido gran protagonismo científico y mediático a raíz de la concesión del Nobel de Medicina 2007, a los tres investigadores pioneros en dicha tecnología: M.R. Capechi, M.J. Evans y O. Smithies.

En la PAF se han utilizado para anular en unos casos el gen murino del SAP *(serum amyloid component)* y en otros el gen murino de la TTR, como se comentará al hablar de las perspectivas terapéuticas.

2.6.8. Estudio isotópico de las amiloidosis sistémicas

La técnica con isótopos radiactivos ha sido una de las aportaciones más destacadas en los últimos años (52). Se basa en el marcado con I^{123} del SAP, o sea, el precursor del componente P de los cuatro tipos de amiloide sistémica.

El SAP marcado, procedente de donante sano, se inyecta por vía endovenosa y es captado rápidamente y en cantidad por los depósitos de amiloide (hasta el 95% en los casos de amiloidosis masiva), donde queda retenido durante largo tiempo y se convierte así en el agente indicador de dicha sustancia. Su presencia se objetiva mediante gammagrafía que proporciona el diagnóstico por imagen de la amiloide. En cambio, en el individuo sano se mantiene en sangre y va siendo excretado por el riñón a partir de las 6 horas. Se trata de un método de diagnóstico específico de amiloidosis sistémica, puesto que el componente P es común a los 4 tipos de amiloide.

La gammagrafía practicada a las 24 horas de la administración de dicha sustancia, proporciona una cartografía totalmente fiable de los depósitos de amiloide en los diversos órganos afectados salvo el corazón y los nervios periféricos. Además, se investiga la radiactividad plasmática a partir de las 6 horas de la administración, la cual disminuye en relación directa con la

captación del isótopo por parte de los depósitos de amiloide y consecuentemente, disminuye la excreción urinaria de aquel. En cambio, en el individuo sano, dado que el isótopo no es captado, la radiactividad plasmática persiste y sólo desciende progresivamente a medida que éste es excretado.

Las aplicaciones prácticas de este estudio son múltiples:

- Diagnóstico de amiloidosis en los pacientes con cuadro clínico compatible pero con estudio histopatológico negativo después de una o varias biopsias.
- Comprobación de la extensión y cantidad de depósitos de amiloide.
- Guía para seleccionar el sitio más adecuado de posteriores biopsias en los casos en que interesa obtener una demostración histopatológica de la amiloide después de varias biopsias negativas.
- Demostración del aumento progresivo de los depósitos en la mayoría de pacientes no tratados.
- Control de los resultados de un tratamiento clínicamente eficaz. En algunos casos se comprueba la ausencia de progresión de los depósitos y en otros una reducción significativa de los mismos. En estos y como consecuencia de la menor captación del isótopo por parte de los depósitos, aumenta la radiactividad plasmática en relación con la observada antes y subsiguientemente se incrementa la eliminación urinaria del isótopo.

Por otra parte, se ha propuesto para el diagnóstico temprano de la enfermedad en los portadores asintomáticos de PAF, para detectar los depósitos en la etapa preclínica; han comprobado que en ocasiones tardan más de cinco años en iniciar el proceso (53).

2.6.9. Afectación temprana del sistema nervioso autonómico cardíaco

Fue estudiada con todo detalle por el grupo del Profesor Falcao de Freitas de Porto (54) y se concluyó que en todos los pacientes con PAF, la variabilidad de la frecuencia cardíaca estaba tanto más alterada cuanto mayor era la duración del proceso. Se analizaban los intervalos R-R después de someterles a diversos estímulos físicos y farmacológicos y se constataba la disminución o anulación de dicha variabilidad. Además se comprobó esa alteración en la fase inicial de la PAF, por lo que era un signo temprano de la misma, e incluso se

detectó en algunos portadores asintomáticos en la fase preclínica cuando estaban a punto de instaurarse las manifestaciones evidentes, por los que esos portadores quedaban convertidos en pacientes asintomáticos si dichas alteraciones se mantenían.

En el foco balear se investiga esa alteración desde 1990 y ha confirmado dichos resultados (24).

2.6.10. Anticipación en la edad de inicio de la PAF

Se había estudiado en diversas enfermedades hereditarias autosómico dominantes como la distrofia miotónica, Machado-Joseph y Huntington entre otras. En la PAF se inició por los autores portugueses. Para determinarla se compara la edad de inicio del proceso en los progenitores y sus hijos. La anticipación será positiva si la edad de los hijos es menor que la de los padres, nula si coinciden ambas y negativa cuando la edad de inicio en los hijos es más tardía.

En las dos series portuguesas más importantes (55,21) la anticipación positiva superó las otras dos (68% en 147 pares y 72% en 227 pares). Por otra parte se comprobó en la primera serie que la anticipación positiva era más elevada en los hijos de madre (83%) que en los de padre (68%).

En la única evaluación española, la anticipación positiva alcanzó el 83% sobre 24 pares de padres-hijos (20).

2.6.11. Trasplante hepático

El tratamiento etiopatogénico con el trasplante hepático (TXH), que se inició en 1990 (56) con el fin de suprimir la fuente de la variante sistémica, se ha consolidado como un método eficiente especialmente en pacientes con la variante TTRMet30 ya que interrumpe el curso de la PAF y se inician lentas mejorías de muchos síntomas.

El número de TXH ha ido en aumento y en los últimos datos del Registro Internacional (57) figuraban 1.229 TXH a los que deben sumarse los no registrados que probablemente superen los 500.

Se insiste en que los resultados son mejores si:

- La variante es la TTRMet30
- Más jóvenes son los pacientes
- Menor es la duración de la PAF sugiriendo a ser posible el TXH durante el primer año del diagnóstico (58,59)

Basados en la independencia de la fuente retiniana, existe la posibilidad de que después del TXH se originen depósitos amiloideos en el vítreo tributarios de vitrectomía y otros en el trabéculo causantes de glaucoma secundario (60).

En todo trasplantado es preceptiva la investigación del marcador para comprobar que la variante ha desaparecido del suero. En los casos en que se hubiera implantado el hígado de un portador, obviamente el marcador seguiría siendo positivo y por consiguiente el trasplante habría sido inefectivo (22). Hasta ahora no se ha comunicado ningún caso.

2.6.12. Trasplante hepático dominó

Relacionado con el TXH en los enfermos con PAF y debido a la progresiva escasez de donantes, se propuso la utilización del hígado de esos pacientes, para implantarlo a otros enfermos mayores de 50 años con un proceso hepático de extrema gravedad y por tanto muy limitada expectativa de vida (22). Se basa en que el hígado de los pacientes con PAF es completamente normal desde el punto de vista morfológico y funcional, salvo la síntesis de la variante sistémica de la TTR que teóricamente podría originar la PAF al cabo de un período que en principio se consideró sería de 8-10 años.

El primero se realizó en 1995 (61) y se ha denominado trasplante hepático secuencial o dominó (DTXH). Se proporciona un hígado válido a unos pacientes que debido a su proceso posiblemente habrían fallecido antes de llegarles el turno en la lista de espera, o ya no serían operables en dicho momento. Como es lógico los receptores quedarían convertidos en portadores asintomáticos. El número de DTXH ha ido en aumento y en los últimos datos del Registro Internacional (57) figuraban 512 casos a los que deben sumarse los no registrados que probablemente superen los 100.

Con este tipo de trasplante se agilizan las listas de espera, pues cada vez que llega un hígado cadáver se trasplantan dos candidatos en vez de uno. Incluso en 1999 se trasplantaron tres al hacer el “split” del hígado del paciente con PAF (Comunicación del Dr. Bismuth del Hospital Paul Brousse de París).

Para los portadores que inician la PAF y cuyo diagnóstico es muy temprano, tiene gran interés este tipo de trasplante, pues permite implantarles el hígado cadáver mucho antes de lo que les correspondería ya que son llamados cuando lo es uno que le precede en la lista y que recibirá su hígado.

Debido a la condición de portadores, se recomiendan controles periódicos de los receptores para comprobar la posible aparición de la PAF en el futuro.

2.6.13. Aparición de PAF en los receptores de DTXH

Debido al riesgo de que el DTXH pueda originar la PAF en el receptor, diversos grupos han realizado controles en esos pacientes para comprobar si se producía el depósito de la variante, así como el intervalo transcurrido y en su caso si originaba la PAF.

- Un primer grupo (62) realizó biopsias gastroduodenales a 5 receptores asintomáticos a los 3 y 9 años y en dos fue positivo el resultado.
- El segundo grupo (63) realizó la biopsia de piel a 4 receptores asintomáticos entre los 6 y 7 años y en todos fue positiva. En la biopsia del nervio sural en 6 receptores asintomáticos, sólo fue positiva en 1 de ellos a los 6 años.
- El tercer grupo (64) comprobó en un receptor el cuadro clínico de polineuropatía (PNP) a los 8 años del implante con biopsia de nervio y recto positivas. Debido a la progresión fue retrasplantado a los 14 meses. En 4 receptores asintomáticos sólo se comprobó la biopsia rectal positiva en uno de ellos a los 2,5 años.
- El cuarto grupo (65) comprobó biopsia duodenal positiva a los 6 años en un receptor asintomático que al cabo de un año inició un cuadro clínico de PNP leve con EMG positivo.

Como consecuencia de lo expuesto debe informarse a los receptores que la posible aparición de la PAF calculada previamente entre 8-10 años, puede iniciarse a partir de los 2,5 años.

2.6.14. Sustancia R1

Uno de los datos más trascendentes ha sido la creación y desarrollo por el grupo del Profesor Pepys (66) de una sustancia llamada R1, cuya sigla es el palíndromo CPHPC, para el tratamiento farmacológico de las amiloidosis sistémicas. Está destinada a eliminar el componente P sérico de la amiloide (SAP) que es el precursor del componente P amiloideo.

Se basa en que el componente P amiloideo *in vitro* estabiliza el componente fibrilar y le protege de la degradación por los fagocitos y enzimas proteolíticos y por otra parte en la existencia de un equilibrio dinámico entre el componente P sérico y el amiloideo en los pacientes.

Los ratones transgénicos SAP X SAP-KO *mice* (desprovistos del gen murino del SAP, transgénicos para el SAP humano), fueron utilizados en las primeras fases de la investigación para fundamentar el tratamiento *in vivo* con dicha sustancia. Se les indujo la formación de amiloide mediante la inyección endovenosa del factor incrementador de la misma (*amyloid-enhancing factor)* y al cabo de 7 días se inició la administración del CPHPC en el agua a un grupo de 21 ratones mientras que los 11 de otro grupo no fueron tratados. Al cabo de 40 días se comprobó que el depósito de amiloide era significativamente menor en el grupo tratado sugiriendo que el CPHPC había reducido el acúmulo de amiloide.

La administración de esa sustancia tiene por objetivo su unión con el SAP que es eliminado por el hígado. La acusada disminución del mismo cambia la distribución del SAP en los depósitos que va fluyendo hacia el plasma donde se une a dicha sustancia R1 y es igualmente eliminado. Como consecuencia la cantidad del componente P de los depósitos va disminuyendo. Se espera que esa disminución facilitará la degradación proteolítica del componente fibrilar y consecuentemente mejorarán los síntomas de la PAF.

Los ensayos clínicos en 26 pacientes con diversas amiloidosis sistémicas adquiridas y hereditarias son hasta el momento muy alentadoras.

