



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EPÍTOPOS/MIMÓTOPOS DEL
PÉPTIDO β -AMILOIDE PARA LA INMUNOTERAPIA DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

María de la Paz Alejandra Hernández Melesio

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian por la dirección de esta tesis, por sus enseñanzas y por darme la oportunidad de participar en este interesante proyecto.

A la Dra. Luz María López Marín por sus valiosas sugerencias para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su orientación y valiosas observaciones para la realización de esta tesis.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldía por la revisión de esta tesis, enriquecida por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Biol. Exp. Gonzalo Acero, gracias por tus enseñanzas, por la revisión de esta tesis y por ser un excelente asesor y guía.

A la M. en C. María Elena Munguía y al M. en C. Erik González por su asesoría en la realización de la técnica de secuenciación.

A la Biol. Erika Segura, por sus consejos y el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A Blanca Huerta Hernández y Azucena Ayala Pichardo por su amistad y su apoyo invaluable en la realización de los trámites del posgrado.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian.

DEDICATORIA

A mis padres María de la Paz y Marcos por su cariño y apoyo incondicional, por estar conmigo en la culminación de esta meta.

A POO por tu cariño, compañía, por tu inagotable paciencia y sobre todo por motivarme a seguir adelante.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Carmen, Claudia, David, Jessica, Julia, Lenin, Mactzil, Marcia, Mayra y Rodrigo por brindarme su amistad y confianza, por compartir éxitos, regaños y una que otra fiestecilla.

INDICE

RESÚMEN

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESQUEMA METODOLÓGICO

METODOLOGÍA

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo complejo en cuanto a su origen que es multifactorial; sin embargo, el principal factor de desarrollo de ésta es la edad; los casos de muerte asociados a demencia de Alzheimer generalmente ocurren en personas mayores a los 65 años.

Las características histopatológicas de esta enfermedad son: la presencia de agregados extraneuronales del péptido β amiloide conocidos como placas neuríticas o seniles y las estructuras intraneuronales llamadas marañas neurofibrilares o NFT's, que son el resultado de la fosforilación anormal de la proteína TAU, la cual se encuentra asociada a los microtúbulos. Las regiones del cerebro más afectadas son la corteza entorrinal, el hipocampo y la amígdala.

La presencia de mutaciones en la secuencia del péptido β amiloide contribuye a la pérdida progresiva de las funciones cognitivas en personas menores de 60 años, así como hemorragia cerebral por la acumulación del péptido mutado en la pared de los vasos sanguíneos. Tal es el caso de las mutaciones FLEMISH y DUTCH que ocurren por el intercambio de los aminoácidos: Alanina por Glicina en el residuo 21 y Ácido glutámico por la Glutamina en el residuo 22 respectivamente. Además de las formas completas de βA , se ha demostrado la existencia de variantes cortas que no contienen en su secuencia los residuos iniciales ${}_{3}\text{EFRH}_6$ del péptido completo, las cuales se caracterizan por ser más tóxicas y tener una mayor capacidad de agregación que βA_{1-42} , además de estar asociadas con el daño sináptico y la formación inicial de las placas neuríticas.

Debido a la estrecha relación del péptido β amiloide con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, se han desarrollado estrategias terapéuticas enfocadas a la prevención de la generación y agregación de las formas tóxicas del péptido, así como métodos que promueven la remoción de estas formas mediante la inmunoterapia en modelos animales. La inmunización activa en humanos y en modelo murino con la forma amiloidogénica βA_{1-42} , genera anticuerpos con capacidad desagregante dirigidos específicamente al epítipo inmunodominante EFRH, ubicado en el extremo amino terminal del péptido. Sin embargo, la respuesta inmune asociada a este epítipo genera efectos adversos. Es por esto que la identificación de epítipos distintos a EFRH en diferentes especies de βA constituye una alternativa inmunoterapéutica útil para la prevención temprana de la enfermedad descartando posibles efectos secundarios.

En este trabajo se llevó a cabo la identificación de nuevos epítipos del péptido β -amiloide mediante la técnica de despliegue en fago (Phage Display) utilizando bibliotecas

comerciales de péptidos de siete y doce aminoácidos expresados en la proteína pIII del fago filamentoso M13. Se llevaron a cabo tres rondas de bioselección con los sueros policlonales de ratones inmunizados con tres formas del péptido β amiloide: βA_{8-42} , βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH. De la bioselección con cada suero se seleccionaron 21 clonas, las cuales fueron evaluadas por ELISA y posteriormente secuenciadas para comparar su similitud con la secuencia de los péptidos βA . Se demostró que todas las clonas positivas con el suero anti- βA_{8-42} tienen la secuencia consenso **SGY (F, M, L) EV(A, L, R) H (F, Q)** y se identificó la región inmunodominante 1-6 de la especie amino truncada βA_{8-42} . Del mismo modo se demostró que los mimótopos del péptido βA_{1-42} FLEMISH obtenidos presentan la secuencia consenso **LV (D, A, S) FF (W)**. También se identificó un epítipo localizado en la región central del péptido mutado comprendida entre los residuos 17-20 de βA_{1-42} FLEMISH. La importancia de estos mimótopos radica en su similitud con un péptido sintético reportado previamente que desintegra estructuras β .

La presente tesis es la primera investigación en identificar al epítipo inmunodominante de la especie amino truncada βA_{8-42} , y en demostrar la especificidad de anticuerpos contra distintas especies del péptido β amiloide (amino truncadas y con las mutaciones FLEMISH y DUTCH). Se propone que los epítopos y mimótopos obtenidos en este estudio podrían ser útiles para el desarrollo de inmunoterapéuticos dirigidos a la prevención temprana de la enfermedad de Alzheimer y de sus patologías asociadas.

SUMMARY

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder that has a complex and multifactor origin; however the main factor is the age. Histopathological characteristics in this illness are: accumulation of extraneuronal amyloid β peptide as senile or neuritic plaques and neurofibrillary tangles or NFT's that result from an abnormal phosphorylation of a microtubule associated protein TAU. The more affected brain areas are entorrhinal cortex, hippocampus and amygdale.

The existence of mutations in β amyloid sequence contributes to the progressive loss of cognitive functions as well as brain haemorrhages caused by the accumulation of the mutated peptide in blood vessels walls in individuals younger than 60 years old (FAD). FLEMISH (A21G) and DUTCH (E22Q) mutations also cause FAD. Complete forms of $A\beta$ are not the only species that have been found in the brain of AD patients. Amyloid β peptides that do not contain within their sequences the amino terminal residues ${}_{3}EFRH_{6}$, are present too. These peptides are characterized for being more toxic and aggregate *in vitro* more quickly than full length $A\beta_{1-42}$. Also, it has been demonstrated that these species may cause synaptic damage and initial neuritic plaques formation.

Since the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) peptide aggregates in the brain has been hypothesized to play a central role in neuropathology of AD, the search for compounds capable of removing these aggregates was performed.

Active immunization in humans and a murine model of AD with the amiloidogenic βA_{1-42} form generated antibodies with disaggregating properties directed specifically to the immunodominant epitope EFRH, located in the amino terminal end of the peptide. Nevertheless, the immune response associated to this epitope generates also adverse effects. For that reason, the identification of different epitopes in some βA species could provide an immunotherapeutics useful for early prevention of the illness without possible side effects.

In this research, new epitopes of the β -amyloid peptide have been identified through the phage display technique using commercial libraries of 7-mer and 12-mer peptides expressed at the N-terminus of the minor coat protein (cpIII) of the M13 filamentous phage. Three rounds of biopanning were performed using polyclonal serum from immunized mouse with three human β amyloid peptides: $A\beta_{8-42}$, $A\beta_{1-42}$ DUTCH and $A\beta_{1-42}$ FLEMISH, and 21 individuals clones were randomly selected after the third round, amplified and used in ELISA to evaluate their binding to anti- $A\beta$ antibodies. DNA sequences of heptapeptide and dodecapeptide coding inserts were determined.

It was demonstrated that all positive clones selected in biopanning using mouse anti-human $A\beta_{8-42}$ polyclonal antibodies, contained a consensus sequence **SGY (F, M, L) EV(A, L, R) H (F, Q.)**. Thus, immunodominant region of human amyloid-beta $A\beta_{8-42}$ was identified (aa 1-6). Peptide inserts of all positive clones selected in biopanning using mouse anti human $A\beta_{1-42}$ FLEMISH mutation had a consensus sequence **LV (D, A, S) FF (W)**. A new central epitope (aa 17-20) from $A\beta_{1-42}$ FLEMISH was identified. The relevance of these mimotopes lies in their similarity with a synthetic peptide that has β sheet breaker properties, described previously.

This thesis is the first investigation of the specificity of antibodies raised against different species of $A\beta$ peptide (amino truncated and containing DUTCH and FLEMISH mutations). Epitopes and mimotopes described here are important for the development of immunotherapeutic reagents for early prevention of Alzheimer's disease and their associated pathologies.

INTRODUCCIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se manifiesta clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria, deterioro cognitivo, desorientación espacial, demencia y la pérdida de independencia del paciente (Oddo et al., 2006). Actualmente esta enfermedad es considerada como uno de los principales problemas de salud pública en las naciones desarrolladas; se estima que afecta entre 20 y 30 millones de personas en el mundo (Selkoe y Schenk, 2003; Van Gassen y Annaert, 2003). En México, el número de pacientes con Alzheimer se acerca a las 430 mil personas (Montero, 2004).

La EA, uno de los tipos más comunes de demencia después de los 65 años de edad, se caracteriza histopatológicamente por la presencia de placas neuríticas (también conocidas como placas seniles) extracelulares cuyo componente principal es el péptido β amiloide (Wirths et al., 2004). Otra característica de esta enfermedad son las estructuras intraneuronales conocidas como marañas neurofibrilares o NFT's de sus siglas en inglés Neurofibrillary Tangles), que se forman por la agregación anormal de la proteína *tau*, la cual normalmente se encuentra asociada a microtúbulos (Allsop, 2000). Los síntomas de la enfermedad son inicialmente imperceptibles; y a menudo se confunden con episodios de amnesia moderados (Van Gassen y Annaert, 2003; Bayer et al., 2001). Los primeros síntomas que presentan los pacientes están relacionados con el deterioro cognitivo siendo principalmente: la desorientación en tiempo y espacio, así como la resolución errónea de pruebas que personas sanas resuelven fácil y correctamente (Selkoe y Schenk, 2003). Aproximadamente a los diez años de la aparición de la enfermedad y aunado al incremento del déficit cognitivo, los enfermos experimentan apatía, inestabilidad emocional, dificultad en el reconocimiento de personas y objetos, dificultad en la articulación del lenguaje, pérdidas en la función motora, problemas en la marcha y dificultades respiratorias que conducen a la muerte (Dong et. al., 2005).

El diagnóstico clínico de la enfermedad se basa en los síntomas de los pacientes, ya que prácticamente resulta imposible verificar "*in vivo*" el desarrollo de las placas seniles (Vanderstichele, 2005). Actualmente se lleva a cabo la cuantificación del daño cognitivo a través de exámenes físicos y pruebas para medir habilidades del lenguaje; además, el uso de técnicas de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la resonancia magnética (MRI), permite detectar alteraciones estructurales que ocurren en el

cerebro de los pacientes. Sin embargo, la confirmación se efectúa “*post-mortem*” a través de la observación de las lesiones (placas neuríticas y marañas neurofibrilares) en cortes microscópicos de estructuras cerebrales como la amígdala, hipocampo, lóbulos parietales, frontales y temporales (Selkoe y Schenk, 2003).

La edad es el principal factor de riesgo asociado a esta enfermedad (Price et al., 1994). Se ha reportado que en adultos mayores cuya edad se aproxima a los 80 años, la probabilidad de que este padecimiento se establezca se incrementa hasta en un 50% (Esteban, 2004). Sin embargo, existen otros factores de riesgo asociados al inicio temprano de la enfermedad; entre los que se destacan la predisponibilidad genética: algunas mutaciones puntuales en la región codificante de βA de la proteína precursora (PPA), mutaciones familiares en genes de las presenilinas, y la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (Ribé et al., 2005; Le Vine III, 2004; Kumar-Singh, et al. 2002; Wang, et al. 2000).

PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE Y PÉPTIDO BETA-AMILOIDE

PPA es una proteína integral de membrana que se expresa ampliamente en las células del organismo en diferentes isoformas que van de 695 (forma más abundante producida por las neuronas) a 770 aminoácidos (Robner, 2004). La síntesis de esta proteína está asociada al desarrollo y estado fisiológico celular (Mattson, 2004).

Aunque se desconocen las funciones biológicas de la PPA, se sugiere que participa como receptor de superficie modulando la actividad de los canales de potasio y activando al factor de transcripción NF- κ B. También colabora en el transporte axonal y en eventos de regulación neuronal como el crecimiento de neuritas, plasticidad sináptica y adhesión celular (Esteban, 2004).

El péptido β -amiloide es un producto del procesamiento de la proteína precursora del amiloide (PPA) por la acción combinada de distintas secretasas. Este evento puede seguir una ruta no-amiloidogénica a través de la acción proteolítica de la alfa secretasa, o una ruta amiloidogénica por el procesamiento combinado de las beta y gamma secretasas, generando un fragmento de alrededor de 4 kDa y longitud variable de 39 a 43 aminoácidos. Los péptidos βA más abundantes en el cerebro son βA_{40} y βA_{42} , siendo éste último el más amiloidogénico (Gouras et. al., 2000). Como puede apreciarse en la figura 1, los sitios de proteólisis de las secretasas que generan al péptido β -amiloide involucran residuos

de aminoácidos ubicados en las regiones extracelular y transmembranal de PPA.