2.6.15. Diagnóstico preimplantatorio

Es un método de reproducción asistida que posibilita la procreación de hijos sanos a los portadores asintomáticos heterocigotos. Consiste en implantar blastómeros de embriones que no tienen la mutación TTRMet30. Se ha realizado en Portugal desde 2001 siendo el protocolo muy laborioso (67,68).

2.6.16. Estabilización de la TTRMet30

El conocimiento de la amiloidogénesis ha dirigido los esfuerzos de los investigadores para lograr medicamentos que fueran capaces de evitar la disociación de la TTRMet30 y de este modo impedir la formación de la amiloide. Comentaremos las sustancias estabilizadoras más utilizadas en los diversos ensayos en curso.

- **Yododiflunisal**. Se comprobó el efecto estabilizador en los estudios *in vitro* y *ex vivo* del plasma de enfermos y portadores homo y heterocigotos y de ratones transgénicos TTRMet30XTTR-KO *mice* desprovistos del gen murino de la TTR (69). Posteriormente se ha

investigado su efecto *in vivo* en el ratón transgénico para la TTRMet30 humana y aunque se comprueba la estabilización de la TTR en plasma, no aparecen diferencias significativas entre los ratones tratados y no tratados en cuanto a depósitos de amiloide o agregados no fibrilares de TTRMet30 (70).

- **Diflunisal**. Se ha comprobado la estabilización de la TTR *in vitro* y tambien *ex vivo* en los sueros de los enfermos tratados con el fármaco al compararlos con los controles y que su efecto es proporcional a las dosis administradas (71). De todos modos, al comparar su efecto *in vitro* con los del yododiflunisal, éste tiene una capacidad 100 veces mayor para inhibir la disociación (69). Queda por conocer el estudio *in vivo* en los ratones transgénicos TTRMet30.
- **Fx-1006A**. Se ha propuesto por diversos grupos basados en el efecto estabilizador de la disociación en el estudio *ex vivo* del plasma de los enfermos tratados (72). Como en el caso anterior queda por conocer el estudio *in vivo* en los ratones transgénicos TTRMet30.
- **Genisteína**. Es una isoflavona de la soja propuesta para la inhibición de la disociación de la variante de la TTR (73). Posteriormente se ha realizado un exhaustivo estudio del efecto sobre la TTR aislada y en la TTR del plasma total comprobando ligera inhibición de la disociación. No obstante, tras el estudio *ex vivo* incubando genisteína con plasma humano e *in vivo* administrando el producto a ratones transgénicos TTRMet30 (74), se ha demostrado que no evita la agregación de la TTR y por tanto la aparición de depósitos amiloideos.

Después de lo expuesto sobre las cuatro sustancias propuestas debemos concluir que hasta la fecha no se ha logrado el objetivo perseguido quedando pendientes de las investigaciones en curso.

2.6.17. Desestructuración de los depósitos amiloideos

Se ha comprobado que el antibiótico doxiciclina desestructura las fibrillas amiloideas *in vitro.*

Estos datos han sido complementados con el estudio *in vivo* en ratones transgénicos TTRMet30XTTR-KO *mice* o sea en los que se ha suprimido el gen murino de la TTR. Al cabo de un año de la administración oral de doxiciclina en el 60% de los casos no tratados, o sea el grupo control, han aparecido

depósitos de amiloide congofílicos mientras que no han aparecido en los tratados. Por ello se debe concluir que la doxiciclina es un eficaz desestructurador de la variante TTRMet30 en el ratón transgénico y además disminuyen sensiblemente los marcadores asociados al depósito amiloideo como la matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) y el SAP (75). Esperamos los datos de la aplicación en clínica para valorar definitivamente su eficacia.

2.6.18. Silenciación del gen de la TTRMet30

Los agentes que silencien la expresión del gen de la variante pero no de la TTR nativa, podrían ser un excelente medio para evitar la aparición de la PAF. Con este objetivo se ha utilizado los *small interfering RNAs* (sRNAs) en los cultivos celulares comprobando que inhiben específicamente la variante de la TTR pero no la TTR nativa (76). Si se confirman esos datos en los enfermos y portadores asintomáticos, esa terapéutica génica podría convertirse en una herramienta fundamental para el tratamiento y la prevención de la PAF.

2.6.19. Reducción de la síntesis hepática de la TTR mutada

La administración de oligonucleótidos antisentido específicos (*specific antisense ologonucleotids: ASO)* en ratones transgénicos TTRSer84 ha logrado la disminución de los niveles de la variante plasmática sintetizada por el hígado, proporcional a las dosis administradas (77). A modo de conclusión repetimos lo dicho en la terapia génica citada en el apartado anterior.

2.6.20. Posible presentación de la amiloidosis senil sistémica en los portadores añosos

Esta entidad nosológica, previamente llamada amiloidosis cardíaca senil, se había descrito en enfermos entre 70 y 80 años con afectación cardíaca amiloidea sin antecedentes familiares de amiloidosis y se comprobó que la amiloide depositada estaba originada por la TTR nativa (78).

Se ha demostrado una evidente relación de la ASS con la PAF en un interesante trabajo (79). Se realizó el estudio necrópsico cardíaco de 6 enfermos con diversas variantes de TTR, todos ellos con cardiopatía amiloidea y solo uno de ellos era mayor de 67 años. Cinco pacientes no habían sido trasplantados y uno sí. En los cinco primeros el 50% del depósito amiloideo cardíaco estaba constituído por TTR normal y el 50% restante por las respectivas variantes de TTR, mientras que en el paciente trasplantado la TTR normal alcanzaba el 80%. Como consecuencia se consideró que la cardiopatía

previa de la PAF era un factor predisponente para el depósito de la TTR nativa, o sea, de la ASS y se acentuaba después del TXH.

Además de la típica cardiopatía restrictiva se han descrito otras localizaciones en estos pacientes: síndrome del túnel carpiano bilateral junto con el del túnel cubital unilateral en un paciente con biopsias gastroduodenal e ileal Rojo Congo positivas (80), afectación vascular diseminada en una paciente con tromboflebitis femoral (81) y afectación pulmonar y renal en las necropsias de 33 pacientes (82).

Por otra parte, se ha logrado un modelo experimental de la ASS mediante ratones transgénicos para la TTR nativa humana, que ha aportado importantes datos sobre la amiloidogénesis de esa entidad nosológica (83). En el 84% de ellos, a los 18 meses aparecieron depósitos cardíacos y renales de los cuales el 20% fueron fibrilares y congofílicos idénticos a los detectados en la ASS, mientras que en el resto eran depósitos de monómeros de la TTR, no fibrilares ni congofílicos, que posiblemente son los precursores de la amiloide que posteriormente también se describieron *in vitro* al iniciarse la formación de fibrillas de la TTR nativa (43).

Munar-Qués (comunicación personal) en el año 2003 se planteó la posibilidad, hasta entonces inédita según nuestras informaciones, de que la ASS pudiera presentarse en los portadores añosos en vez de la PAF. Por ello, especialmente en los casos en que existiera cardiopatía restrictiva con datos sugestivos de depósitos amiloideos, sugirió realizar el diagnóstico diferencial entre PAF y ASS con el estudio molecular de dichos depósitos cuyas fibrillas en la primera serían de TTR mutada y en la segunda de TTR normal o nativa.

2.6.21. Importancia de la microalbuminuria persistente en los portadores asintomáticos

Se investigó la microalbuminuria de 24 horas cada seis meses en 22 portadores asintomáticos portugueses (7 varones y 15 hembras, con edad media de 41.6 ± 9.6) y se comprobó la persistencia en 8 (36%) de valores patológicos lo que conllevó, en comparación con los que la microalbuminuria era normal, 4,8 más probabilidades de iniciar la PAF generalmente en los 3 años siguientes (84).

Como consecuencia debemos concluir que la microalbuminuria patológica mantenida, en los portadores asintomáticos, es un factor predictivo del inicio de PAF, lo que tiene gran trascendencia práctica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL: SUJETOS ESTUDIADOS

Son los familiares consanguíneos asintomáticos del foco balear de PAF, en los que se ha realizado la investigación molecular. Corresponden a 50 grandes familias de las 55 existentes pues los familiares de 5 de ellas rehusaron el estudio.

En la familia del probando de cada gran familia, con sus ascendientes, colaterales y descendientes, en bastantes ocasiones se han originado núcleos familiares (familias nucleares) al tener descendencia sus miembros. Como consecuencia en las familias nucleares se han comprobado progenitores enfermos o portadores, con colaterales y descendientes portadores o no portadores, que se han sumado a los de la primera familia.

3.2. METODOLOGÍA: CONSEJO GENÉTICO INTEGRAL

Se ha revisado el protocolo de actuación del Grupo de Estudio de la PAF para el estudio de esos familiares, realizado atendiendo a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki, a través de las historias clínicas de los probandos y los progenitores enfermos o portadores de las diferentes familias y las de los portadores investigados en cada una.

Como se ha dicho previamente, denominamos consejo genético integral a ese protocolo que es el conjunto de entrevistas de los clínicos e investigadores básicos con los miembros de las familias afectadas: enfermos y familiares consanguíneos. Por ser la PAF una enfermedad sistémica se ha planeado con criterio de internista y se ha sistematizado en los siguientes apartados.

3.2.1. Conocimiento de la mutación del paciente

En todos los enfermos-probandos de gran familia y de familia nuclear, se ha comprobado la misma mutación en el gen de la TTR localizada en un solo alelo por lo que han sido heterocigotos.

Se encuentra en el exon 2 del ADN del citado gen cuyo codón en posición 30 está constituido por las bases ATG en vez de GTG, es decir, se ha sustituído la base de adenina (A) por una guanina (G). Esa mutación codifica la síntesis de una TTR anómala que es su marcador bioquímico, en la que se ha sustituido la valina por metionina en la posición 30 y por ello se denomina TTRVal30Met en la moderna terminología aunque en todo el texto utilizaremos la sigla primitiva TTRMet30 por ser la más conocida en la literatura mundial.

3.2.2. Entrevista con el paciente

Una vez logrado el diagnóstico específico de PAF se le informa de la naturaleza hereditaria del proceso y su patogenia, la posibilidad de que algún familiar consanguíneo hubiera padecido la enfermedad confundida con otro proceso y que un porcentaje de familiares asintomáticos fuera portador de la mutación. Además se le resumen los constantes avances de la investigación molecular aplicada, de gran interés para los enfermos y portadores.

Por estos motivos se le ruega la recolección de los datos de su familia para elaborar el árbol genealógico.

3.2.3. Árbol genealógico familiar

Se elabora un detallado árbol genealógico en el que se evidencia el probando y sus familiares consanguíneos: ascendientes, colaterales y descendientes de todas las familias nucleares que constituyen la gran familia. Debe abarcar el mayor número de generaciones, como mínimo la del probando, la anterior y la posterior, incluyendo a ser posible los nombres y apellidos de todos los familiares junto con las fechas de nacimiento y en su caso las de fallecimiento. Igualmente las de inicio de la enfermedad en los pacientes, como es lógico debe investigarse la posible existencia de familiares, vivos o fallecidos, diagnosticados de PAF o con un cuadro clínico compatible con ésta (enfermos probablemente afectados).

El número de generaciones en los árboles de las 50 familias, ha oscilado entre las 3 y 7 predominando las de 4 (36%) y 5 (38%).

Una vez concluído el árbol, si existen antecedentes de PAF en el probando, queda clasificado como caso familiar y como caso aislado si no existen.

3.2.4. Selección de candidatos para la investigación

Se explica al paciente la posibilidad de detectar la mutación en un porcentaje de familiares mediante la investigación molecular (genómica y proteómica).

Para realizarla se seleccionan los familiares en diversas etapas comenzando por los directos del paciente (padres, hijos y hermanos) para seguir después con los demás, guiados por los resultados de los primeros. Se insiste en que la decisión para llevarla a cabo deben tomarla los interesados si son mayores de edad o sus progenitores en el caso de que los familiares sean menores.

Como es lógico desde el momento en que se decide la investigación, todos esperan con angustia el resultado.

a) Investigación en los mayores de edad. Obviamente se realiza a los que lo desean.

b) Investigación en los menores de edad. El criterio seguido por el Grupo de Estudio para la edad del rastreo en éstos, se basa en que el inicio de la PAF en los portadores que puedan padecerla en el futuro no comienza hasta los 20 años y que los adolescentes pueden tener una gestación con el consiguiente riesgo de transmisión de la mutación a sus descendientes. Como consecuencia, sólo se aconseja la investigación poco antes de llegar a la pubertad.

A pesar del criterio expuesto, debido a la gran presión de los progenitores que desean comprobar si han transmitido la mutación a sus descendientes y como ha ocurrido en otros focos endémicos de PAF (tabla 4), se han investigado menores de edad mucho antes de la pubertad, basados en el derecho que tienen los progenitores a conocer si les han transmitido la mutación. En esos casos se ha insistido en que al llegar a la edad puberal debían informar a los portadores del citado riesgo de transmisión de la mutación y al alcanzar la mayoría de edad era preceptivo explicarles la posibilidad de padecer la enfermedad en el futuro e indicarles una entrevista con un clínico o investigador básico conocedor de la PAF.

Desde 2002 en que se promulgó la Ley de Autonomía del Paciente se ha impuesto la firma del conocimiento informado a los interesados mayores de edad y a los progenitores de los menores, que se comprometen a llevar al menor al médico para recibir la primera información cuando cumpla 12 años y que obre por su cuenta a partir de la mayoría de edad o sea, a los 18 años. Como puede comprobarse las obligaciones legisladas son coincidentes con los compromisos exigidos por el Grupo de Estudio.

3.2.5. Tipo de investigación molecular

Se ha realizado de modo diferente en dos etapas.

3.2.5.1. Primera etapa. Desde 1986 hasta 1995, la investigación molecular se realizó en Oporto por los Drs. Pedro P. Costa y María J.M. Saraiva, referentes mundiales de la PAF, quienes comprobaron que la mutación era la TTRMet30 en todas las familias mallorquinas y la carga génica heterocigota.

- La investigación proteómica o sea, el marcador bioquímico, se llevó a cabo con el método del immunoblotting (IB) que habían descrito al

descubrir la TTRMet30 circulante (29) y posteriormente con el método del IB simplificado (85).

Se basa en la fragmentación de la TTR por medio del bromuro de cianógeno (CNBr) que es específico para romper el carboxilo terminal de la metionina en una cadena peptídica. El monómero o subunidad de TTR normal de 127 aminoácidos tiene una metionina en posición 13 mientras que en la variante TTRMet30 existen 2, una en posición 13 y otra en la 30. Como consecuencia del efecto del CNBr, los aminoácidos de la TTR normal quedan divididos en 2 fragmentos (1-13 y 14-127 llamados respectivamente C1 y C2) mientras que la TTRMet30 origina 3 (1-13, 14-30 y 31-127 llamados respectivamente C1, Ca y Cb). Este último fragmento es la clave para el diagnóstico de los portadores heterocigotos y homocigotos.

Al realizar el IB se comprueba que tanto en los no portadores como en los portadores existe TTR no fragmentada que origina una banda llamada TTR; por otra parte los fragmentos C1 (1-13) y Ca (14-30) no son detectados por ser demasiado pequeños (47). En cambio siempre se detecta el C2 (14-127) correspondiente a la TTR fragmentada, con cambios de intensidad según sean o no portadores. El fragmento Cb (31-127) sólo se detecta en los hetero y homocigotos con cambios de intensidad entre ambos. Como consecuencia de lo expuesto el resumen de las bandas del IB es el siguiente:

a) No portador. Sólo dos bandas TTR y C2.
b) Portador heterocigoto. Aparecen 3 bandas: TTR, C2 y Cb. La banda Cb es poco intensa.
c) Portador homocigoto. Igualmente aparecen tres bandas: TTR, C2 y Cb pero en las dos primeras la intensidad es menor que en los heterocigotos, mientras que la de la Cb es mayor.

- La investigación genómica se simplificó debido a las especiales características de la mutación TTRMet30. Como se ha dicho, se origina por la sustitución de adenina por guanina en el segundo exón de la misma lo que produce sitios de restricción o digestión para las endonucleasas restrictasas Nsi I y Bal I (47,86). Basados en este hecho se realizó el análisis RFLP (*restriction fragments lenght polymorfisms*) de

ADN digerido por la Nsi I. El ADN amplificado con la PCR (*polymerase chain reaction)* digerido por la citada restrictasa logra, mediante los adecuados cebadores, el análisis del fragmento donde está la mutación comprobando que se trata de un heterocigoto u homocigoto según las características de las bandas electroforéticas: en el primero se ve la banda del gen de la TTR normal (195 pb) y las dos de la TTRMet30 (115 y 80 pb), mientras que en el homocigoto sólo se ven las dos bandas del gen de la TTRMet30 (115 y 80 pb), en cambio en el individuo normal sólo se ve la banda del gen de la TTR normal (195 pb).

3.2.5.2. Segunda etapa. A partir de 1996, la investigación molecular se ha realizado en Mallorca por los investigadores básicos Carlos Viader-Farré (fallecido recientemente en 2005), José María Zabay-Becerril y Juana María Mulet-Ferrer, siguiendo las directrices de la Profesora María J.M. Saraiva.

- Investigación genómica. Se ha utilizado la citada técnica del análisis RFLP comprobando que todos los portadores han sido heterocigotos.
- Investigación de la TTRMet30 circulante o marcador bioquímico. No se ha realizado el estudio proteómico con los métodos antes citados, sino con la investigación inmunológica de la variante mediante anticuerpos monoclonales.
    a. En 1993 se había publicado la preparación de un anticuerpo monoclonal del ratón frente a la TTR, denominado FD6, que por medio de ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay)* detectaba múltiples variantes de TTR amiloidogénicas causantes de neuropatía periférica y por tanto de la TTRMet30, tanto en enfermos como portadores (87). Por este motivo y siguiendo el consejo de la Profesora Saraiva, se llevó a cabo dicha investigación inmunológica en los portadores como rastreo para orientar a los clínicos mientras se completaba el estudio genómico.
    b. Posteriormente en 2001, se comunicó la preparación de un anticuerpo monoclonal del conejo frente a la TTR, llamado MAB 39-44 o A15, que mediante ELISA lograba resultados superponibles a los del FD6 (88). Por este motivo y la mayor

facilidad para conseguirlo, se inició su aplicación con el mismo fin antes comentado.

Los resultados positivos con ambos anticuerpos se dieron en todos los portadores, cuyo análisis genómico comprobó la mutación heterocigota.

3.2.6. Estadística

Se ha realizado un estudio descriptivo en que los resultados se expresan con la media, error estándard de la media (EEM), rango y mediana.

3.2.7. Comunicación de los resultados

Se realiza directamente a los mayores de edad o a través de sus progenitores si son menores.

Para los no portadores supone la liberación de la comentada angustia mientras que en los portadores se mantiene y exagera al analizar las posibles consecuencias personales y familiares. Por ello se les aconseja una entrevista con un médico o investigador básico conocedores de la PAF, para recibir las informaciones sobre los riesgos que su condición conlleva junto con la adecuada conducta frente a los mismos, a las que se suma un resumen de las alentadoras perspectivas para el futuro con la finalidad de mejorar su situación psicológica.

3.2.8. Informaciones a los portadores sobre los riesgos y conducta frente a los mismos

Los sistematizaremos en cuatro apartados:

3.2.8.1. Posibilidad de padecer la PAF en el futuro. La penetrancia del gen con el consiguiente inicio de la enfermedad, es relativamente reducida como podrá comprobarse al analizarla en los Resultados. Como consecuencia, los portadores no deben obsesionarse en la posible presentación en el futuro y evitar sobre todo la constante búsqueda de síntomas de inicio de la PAF basados en los de sus progenitores o enfermos conocidos.

Debido al riesgo de iniciar la enfermedad, se aconseja a los portadores una revisión anual de gran trascendencia práctica para lograr el diagnóstico temprano de la PAF en los casos en que se inicien los primeros síntomas, pues cuanto antes se realice el tratamiento etiopatogénico, o sea el TXH, mejores serán los resultados. Además de una revisión clínica se indica el

estudio de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y el control periódico de la microalbuminuria, cuyas alteraciones persistentes, son las primeras manifestaciones objetivables de la PAF en la etapa preclínica que permiten etiquetarlos de pacientes asintomáticos. Igualmente es de interés la gammagrafía amiloidea, puesto que puede detectar el inicio de depósitos amiloideos en esa etapa como se ha comprobado en los casos antes citados.

En los portadores que han enfermado se aconseja el TXH en la mayor brevedad por lo antes comentado y una vez realizado se indica la investigación del marcador bioquímico para descartar la inédita posibilidad de TXH ineficaz comentada previamente.

3.2.8.2. Posibilidad de presentación de la amiloidosis senil sistémica (ASS) en los portadores añosos. Debido a la hipótesis expuesta de que esa entidad pudiera presentarse en los portadores añosos, en los casos en que se iniciara una amiloidosis cuya manifestación más destacada fuera la cardiomiopatía restrictiva, debería realizarse el diagnóstico diferencial entre PAF y ASS con el estudio histoinmunoquímico de los depósitos amiloideos comentado previamente.

3.2.8.3. Riesgo para los descendientes. Es la posible transmisión de la mutación del portador a su descendencia.

Se ofrece una entrevista a los portadores mayores de 18 años, en edad fértil, sugiriendo que acudan acompañados de su pareja para ser informados con todo detalle. El objetivo es explicarles los riesgos de transmisión de la mutación, que como se ha dicho oscilan entre el 50% y el 100% según sea la carga génica del portador, para que tomen la decisión que consideren oportuna. Para completar la información se les proporcionan los datos recogidos merced a tres investigaciones pioneras del Grupo de Estudio referentes a los portadores de progenitores portadores y los porcentajes de portadores por paciente y por progenitor portador.

En los casos en que un progenitor sea heterocigoto y el otro sano, o ambos heterocigotos, se les informa sobre la posibilidad de tener hijos libres de la mutación mediante el método del diagnóstico preimplantatorio antes comentado (67,68).

En la misma y dirigida a los portadores varones se ha incluído la posible reserva de semen basados en lo ocurrido a uno de los portadores, por considerarla lógica. Dicho portador que tenía depósitos de amiloide en la gammagrafía amiloidea, inició disminución de potencia sexual que podía ser el primer síntoma de la PAF. Mientras se investigaba si el proceso comenzaba, el portador sugirió la posibilidad de reservar semen en el Banco, pues si se confirmaba el inicio y en consecuencia progresaba su impotencia, no podría concebir hijos, pero sí con dicho semen mediante el método del diagnóstico preimplantatorio.

A los portadores jóvenes de uno u otro sexo menores de edad se les aconseja dicha entrevista, directa o indirectamente a través de sus progenitores cuando llegan a la pubertad. Se les informa en los mismos términos debido al riesgo existente a partir de entonces de transmitir la mutación a sus descendientes.