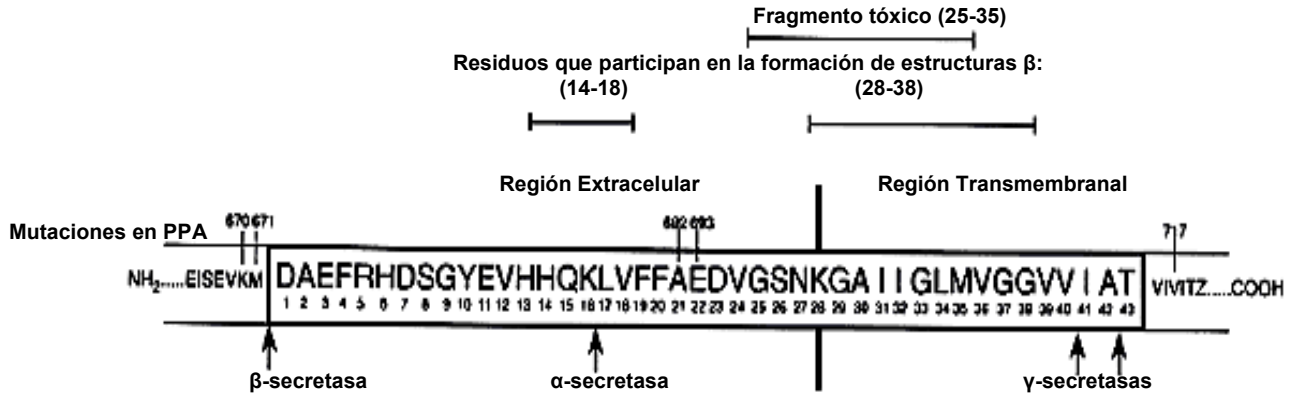


FIGURA 1. Región de la proteína precursora del amiloide (PPA) que da origen al péptido beta-amiloide. Con flechas se indican los sitios de proteólisis de las distintas secretasas y las regiones involucradas en el plegamiento de la proteína, así como los residuos que participan en la agregación y neurotoxicidad del péptido (Larner, 1999).

Normalmente ambos péptidos βA_{1-40} y βA_{1-42} se encuentran presentes en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de individuos sanos; siendo mayor el porcentaje de βA_{1-40} (90%) con respecto a βA_{1-42} (10%). La función de βA no se ha establecido claramente, sin embargo se ha propuesto que actúa como un regulador fisiológico de la función de los canales iónicos neuronales y como regulador negativo de la transmisión sináptica excitadora (Esteban, 2004). Además se sugiere que juega un papel fundamental en el desarrollo de EA; siendo esta idea apoyada por evidencias bioquímicas y genéticas que se explican a continuación: La mayoría de las mutaciones que se asocian a la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) se presentan en la región de PPA que codifica para βA o en genes de las presenilinas (*PS1* y *PS2*), y se asocian al incremento en la generación de la forma más amiloidogénica de este péptido: βA_{1-42} (Walsh, et al. 2001). La sobre expresión de PPA también se considera un factor de riesgo para la aparición temprana de la enfermedad. En pacientes con síndrome de Down, la presencia de un gen extra debida a una trisomía en el cromosoma 21 provoca una sobre expresión de la proteína precursora del amiloide y favorece el desarrollo de una neuropatología similar a la presente en la EA (Sánchez de Groot, et al. 2006).

NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La acumulación extracelular del péptido βA_{1-42} en forma de agregados difusos y placas seniles compactas en distintas regiones del cerebro como la corteza entorrinal, el hipocampo, y la amígdala afecta procesos como el aprendizaje, la memoria y la conducta emocional. Los daños ocasionados por βA_{1-42} se asocian principalmente a la distrofia dendrítica y déficit de neurotransmisores (Gouras et. al., 2000; Walsh, et al. 2001; Broytman y Malter, 2004).

PROCESO INFLAMATORIO

Uno de los eventos críticos que ocurren en el cerebro de casos de personas con EA tanto esporádicos como familiares es el proceso inflamatorio, el cual se asocia a células gliales en los sitios de la lesión y en las zonas circundantes a ésta, tales como la microglia activada y astrocitos (Guénette, 2003). También se ha reportado la participación de células T que se infiltran a través de los vasos sanguíneos y secretan citocinas inflamatorias como el IFN- γ (Monsonogo et al., 2006; Broytman y Malter, 2004; McGeer y McGeer). Evidencias “*in vitro*” e “*in vivo*” sugieren que la microglia activada es fuente de moléculas neurotóxicas como citocinas pro inflamatorias ($IL-1\beta$), glutamato y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que alteran funciones metabólicas importantes como el metabolismo de la glucosa y la función mitocondrial por la alteración de canales iónicos dependientes de voltaje, ATPasas, así como los transportadores de glucosa y glutamato (Mattson, 2004).

La agregación de especies tóxicas de β -amiloide desencadena, además de los efectos mencionados anteriormente, otros eventos relacionados que favorecen al proceso inflamatorio (Larner, 1999). El principal suceso bioquímico que se presenta es la activación de la vía clásica del complemento por la unión de C1q a complejos formados por anticuerpos unidos a βA , como se explica en la figura 2. También se sugiere que los agregados extracelulares promueven la activación de la vía alternativa en la cual se genera el complejo de ataque a la membrana, favoreciendo así la neurodegeneración y la muerte neuronal (Weiner y Frenkel, 2006; Selkoe, 2001)

Debido a que en pacientes es difícil llevar a cabo el seguimiento “*in vivo*” de cada uno de los eventos descritos anteriormente, se han propuesto modelos alternativos que desarrollen

algunas de las patologías que presentan los enfermos, lo cual ha generado avances importantes en la comprensión de ciertos aspectos de la enfermedad. Los ratones transgénicos que sobre expresan el gen de la proteína precursora del amiloide humana (PPA) son los modelos más utilizados para este fin (Götz et al., 2004).

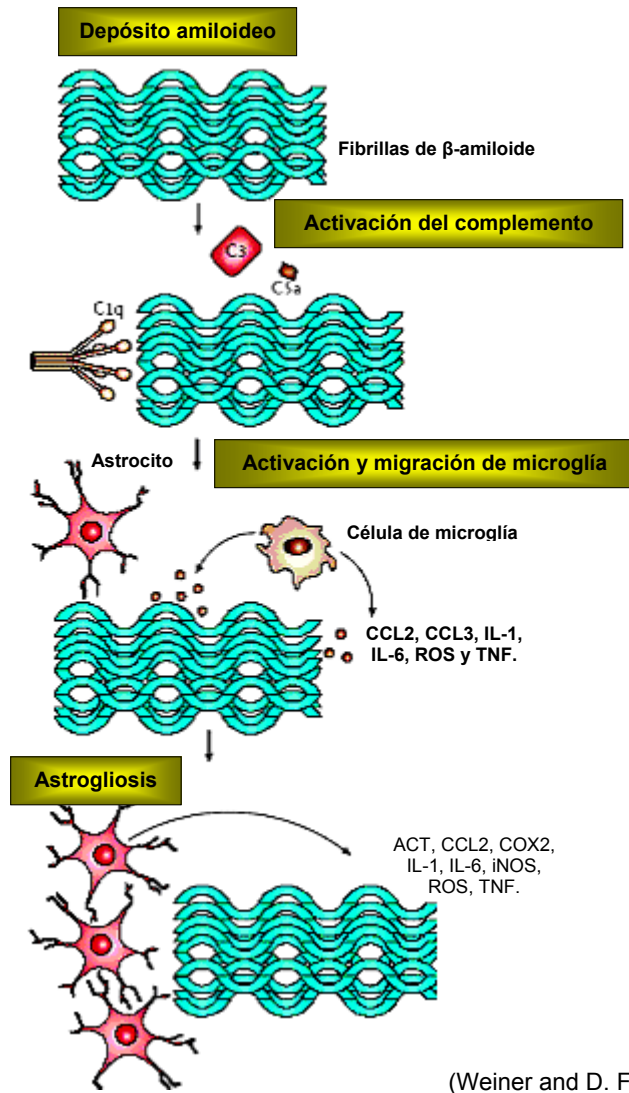
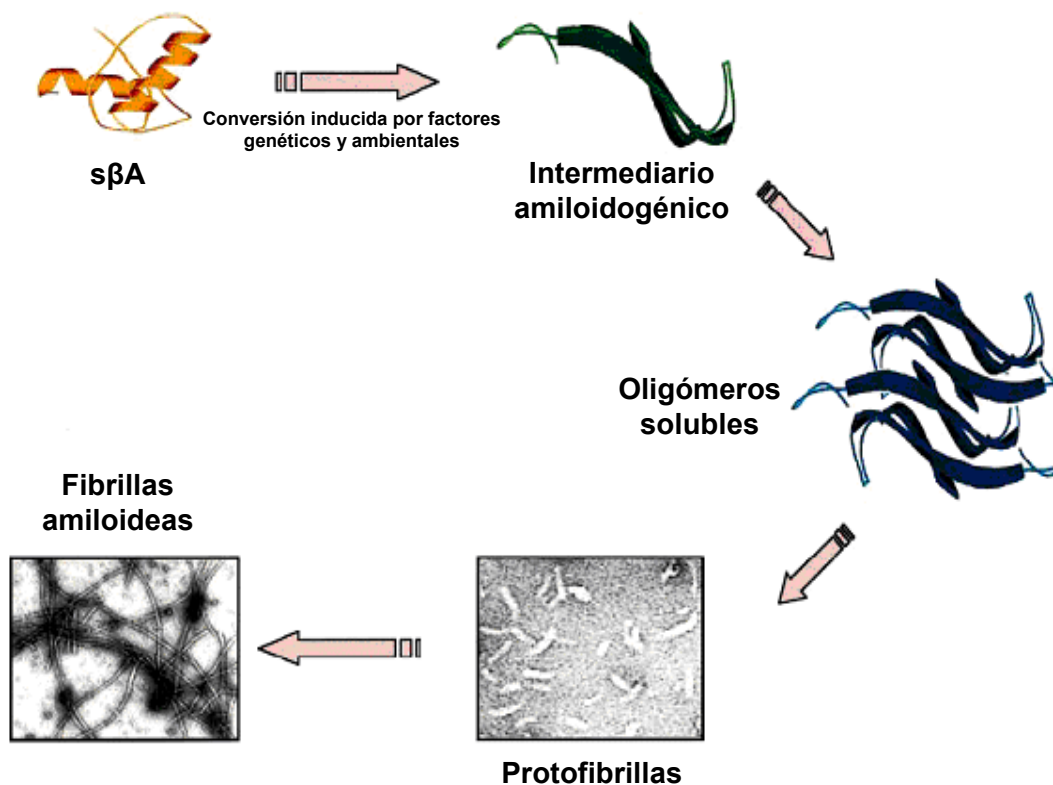


FIGURA 2. Respuesta inmune innata hacia β amiloide. Se muestra la secuencia del proceso inflamatorio resultante de la agregación del péptido: (1) Generación de los elementos C1q, C3 y C5 del complemento; (2) activación de la microglía; (3) Astrogliosis; (4) Secreción de moléculas pro inflamatorias: ACT, α 1-antiquimiotripsina, CCL, ligando de quimiocinas CC, ciclooxigenasa 2 (COX 2); interleucinas; sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), especies reactivas de oxígeno (ROS), y factor de necrosis tumoral (TNF).

AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE

Los péptidos β A de 40 y 42 aminoácidos resultantes del procesamiento de la proteína precursora del amiloide forman una variedad de estructuras de agregación: oligómeros, protofibrillas y fibrillas, las cuales se muestran en la figura 3 (Soto et al., 2000).



(Soto et al., 2000).

FIGURA 3 Secuencia de la formación de agregados de β -amiloide a partir de intermediarios amiloidogénicos.

Estudios realizados en humanos y en ratones transgénicos sugieren que el daño cognitivo se presenta antes de que se detecten las placas seniles, por lo tanto no existe una relación directa entre la presencia de placas y la severidad de la enfermedad (Soto et al., 2000; Soto et al., 1998). Se ha propuesto que la agregación del péptido β -amiloide es el resultado de la conversión de especies monoméricas solubles de βA que tienen una configuración de α hélice en intermediarios amiloidogénicos con una alta capacidad de agregación (Pravat y Pettegrew, 2004). Estos intermediarios tienen una conformación β plegada y se estabilizan al

formar oligómeros, los cuales se unen entre ellos y dan origen a otra estructura de agregación conocida como protofibrilla. Finalmente la interacción de las protofibrillas entre sí dan lugar a las fibras amiloideas (Soto et al., 2000).

La generación de oligómeros solubles y protofibrillas es un evento que podría estar asociado a un proceso conocido como **macroautofagia**, el cual constituye una vía alternativa de producción de β A en organelos celulares que se relacionan funcionalmente a los lisosomas. Yu y colaboradores (2005) han propuesto que el ambiente ácido de los autofagosomas podría contribuir a la formación y secreción de dichas especies tóxicas de β A (Yu et al., 2005). En estudios recientes se ha propuesto que los oligómeros solubles de β A tienen una mayor actividad neurotóxica que las otras estructuras (Baumketner et al., 2006; Cleary et al., 2005; Irie et al., 2005). La presencia de ADDL's (de sus siglas en inglés: "*amyloid β derived diffusible ligands*") en cerebros de ratones transgénicos y en pacientes con EA se asocia a eventos patológicos como disfunción sináptica, alteraciones tempranas de la memoria y con la inhibición de la potenciación a largo plazo (Dong, et al. 2005). Es por esto que, los métodos dirigidos a evitar la neurotoxicidad asociada a β A deberían enfocarse a la inhibición de intermediarios oligoméricos solubles en vez de evitar la agregación del péptido en placas neuríticas, pues varios autores han propuesto que la formación de placas genera un efecto "*protector*" a través del aislamiento de estas especies tóxicas mediante su depósito extraneuronal (Cruz et al., 2005; Mizushima, 2005; Yu et al., 2004).

ESTRUCTURA DEL PÉPTIDO β AMILOIDE Y NEUROTOXICIDAD

Las propiedades fisicoquímicas del péptido β amiloide están asociadas a la secuencia de aminoácidos que integran la cadena polipeptídica y a su estructura secundaria. Se ha reportado que los residuos 12-28 intervienen en la interacción de este péptido con la apolipoproteína E, mientras que los residuos 16-20 favorecen la polimerización del péptido (Irie et. al., 2005). Larner (1999) describe que las regiones 6-28 y 1-16 de β A están involucradas en la unión a Zn^{2+} y a la proteína del complemento C1q respectivamente (McGeer y Mc Geer, 2003; Larner, 1999). La unión de β A a iones como Zn^{2+} , Cu^{2+} , o Fe^{3+} se relaciona con estrés oxidativo por la producción de peróxido de hidrógeno (Irie et. al., 2005). Es probable que las interacciones hidrofóbicas de los residuos localizados en la región central de β A entre las posiciones 25-35 favorezcan el efecto neurotóxico y la agregación del péptido, por lo que se considera que la región central de β -amiloide tiene un papel muy importante en su actividad biológica (El-Agnaf, et al., 1998). Además, las deleciones de un solo aminoácido entre los residuos 17 y 20 disminuyen la agregación y la neurotoxicidad del péptido (Sánchez de Groot et al., 2006).

Uno de los aspectos patológicos tempranos de la enfermedad de Alzheimer es la alteración sináptica asociada a β A (Datki et. al., 2004). Dado que una de las funciones biológicas de la proteína precursora del amiloide (PPA) se relaciona con la plasticidad sináptica; la alteración en su transporte axonal, así como su procesamiento amiloidogénico son factores que favorecen la acumulación de especies tóxicas del péptido β amiloide en las terminales sinápticas en cerebros de pacientes con EA. La acumulación de β A y su interacción con la membrana neuronal provoca apoptosis en cultivos celulares, altera la regulación del calcio intraneuronal así como el metabolismo de la glucosa y activa receptores a glutamato provocando excitotoxicidad. Además genera estrés oxidativo "*in vitro*" e "*in vivo*" y alteraciones mitocondriales, lo que provoca pérdida de la funcionalidad sináptica (Esteban, 2004; Mattson, 2004).

Se ha reportado que los péptidos amino truncados (BA_{8-42} , BA_{11-42} , BA_{17-42} , etc.), es decir aquellos péptidos que no contienen en su secuencia los residuos iniciales $_3EFRH_6$ del péptido completo BA_{1-42} son más amiloidogénicos que este último. Lo anterior podría sugerir que la ausencia de residuos en el extremo N-terminal de β A, favorece la exposición de residuos hidrofóbicos implicados en la formación de fibrillas con estructura β -plegada.

Aunque hay contradicciones, la agregación de péptidos β A amino truncados en estadios previos a la aparición de los síntomas de la enfermedad y su presencia en agregados pre-amiloideos, apoya la hipótesis de que estas variantes amino truncadas podrían iniciar el depósito del péptido β -amiloide formando un núcleo a partir del cual se promueve la generación de placas (Pike, et al. 1995, El-Agnaf et al. 1998).

Estudios realizados por Pike y colaboradores (1995) demuestran que las especies de β A que tienen diferencias en su extremo amino terminal, entre ellas, β A₈₋₄₂, poseen una mayor capacidad de agregación y neurotoxicidad *in vivo* e *in vitro* en cultivos de neuronas hipocampales con respecto al péptido completo β A₁₋₄₂. La acumulación de estas especies amino truncadas producen peroxidación de lípidos de la membrana neuronal y promueven la formación de estructuras β típicas de las placas seniles (Pike et. al., 1995). Además, ha sido reportada la presencia de β A₈₋₄₂ en líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral de pacientes con EA (Vanderstichele et.al., 2005; Näslund, 1994), mientras que las especies amino truncadas (β A₄₋₄₂, β A₈₋₄₂, β A₁₁₋₄₂, β A₁₇₋₄₂, etc.), se encuentran en placas difusas y/o asociadas a neuritas distróficas (Saido et. al., 1995). La presencia de β A₈₋₄₂ y otros péptidos amino truncados en el líquido cefalorraquídeo, podría constituir un marcador con alto valor para el diagnóstico diferencial temprano de la EA con respecto a otras demencias en personas con desórdenes cognitivos moderados.

Una de las alteraciones que ocurren normalmente con la edad es la disminución de la función de los vasos sanguíneos cerebrales; sin embargo, se ha relacionado al péptido β A con la alteración prematura de la vasculatura cortical y con la presencia de hemorragias cerebrales y el incremento de éstas en personas con antecedentes familiares de angiopatía vascular amiloide (Racke et. al., 2005; Murakami et. al., 2003; Miravalle et. al., 2000; Van Duinen et. al., 1987). El transporte de distintas especies solubles de β A favorece su acumulación en las paredes de los vasos sanguíneos de las meninges y el parénquima cerebral. La presencia de este péptido altera el flujo sanguíneo por la disminución del diámetro de los capilares, promueve la ruptura de los vasos sanguíneos por la fragmentación de la lámina basal endotelial, causa atrofia de las células musculares lisas de los vasos y perturba la continuidad de la barrera hematoencefálica (Gandy y Walker, 2004). Además de las alteraciones estructurales antes mencionadas, la presencia de β A disminuye la función de los receptores GLUT 1 y GLUT 3, responsables del transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica y de la glucosa capturada por las neuronas respectivamente (Shi et. al., 2000).

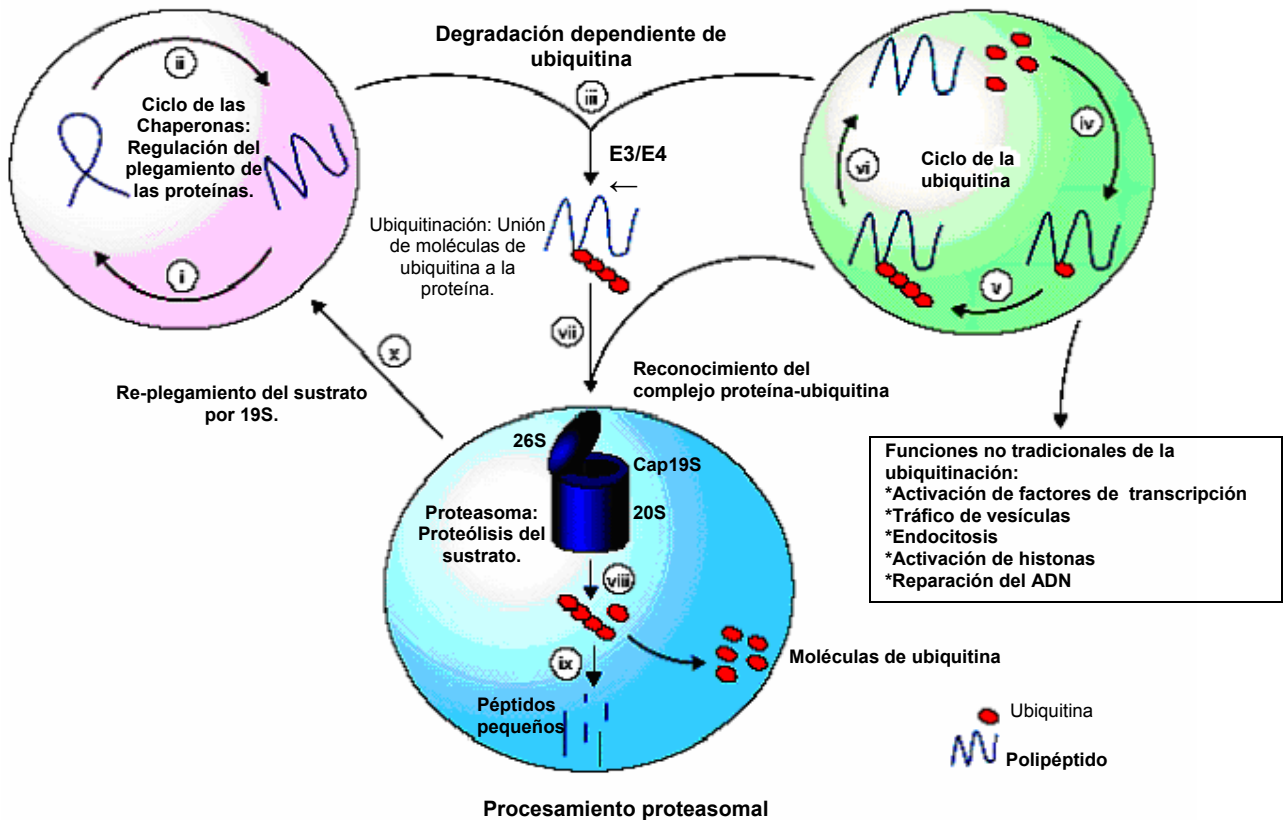
Además, se ha postulado que el péptido β A contribuye al incremento del calcio intraneuronal a través de la formación de poros en la membrana por donde ingresa este ion a las células nerviosas (Singer y Dewji, 2006; Quist et. al., 2005; Arispe et. al., 1993).

ALTERACIÓN DE LA VÍA DE DEGRADACIÓN PROTÉICA: UBIQUITINA-PROTEASOMA OCACIONADA POR EL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE

En las células nerviosas como el resto de las células del organismo, existe un continuo recambio para la renovación y el control de la producción de las proteínas generadas, siendo dos de los principales componentes del sistema de calidad proteica las chaperonas de choque térmico (HSP's de sus siglas en inglés *heat shock proteins*), y la vía ubiquitina-proteasoma: VUP (Shoesmith y Paulson, 2003).

La VUP (ver figura 4) constituye un complejo sistema de regulación de los niveles proteicos a través de la degradación no lisosomal de proteínas mal plegadas o con mutaciones, así como de péptidos de vida corta relacionados con el ciclo celular y factores de transcripción. Esta vía está involucrada además, en la regulación de receptores de superficie, canales iónicos y en la generación de péptidos que serán presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad CMH I (Oh, et al. 2005; Shoesmith y Paulson, 2003). Uno de los componentes de este sistema lo constituye un complejo multicatalítico llamado PROTEASOMA, cuya función es la proteólisis de proteínas intracelulares marcadas o ubiquitinadas a través de su subunidad catalítica 26S dependiente de ATP. Es posible que este sistema de control de calidad juegue un papel muy importante en la función y sobrevivencia de las células nerviosas, pues se sugiere que un mal funcionamiento del sistema provoca la acumulación de proteínas ubiquitinadas en las células; hecho que se relaciona con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, específicamente con el incremento en la producción de péptidos con mayor propensión amiloidogénica y con la formación de marañas neurofibrilares. Lo anterior se ha demostrado en ensayos previos sobre la función proteasómica, en donde el bloqueo de la subunidad 26S por la lactacistina disminuye marcadamente la degradación de β A₁₋₄₂. Otras evidencias sugieren que la hiperfosforilación de la proteína tau también inhibe la actividad del proteasoma en pacientes con EA. En ratones transgénicos que expresan la mutación SW (Tg2576), se ha reportado una relación inversamente proporcional entre el incremento de β A con la edad y la actividad proteasómica. No obstante que se desconoce el mecanismo preciso que involucra al péptido β -amiloide en el

mal funcionamiento de VUP, estudios *in vitro* demostraron que la exposición extracelular de los péptidos BA₁₋₄₂ y BA₂₅₋₃₅ disminuyó la actividad proteasomal de las células, sugiriendo que la interacción entre el péptido y el sistema catalítico ocurre en el citosol y que la región central del péptido contiene una secuencia de residuos esenciales para la inhibición del proteasoma (Oh, et al. 2005).



(Shoesmith y Paulson, 2003).

FIGURA 4. Degradación de proteínas por la vía ubiquitina-proteasoma. La preparación de la proteína para su degradación consiste en la unión covalente de al menos cuatro moléculas de ubiquitina por enzimas ligasas (E3) de ubiquitina (Ciechanover y Brundin, 2003), a residuos de lisina específicos de la proteína sustrato para ser reconocida por el complejo 26S del proteasoma. Posteriormente interviene un complejo estructural del mismo proteasoma, cap19S que separa las moléculas de ubiquitina del sustrato, generando un cambio conformacional en la proteína plegada que facilita su entrada al túnel proteasómico de la subunidad 20S. Finalmente por la acción de distintas peptidasas, la proteína es degradada a péptidos pequeños. (iii) Existe una relación importante entre las chaperonas y el ciclo de la ubiquitina en el marcaje de las proteínas que serán degradadas por el proteasoma. (i,ii) Las chaperonas regulan el plegamiento de las proteínas; (iii) interacciones entre las chaperonas E3/E4 facilitan la degradación dependiente de ubiquitina; ubiquitinación de sustratos (mono y poli ubiquitinación); (vi) desubiquitinación no proteasomal; (vii) sustratos marcados con ubiquitina son reconocidos por el proteasoma; (viii) desubiquitinación en el proteasoma; (ix) proteólisis del sustrato por el proteasoma (endoproteólisis); y (x) re-plegamiento de sustratos por 19S (Shoesmith y Paulson, 2003).

MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO DE PPA: VARIANTES FLEMISH Y DUTCH.

Se ha descrito que la sustitución de aminoácidos ocurre generalmente entre los residuos hidrofóbicos 17 a 21 del péptido β A, afectando las características fisicoquímicas del mismo (Sánchez de Groot, et al. 2006, Kumar-Singh, et al., 2000, Wang, et al.2000).

Se han reportado 15 mutaciones localizadas en el gen de PPA, algunas están relacionadas con la enfermedad de Alzheimer pues se localizan dentro de la secuencia codificante para β A: Flemish (A692G), Dutch (E693Q), Arctic (E693G), Italian (E693K) e Iowa (D694N) (Kumar-Singh, Julliams, et al. 2002). La presencia de estas mutaciones incrementa la concentración de β A en plasma y en el líquido cefalorraquídeo (Walsh, et al. 2001).

Cuando las mutaciones se generan cerca del sitio de corte de la secuencia de beta amiloide por α -secretasa, interfieren con la actividad de esta enzima y el procesamiento de PPA se dirige por la vía de β y γ secretasas, lo que genera un incremento extracelular del péptido que posee mayor propensión amiloidogénica: βA_{1-42} (Hardy y Selkoe, 2002). Los cambios en la secuencia de aminoácidos en la región de PPA que codifica para la generación del péptido β -amiloide, originan fenotipos variables de la enfermedad y se heredan con un patrón de herencia autosómico dominante (Rossor et al., 1996).

Dos de las mutaciones que se han estudiado corresponden a las formas FLEMISH (A21G) y DUTCH (E22Q). La diferencia entre estas dos variantes de β A se encuentra en el cambio de un aminoácido en los residuos adyacentes 21 y 22 de PPA; alanina por glicina en FLEMISH y ácido glutámico por glutamina en DUTCH (Wang, et al.2000). La presencia de estas mutaciones está asociada al incremento de hemorragia cerebral, muerte neuronal, y pérdida progresiva de las funciones cognitivas a temprana edad (Walsh, et al. 2001; De Jonghe, et al. 1998).