Sólo en una ocasión se planteó al Grupo la posibilidad del diagnóstico prenatal. Se trataba de una portadora que había iniciado la gestación. Deseaba saber si había transmitido la mutación al feto e insistió en que no tenía intención de llevar a cabo la IVE. Se le explicó que no era lógico intentarlo porque la PAF es una enfermedad de inicio tardío y por otra parte la amniocentesis puede originar complicaciones; como consecuencia no se realizó.

3.2.8.4. Riesgo para la Comunidad. Los portadores no pueden ser incluidos en las listas de donantes de hígado porque como se ha comentado, los pacientes receptores de su hígado se convertirían en portadores asintomáticos por lo que tendrían el riesgo de padecer la PAF en el futuro (18) tanto mayor cuanto más jóvenes fueran.

3.2.9. Alentadoras perspectivas terapéuticas para el futuro

Basados en lo expuesto en la Introducción resumiremos las diversas líneas de investigación que si consiguen los objetivos perseguidos, permiten albergar muchas esperanzas para el futuro de los portadores, quizás no lejano.

3.2.9.1. Silenciamiento del gen mutado. Con este método el gen dejaría de expresarse, o sea, que no codificaría la síntesis de la TTRMet30 en todos los focos por lo que se evitaría la PAF.

3.2.9.2. Evitar la síntesis hepática de la TTRMet30. Con ello se evitaría la TTRMet30 circulante por la sangre, o sea la sistémica. Como consecuencia seguirían en juego los otros dos focos de síntesis de la variante, o sea, retina y plexos coroideos.

3.2.9.3. Evitar la disociación de la TTRMet30. La disociación, como se ha comentado, es la fase previa obligada para originarse la amiloide. Con los procedimientos que puedan lograrlo, el portador seguiría con la TTRMet30 sin el peligro de iniciar la PAF.

3.2.9.4. Disminución progresiva de los depósitos de amiloide. En los casos en que el portador asintomático ya tiene depósitos de amiloide comprobados por gammagrafía amiloidea o biopsia, podría iniciar el tratamiento con la sustancia R1 para eliminar el componente P de las fibrillas de amiloide, que quedan desprotegidas y a merced de los macrófagos y enzimas proteolíticos, con lo que irían disminuyendo esos depósitos. Lo mismo podría hacerse con mayor motivo, en los casos de portadores que presentan las primeras manifestaciones objetivables de la PAF en la etapa preclínica (alteración persistente de la variabilidad de la fecuencia cardíaca y microalbuminuria).

La destrucción de las fibrillas podría lograrse igualmente con el antibiótico doxiciclina, que en todo caso sólo actuaría sobre la TTRMet30 sistémica pues no atraviesa la barrera hemato-retiniana. Como consecuencia seguirían expuestos a presentar amiloidosis vítrea o glaucoma secundario en el futuro.

4. RESULTADOS

Son datos recogidos en cada una de las etapas del consejo genético integral expuesto en la Metodología, que constituyen la epidemiología global de esos familiares, en especial de los portadores y las consecuencias de las informaciones recibidas.

En algunos apartados además de los datos de la serie actual se adjuntan los de las anteriores series del foco balear y en algún ítem los de las escasas aportaciones de otros focos endémicos.

4.1. EPIDEMIOLOGÍA GLOBAL. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS FAMILIARES INVESTIGADOS Y EN ESPECIAL DE LOS PORTADORES ASINTOMÁTICOS

4.1.1. Familias investigadas

4.1.1.1. Número

Hemos realizado el estudio a 50 familias (47 procedentes de Mallorca y 3 de Menorca) de las 55 existentes (5 de ellas rehusaron el estudio) desde el inicio de 1986 hasta el 31 de diciembre de 2006.

4.1.1.2. Generaciones por familia

El número de generaciones analizadas en cada familia ha oscilado entre 1 y 7. Han predominado 19 con 5 generaciones (38%) y 18 con 4 (36%).

4.1.1.3. Antecedentes familiares de PAF

Llama la atención en las cuatro series del foco balear (Tabla 1) el progresivo aumento de familias y el porcentaje de casos aislados que llega en la actual al 60%.

Tabla 1. Familias del foco balear con y sin antecedentes familiares

	Munar-Bernat 1989 (1)	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar-Qués et al 1996 (3)	Bosch-Rovira 2006
A. familiares	11	11	13	20
Casos aislados	5 (31%)	14 (56%)	18 (58%)	30 (60%)
Familias	16	25	31	50

4.1.1.4. Rastreo de familiares consanguíneos

Se han rastreado 307 consanguíneos 48% varones y 52% mujeres, distribuidos genealógicamente en: 56 ascendientes (18%), 91 colaterales (30%) y 160 descendientes (52%).

En la Tabla 2 se resumen los datos de las tres series del foco balear junto con los de tres series de otros focos endémicos. En el foco balear el número de familiares consanguíneos rastreados ha aumentado progresivamente así como el de portadores, no obstante, el porcentaje de estos últimos fue mayor en la primera serie y se ha mantenido en las dos últimas alrededor del 40%.

Tabla 2. Rastreo familiares consanguíneos

	Costa y Saraiva 1988 (89)	Nakazato et al 1986 (90)	Tanaka et al 1987 (91)	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar-Qués et al 1996 (3)	Bosch-Rovira 2006
Familiares	367	50	115	125	208	307
Portadores	182 (49,6%)	9 (18%)	17 (14,7%)	74 (59,2%)	83 (39,9%)	125 (40,7%)
No portadores	185	41	98	51	125	182

Al comparar estos datos con los de los demás focos, se comprueba que el número de rastreos de familiares del foco balear sólo ha sido superado por los del foco portugués y por otra parte que el porcentaje de portadores ha sido mucho más elevado en el foco portugués y el balear que en las dos series japonesas.

4.1.2. Portadores asintomáticos

4.1.2.1. Número

Detectamos 125 portadores (40,7%) entre los consanguíneos rastreados.

4.1.2.2. Mutación

Todos ellos han presentado la mutación TTRVal30Met y han sido heterocigotos. Según el antecedente de PAF en los probandos de las 50 familias estudiadas un 40% fueron familiares frente a un 60% aislados.

4.1.2.3. Distribución genealógica

Se clasificaron en 17 ascendientes (14%), 29 colaterales (23%) y 79 descendientes (63%).

En la Tabla 3 puede comprobarse en las cuatro series del foco balear que el aumento de portadores ascendientes y colaterales es discreto, mientras que el de los descendientes es llamativo.

Tabla 3. Distribución genealógica portadores foco balear

	Munar-Bernat 1989 (1)	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar-Qués et al 1996 (3)	Bosch-Rovira 2006
Portadores	46	74	83	125
Ascendientes	8 (17,3%)	8 (10,8%)	10 (12%)	17 (13,6%)
Colaterales	6 (13%)	10 (13,5%)	12 (14,5%)	29 (23,2%)
Descendientes	32 (69,6%)	56 (75,6%)	61 (73,5%)	79 (63,2%)

4.1.2.4. Sexo

De los 125 portadores, el 48% fueron varones y 52% mujeres.

4.1.2.5. Origen de la mutación

El origen de la mutación ha sido paterno en el 46% de los portadores, materno en el 32% y desconocido 22%.

4.1.2.6. Clasificación progenitores

Entre los 125 portadores, 40 tenían el padre enfermo, 24 la madre enferma, 18 el padre portador, 16 la madre portadora y en 27 el origen fue desconocido.

4.1.2.7. Edad de rastreo de los portadores

Se practicó el rastreo por décadas con el siguiente resultado:

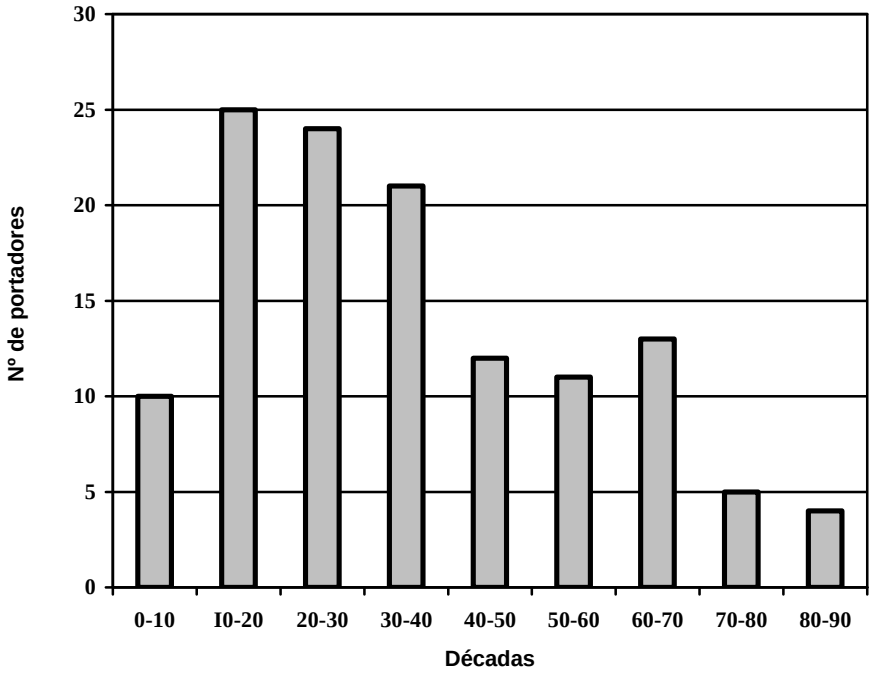

Figura 1. Edad de rastreo de los portadores

La edad media fue 35.3 ± 1.9 (1-87) y la mediana 31. Entre la 6ª, 7ª, 8ª y 9ª décadas suman 33 lo que supone el 26,4%.

4.1.2.8. Portadores fallecidos

Fallecieron durante el estudio 11 portadores (8,8%).

La edad media fue 73,1 ± 5,3 (36-91) y la mediana 76. Entre la 7ª, 8ª, 9ª, y 10ª décadas se encuentran el 90% de los fallecidos.

Dos fallecidos eran menores de 50 años, uno falleció de accidente de tráfico y el otro (que desarrolló la PAF) por complicaciones postoperatorias derivadas del trasplante hepático. Los demás, todos mayores de 50 años, fallecieron por diversas causas.

4.1.2.9. Demografía, incidencia y prevalencia de portadores

La población de las islas Baleares por datos facilitados por el IBE (Instituto Balear de Estadística) del año 2006 fue 1.001.062 habitantes.

La incidencia ha sido de 11,98 portadores por 100.000 habitantes y la prevalencia de 11,38 portadores por 100.000 habitantes.

La prevalencia se ha mantenido en las tres últimas series del Grupo de Estudio del foco balear: 11.5, 13.7 y 11.38 por 100.000 habitantes.

4.1.2.10. Portadores asintomáticos con depósito de amiloide

Basados en la existencia de depósitos amiloideos en portadores detectados por gammagrafía con ^{123} I-SAP y debido a la colaboración de los Drs. M.B. Pepys y P.N. Hawkins de Londres. Se realizó en 7 portadores asintomáticos del foco balear cuyas edades estaban comprendidas entre 13 y 41 años. Se detectaron depósitos en seis. Entre estos, tres se mantienen asintomáticos a los 34, 31 y 34 años. En los tres restantes se inició la PAF al cabo de 1, 4 y 14 años de la exploración.