MUTACIÓN DUTCH (APP/E693Q):

La enfermedad asociada a la variante DUTCH genera una forma autosómica dominante de amiloidosis vascular que se conoce como "*hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch*" y se caracteriza por el depósito de βA en la microvasculatura del cerebro, microhemorragias cerebrales masivas, demencia, ausencia de marañas neurofibrilares y de placas seniles compactas (Van Duinen, et al. 2000; Haas et al., 1994).

En estudios de agregación, se explica que la cinética de la fibrillogénesis es mucho mayor que la del péptido nativo, lo que minimiza la posibilidad de encontrar formas oligoméricas no agregadas o difusibles del péptido, siendo las especies involucradas en la citotoxicidad los confórmeros intermediarios y las fibras finales (Kumar-Singh, Julliams, et al. 2002; Walsh, et al. 2001; Miravalle, et al. 2000).

Ensayos con anticuerpos han demostrado que la especie de βA que se encuentra en mayor proporción en la mutación DUTCH con respecto al péptido βA_{1-42} , es βA_{1-40} mutado (3:1), lo que sugiere que este péptido es resistente a la acción de proteasas que degradan a βA en el cerebro como la neprilisina o la enzima degradadora de insulina, favoreciendo su acumulación en las paredes de vasos sanguíneos. En estudios llevados a cabo "*post mortem*" en cerebros humanos, se han descrito también presentes las especies βA_{1-40} Wild type y βA_{1-42} (Sánchez de Groot, et al. 2006; Herzig, et al. 2004).

MUTACIÓN FLEMISH (APP/A692G):

Una de las mutaciones que ocurren en el codón 692 de la proteína precursora del amiloide es la mutación FLEMISH (PPA692), ocasionada por la sustitución de la alanina por la glicina, lo que genera una forma autosómica temprana de la enfermedad de Alzheimer que se caracteriza por demencia en personas menores a 65 años, asociada a distrofia neurítica, hemorragias cerebrales, marañas neurofibrilares y la presencia de depósitos amiloideos en vasos sanguíneos y parénquima cerebral (Kumar-Singh, et al., 2002; Walsh, et al. 2001; De Jonghe, et al. 1998; El-Agnaf, et al. 1998).

La sustitución de la alanina por la glicina incrementa la producción de las dos especies βA_{1-40} y βA_{1-42} , además modifica la cinética de ensamblaje del péptido haciendo más lenta la formación de fibrillas, lo que podría facilitar la difusión o transporte de esta variante del péptido desde el parénquima cerebral a los vasos sanguíneos (Roks et al., 2000). Con base en lo anterior es probable que la toxicidad de la variante FLEMISH se asocie a la presencia extracelular de intermediarios oligoméricos solubles favoreciendo la formación de grandes depósitos (Walsh, et al. 2001; El-Agnaf, et al. 1998).

Los cambios conformacionales inducidos por la sustitución de $Ala^{21} \rightarrow Gly$, podrían incrementar la tendencia del péptido de pasar de una estructura α -hélice a β -plegada (Murakami, et. al 2002), facilitando la adherencia del péptido a las paredes de los vasos sanguíneos por la exposición de regiones, que normalmente en el péptido nativo no son capaces de interactuar con la superficie de las células endoteliales (Walsh, et al. 2001).

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente se han abordado diferentes estrategias para el tratamiento de esta enfermedad; algunas se enfocan en los síntomas, a través del uso de agentes farmacológicos que los supriman temporalmente (Selkoe y Schenk, 2003).

Otras estrategias hacen uso de la hipótesis de la cascada del amiloide para la prevención y el tratamiento de la enfermedad, enfocándose principalmente en la disminución de la producción de βA en etapas tempranas a través de la inhibición de la actividad de las secretasas β/γ (Selkoe, 2001). La utilización de moléculas que se unan a formas solubles monoméricas de βA es una propuesta dirigida a evitar la formación de los intermediarios oligoméricos neurotóxicos (Datki et al., 2004).

Los procesos inflamatorios están muy relacionados con la patología de Alzheimer y se ha reportado que el consumo frecuente de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) minimiza el riesgo de padecer EA. El uso de este tipo de medicamentos se enfoca principalmente a la regulación de la producción de βA modulando la actividad de γ -secretasa, favoreciendo la producción de péptidos con menor número de aminoácidos que βA_{1-42} . Estudios realizados en ratones transgénicos han demostrado que la administración de altas dosis de AINES reduce la carga amiloidea y promueve la activación de la microglía (Weiner y Frenkel, 2006).

Existen otros factores de riesgo asociados a EA, entre ellos se encuentran la hipertensión y la hipercolesterolemia. A través de estudios "in vitro" en neuronas hipocampales, se demostró que el incremento del colesterol en el medio de cultivo favorece el procesamiento amiloidogénico de PPA. Una alternativa enfocada a la prevención de la EA es la inhibición de la enzima ACAT, responsable de la formación de ésteres de colesterol, los cuales están muy relacionados con la producción de βA (Crisby et al. 2002).

El uso de estatinas (Pravastatina, Atorvastatina, Mevastatina y Simvastatina), es un recurso útil por sus efectos anti inflamatorios y antioxidantes; además de inhibir la síntesis de ésteres de colesterol y reducir los niveles de $\beta A_{1-40/42}$, la protección de estos fármacos contra procesos isquémicos reduce el riesgo de se generen procesos neurodegenerativos

asociados a β A (Citron, 2004; Adamson y Greenwood, 2003)).

El uso de antioxidantes se basa en la observación de que el Fe^{3+} y el Cu^{2+} se reducen en presencia de β A y generan especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno, el cual ocasiona daño neuronal (Atwood, 2003). Además, la unión del Zn^{2+} y el Cu^{2+} con β A forma complejos que favorecen la agregación del péptido. La administración de fármacos quelantes de zinc y cobre en ratones transgénicos disminuye el depósito de β A (Wolfe, 2002).

INMUNOTERAPIA EN MODELOS ANIMALES

La inmunoterapia con el péptido βA_{1-42} ha sido evaluada principalmente a través del empleo de ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la PPA humano. La inmunización activa con el péptido en ratones jóvenes ha demostrado tener un efecto preventivo del desarrollo de placas, es decir de la patología parecida a la enfermedad de Alzheimer. En ratones viejos, se ha reportado la disminución de placas y de la carga del péptido en el cerebro, además de la recuperación del daño cognitivo. Estudios recientes sugieren la disminución de la carga del péptido en la corteza cerebral en perros, conejos, cuervos y primates no humanos inmunizados con el péptido fibrilar βA_{1-42} (Head, et al. 2006; Maier et al., 2006; Schenk, 2004; Dickey et al., 2001; Janus, 2000; Morgan, 2000; Dodart et al., 2002; Bonici et al, 2003).

Con el propósito de generar un método de inmunoterapia seguro y efectivo, Gochikyan y colaboradores (2006) diseñaron un protocolo de inmunización en modelo murino con la molécula sintética *PADRE₁₋₁₅MAP* construida con base en la secuencia de aminoácidos integrantes de la región 1-15 del péptido β -amiloide. La administración inicial del inmunógeno con un adyuvante de aluminio, el cual suscita una respuesta inmune anti-inflamatoria, seguida de inyecciones de la mezcla del péptido sintético (*PADRE₁₋₁₅MAP*) con QuilA que es un adyuvante que promueve la respuesta inflamatoria, generó anticuerpos específicos contra β A, predominantemente los tipos IgG1 e IgG2b, lo que sugiere que la formulación propuesta favoreció la generación de una respuesta inmune de tipo anti inflamatoria o Th2 (Gochikyan et al., 2006; Baril et al., 2004).

INMUNOTERAPIA EN HUMANOS

La inmunización activa con el péptido βA_{1-42} genera anticuerpos con capacidad desagregante tanto en modelos humanos como en murinos. Sin embargo, la mayoría de estos anticuerpos están dirigidos contra un epítipo localizado entre los residuos 1-15 del extremo amino terminal del péptido, cuya respuesta inmune se relaciona con hemorragia cerebral e inflamación en ambos modelos (Maier et al., 2006; Schenk et al., 2004; Münch y Robinson, 2002; Pfeifer et al., 2002).

El péptido βA se encuentra normalmente en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de individuos sanos. De acuerdo con lo anterior, la inmunización activa con βA debe considerar que éste péptido puede ser reconocido como auto antígeno, por lo que es necesario romper la tolerancia a través de la co-administración de un adyuvante. Se sabe que el uso del adyuvante QS21 en humanos, induce una respuesta autoinmune y citotóxica tipo TH_1 (Gandy y Walker, 2004).

Mediante estudios realizados en pacientes con EA, cuyos síntomas fueron evaluados como grado moderado, se demostró que la administración parenteral con un péptido βA_{1-42} sintético y adyuvante no desarrolló efectos secundarios en ellos (Gilman, 2005). Al continuar con la siguiente fase de prueba, en un estudio "doble-ciego", 372 pacientes fueron inmunizados de manera intramuscular con el péptido sintético preagregado βA_{1-42} (AN1792), aplicándoles un refuerzo a las cuatro semanas. Se observó que 6% de los pacientes inmunizados desarrollaron meningoencefalitis, razón por la cual se suspendió el estudio (Schenk et al., 2004). A pesar de los efectos secundarios observados en algunos pacientes, Hock y colaboradores (2002) reportaron que la inmunización con este péptido evitó la progresión de los daños cognitivos y clínicos en los pacientes que desarrollaron encefalitis y en los que no presentaron efectos secundarios, también se reportó que los anticuerpos generados podían cruzar la barrera hematoencefálica (Monsonogo et al., 2006; Hock et al., 2002). Los estudios "*post mortem*" del cerebro de los pacientes fallecidos, demostraron que la causa de la meningoencefalitis fue la activación de células T reactivas hacia el βA inyectado con QS21, pues se detectaron en el cerebro infiltrados de células TCD4+ y TCD8+ (Münch, 2002).

MAPEO DE EPÍTOPOS E IDENTIFICACIÓN DE MIMÓTOPOS DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE.

Un aspecto fundamental para la prevención de la EA y los daños neuronales asociados a ésta, es la generación de una respuesta inmune efectiva dirigida hacia la inhibición de especies tóxicas del péptido β A, para lo cual es importante el reconocimiento y unión de un anticuerpo con el antígeno promotor de dicha respuesta. Es así que, existen elementos estructurales que participan activamente en el reconocimiento del antígeno y que se conocen como **EPÍTOPOS** o “*determinantes antigénicos*”. Un epítipo se define como aquella región, secuencia o segmento (lineal o conformacional) de una proteína (antígeno) que entra en contacto con el parátipo (sitio de reconocimiento para el antígeno) de un anticuerpo particular o bien, con un linfocito T a través de su receptor TCR [de sus siglas en inglés “*Tcell receptor*”] (Meola et al., 1995; Gutte, 1995).

Desde puntos de vista funcionales y estructurales los determinantes antigénicos ya sean lineales o discontinuos, pueden ser imitados o mimetizados por péptidos pequeños que están constituidos por un número de aminoácidos variable de 6 a 20 residuos (Gutte, 1995; Meloen et al., 2000). Estos péptidos se conocen como **MIMÓTOPOS** o “*péptidos miméticos*” y no poseen necesariamente similitud con la secuencia del epítipo. Un péptido mimético puede ser inmunogénico siempre y cuando sea capaz de crear una respuesta inmunológica contra el epítipo original. También puede ser reconocido por los anticuerpos generados por el antígeno original sin promover una respuesta inmunológica específica contra dicho antígeno, a estos últimos mimótopos se les conoce como antigénicos (Meola et al., 1995).

Al inmunizar ratones transgénicos que sobre expresan el gen de la proteína precursora del amiloide (PPA) con el péptido β A₁₋₄₂ humano, los anticuerpos del suero reconocen mayormente mimótopos del péptido nativo fibrilar. Por el contrario, los anticuerpos presentes en el suero obtenido de ratones no transgénicos inmunizados con el mismo péptido, reconocen preferentemente al epítipo lineal EFRH, lo que sugiere que la inmunización con el péptido β A en roedores puede generar repertorios de anticuerpos dirigidos contra epítopos blanco distintos que pueden ser identificados a través del monitoreo de librerías de péptidos expresados al azar en fagos filamentosos con anticuerpos monoclonales o policlonales (Gevorkyan et al., 2004).

TECNOLOGÍA DE DESPLIEGUE EN FAGOS FILAMENTOSOS

El despliegue en fagos tiene su origen en la década de los 80's y consiste en la inserción de secuencias de ADN de las moléculas de interés en el genoma de un bacteriófago filamentoso para ser expresadas como productos de fusión en alguna de las proteínas de la cubierta del fago, lo cual favorece la presentación de bibliotecas de péptidos o de proteínas en la superficie del virus (Azzazy y Highsmith, 2002).

El uso de esta técnica facilita la identificación de ligandos específicos para el mapeo de diversos epítomos y mimótopos de epítomos lineales o conformacionales con base en la naturaleza de unión antígeno-anticuerpo. La selección de péptidos, proteínas o anticuerpos se lleva a cabo con alta afinidad y especificidad, por lo que es posible hacer uso del despliegue en fagos para identificar moléculas útiles para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (Sidhu, 2001).

El uso de bibliotecas comerciales de heptapéptidos y dodecapéptidos lineales es un recurso útil para la obtención de un gran número de epítomos elegibles (Sompuram et al., 2002; Santamaría et al., 2001; Delmastro et al., 1997; Meola et al., 1995). Es por esto que, mediante un proceso de bioselección (Biopanning) utilizando bibliotecas comerciales integradas por mezclas de péptidos, cuyas secuencias han sido aleatorizadas previamente y que están expresadas en proteínas de cubierta del bacteriófago M13, es posible evaluar la especificidad de anticuerpos IgG presentes en sueros policlonales de ratones inmunizados con formas mutadas y amino truncadas del péptido β -amiloide con el fin de identificar y caracterizar epítomos y/o mimótopos presentes en distintas regiones de β A.

BACTERIOFAGO M13

Este virus pertenece al género *Inovirus* e infecta bacterias *Escherichia coli* gram (-) utilizando el pilus de la bacteria como receptor sin generar lisis, lo que garantiza un método limpio de purificación de partículas virales (Azzazy y Highsmith, 2002). Como se muestra en la figura 5, la estructura de M13 consta de una envoltura proteica de forma tubular integrada por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. El genoma del virus comprende 6.4 kb en una molécula de ADN circular de cadena sencilla. La partícula viral mide 900 nm de largo y

comprende un diámetro de 6.5 nm (Stopar et al., 2003; Vispo y Puchades, 2001).

Dos de las proteínas de cubierta que se utilizan frecuentemente para el despliegue de péptidos, proteínas e incluso fragmentos de anticuerpos son: pIII (340 aminoácidos), expresada de 3 a 5 copias en uno de los extremos del fago y pVIII (50 aminoácidos), que cuenta con 2700 copias (Mullen et al., 2006; Webster, 2001). El grado de expresión de las dos proteínas mencionadas anteriormente constituye una diferencia importante para llevar a cabo la selección de uniones de alta o baja afinidad (Santamaría, 2003).

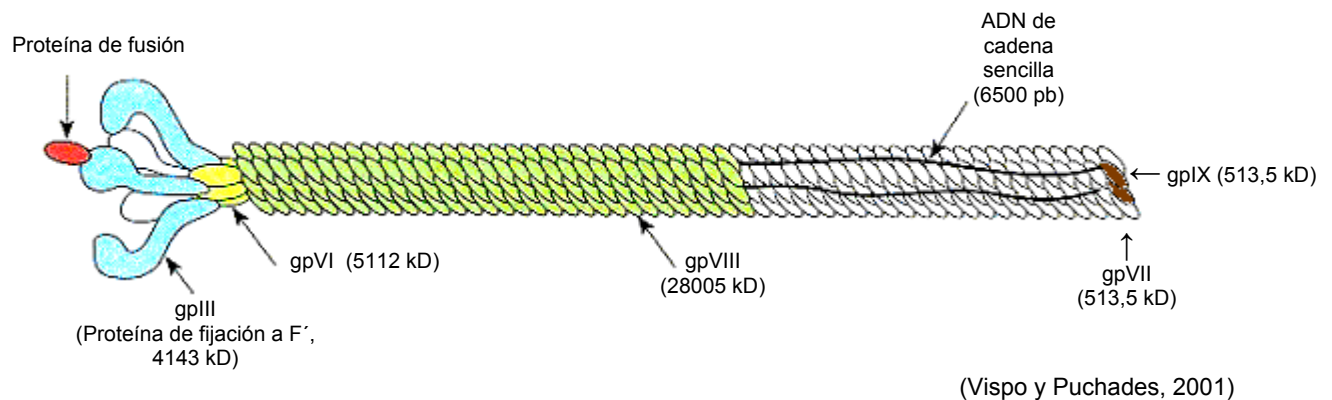
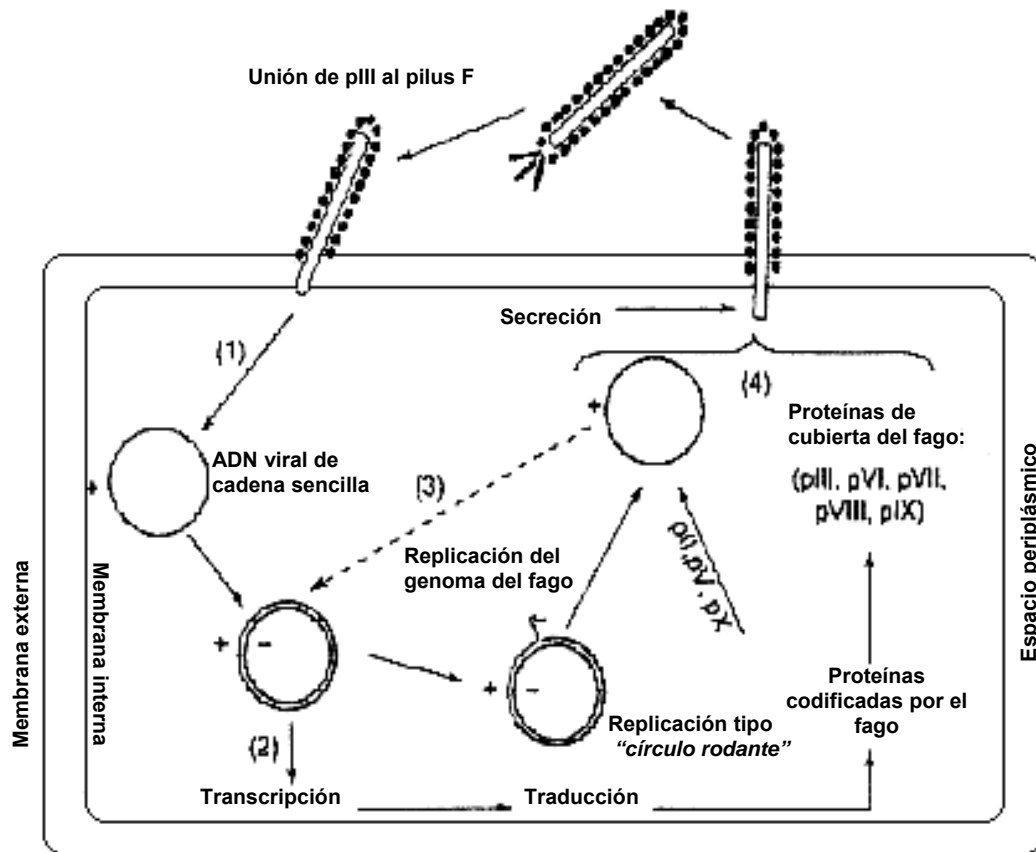


FIGURA 5. Esquema que muestra la estructura del bacteriófago M13 donde se aprecian las principales proteínas que conforman la cubierta del virus. El péptido está representado sobre la superficie del fago, unido a la proteína pIII.

El ciclo de infección de M13 se inicia por la unión de la proteína gpIII del fago al pilus (F⁺) en la superficie de una célula de *Escherichia coli*. Posteriormente, el ADN de cadena sencilla (+) del bacteriófago entra a la bacteria y es convertido por la maquinaria de replicación de *E. coli* en su forma replicativa como un plásmido de doble cadena (-). La forma replicativa del fago lleva a cabo un proceso de replicación conocido como círculo rodante que genera un ADN de cadena sencilla e induce la expresión de sus proteínas de cubierta gp3 y gp8, de esta manera, los componentes para la formación de nuevas partículas virales se acumulan dentro de la célula bacteriana y el ensamblaje de cada fago se lleva a cabo en la membrana citoplasmática con la ayuda de las proteínas pI y pIV (ver figura 6) (Sidhu, 2001; Webster, 2001).



(Mullen et al., 2006)

FIGURA 6. Esquema que muestra el ciclo de infección del bacteriófago M13. La replicación del bacteriófago inicia con la unión de pIII al pilus (F) de la bacteria. (1) Translocación del ADN viral al citoplasma de *E. coli*, (2), Formación del plásmido de doble cadena, (3) Síntesis de las proteínas del fago a partir de la forma replicativa a través de la replicación "círculo rodante", (4) Ensamblaje de las partículas virales y secreción de nuevos fagos.

El despliegue en fago tiene la ventaja de que las clonas seleccionadas, que contienen en sus insertos secuencias correspondientes a epítopos lineales y/o mimótopos del péptido β A, pueden amplificarse en pocas horas, produciendo grandes cantidades disponibles para su análisis.

JUSTIFICACIÓN

Un aspecto inmunoterapéutico que ha sido poco explorado, es la búsqueda de anticuerpos dirigidos a la región media o carboxilo terminal del péptido βA y su evaluación en la capacidad desagregante; ya que se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra la región inmunodominante EFRH de βA_{1-42} , localizada en el extremo amino terminal del péptido, favorecen el desarrollo de una respuesta inmune adversa asociada a hemorragia cerebral en ratones transgénicos (Gandy y Walker, 2004; Pfeifer et al., 2002). Se ha postulado que la inmunización en humanos con péptidos cortos que mimeticen regiones del péptido βA diferentes a EFRH podría generar inmunogenicidad sin efectos tóxicos (Gevorkian et. al., 2004).

Es así que la caracterización de nuevos epítomos/mimótopos del péptido βA (silvestre, así como truncados y mutantes), podría ser de ayuda para el desarrollo de terapias efectivas que eviten la agregación de βA sin provocar los efectos secundarios asociados al epítomo EFRH.

HIPÓTESIS

La identificación de epítomos presentes en regiones distintas a EFRH de βA_{1-42} , así como mimótopos de diferentes epítomos conformacionales presentes en agregados de βA_{1-42} , nos permitirá desarrollar nuevos blancos para la inmunoterapia de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar epítomos/mimótopos del péptido βA_{1-42} (silvestre, FLEMISH y DUTCH) componente principal de placas neuríticas en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y del péptido amino truncado βA_{8-42} , con el fin de desarrollar moléculas capaces de inducir una respuesta inmune protectora para el tratamiento de la enfermedad.

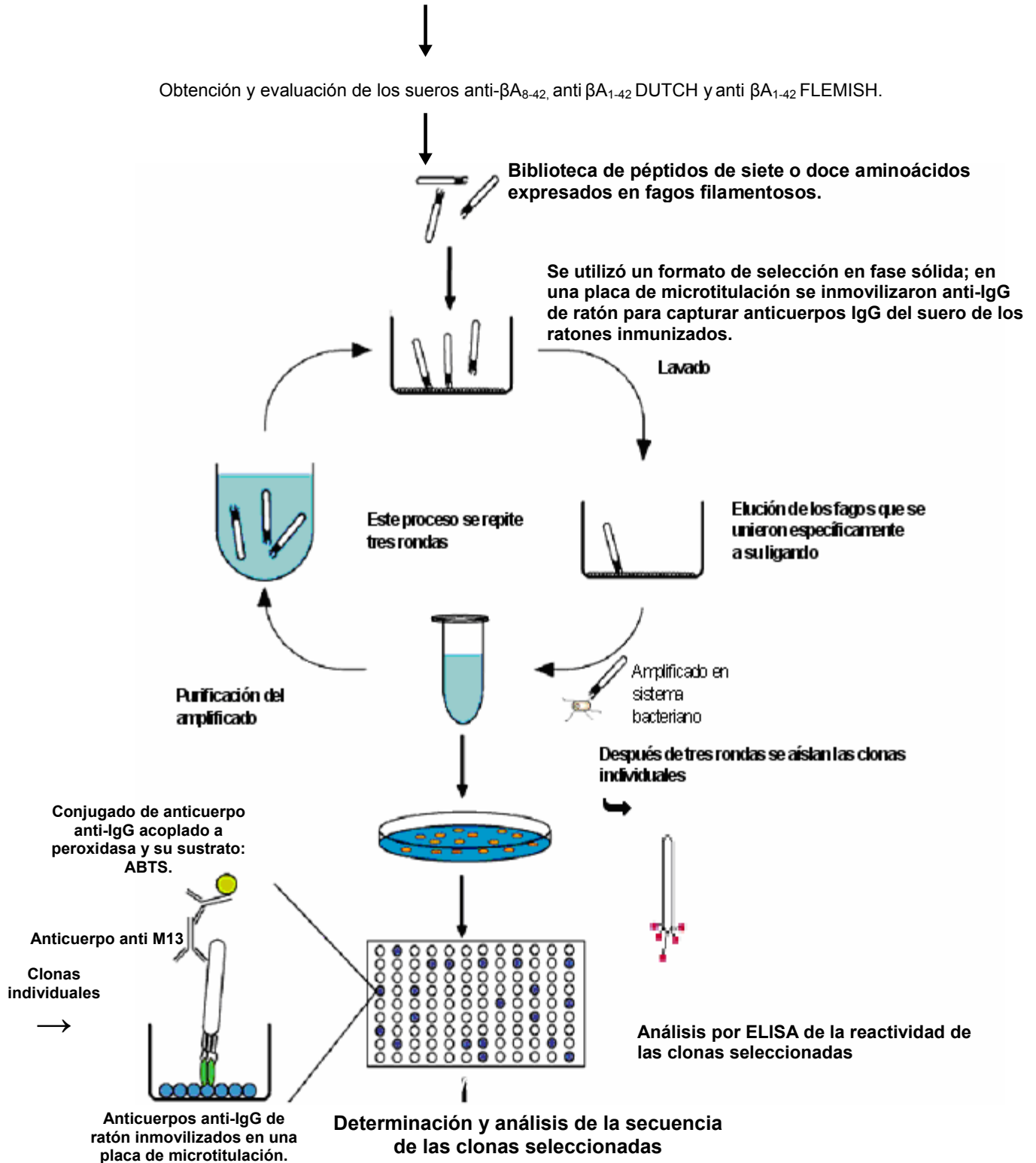
OBJETIVOS PARTICULARES

- Producción y titulación de un suero específico contra el péptido amino truncado βA_{8-42} en ratones machos Balb/C AnN.
- Búsqueda de epítomos/mimótopos del péptido βA_{8-42} por bioselección con una biblioteca comercial de péptidos expresados en fago contra el suero policlonal anti- βA_{8-42} .
- Producción y titulación de un suero específico contra los péptidos βA_{1-42} (silvestre, FLEMISH y DUTCH) y βA_{8-42} , en ratones Balb/C AnN machos.
- Búsqueda de epítomos/mimótopos de los péptidos βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH por bioselección con una biblioteca comercial de péptidos expresados en fago contra los sueros policlonales anti- βA_{1-42} FLEMISH y anti- βA_{1-42} DUTCH.
- Evaluación de las clonas específicas.
- Secuenciación de las clonas positivas.
- Análisis de las secuencias.

ESQUEMA METODOLÓGICO

Imunización de ratones Balb c/Ann ♂ (H-2^d) con 30 µg/ratón de los péptidos βA_{8-42} , βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH.

Obtención y evaluación de los sueros anti- βA_{8-42} , anti βA_{1-42} DUTCH y anti βA_{1-42} FLEMISH.