4.1.2.11. Portadores hijos de enfermos

Se ha investigado en las cuatro series del foco balear (Tabla 4). Se observa que el porcentaje de portadores ha sido siempre muy elevado: mayor del 70% en las dos primeras series y posteriormente alrededor del 64%, valores todos alejados del 50% teórico esperado.

Al comparar estos datos con los de las 3 series de otros focos endémicos, se comprueba que en éstos el porcentaje de portadores es mucho más reducido.

Tabla 4. Portadores hijos de enfermos

	Saraiva et al 1985 (29)	Nakazato et al 1986 (90)	Tanaka et al 1987 (91)	Munar-Bernat 1989 (1)	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar-Qués et al 1996 (3)	Bosch-Rovira 2006
Padres con PAF	12	15	13	18	27	36	48
Hijos rastreados	40	24	37	42	63	77	95
Hijos portadores	21 (52,5%)	9 (37,5%)	17 (43,2%)	31 (73,8%)	45 (71,4%)	50 (64,9%)	61 (64,2%)
Límites edad (años)	6-35	7-22	7-21	1-35	1-56	1-56	1-57

De los 61 portadores de la última serie estudiada, el 54% fueron mujeres y el 46% varones. Tenían el padre enfermo 31 de los portadores y 17 la madre.

La edad media fue 23.3 ± 12.5 (1-57). La mediana 21.

4.1.2.12. Portadores hijos de progenitor portador

Se ha realizado en las tres últimas series (Tabla 5) comprobando el progresivo aumento de portadores entre la primera de las series y las dos últimas, quedando alrededor del 48%.

Es una investigación que junto con las dos siguientes sólo se ha realizado en el foco balear. Están destinadas a completar la información proporcionada a los pacientes con hijos no rastreados (probandos de las grandes familias y progenitores de familias nucleares) al explicarles los riesgos teóricos de la transmisión a sus descendientes.

Tabla 5. Portadores hijos de progenitores portadores

	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar-Qués et al 1996 (3)	Bosch-Rovira 2006
Padres	13	18	28
Hijos	21	33	54
Portadores	9 (42,8%)	16 (48,4%)	26 (48,1%)

Al comparar los porcentajes con los de los portadores hijos de enfermos (Tabla 4), las de éstos últimos son mucho más elevados.

4.1.2.13. Porcentaje de portadores por paciente

Exponemos a continuación el porcentaje de hijos portadores por paciente con PAF del foco balear recogidos en diversos períodos de tiempo.

Se estudió en las cuatro series del Grupo de Estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de portadores por paciente

	Munar-Bernat 1989 (1) 18 pacientes	Munar-Qués et al 1992 (2) 27 pacientes	Munar-Qués et al 1996 (3) 36 pacientes	Bosch- Rovira 2006 48 pacientes
100%	10 (55,5%)	14 (51,8%)	17 (47,2%)	23 (47,9%)
80%	1	1	1	1
66%	0	1	1	1
50%	4	6	7	9
33%	1	2	2	3
0%	2	3	8	11

Puede comprobarse el elevado predominio de los pacientes con PAF con el 100% de hijos portadores que supera el 50% en las dos primeras y queda alrededor del 47% en las otras dos.

4.1.2.14. Porcentaje de portadores por progenitor portador

Se ha realizado el estudio en las tres últimas series del foco balear (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de portadores por progenitor portador

	Munar-Qués et al 1992 (2) 13 portadores	Munar-Qués et al 1996 (3) 18 portadores	Bosch Rovira 2006 28 portadores
100%	5 (38,4%)	6 (33,3%)	10 (35,7%)
80%	0	1	1
66%	0	0	1
50%	3	5	5
33%	1	1	4
25%	0	0	1
0%	4	5	6

Al igual que en los pacientes, predominan los progenitores con el 100% de portadores aunque los porcentajes son mucho más reducidos que los detectados en los portadores hijos de enfermos quedando en la última serie alrededor del 36%.

4.1.3. Portadores que enferman: pacientes con PAF

4.1.3.1. Número

De los 125 portadores detectados sólo 29 (23%) desarrollaron la PAF, o sea que el gen de la mutación se expresó.

4.1.3.2. Edad de inicio

El inicio clásico, antes de los 40 años, se observó en el 69% y el inicio tardío, a partir de los 40 años, en el 31%.

La edad de inicio queda resumida por décadas en la figura 2:

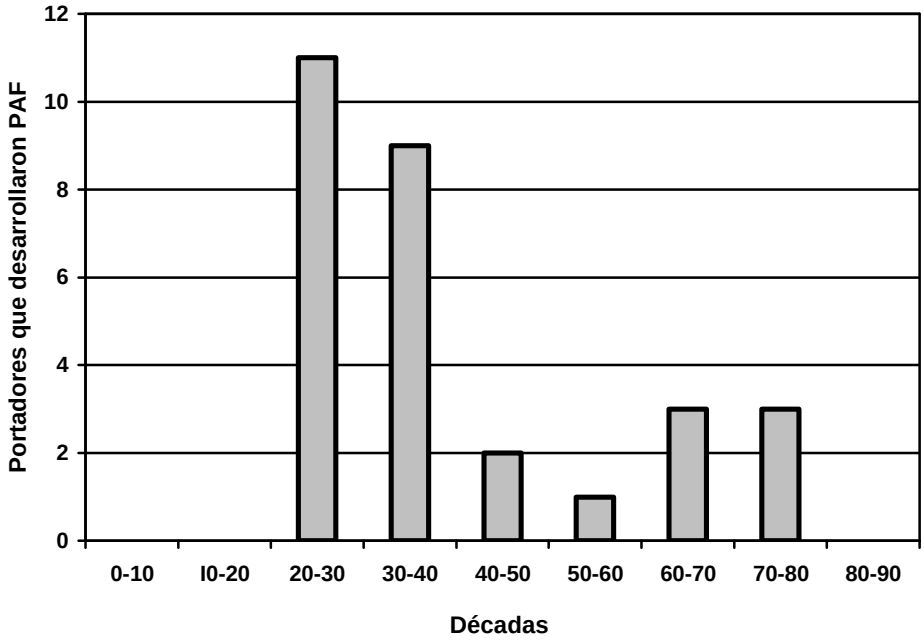

Figura 2. Edad de inicio de la PAF

La edad media fue 39,7 ± 3,3 (20-76) y la mediana 33.

4.1.3.3. Penetrancia de la mutación

En las dos primeras series del foco balear, la penetrancia (expresión clínica del gen mutado, o sea, portadores que han desarrollado la PAF) era muy baja, pero en la serie actual ha alcanzado el 23% (Tabla 8). Lo atribuímos a que muchos portadores han superado los 20 años y se ha originado anticipación en

la edad de inicio. Por otra parte, en la serie actual se ha comprobado que las mujeres han sido más resistentes a la penetrancia (34% vs 66%).

Tabla 8. Penetrancia de la mutación: PAF en portadores

	Costa y Saraiva 1988 (89)	Munar-Qués et al 1992 (2)	Munar- Qués et al 1996 (3)	Bosch- Rovira 2006
Portadores	26	74	83	125
Enfermos	7 (26,9%)	2 (2,7%)	3 (3,6%)	29 (23,2%)

Al comparar estos datos con los únicos localizados en el foco portugués, se comprueba que la penetrancia más elevada del foco balear es inferior a la de dicho foco. Consideramos que es debida a la mayor resistencia a la penetrancia de los portadores de nuestro foco, apoyada por el predominio de casos aislados descendientes de portadores asintomáticos de las generaciones precedentes y por el hecho de que entre los 29 portadores en que la mutación se expresó hubiera 9 pacientes (31%) con formas tardías, o sea con inicio de la PAF a partir de los 40 años (5ª década) de los cuales 6 estaban entre 50 y 80 años (6ª,7ª y 8ª décadas).

4.1.3.4. Anticipación de la edad de inicio de la PAF

Los portadores que han iniciado la PAF han sido 29 (23%).

En 22 pudo estudiarse la anticipación de la edad de inicio en relación a los padres que fue positiva en el 77% :

- padre: 10 (3-25 años), madre: 7 (5-22 años)

Presentaron anticipación negativa 5 portadores:

- padre: 4 (3-11 años), madre: 1 (12 años)

4.1.4. Trasplantados

4.1.4.1. Número

De los 29 portadores que desarrollaron PAF 22 fueron trasplantados.

4.1.4.2. Edad trasplante

La edad media fue 34.7 ± 2.3 (21-65) y la mediana 33.

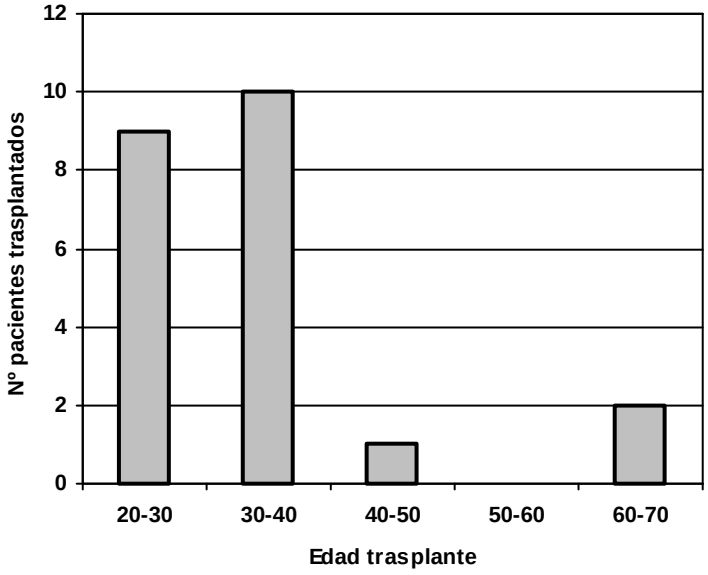

Figura 3. Edad de trasplante en los pacientes trasplantados

4.1.4.3. Fallecidos

Falleció 1 paciente.

4.1.4.4. Supervivencia

La supervivencia estimada con el método directo fue 95%.

4.1.4.5. Intervalo de edad de inicio de la PAF y edad en el momento del trasplante

El intervalo desde el inicio de PAF hasta el trasplante ha sido muy corto, entre 1 y 3 años en 20 pacientes (91%).

Se ha logrado ante todo por el diagnóstico temprano de la PAF e inmediata inclusión en la lista de espera y además haber indicado el trasplante dominó ya que reciben el hígado cadáver mucho antes de lo que les correspondería.

El trasplante dominó se realizó en 17 pacientes (77%).

4.2. CONSECUENCIAS DE LAS INFORMACIONES RECIBIDAS POR LOS PORTADORES SOBRE LOS RIESGOS QUE CONLLEVA SU CONDICIÓN Y LA CONDUCTA FRENTE A LOS MISMOS

4.2.1. Investigación molecular en menores de edad. El Grupo de Estudio exigió unos compromisos a los progenitores respecto a la información a los hijos portadores, que como puede comprobarse son coincidentes con las obligaciones que figuran en la Ley de Autonomía del Paciente promulgada en el año 2002.

4.2.2. Diagnóstico temprano de la PAF. Se ha logrado el diagnóstico en la etapa preclínica al comprobar la persistencia de la alteración del SNA cardíaco detectada en la revisión anual aconsejada, acompañada en algún caso de microalbuminúria de 24 horas persistente. Como consecuencia se facilita el diagnóstico temprano de PAF ante las primeras manifestaciones clínicas.

4.2.3. Trasplante hepático en los primeros años de la PAF. Ha sido posible debido al citado diagnóstico temprano y consecuentemente el TXH tiene mejor pronóstico.

4.2.4. Diagnóstico preimplantatorio. Tres portadoras asintomáticas del foco balear iniciaron las correspondientes gestiones para lograrlo. Una de ellas, a los 32 años, dio a luz una niña libre de la mutación TTRMet30 mediante ese método realizado en Oporto en 2005. Según nuestras noticias es el caso pionero del procedimiento en España en esta amiloidosis hereditaria. La madre sigue asintomática a los 34 años.

4.2.5. Reserva de semen. El planteamiento de esta posibilidad a los portadores varones es lógica y muy agradecida. Por otra parte según nuestras informaciones no ha sido descrita.

4.2.6. Diagnóstico diferencial entre PAF y ASS en los portadores añosos que inician amiloidosis. La posibilidad de que la ASS pudiera presentarse en el portador añoso no se había planteado hasta la fecha.

4.2.7. Beneficio para la Comunidad. Se ha logrado que los portadores no figuren en las listas de espera para trasplante hepático. De este modo se evita el riesgo que conlleva si el receptor del implante fuera joven.

4.2.8. Mejoría psicológica de los portadores. Ha sido notable ante las alentadoras perspectivas farmacológicas y genéticas.

5. DISCUSIÓN

En este capítulo exponemos los problemas científicos y críticos planteados.

5.1. Aceptación de la investigación

Más del 40% de los familiares rehusó la investigación molecular.

En la etapa anterior al tratamiento etiopatogénico con el TXH (iniciado en el año 1990), el motivo aducido era la imposibilidad de ser tratado si se iniciaba la PAF en el futuro. Desde dicho año sólo suelen rechazar el estudio los que tienen edades que no permiten en TXH.

Entre los familiares en edad fértil, algunos no querían conocer su condición, pues fuera o no positivo el resultado, deseaban tener descendencia. Desde 2001 en que los portadores pueden lograr descendientes libres de la mutación con el método del diagnóstico preimplantatorio, han aumentado los que requieren el rastreo.

5.2. Casos aislados

En los probandos de las familias investigadas es llamativo el predominio de casos aislados sobre los que tienen antecedentes familiares de PAF y su progresión en las tres series del Grupo de Estudio. En la mayoría de ellos ha sido la causa del retraso en el diagnóstico del probando.

5.3. Simplificación de la investigación molecular

La comprobación en todas las familias de la misma mutación TTRMet30, ha permitido simplificar la metodología para el estudio de la mutación y el marcador de los familiares sin llegar a la secuenciación, por lo que ha resultado mucho más económica.

5.4. Actualización de conocimientos sobre la PAF

Como se ha comentado al exponer el consejo genético integral, es preceptivo que los médicos e investigadores básicos que se entrevistan con los portadores para darles las informaciones comentadas, mantengan actualizados sus conocimientos respecto a los avances clínicos y la investigación molecular aplicada.

Tiene destacado interés en los casos de los portadores que pueden iniciar la enfermedad con síntomas poco habituales como son, entre otros, bloqueo aurículo-ventricular completo, amiloidosis vítrea, sdr del túnel carpiano, acusadísima hipotensión ortostática y progresiva pérdida de peso.

5.5. Información a las familias que rehúsan la investigación molecular

En estos casos se les recuerda el riesgo de transmisión de la mutación a sus descendientes, que oscila entre el 50% y el 100% y se les informa de la conveniencia de que los familiares que presenten síntomas persistentes parecidos a los de sus familiares enfermos, consulten apresuradamente con un médico conocedor de la PAF.

5.6. Investigaciones novedosas y exclusivas del foco balear

Según nuestras noticias las investigaciones del porcentaje de portadores por paciente, portadores hijos de portadores y porcentaje de portadores por progenitor portador sólo se han realizado en el foco balear.

Están destinadas a complementar la información proporcionada a los progenitores con hijos no rastreados, al explicarles los riesgos teóricos de transmisión de la mutación a sus descendientes basados en la carga génica de las parejas. Sus resultados les proporcionan una información muy valiosa para decidir la investigación molecular a sus descendientes.

5.7. Intervalo libre de síntomas en los portadores con depósitos de amiloide

En el estudio portugués antes citado (44) se exponen los datos de 13 portadores asintomáticos con edades comprendidas entre 16 y 34 años, con depósitos de amiloide en la biopsia, de ellos 7 (54%) se mantuvieron asintomáticos entre 11 y 22 años desde la biopsia, en los 6 casos restantes (46%) se inició la sintomatología de la PAF entre 1 y 14 años después de esta.

Por otra parte en la muestra citada en el capítulo 4 de seis portadores asintomáticos con depósitos de amiloide detectados con la gammagrafía amiloidea, se ha comprobado que tres se mantenían asintomáticos a los 10 años de dicha exploración y que en los tres restantes no se inició la PAF hasta que no transcurrieron 1, 4 y 14 años de dicha exploración.

Como consecuencia de esos datos y los de la reducida muestra del Grupo de Estudio de portadores con depósitos de amiloide comprobados por la gammagrafía amiloidea antes citada, debe concluirse que son frecuentes los depósitos en los portadores asintomáticos y hacer hincapié en la extraordinaria variabilidad de la persistencia de la condición de portadores y de la presentación de PAF en los mismos.

Por otra parte esas aportaciones son de extraordinaria trascendencia para el clínico quien debe tener muy en cuenta que la biopsia positiva de amiloide no conlleva el diagnóstico de enfermedad. El portador asintomático puede no tener depósitos, tenerlos sin alteración alguna subclínica o con las alteraciones subclínicas comentadas en el capítulo III que permiten etiquetarlos de pacientes asintomáticos.

5.8. Investigaciones rutinarias discutibles en los portadores asintomáticos

El Grupo de Estudio ha atendido portadores asintomáticos a los que previamente se habían practicado de modo rutinario dos exploraciones con el fin de lograr el diagnóstico temprano de la posible PAF: biopsia anual para detectar amiloide y estudio electrofisiológico de extremidades inferiores cada 3 ó 6 meses para detectar la PNP por considerarla el primer síntoma de la PAF.

Algunos no tenían manifestaciones subjetivas que hicieran sospechar el comienzo de la PAF. En otros, eran portadores muy angustiados por el riesgo de enfermar que habían vivido la enfermedad en familiares o conocidos y presentaban aisladamente ligeras alteraciones sensitivas irritativas, discontínuas de localización cambiante y corta duración y no tenían alteraciones objetivas en la exploración.

- Biopsias rutinarias. Basados en lo dicho, el criterio del Grupo de Estudio es descartarlas en los portadores con las citadas características. Sólo indican las biopsias cuando se han iniciado las primeras manifestaciones clínicas sistémicas, subjetivas y objetivas en los portadores que presentan alteraciones subclínicas, o sea, en los pacientes asintomáticos.
- Estudios electrofisiológicos de miembros inferiores reiterados. El Grupo de Estudio también los descarta. Únicamente los indican en los portadores asintomáticos que han pasado a pacientes asintomáticos y presentan manifestaciones clínicas subjetivas y objetivas de PNP en extremidades inferiores.

5.9. Importancia pronóstica del tipo de mutación

Todos los grupos están de acuerdo en que los pacientes con la variante TTRMet30 suelen presentar un curso clínico mucho menos agresivo que los pacientes que tienen otras variantes afortunadamente poco frecuentes y por

otra parte el TXH en ellos es mucho más agradecido. Debe hacerse hincapié en esos datos en los portadores que han iniciado la PAF, para mejorar su situación psicológica frente al próximo implante.

5.10. Necesidad del TXH temprano

Debido a la progresión de las alteraciones anatomopatológicas y funcionales de la PAF, se incrementan constantemente las manifestaciones clínicas y aparecen discapacidades, minusvalías e importantes complicaciones. Para evitar esta terrible evolución debe mentalizarse a las Unidades de Trasplante Hepático para que realicen el implante en las primeras etapas del proceso, a ser posible en el primer año, con lo que por otra parte serán mayores las posibilidades de regresión de las manifestaciones. La experiencia del Grupo de Estudio lo confirma.

5.11. Posibilidad de presentación de la ASS en los portadores añosos

Se ha planteado la posible presentación de dicha amiloidosis debida a depósito de TTR normal, inédita según nuestras informaciones. Por ello ante una amiloidosis en portadores añosos es obligado el diagnóstico diferencial entre PAF y ASS.

5.12. Conducta de los progenitores de los portadores menores de edad

Desgraciadamente no siempre han cumplido el compromiso contraído de explicarles lo expuesto en la entrevista informativa. Además en algunas ocasiones les ocultaron la positividad por complejo de culpabilidad, no aconsejaron la visita médica al iniciar los síntomas del proceso e incluso en algunos casos muy lamentables no lo hicieron hasta transcurridos dos o tres años, cuando ya tenían la florida sintomatología que había presentado el progenitor o familiar enfermo.

5.13. Diagnóstico prenatal

El Grupo de Estudio no lo indica en los casos en que sólo desean saber cuanto antes si han transmitido la mutación al feto por los motivos expuestos anteriormente. Por otra parte lo desaconseja en los casos de portadores con gestación en curso que piensan realizar la IVE si el resultado es positivo, por su respeto a la vida desde el momento de la concepción, la existencia de portadores que no han desarrollado la enfermedad en edades muy avanzadas (en el foco balear existen nueve portadores entre las 8ª y 9ª décadas o sea con

edades entre 70 y 90 años) y por último las alentadoras perspectivas terapéuticas antes comentadas.

5.14. Reserva de semen

Como se ha comentado en el capítulo de Resultados el Grupo apoyó esta posibilidad inédita según nuestras informaciones y por ello la incluímos en la información a los portadores varones.

5.15. Primer caso de diagnóstico preimplantatorio en la PAF

El caso descrito en una portadora de nuestra serie, es según nuestras informaciones el primero en que se utilizó dicho procedimiento en España.

5.16. Posibilidad de nuevas variantes en el futuro

Como se ha comentado, hasta la fecha sólo se ha detectado la variante TTRMet30. No nos sorprendería que en el futuro aparecieran nuevas variantes debido a que una parte importante de la población insular es de origen peninsular desde hace más de 50 años y en la península se han diagnosticado otras variantes. Sólo en la estadística del Grupo de Estudio correspondiente a familias con PAF de once Comunidades Autónomas se han detectado seis variantes diferentes: TTRVal71Ala, TTRSer77Tyr, TTRΔVal122, TTRThr49Ile, TTRSer50Arg y TTRGlu89Gln.

Por otra parte en los últimos años han llegado a las Islas personas de países de diversos Continentes, en los que se han diagnosticado otras variantes.

5.17. Problema de salud pública

Debido a la prevalencia del 11,38 por 100.000 habitantes y la penetrancia del gen en la serie actual que ha originado la PAF en el 23% de los portadores asintomáticos, éstos constituyen un problema de salud pública para nuestras islas.

Por ello debe insistirse en la necesidad de que los familiares consanguíneos de los pacientes decidan la investigación molecular para detectarlos y consecuentemente poder ayudarles a afrontar los problemas que su condición conlleva.