METODOLOGÍA

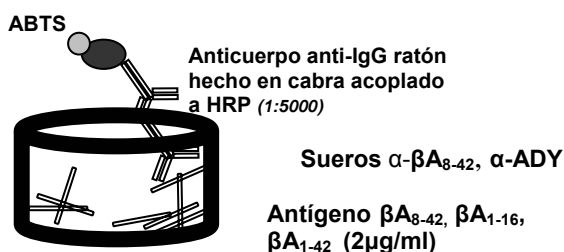
1. OBTENCIÓN DE SUERO ESPECÍFICO ANTI- βA_{8-42} :

Con el fin de obtener anticuerpos específicos contra epítomos de péptidos βA amino truncados carentes de la región inmunodominante ${}_3EFRH_6$, se inmunizaron de manera subcutánea dos ratones machos Balb c/Ann (H-2^d) de 4-6 semanas de edad con 30 μg /ratón del péptido βA_{8-42} (AnaSpec, San José CA, USA) a intervalos de 0, 15, 30, 45, y 60 días. Se utilizó adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto para los refuerzos subsecuentes (ver apéndice 4). Como control, dos ratones recibieron la administración subcutánea de buffer y adyuvante exclusivamente.

El inmunógeno se preparó suspendiendo 100 μg del péptido en 135 μl de agua libre de pirógenos y se incubó por 7 días; posteriormente se añadió 15 μl de PBS (10x) a la solución que se incubó a 37°C toda la noche. Para la primera inmunización, la suspensión inmunogénica se mezcló con 150 μl de adyuvante de Freund completo.

1.1 EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- βA_{8-42} :

Después de la quinta inmunización (día 60) se extrajo sangre por punción del plexo retro ocular de los ratones inmunizados, con el fin de evaluar por ELISA la presencia de anticuerpos específicos anti- βA_{8-42} en el suero.



En una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se inmovilizaron los siguientes péptidos preagregados: βA_{8-42} , βA_{1-16} , βA_{1-42} (Bachem, Philadelphia, USA) en una concentración de 2 μg /ml en Buffer de carbonatos a pH 9.6 (0.1M Carbonato/bicarbonato a pH 9.6) colocando 100 μl por poza y un péptido no relacionado en concentración de 5 μg /ml. La placa sensibilizada se dejó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la placa con un ciclo (4X) de lavado automático (Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%), y se bloqueó con 200 μ l/poza de PBS (1x) - BSA 2% por 1 hora a 37°C.

Después de lavar la placa se incubó con 100 μ l/poza de los sueros anti-adyuvante y anti- β A₈₋₄₂ de cada ratón en diluciones seriales de 1:100, 1:200, y 1:400 en PBS 1X/ BSA 1%/ TWEEN₂₀ 0.1% por una hora a 37°C y se lavó como se mencionó anteriormente. Se hizo un pool del suero anti-adyuvante mezclando los sueros de los dos ratones inmunizados con el adyuvante de Freund. Como control positivo se utilizó un suero de ratón anti- β A₁₋₄₂.

La reactividad se reveló añadiendo 100 μ l/poza de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón hecho en cabra diluido 1:5000 en PBS 1X/ BSA 1%/ TWEEN₂₀ 0.1% conjugado a la enzima peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar la placa, se desarrolló la reacción con 100 μ l/poza de sustrato para la peroxidasa (ABTS Single Solution, Zymed, San Francisco CA, USA). La placa se protegió de la luz directa y se incubó por 15 minutos a 37°C para llevar a cabo la reacción colorimétrica. Finalmente se tomó la lectura con un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA) a una longitud de onda de 405 nm.

1.2 MAPEO DE EPÍTOPOS DE SUERO ESPECÍFICO ANTI β A₈₋₄₂:

Para la identificación de epítopos o mimótopos del péptido β A₈₋₄₂ (AnaSpec, San José CA, USA), se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de doce aminoácidos expresados al azar sobre la proteína de cubierta *pIII* del fago filamentoso M13 (*Phage Display Peptide Library Kit, New England BioLabs, Hertfordshire, England*).

El proceso de bioselección fue realizado en un formato de fase sólida con el suero del ratón 1 inmunizado con el péptido β A₈₋₄₂. En cuatro pozas de una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se inmovilizó un anticuerpo monoclonal anti-IgG (cadena gamma) de ratón hecho en cabra a una concentración de 5 μ g/ml en buffer de carbonatos (0.1M Carbonato/bicarbonato) a pH 9.6 para un volumen de 100 μ l, durante una hora a 37°C.

Se lavó cada poza de forma manual cinco veces con 200 μ l/poza de una solución de PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%). Posteriormente se bloqueó con PBS-BSA al 2% (200 μ l/poza) por 1 hora a 37°C y se lavó como antes.

El suero del ratón 1 inmunizado con el péptido βA_{8-42} (Bachem, Philadelphia, USA) se diluyó 1:200 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%). Se colocaron 100 μ l/poza de la dilución del suero y se incubó la placa a 37°C por una hora.

Después de lavar las pozas, se añadieron 100 μ l/poza de la biblioteca comercial a una concentración de 10^{11} pfu/ml en PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%) y se incubó toda la noche a 4°C. Después de este tiempo la placa se dejó a temperatura ambiente durante treinta minutos y se lavaron las pozas cinco veces con PBS 1x -TWEEN 20 (0.2%) y dos veces con PBS 1x.

Finalmente se añadieron 100 μ l/poza de buffer de glicina-HCl 0.2M a pH 2.2 y la placa se incubó inicialmente por diez minutos a 37°C y después otros diez minutos a temperatura ambiente para la elución de los fagos.

Se colectó en un solo tubo el contenido de las cuatro pozas (400 μ l en total), y se neutralizó a pH 7.2 con 25 μ l de TRIS-BASE 2M pH 9.0. El tubo con el eluido se guardó a 4°C.

1.3 AMPLIFICACIÓN:

En un matraz de 250 ml con un volumen de 50 ml de 2YT se infectaron 500 μ l de un cultivo de toda la noche de bacterias *Escherichia coli* (ER 2738) con 380 μ l del eluido. Esta mezcla se incubó a 37°C sin agitación durante quince minutos para facilitar la infección y se incubó en agitación (220 rpm) durante 4.5 horas a 37°C.

Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C con un rotor JA20 en una centrifuga Heraeus (Biofuge Stratos, Madrid España) durante 10 minutos en tubos de policarbonato (Nalgene, New York USA). Se recuperó el sobrenadante en tubos frescos y estériles y se precipitaron los fagos agregando 1/6 del volumen de PEG/NaCl. Para favorecer la precipitación de los fagos los tubos se conservaron a 4°C toda la noche.

1.4 PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO:

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de TBS pH 7.5 estéril. La suspensión se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos. Esto se hizo para eliminar restos de bacterias.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 170 µl de PEG/NaCl, equivalente a 1/6 del volumen total de suspensión (1 ml), se incubó en hielo durante 60 minutos y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm, 4°C por 5 minutos. El pellet se resuspendió en 200 µl de TBS estéril se volvió a centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para ser titulado.

1.5 TITULACIÓN DEL ELUIDO Y AMPLIFICADO:

Se sembró una colonia de ER 2738 en 10 ml de 2YT y se dejó incubando con agitación a 37 °C hasta verificar una turbidez correspondiente a la media de la fase logarítmica de crecimiento $D.O._{600} = 0.5$ y una concentración aproximada de 10^8 células por mililitro.

En microtubos de 1.5 ml con 200 µl de la suspensión de bacterias, se infectaron con diluciones apropiadas del eluido y amplificado, éstos se incubaron a 37 °C por 30 minutos para facilitar la infección. Se consideró un rango de dilución de 10^3 a 10^6 pfu/ml para el eluido y de 10^{10} a 10^{13} pfu/ml para el amplificado.

A cada tubo de infección con los fagos del eluido y del amplificado se añadieron 15 µl de Xgal/IPTG y se mezcló el volumen completo de cada tubo con las bacterias infectadas y Xgal/IPTG a su correspondiente tubo con 4 ml de TOP AGAR a 45°C, la mezcla se agitó en el vórtex y se vació en cajas Petri con 10 ml de LB. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C.

El título del eluido y del amplificado se obtuvo a partir del número total de placas presentes en las cajas de cada dilución, éste se expresa como unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml). Cada placa corresponde a una clona individual, es decir a un fago que expresa una secuencia particular de aminoácidos.

Se llevaron a cabo tres rondas de bioselección. El procedimiento para la segunda y tercera ronda fué el mismo que se describió anteriormente, el amplificado de la primera y segunda ronda se añadieron en lugar de la biblioteca. Se obtuvieron los títulos de los eluidos de las tres rondas y los títulos de los amplificados de las dos primeras rondas.

Después de la tercera ronda se obtuvieron 21 clonas individuales provenientes de la bioselección con el suero anti- βA_{8-42} que fueron amplificadas y tituladas para contar con la cantidad suficiente de fagos viables (10^{11} pfu/ml) para evaluar su reactividad y llevar a cabo el análisis de las secuencias.

1.6 PURIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES:

Después de contar el número total de unidades formadoras de colonias, se seleccionaron aquellas cajas con suficiente número de placas y se recuperaron 21 placas al azar provenientes de la titulación del eluido de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- βA_{8-42} . Cada clona se amplificó en 3 ml de medio líquido 2YT con una dilución 1:100 de bacterias ER 2738 crecidas toda la noche y se incubó en agitación constante durante 4 horas 30 minutos a 37°C.

Los tubos se centrifugaron a 4 000 rpm, 4°C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 3 ml) y se dividió en dos alícuotas por clona de la siguiente manera: 1.2 ml para la evaluación de las clonas por ELISA, y 1.0 ml para la obtención de ADN de cadena sencilla de los fagos.

1.7 PURIFICACIÓN DE FAGOS POR DOBLE PRECIPITACIÓN CON PEG/NaCl:

Se añadieron 200 μ l de PEG/NaCl a los tubos destinados para ELISA y se incubaron toda la noche a 4°C para la precipitación de los fagos. Al día siguiente se centrifugaron a 14000 rpm, 4°C por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante.

Se resuspendió cada pellet en 1 ml de TBS estéril y se añadieron 165 μ l de PEG/NaCl para una segunda precipitación. Los tubos del resuspendido se mezclaron y se incubaron durante una hora a 4°C. Nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 14000 rpm y 4°C.

El pellet se resuspendió en 200 μ l de TBS estéril y se centrifugó a 14000 rpm, 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y estériles y se guardaron a 4°C para posteriormente ser titulados y determinar la reactividad de las clonas mediante un ensayo de ELISA.

1.8 OBTENCIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA:

Se añadieron 400 μ l de PEG/NaCl a los tubos con 1 ml de sobrenadante y se incubaron toda la noche a 4°C para facilitar la precipitación del fago. Al día siguiente se centrifugaron a 14000 rpm, 4°C por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se recentrifugaron los

tubos para retirar completamente los remanentes del sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 200 μ l de buffer de ioduro de sodio/EDTA adicionando de inmediato 500 μ l de etanol absoluto frío, los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue desechado por vacío y el pellet de cada tubo se lavó con 200 μ l de etanol al 70%. Esto se hizo con el fin de precipitar el ADN y eliminar las sales de yodo.

Nuevamente se centrifugaron los tubos; a 13 000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante mediante vacío. Todos los tubos se destaparon y se dejaron abiertos bajo la campana extractora durante 15 minutos para facilitar su secado.

El ADN se resuspendió en 20 μ l de agua miliQ estéril y cada tubo se guardó a -20°C para posteriormente determinar la secuencia de las clonas seleccionadas.

1.9 SECUENCIA DE LAS CLONAS INDIVIDUALES:

Para verificar la calidad y cantidad del ADN obtenido de las clonas individuales provenientes de la tercera ronda de la bioselección con el suero anti- βA_{8-42} , se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Buffer de TBE 1X y Bromuro de Etidio al 0.02%. En una cámara de electroforesis se cargaron 3 μ l de ADN de cadena sencilla de cada una de las clonas en una mezcla de 1 μ l de Buffer de carga 5X y 1 μ l de agua mili Q estéril. El gel se corrió aproximadamente durante 1 hora 30 minutos a un voltaje constante de 100 V.

La obtención de las secuencias de las clonas se llevó a cabo utilizando el ADN de cadena sencilla del fago, el Kit de Secuenciación Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland Ohio, USA) y dATP $\alpha\text{-S}^{35}$.

La reacción de ANNEALING se preparó en una mezcla de 12.5 μ l de templado (ADN de cadena sencilla), 2.0 μ l de buffer de reacción y 1.5 μ l de primer -28 (Sequencing Primer -28), que se incubó a 37°C por 10 minutos y posteriormente 10 minutos en hielo,

A cada tubo con la mezcla de annealing se añadieron (reacción de labeling) 1 μ l de dithiothreitol 0.1M (DTT), 2 μ l de la mezcla LABELING MIX 1:5 (7-deaza-dGTP), 0.3 μ l de marca dATP $\alpha\text{-S}^{35}$, 1 μ l de enzima polimerasa (sequenase versión 2.0 DNA polymerase) y

1 μ l de buffer de manganeso (isocitrato de sodio 0.15M/MnCl₂ 0.1M), y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente 4.5 μ l de la mezcla annealing-labeling se añadieron a cuatro tubos por reacción precalentados a 37°C que contenían 2.5 μ l de los nucleótidos análogos de terminación G, A, T, C, (ddNTPs 80 μ M) y se incubaron por 5 minutos a 37°C. Finalmente se añadió a cada tubo 4 μ l de solución de paro (Stop Mix), se incubaron durante dos minutos a 75°C y se cargaron 7 μ l en los carriles correspondientes de un gel de poliacrilamida 8% corriéndose a 1750V – 1800V durante 4.5 horas. El gel se recorrió a 1100 V por 15 minutos y a 1500 V durante 30 minutos.

Al término de este tiempo se recuperó el gel mediante papel filtro y se colocó en el secador de geles (Bio-Rad, USA). El proceso de secado se realizó durante 1.5 hora a 80 °C. Transcurrido el tiempo de secado el gel se colocó en un cassette de exposición con una placa de rayos X (Kodak, X.O mat), se guardó a temperatura ambiente y se reveló después de 72 horas.

1.10 ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS:

Las secuencias de las clonas individuales obtenidas de la bioselección con el suero anti- β A₈₋₄₂ se obtuvieron por el método de Sanger en un gel de poliacrilamida 8% con un primer de -28 pb. A través la lectura manual del gel representado por la placa en dirección 5' → 3' se obtuvo la secuencia de nucleótidos y a partir de la cadena complementaria 3' → 5', se obtuvo la secuencia de los 12 aminoácidos expresados en los insertos de cada clona.

Finalmente se determinó la homología de las regiones de aminoácidos entre los insertos de los péptidos de las 21 clonas seleccionadas y la secuencia del péptido β A₈₋₄₂ mediante la alineación de ambas secuencias para determinar si los insertos de péptidos correspondían a epítomos lineales o mimótopos.

1.11 EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA:

Con el fin de evaluar la reactividad de las 21 clonas individuales obtenidas en el proceso de bioselección con el suero anti- β A₈₋₄₂, se llevó a cabo un análisis por ELISA para determinar si estas clonas fueron reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en

el suero del ratón 1 inmunizado con el péptido βA_{8-42} . Se utilizó el suero de los dos ratones inmunizados con adyuvante de Freund como suero control.

M13 fue utilizado como control negativo y no se utilizó control positivo, pues no se contaba con una clona obtenida y evaluada anteriormente con anticuerpos específicos anti βA_{8-42} .

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark), utilizando 88 pozas en las que se añadieron 100 μ l/poza de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón hecho en cabra a una concentración de 5 μ g/ml en Buffer de carbonatos y se incubó la placa durante una hora a 37°C. Después de un ciclo de lavado (4X) con PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%) en el lavador automático de placas (Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA), se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 200 μ l/poza de la solución PBS-BSA al 2% y se lavó de igual manera.

Se incubaron 44 pozas con 100 μ l/poza del suero anti- βA_{8-42} y 44 pozas con 100 μ l/poza del pool de sueros anti-ADYUVANTE diluidos 1:200 en PBS (1x) - BSA (1%) - TWEEN₂₀ (0.1%) por 1 hora a 37°C. Después de lavar, se agregaron por duplicado a cada uno de los sueros las 21 clonas seleccionadas a una concentración de 10¹⁰ fagos/poza en PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%) y se incubó toda la noche a 4°C.

Después de lavar se adicionaron 100 μ l por poza de una solución de suero contra M13 hecho en conejo diluido 1:3000 en PBS (1x) - BSA (1%) - TWEEN₂₀ (0.1%) incubándose 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se reveló la reactividad con 100 μ l/poza de un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%), se utilizó ABTS como sustrato para la peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco CA, USA). La placa se protegió de la luz directa y se incubó a 37°C por 15 min, se leyó a una densidad óptica de 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA).

1.6 EVALUACIÓN DE CLONAS ESPECÍFICAS CONTRA EL SUERO ANTI- βA_{8-42} :

Con el fin de comprobar la especificidad de las clonas positivas C1, C8, C3/10, C16 y C21 obtenidas del proceso de selección con el suero anti- βA_{8-42} , se realizó otro inmunoensayo para evaluar la reactividad de estas cinco clonas con los sueros anti- βA_{1-42} , anti- βA_{8-42} y anti-ADYUVANTE. También se evaluaron las clonas negativas C2 y C19.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 µl/poza de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón hecho en cabra a una concentración de 5 µg/ml en buffer de carbonatos (pH 9.6) durante una hora a 37°C. Después de lavar se bloqueó con 200 µl/poza con PBS-BSA al 2% por 1 hora a 37°C, y se lavó nuevamente.

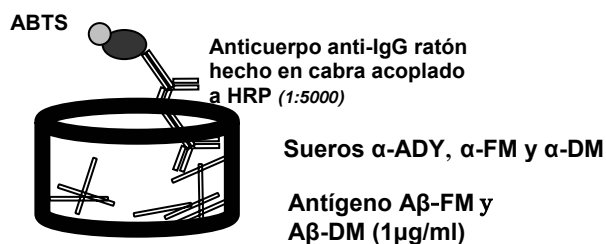
Se añadieron 100 µl/poza de cada uno de los sueros anti-βA₁₋₄₂, anti-βA₈₋₄₂ y anti-ADYUVANTE en diluidos 1:400 en PBS (1x) - BSA (1%) - TWEEN₂₀ (0.1%) incubando durante 1 hora a 37°C. Se lavó una vez más y se añadieron por duplicado las clonas seleccionadas: C1, C8, C3/10, C16, C21, M13 silvestre (clona control negativo), y Mix-EFRH: 4, 14, 15, 16 (clona control positivo) a una concentración de 7x10¹⁰ pfu/poza en 100 µl de PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de lavar se añadieron 100 µl/poza de un suero contra M13 hecho en conejo diluido 1:3000 en PBS 1X/ BSA 1%/ TWEEN₂₀ 0.1%, la placa se incubó por 1 hora a 37°C y la reactividad fué revelada con 100 µl/poza de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%). Se lavó y se le adicionaron 100 µl por poza del sustrato ABTS de la peroxidasa. La placa se incubó a 37°C por 15 min y se leyó a una λ de 405 nm.

2. OBTENCIÓN DE SUERO ESPECÍFICO CONTRA DOS FORMAS MUTADAS DEL PEPTIDO β -AMILOIDE: βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH.

Para la obtención de anticuerpos policlonales anti βA_{1-42} , se inmunizaron tres grupos de ratones machos Balb/C Ann de 4-6 semanas de edad, con un intervalo de 0, 2, 4, y 6 semanas. El primer grupo se inmunizó con 30 μg /ratón del péptido wild type βA_{1-42} humano (Bachem, Philadelphia, USA), el segundo grupo con 30 μg /ratón de la variante *Dutch* del péptido βA_{1-42} humano (Bachem, Philadelphia, USA), y el tercer grupo con 30 μg /ratón de la variante Flemish del péptido βA_{1-42} humano (Bachem, Philadelphia, USA). Se llevó a cabo el protocolo de inmunización descrito anteriormente (ver obtención de anticuerpos específicos contra el péptido βA_{8-42} pág. 29).

3. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- βA_{1-42} DUTCH y ANTI βA_{1-42} FLEMISH:

Después de la cuarta inmunización (sexta semana) se extrajo sangre por punción del plexo retro ocular de los ratones inmunizados con el fin de evaluar por ELISA la presencia de anticuerpos anti- βA específicos en el suero.



En una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se inmovilizó el péptido preagregado βA_{1-42} FLEMISH (Bachem, Philadelphia, USA) o el péptido preagregado βA_{1-42} DUTCH (Bachem, Philadelphia, USA), ambos en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en buffer de carbonatos (0.1M Carbonato/bicarbonato pH 9.6) colocando 100 μl por poza y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la placa se lavó automáticamente (Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%), y se bloqueó con PBS (1x) - BSA 2% (200 $\mu\text{l}/\text{poza}$) por 1 hora a 37°C.

Después de lavar la placa se incubó con 100 μl por poza de los sueros de los ratones; anti-ADYUVANTE, anti- βA_{1-42} FLEMISH y anti- βA_{1-42} DUTCH en diluciones doble seriales de

1:200 a 1:12800, por 1 hora a 37°C y se lavó como se mencionó anteriormente.

La reactividad fue revelada añadiendo 100 µl/poza de una solución de un anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a la enzima peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar la placa, se incubó por 15 minutos a 37°C con 100 µl/poza de ABTS (Zymed, San Francisco CA, USA) y se tomó la lectura a 405 nm.

4. MAPEO DE EPÍTOPOS DE LOS SUEROS ESPECÍFICOS:

Para la identificación de epítopos o mimótopos de los péptidos βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH (Bachem, Philadelphia, USA) se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en fagos filamentosos M13 (*Phage Display Peptide Library Kit*, New England BioLabs, Hertfordshire, England).

El proceso de bioselección se llevó a cabo en tres rondas para un formato de fase sólida y se llevó a cabo independientemente para los sueros mutantes anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} FLEMISH. En cuatro pozas de una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se inmovilizó un anticuerpo monoclonal anti-IgG (cadena gamma) de ratón hecho en cabra a una concentración de 5 µg/ml en buffer de carbonatos (0.1M Carbonato/bicarbonato) durante una hora a 37°C.

Se lavaron las pozas de forma manual cinco veces con 200 µl/poza una solución de PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%). Posteriormente se bloqueó con PBS-BSA al 2% (200 µl/poza) por 1 hora a 37°C se lavó de igual manera.

Los sueros provenientes de los ratones inmunizados con los péptidos βA mutantes DUTCH y FLEMISH (Bachem, Philadelphia, USA) se diluyeron 1:400 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%). Se colocaron 100 µl/poza de las diluciones de los sueros y se incubó cada placa a 37°C por una hora.

Se preparó una solución de péptido βA_{1-16} a una concentración de 8 µg/ml en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%), después de lavar la placa se colocaron 100 µl/poza. La placa se dejó toda la noche a 4°C. Este procedimiento se hizo con el fin de evitar que aquellos anticuerpos específicos para la región inmunodominante del péptido βA seleccionaran fagos que expresaran la secuencia *EFRH*. La adición del péptido βA_{1-16} se

hizo exclusivamente para la primera ronda del panning con el suero anti βA_{1-42} DUTCH.

Después de lavar las pozas, se añadió la biblioteca, a una concentración de 10^{11} pfu/ml en PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%) y se incubó toda la noche a 4°C . Después de este tiempo la placa se dejó a temperatura ambiente durante treinta minutos y se lavaron las pozas cinco veces con PBS 1x -TWEEN 20 (0.2%) y dos veces con PBS 1x.

Finalmente se añadieron 100 μl /poza de buffer de glicina-HCl 0.2M a pH 2.2 y la placa se incubó inicialmente por diez minutos a 37°C y después otros diez minutos a temperatura ambiente para la elución de los fagos.

Se colectó en un solo tubo el contenido de las cuatro pozas (400 μl en total), y se neutralizó a pH 7.2 con 25 μl de TRIS-BASE 2M pH 9.0. El tubo con el eluido se guardó a 4°C , para posteriormente ser titulado y amplificado como se explicó anteriormente (protocolo en págs. 31-32).

4.1 PURIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES:

De la titulación del eluido de la tercera ronda de bioselección con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} FLEMISH, se recuperaron 21 clonas (placas) al azar que fueron amplificadas y tituladas para conocer la concentración de fagos obtenidos por mililitro de medio líquido 2YT; de esta manera se aseguró contar con la cantidad suficiente de fagos viables (10^{11} pfu/ml) para evaluar su reactividad y llevar a cabo el análisis de las secuencias (ver protocolo de purificación de clonas y obtención de ADN para secuenciación págs. 33-35)

4.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS:

Las secuencias de las clonas individuales obtenidas de la bioselección con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH se obtuvieron a través de la lectura manual de la placa; de esta manera se determinó la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los fagos seleccionados. Finalmente se evaluó la homología de las regiones de aminoácidos entre los insertos de los péptidos de las 21 clonas seleccionadas con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH y de las 21 clonas individuales seleccionadas con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH con la secuencia de los péptidos βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH respectivamente a través de la alineación de ambas secuencias para determinar si los insertos de estos péptidos

correspondían a epítomos lineales o mimótopos.

4.3 EVALUACIÓN DE LAS CLONAS POR ELISA:

Con el fin de evaluar la reactividad de las clonas obtenidas en los procesos de bioselección con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH, se llevó a cabo un Ensayo Inmunoenzimático para determinar si estas clonas fueron reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con los péptidos βA_{1-42} Wild Type y las formas mutadas βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH (Bachem, Philadelphia, USA). Se utilizó como suero control el suero de los ratones inmunizados con adyuvante de Freund.

Las clonas siguientes fueron utilizadas como controles: El control positivo fue la clona 5.8 cuya secuencia contiene los residuos EFRH, esta clona proviene de experimentos anteriores. Se utilizó como control negativo M13 silvestre.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 μ l/pozo de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-IgG (cadena gamma) de ratón hecho en cabra a una concentración de 5 μ g/ml en buffer de carbonatos y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de un ciclo (4X) de lavado automático (Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%), se bloqueó con una solución de PBS (1x) - BSA 2% (200 μ l/poza) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Se lavó la placa y se añadieron 100 μ l/pozo de los sueros de ratón inmunizados con diferentes formas del péptido beta amiloide; anti- $A\beta$ DUTCH, anti- $A\beta$ FLEMISH, anti- $A\beta$ WILD TYPE, y anti-ADYUVANTE, todos en dilución 1:400 en PBS(1x) – BSA(1%) – TWEEN 20 (0.1%) para el ELISA de las clonas anti-DUTCH y 1:800 en PBS(1x) – BSA(1%) – TWEEN 20 (0.1%) para el ELISA de las clonas anti-FLEMISH. Después de lavar, se agregaron por duplicado las 21 clonas seleccionadas a cada uno de los sueros, a una concentración de 10¹⁰ pfu/poza en 100 μ l de PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%) y se incubó toda la noche a 4°C.

Después de lavar se adicionaron 100 μ l/poza de una solución de suero contra M13 hecho en conejo a una dilución 1:3000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%) incubándose 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y la reactividad fué revelada con 100 μ l/poza de un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%), se utilizó ABTS como sustrato para la peroxidasa. La placa se

protegió de la luz directa y se incubó a 37°C por 15 min., se leyó a una densidad óptica de 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA).

5. OBTENCIÓN DE SUEROS CONTRA PÉPTIDOS EXPRESADOS EN FAGOS:

Con el propósito de obtener anticuerpos específicos contra mimótopos de los péptidos βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH (Bachem, Philadelphia, USA), se inmunizaron cuatro grupos de cinco ratones machos Balb/C Ann de 4-6 semanas con 7×10^{11} partículas de fago/ratón sin adyuvante de Freund, alternando inyecciones intraperitoneales y subcutáneas a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, y 75 días.

Tres grupos de ratones se inmunizaron con clonas provenientes de la bioselección con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH de la siguiente manera: El primer grupo fue inmunizado con la mezcla de las clonas positivas 2 y 5 (secuencia CFFGQCV), el segundo grupo con la mezcla de clonas con la secuencia EFRH (clonas 4, 6, 14, y 15), y el tercer grupo con las clonas negativas 10/20 (secuencia HAIYPRH). El cuarto grupo fue inmunizado con la clona 7 (secuencia EMRHYV) obtenida de la bioselección con el suero anti βA_{1-42} DUTCH (ver apéndice 3). Mediante un ensayo de ELISA se evaluó la reactividad de las clonas con los sueros anti βA_{1-42} FLEMISH y anti-ADYUVANTE.