6. CONCLUSIONES

1. La investigación molecular de la PAF, genómica y proteómica, se inició en el foco balear en el año 1986 por lo que fue pionera en España. Dicho foco es el quinto endémico en el mapa epidemiológico mundial de la PAF.
2. Ese foco estaba constituído hasta el 31-12-2006 por 159 enfermos diagnosticados por el Grupo de Estudio de la PAF, que ha seguido en cada familia un protocolo de actuación que denominamos consejo genético integral.
3. En la Tesis se ha realizado el análisis de ese protocolo en 307 familiares consanguíneos del foco balear con estudio molecular: 56 ascendientes, 91 colaterales y 160 descendientes.
4. El 60% de probandos de sus familias no tenían antecedentes de PAF (casos aislados), lo que fue causa de retraso diagnóstico en la mayoría.
5. La única mutación detectada ha sido la TTRMet30 heterocigota lo que ha permitido simplificar la metodología diagnóstica y consecuentemente disminuir los costes.
6. Se han detectado 125 portadores asintomáticos (41%), 17 ascendientes, 29 colaterales y 79 descendientes, con un discreto predominio del sexo femenino (52%) . El origen de la mutación fue paterno 46%, materno en 32% y desconocido en 22%.
7. Respecto a las edades, el error estándar de la media fue 35,3 ± 1,9 (1-87). Destacan las de 33 portadores (26%) comprendidas entre 50 y 90 años.
8. Para la investigación molecular en menores de edad, el Grupo de Estudio exigió unos compromisos a los progenitores respecto a la información a sus hijos portadores, que coinciden con las obligaciones de la Ley de Autonomía del Paciente de 2002.
9. Primeras gammagrafías amiloideas en nuestro país en 7 portadores asintomáticos del foco balear, que comprobaron depósitos de amiloide en 6 (86%). La mitad siguen asintomáticos después de 10 años.

10. Ante el riesgo de padecer la PAF en el futuro se indica a los portadores la revisión anual con estudio del SNA cardíaco para diagnosticarla en la etapa preclínica lo que facilita el diagnóstico clínico temprano y conlleva la inmediata indicación del TXH si la edad lo permite.
11. Planteamiento inédito de diagnóstico diferencial entre PAF y ASS en los portadores añosos que inician amiloidosis.
12. El riesgo teórico de transmisión de la mutación a los descendientes oscila entre el 50% y el 100% según sea la carga génica de las parejas.
13. Se han realizado 3 investigaciones novedosas en el foco balear para complementar la información proporcionada sobre la transmisión: portadores hijos de progenitor portador y porcentaje de portadores por paciente y por progenitor portador.
14. El diagnóstico preimplantatorio se ofrece a las parejas en edad fértil de portador heterocigoto e individuo sano y de portadores heterocigotos para lograr hijos libres de mutación.
15. Primer caso en España de diagnóstico preimplantatorio en una portadora del foco balear.
16. Indicación pionera de la reserva de semen a los portadores que inician la PAF con disfunción eréctil progresiva, para lograr una gestación en el futuro.
17. Los portadores que han iniciado la PAF han sido 29 (23%). En 22 pudo estudiarse la anticipación de la edad de inicio que fue positiva en el 78%.
18. El intervalo entre la edad de inicio de la PAF y la del TXH ha sido muy corto en el 91% entre uno y tres años. Han contribuido el diagnóstico temprano, la inmediata inclusión en la lista de espera y la indicación del trasplante dominó en el 77%.
19. Los resultados del TXH han sido tanto mejores cuanto más temprana fue la realización. Por ello las Unidades de Trasplante Hepático deben mentalizarse para intervenir a los pacientes en las primeras etapas, a ser posible durante el primer año.

20. Importante beneficio para la comunidad al lograr que los portadores no se inscriban como donantes de hígado, para evitar el riesgo de PAF que conllevaría para el receptor del implante.
21. Debido a la prevalencia de 11,38 por 100.000 habitantes y la penetrancia del gen en la serie actual que ha originado la PAF en el 23% de los portadores asintomáticos, éstos contituyen un problema de salud pública para nuestras islas.
22. Alentadoras perspectivas farmacológicas para los portadores basadas en evitar la disociación de la TTRMet30 circulante que es el requisito básico para originar la amiloide.
23. Las perspectivas de la terapia génica son aún más alentadoras. La primera para silenciar el gen mutado y de este modo evitar la síntesis de la TTRMet30 y la segunda para interrumpir la síntesis hepática de la variante sistémica.
24. El consejo genético integral, constantemente actualizado por los avances en la investigación molecular, es obligado en todas las familias con PAF debido a los beneficios que reporta.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Munar Bernat C. Trascendencia del marcador bioquímico TTR (Met 30) para el estudio de la Polineuropatía amiloidótica familiar tipo I en Mallorca. Tesis Doctoral. Palma de Mallorca, Consellería de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear 1989.

2. Munar-Qués M, Costa PP, Saraiva MJM, Munar-Bernat C. Asymptomatic carriers in the Majorcan focus of FAP I. 2nd International Symposium on familial amyloidotic polyneuropathy and other transthyretin related disorders. Skelleftea, Sweden. Junio 1992. Abstracts: 72.

3. Munar-Qués M, Costa PP, Saraiva MJM, Munar-Bernat C, Costa PMP, Viader-Farré C. Portadors asimptomàtics de la malaltia d'Andrade a Mallorca. En: R. Guerrero ed. Llibre de Ponències del XVè Congrés de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana. Barcelona, Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears 1996: 263-268.

4. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. Familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of peripheral nerves. Brain 1952; 75: 408-427.

5. Mello A R. Polineuropatía amiloidótica familiar. J Bras Med 1959; 1: 161-218.

6. Mac-Clure E, Raick A, Lemos C, Santos Ferreira C. Polineuropatía amiloidótica familiar. O Hospital 1960; 58: 269-290.

7. Novis SAP, André C, Cruz MW. Familial amyloidotic polyneuropathy of the Portuguese type (Type I) in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical features in 127 patients from 22 families. Arquivos de Medicina 1990; 3 (Suppl): 263-266.

8. Araki S, Mawatari S, Ohta M, Nakajima A, Kuroiwa Y. Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family. Arch Neurol 1968; 18: 593-602.

9. Andersson R. Familial amyloidosis with polyneuropathy. A clinical study based on patients living in Northern Sweden. Acta Med Scand 1976; 590 Supl: 1-64.

10. Coutinho P, Martins da Silva A, Lopes Lima J, Resende Barbosa A. Forty years of experience with type I amyloid neuropathy. Review of 483 cases. En: Glenner GG, Costa PP, Falçao de Freitas A, editores. Amyloid and amyloidosis. Amsterdam: Excerpta Médica, 1980; 89-98.

11. Munar-Qués M, Costa PP, Saraiva MJM. Familial amyloidotic polyneuropathy type I, Portuguese form, in the island of Mallorca (Spain). Study of five families. Boletim do Hospital (HGSA) 1988; 3: 17-27.

12. Munar-Qués M, Costa PP, Saraiva MJM, Viader- Farré C, Munar-Bernat C. Polineuropatía amiloidótica familiar tipo I forma portuguesa en Mallorca. Estudio por medio del marcador genético TTR(Met30). Med Clín (Barc) 1988; 91: 441-444.

13. Murphy EA, Chase GA. Principles of genetic counseling. Chicago, Year Book Medical Publishers,1975.

14. Emery AEH. The principles of genetic counselling. In Emery AEH, Pullen I eds. Psichological aspects of genetic counselling. London, Academic Press 1984; 1-9.

15. Sequeiros J. Genetic counseling in hereditary amyloid neuropathy type I (Portuguese, Andrade). En: Sales Luis ML, Bigotte de Almeida L, Costa P eds. Symposium on peripheral neuropathies. Lisbon 1986. Lisbon, Biofarma 1989; 265-271.

16. Coelho T. A experiência do aconselhamento genético na polineuropatia amiloidótica familiar. En Sequeiros J ed. O teste preditivo da doença de Machado-Joseph. Porto, Unigene 1996: 71-77.

17. Sales Luis ML, Conceiçao I, Carvalho M. Clinical and therapeutic implications of presymptomatic gene testing for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). Amyloid; J Protein Folding Disord 2003; 10:26-31.

18. Munar-Qués M. Polineuropatía amiloidótica familiar o Enfermedad de Corino Andrade. JANO 2005; LXVIII: 1134-1139.

19. Munar-Qués M, Costa PP, Saraiva MJM. The Majorcan focus of familial amyloidotic polyneuropathy type I. Arquivos de Medicina 1990; 3 (Suppl):13-18.

20. Munar-Qués M, Saraiva MJM,Viader-Farré C, Zabay-Becerril JM, Mulet-Ferrer J. Genetic epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Balearic Islands (Spain). Amyloid: J Protein Folding Disord 2005; 12: 54-61.

21. Sousa A. A variabilidade fenotípica da polineuropatia amiloidótica familiar: um estudo de genética quantitativa em Portugal e na Suecia. Tesis Doctoral. Porto, 1995.

22. Munar-Qués M. La recerca sobre la malaltia d'Andrade. Annals de Medicina 1999; 82: 157-159.

23. Editorial. Enfermedades raras, medicamentos huérfanos: los criterios de la Comunidad Europea. JANO 2000; LVIII: 9.

24. Forteza Albertí JF. Alteraciones cardiológicas de la Polineuropatía amiloidótica familiar tipo I en Mallorca. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona 1992.

25. López-Andreu FR. Utilidad del trasplante ortotópico del hígado en el tratamiento de la polineuropatía amiloidótica familiar. Tesis Doctoral. Murcia. 1995.

26. Munar-Qués M. Polineuropatía amiloidótica familiar 2003. Editorial. Med. Clin (Barc) 2003; 121: 100-101.

27. Costa PP, Figueira AS, Bravo FR. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polineuropathy. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 4499-4503.

28. Saraiva MJM, Birken S, Costa PP, Goodman DS. Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). J Clin Invest 1984; 74: 104-119.

29. Saraiva MJM, Costa PP, Goodman DS. Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Family studies on the transthyretin (prealbumin) - Methionine-30 variant. The Journal of Clinical Investigation,1985; 76, 2171-2177.

30. Mita S, Maeda S, Shimada K, Araki S. Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin. Biochem Biophys Res Commun 1984; 124: 558-564.

31. Sasaki H, Sakaki Y, Matsuo H, Goto I, Kuroiwa Y, Sahashi I et al. Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy by recombinant DNA techniques. Biochem Biophys Res Commun 1984; 125: 636-642.

32. Whitehead AS, Skinner M, Bruns GAP, Costello W, Edge MD, Cohen AS et al. Cloning of human prealbumin complementary of DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloidotic polyneuropathy. Mol Biol Med 1984; 2: 411-423.

33. Connors LH, Lim A, M, Prokaeva T, Roskens VA and Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants. Amyloid: J Protein Folding Disord 2003; 10: 160- 184.

34. Saraiva MJM. Transthyretin mutations in health and disease. Hum Mutat 1995; 5: 191-196.

35. Almeida MR, Alves IL, Terazaki H, Ando Y, Saraiva MJ. Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTRR104H and TTRT119M. Biochem Biophys Res Commun 2000; 270: 1024-1028.

36. Munar-Qués M, Saraiva MJ, Ordeig-Calonge J, Moreira P, Pérez-Vidal R, Puig-Pujol X, Monells-Abel J, Badal-Alter JM. Familial amyloid polyneuropathy in a Spanish family with a transthyretin deletion (ΔVal 122) presenting with carpal tunnel syndrome. Clin Genet 2000; 58: 411-412.

37. Munar-Qués M. Polineuropatía amiloidótica de Andrade. En: Sociedad Española de Medicina Interna ed. Avances en Medicina Interna 4. Madrid, Arán Ediciones 1997: 219-235.

38. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The betafibrilloses. N Engl J Med 1980; 302: 1.283-1.292 y 1.333-1.334.

39. Benson MD. Amyloidosis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. The metabolic basis of inherited disease. 7th ed. New York, McGraw -Hill 1995: 4159-4191.

40. Linke RP, Nathrath WBJ, Eulitz M. Classification of amyloid syndromes from tissue sections using antibodies against various fibril proteins: report of 142 cases. In: Glenner GG, Osserman EF, Benditt EP, et al, eds. Amyloidosis. New York, London: Plenum Publishing Corporation; 1986: 599-605.

41. Kebbel A, Röcken C. Immunochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. Am J Pathol 2006; 30: 673-683.

42. Colon W, Lai Z, McCutchen SL, Miroy GJ, Strang C, Kelly JF. FAP mutations destabilize transthyretin facilitating conformational changes required for amyloid formation. En: Ciba Foundation Symposium 199. The nature and origin of amyloid fibrils. Chichester, Jhon Wiley and Sons 1996: 228-242.

43. Cardoso I, Goldsbury SA, Muller V, Olivieri S, Wirtz S, Damas AM, Aebi U, Sariva MJ. Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for *in vitro* assembled transthyretin amyloid-like fibrils.J Mol Biol 2002;317: 683-695.

44. Sousa MM, Cardoso I, Fernandes R, Guimaraes A, Saraiva MJ. Deposition of transthyretin in early stages of Familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. Am J Pathol 2001; 159: 1993-2000.

45. Holmgren G, Haettner E, Nordenson I, Sandgren O, Steen L, Lundgren E. Homozygosity for the transthyretin-met 30-gene in two Swedish sibs with familial amyloidotic polyneuropathy. Clin Genet 1988; 34: 333-338.

46. Munar-Qués M, López Domínguez JM, Viader-Farré C, Moreira P, Saraiva MJM.Two Spanish sibs with familial amyloidotic polyneuropathy homozygous for the V30M-TTR gene. Amyloid: J. Protein Folding Disord. 2001 ; 8: 121-123.

47. Falcao de Freitas A. Aspectos clínicos da polineuropatía amiloidótica familiar (tipo Andrade). Bol do Hospital (HGSA) 1976; 1: 17-25.

48. Almeida MR, Alves IL, Sakaki Y, Costa PP, Saraiva MJM. Prenatal diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for an early expression of the associated transthyretin methionine 30. Hum Genet 1990; 85: 623-626.

49. Murakami T, Nishiguchi S, Maeda S, Shimada K, Araki S. Rapid prenatal diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy by polimerase chain reaction. Arquivos de Medicina 1990; 3 (Suppl): 227-229.

50. Nichols WC, Padilla LM, Morris M, Benson MD. Prenatal testing for the transthyretin (prealbumin) amyloidoses. Arquivos de Medicina 1990; 3 (Suppl): 231-235.

51. Sasaki H, Toné S, Nakazato M, Yoshioka K, Matsuo H, Kato Y, Sakaki Y. Generation of transgenic mice producing a human transthyretin variant: a possible mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy. Biochem Biophys Res Commun 1986; 139; 794-799.

52. Hawkins PN, Lavender JP, Pepys MB. Evaluation of systemic amyloidosis by scintigraphy with 123I-labeled serum amyloid P component. N Engl J Med 1990; 323: 508-513.

53. Hawkins PN. Studies with radiolabelled serum amyloid P component provide evidence for turnover and regression of amyloid deposits in vivo. Clin Sci 1994; 87: 289-295

54. Carvalho MJ, Freitas J, Puig J, Coelho T, Fernandes P, Costa O, Falcao de Freitas A. Analyse spectrale de la fréquence cardiaque de la polyneuropathie amyloïde familiale. En: Serratrice G, Pellissier JF, Blin O ed. Le système nerveux autonome. Acquisitions récentes. París, Expansion Scientifique Française 1991: 146-152.

55. Sousa A, Coelho T, Lobato L, Sequeiros J. Anticipation of age-of-onset in familial amyloidotic polineuropathy (Portuguese type). En: Natvig JB, Forre O, Husby G, Husebekk A, Skogen B, Sletten K, Westermark P ed. Amyloid and amyloidosis. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 1991; 694-697.

56. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth CG, Ericzon BG, Eriksson S et al. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). Clin Genet 1991; 40: 242-246.

57. FAPWTR. Familial amyloidotic polyneuropathy. World Transplant Register and the Domino Transplant Register. Update on behalf of reporting members of the FAPWTR. December 2006.

58. Saraiva MJM. Sporadic cases of hereditary amyloidosis. Editorial. N Engl J Med 2002; 346: 1818-1819.

59. Suhr OB, Herlenius G, Friman S, Ericzon BG. Liver transplantation for hereditary transthyretin amyloidosis. Liver Transpl 2000; 6: 263-276.

60. Munar-Qués M, Salvá-Ladaria L, Mulet-Perera P, Solé M, López-Andreu FR, Saraiva MJM. Vitreous amyloidosis after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy: ocular synthesis of mutant transthyretin. Amyloid: Int J Exp Clin Invest 2000; 7: 266-269.

61. Furtado A, Tomé L, Oliveira FJ, Furtado E, Viana J, Perdigoto R. Sequential liver transplantation. Transplant Proc 1997; 29: 467-468.

62. Takei Y, Gono T, Yazaki M, Ikeda S, Hoshii Y. Transthyretin-derived amyloid deposition in the gastric mucosa of domino recipients of familial amyloid polyneuropathy liver. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 62.

63. Sousa MM, Ferrao J, Fernandes R, Guimaraes A, Geraldes JB, Perdigoto R, Tomé L, Mota O, Negrao L, Furtado AL, Saraiva MJ. Deposition and passage of transthyretin through the blood-nerve barrier in recipients of familial amyloid polyneuropathy livers. Lab Invest 2004; 84: 865-873.

64. O'Grady J, Rela M, Muiesan P, Bowles M, William R, Hawkins PN, Heaton ND, Stangou AJ. Domino liver transplantation used explanted grafts from patients with hereditary forms of amyloidosis; the King's College Hospital experience. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 49.

65. Obayashi K, Goto T, Yamashita T, Ueda M, Ohshima S, Yoneyama K, Nakamura M, Nanjo H, Asonuma K, Inomata Y, Watanabe S, Uchino M, Tanaka K, Ando Y. Iatrogenic amyloid neuropathy in a Japanese patient after sequential liver transplantation. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 48.

66. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, Tennent GA, Lachmann HJ, Gallimore JR, Lovat LB, Bartfai T, Alanine A, Hertel C, Hoffmann T, Jakob-Roetne R, Norcross RD, Kemp JA, Yamamura K, Suzuki M, Taylor GW, Murray S, Thompson D, Purvis A, Kolstoe S, Wood SP, Hawkins PN. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. Nature 2002; 417: 254-259.

67. Carvalho F, Sousa M. Fernandes S, Silva J, Saraiva MJ, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). Prenat Diagn 2001: 1093-1099.

68. Almeida VM, Costa PM, Moreira p, Gonçalves J, Braga J. Birth of two healthy females after preimplantation genetic diagnosis for familial amyloid polyneuropathy. Reprod BioMed Online 2005; 10: 641-644.

69. Almeida MR, Macedo B, Cardoso I, Alves I, Valencia G, Arsequell G, Planas A, Saraiva MJ. Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. Biochem J 2004; 381: 351-356.

70. Macedo B, Almeida MR, Arsequell G, Valencia G, Rubio LA, Saraiva MJ.” In vivo” assessment of iododiflunisal as a potential drug in the treatment of FAP. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 43.

71. Tojo K, Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S. Diflunisal stabilizes familial amyloid polyneuropathy-associated transthyretin variant tetramers i serum against dissociation required for amyloidogenesis. Neurosci Res 2006; 56: 441-449.

72. Bulawa C, Wang L, Coelho T, Ranlov P, Svendsen IH, Packman J, Labaudinière R. Stabilization of amyloidogenic transthyretin variants in plasma by Fx-1006A. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 21.

73. Green NS, Foss TR, Kelly JW. Genistein, natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102; 14545-14550.

74. Almeida MR, Cardoso I, Ferreira N, Saraiva MJ. *In vitro* and *in vivo* effect of genistein on TTR aggregation. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1):

75. Cardoso I, Saraiva MJ. Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. FASEB J 2006;20: 234-239.

76. Kurosawa T, Igarashi S, Nishizawa M, Onodera O. Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. Biochem Biophys Res Commun 2005; 337: 1012-1018.

77. Benson MD, Kluve-Beckerman B. Supression of hepatic transthyretin syntesis by anti-sense oligonucleotides. Amyloid 2006; 13 (Suppl 1): 6

78. Westermark P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2843-2485.

79. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, et al. Cardiac amyloid in pacients with familial amyloyd polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. Biochem Biophis Res Commun 2000; 274: 702-706.

80. Takei Y, Hattori T, Gono T, Tokuda T, Saitoh S, Hoshii Y, Ikeda S. Senile systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. Amyloid 2002; 4: 252-255.

81. Shah VB, Pathak AM, Mandke JV, Kandalkar BM, Chitale AR. Senile systemic amyloidosis: a case report. Indian J Physiol Pharmacol 1999; 42: 365-368.

82. Westermark P, Bergström J, Murphy C, Sletten K. Transthyretin-derived senile systemic amyloidosis: clinicopathologic and structural considerations. Amyloid; J Protein Folding Disord 2003; 10: 48-54.

83. Teng M, Yin J, Vidal R, Ghiso J, Kumar A, Rabenou R, Shah A, Jacobson DR, Tagoe C, Gallo G, Buxbaum J. Amyloid and non-fibrillar deposits in mice transgenic for wild-type human transthyretin: a possible model for senile systemic amyloidosis. Lab Invest 2001; 81: 385-396.

84. Lobato L, Beirao I, Silva M, Bravo F, Silvestre F, Guimaraes S, Sousa A, Noel LH, Sequeiros J. Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2003; 18: 532-538.

85. Saraiva MJM, Alves IL, Costa PP. Simplified method for screening populations at risk for transthyretin Met30-associated familial amyloidotic polyneuropathy. Clin Chem 1989; 35: 1033-1035.

86. Skare J, Yazici H, Erken E, Dede H, Cohen A, Milunsky A, Skinner M. Homozygosity for the met30 transthyretin gene in a Turkish kindred with familial amyloidotic polyneuropathy. Hum Genet 1990; 86: 89-90.

87. Costa PMP, Teixeira A, Saraiva MJM and Costa PP. Immunoassay for transthyretin variants associated with amyloid neuropathy. Scand J Immunol 1993; 38, 177-182.

88. Palha JA, Moreira P, Oloffson A, Lundgren E, Saraiva MJ. Antibody recognition of amyloidogenic transthyretin variants in serum of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. J Mol Med 2001; 78: 703-707

89. Costa PP, Saraiva MJM. Familial amyloidotic polyneuropathy: screening of the population at risk in Portugal. En: Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E ed. Amyloid and amyloidosis. New York, Plenum Press 1988: 425-428.

90. Nakazato M, Kurihara T, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Diagnostic radioimmunoassay for familial amyloidotic polyneuropathy before clinical onset. J Clin Invest 1986; 77: 1699-1703.

91. Tanaka M, Nakazato M, Kurihara T, Matsujura S, Kangawa K, Matsuo H. Biochemical characterization of familial amyloidotic polyneuropathy in various districts of Japan. Jpn J Med 1987; 26: 189-193.