Se sensibilizaron 24 pozas de una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 μ l/pozo de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-IgG (cadena gamma) de ratón hecho en cabra a una concentración de 3 μ g/ml en buffer de carbonatos, incubándose durante 1 hora a 37°C. Después de lavar se bloqueó con 200 μ l/poza de PBS (1x) - BSA 2% y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Posterior al lavado, se añadieron 100 μ l/pozo de los sueros de ratón anti- βA_{1-42} FLEMISH, y anti-ADYUVANTE, en dilución 1:800 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%). Se lavó y se agregaron las clonas seleccionadas a una concentración de 10^{11} pfu/poza en 100 μ l de PBS (1x) – BSA (0.1%) – TWEEN 20 (0.1%) a cada suero, se incubó toda la noche a 4°C. Como clonas control se utilizaron la clona positiva 5.8 (secuencia EFRH) referida anteriormente (ver pág. 39) y como control negativo a M13 silvestre.

Después de lavar se adicionaron 100 μ l/poza de una solución de suero contra M13 hecho en conejo a una dilución 1:2000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%) incubándose 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y la reactividad fué revelada con 100 μ l/poza de un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Horse Radish

Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%) se incubó a 37°C por una hora, se lavó nuevamente y se añadieron 100 µl/poza de ABTS como sustrato para la peroxidasa. La placa se protegió de la luz directa, se incubó a 37°C por 15 min., y se leyó a 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA).

5.1 EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA PÉPTIDOS EXPRESADOS EN FAGOS:

Para monitorear la respuesta de anticuerpos generada por la inmunización con los péptidos expresados en los fagos seleccionados, se extrajo sangre por punción del plexo retro ocular de los ratones después de la tercera, quinta y sexta inmunización (30, 60, y 75 días). Se llevó a cabo la titulación de los sueros mediante ELISA para evaluar la presencia de anticuerpos específicos. Se sensibilizaron dos placas de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark), utilizando 40 pozas para inmovilizar al péptido preagregado y βA_{1-42} FLEMISH (Bachem, Philadelphia, USA), 40 pozas para inmovilizar al péptido preagregado y βA_{1-42} Wild Type (Bachem, Philadelphia, USA), y 40 pozas para inmovilizar un péptido no relacionado todos en una concentración de 1µg/ml en buffer de carbonatos a pH 9.6 (0.1M Carbonato/bicarbonato) colocando 100 µl por poza. La placa sensibilizada se dejó toda la noche a 4°C.

Después de lavar la placa de manera automática (Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS (1x) - TWEEN 20 (0.2%), se bloqueó con PBS (1x) - BSA 2% (200 µl/poza) por 1 hora a 37°C. La placa se lavó y se incubó con 100 µl por poza de los sueros de los ratones inmunizados: anti-clonas 2/5(CFFGQCV), anti-mix clonas EFRH (4, 6, 14, y 15), anti-clonas 10/20 (HAIYPRH), anti-clona 7(LEMRHYV), anti- βA_{1-42} (suero control positivo), y anti-adyuvante de Freund (suero control negativo) diluidos 1:100 en PBS 1X/ BSA 1%/TWEEN₂₀ 0.1% por 1 hora a 37°C y se lavó como se mencionó anteriormente. La reactividad fue revelada con 100 µl/poza de suero de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS (1x) – BSA (1%) – TWEEN 20 (0.1%). Después de lavar la placa se desarrolló la reacción con 100 µl/poza de sustrato para la peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco CA, USA). La placa se incubó por 15 minutos protegiéndose de la luz directa y finalmente se tomó la lectura con un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA) a 405 nm.

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA βA_{8-42} :

Con el propósito de identificar epítomos distintos a la región inmunodominante del péptido completo βA_{1-42} y evaluar la especificidad de anticuerpos contra estos epítomos, se inmunizaron ratones con la especie amino truncada βA_{8-42} con el fin de realizar una bioselección esperando identificar otras regiones inmunogénicas en otras formas del péptido βA .

Posterior a la quinta inmunización se obtuvo sangre de los animales y se evaluó la reactividad por ELISA de los sueros de cada uno de los ratones a tres diluciones seriales 1:100, 1:200, y 1:400 con los péptidos en placa βA_{1-16} , βA_{1-42} , βA_{8-42} , y con un péptido no relacionado cuya secuencia de aminoácidos es **AALSPGSSAYPSATVLA**, utilizando como suero control anti- βA_{1-42} . Los sueros de los dos ratones inmunizados con el adyuvante de Freund se mezclaron y se hizo un pool de suero anti-adyuvante.

En la figura 7 se muestra que el suero de los ratones inmunizados fue específico contra el péptido βA_{8-42} .

EVALUACION DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA βA_{8-42}

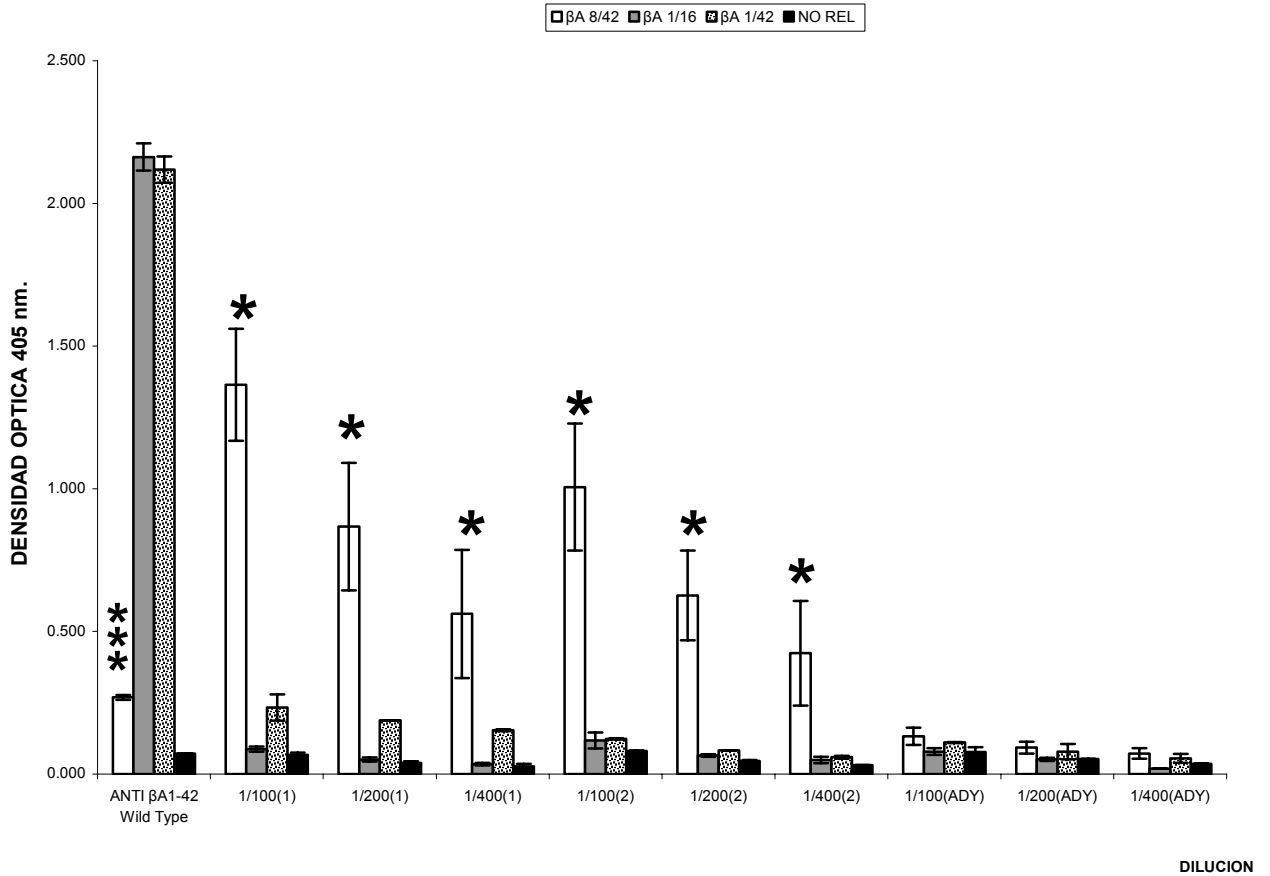


FIGURA 7. Reactividad por ELISA de los sueros de los ratones inmunizados con péptido βA_{8-42} . a diluciones seriales de 1:100, 1:200, y 1:400. Los sueros fueron evaluados con los péptidos βA_{1-16} , βA_{1-42} , βA_{8-42} , y no relacionado en placa utilizando suero anti- βA_{1-42} como suero control. El primer bloque de resultados corresponde al suero del ratón 1, el segundo bloque al suero del ratón 2 y el tercer bloque a la mezcla de sueros de los dos ratones inmunizados con adyuvante de Freund (pool de adyuvantes). Las barras marcadas con un asterisco (*) indican la reactividad de los sueros inmunes con el péptido βA_{8-42} para las tres diluciones. La barra con tres asteriscos muestra la baja reactividad del suero anti- βA_{1-42} con el péptido βA_{8-42} en placa.

2. IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS/MIMÓTOPOS DEL PÉPTIDO βA_{8-42} POR BIOSELECCIÓN:

En la tabla 1 se muestra la eficiencia por cada una de las rondas e bioselección reflejada en el aumento de los valores del título (pfu/ml) de los eluidos de cada ronda. Los valores de entrada corresponden al título de los amplificadores (pfu totales) utilizados para la bioselección.

TABLA 1. Título de fagos (clonas) por ronda de selección con el suero anti- βA_{8-42} .

RONDA	ENTRADA (*pfu/ml)	SALIDA^a (*pfu/ml)
1	10^{11}	3.4×10^4
2	4×10^{12}	2.8×10^7
3	7×10^{11}	1×10^{10}

^a El incremento en los valores de salida reflejan la eficiencia de la bioselección por ronda y el incremento en la cantidad de clonas específicas.

* pfu Unidades formadoras de placas (de sus siglas en inglés “*plaque forming units*”).

2.1 TÍTULO DE CLONAS OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCIÓN CON SUERO ANTI- βA_{8-42} :

Se seleccionaron aleatoriamente 21 clonas individuales de la tercera ronda de bioselección, las cuales se amplificaron y titularon (ver tabla 2).

Tabla 2. Título y reactividad a 405 nm de las 21 clonas individuales seleccionadas al azar de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- βA_{8-42} después de ser amplificadas.

CLONA	DENSIDAD OPTICA 405 nm^{a,b}	TITULO (*pfu/ml)
M13	0.004	1×10^{14}
C1	0.141	8×10^{11}
C2	0.021	2.3×10^{10}
C3	0.071	4.8×10^{11}
C4	0.009	2×10^{10}
C5	0.001	9.5×10^8
C6	0.000	2×10^9
C7	0.001	1×10^{12}
C8	0.026	6×10^{11}
C9	0.057	4.4×10^{10}
C10	0.001	5.5×10^{11}
C11	0.003	3.4×10^{11}
C12	0.001	2.7×10^9
C13	0.008	4×10^{11}
C14	0.009	7.3×10^{11}
C15	0.018	8×10^{11}
C16	0.127	4×10^{12}
C17	0.026	4×10^{11}
C18	0.020	1×10^{10}
C19	0.006	1.3×10^{12}
C20	0.001	3×10^{10}
C21	0.004	8.4×10^{11}

a, b Los valores mostrados de densidad óptica son representativos de dos experimentos independientes y corresponden a la diferencia entre la densidad óptica de las clonas evaluadas con el péptido βA_{8-42} y con el suero anti-ADYUVANTE. Se utilizó M13 como control negativo.

* pfu Unidades formadoras de placas.

2. 2 EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES CON EL SUERO ANTI- βA_{8-42} :

Se llevó a cabo un ensayo de ELISA para analizar la reactividad de las 21 clonas individuales seleccionadas contra el péptido βA_{8-42} .

De las 21 clonas seleccionadas únicamente 5 de las clonas resultaron positivas al suero anti- βA_{8-42} . Estas clonas fueron C1, C3/10, C8, C16 y C21. De las 21 clonas obtenidas se encontraron 14 clonas negativas (C2, C4, C5, C6, C7, C9, C11, C12, C13, C15, C17, C18, C19 y C20 (ver tabla 3).

2. 3 DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS CLONAS ANTI- $\beta_{A_{8-42}}$:

En la tabla 3 se indican las secuencias de las 21 clonas individuales, la frecuencia de éstas y los valores de densidad óptica a 405 nm presentada por las clonas al ser evaluadas mediante ELISA con el suero anti- $\beta_{A_{8-42}}$.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos, frecuencia y reactividad en ELISA de las 21 clonas seleccionadas al azar de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- $\beta_{A_{8-42}}$.

CLONA	SECUENCIA	FRECUENCIA	DENSIDAD OPTICA (405 nm.) ^{a,b,c}
M13			0,040
1	<i>SGYEAHQSRMSH</i>	1	1,331 (+)
2	<i>FHENWSTRPTTR</i>	1	0,009 (-)
3,10	<i>SGFELHNSARMK</i>	2	1,460 (+)
4	<i>MEVYNNPTPLR</i>	1	0,078 (-)
5	<i>FHEMWPTAATLR</i>	1	0,010 (-)
6	<i>FHDLWPTPASTI</i>	1	0,025 (-)
7	<i>FHDDWPMPLELP</i>	1	0,007 (-)
8	<i>SGFERFRAHLQS</i>	1	1,275 (+)
9	<i>FHENWLR---</i>	1	0,010 (-)
11	<i>CVHGIHYRAugaRG</i>	1	0,010 (-)
12	<i>FHENWLRG---</i>	1	0,009 (-)
13	<i>SHLSLPPYQPTF</i>	1	0,101 (-)
14	<i>SGLEVQTGWLYG</i>	1	0,905 (-)
15	<i>FHENWPSGG</i>	1	0,058 (-)
16	<i>SGYEVHNNPRIQ</i>	1	1,553 (+)
17	<i>FHEMWYASTLRuga</i>	1	0,137 (-)
18,20	<i>FHDAWPMPLELP</i>	2	0,011 (-)
19	<i>KPNPETYYFPVT</i>	1	0,021 (-)
21	<i>SGMEVHLGRWSW</i>	1	1,190 (+)

a, b El valor de densidad óptica corresponde a la diferencia entre la densidad óptica de las clonas con el suero experimental menos el valor de las clonas reportado con el suero anti-ADYUVANTE. M13 fue utilizado como control negativo.

c (+) clona positiva, (-) clona negativa.

La figura 8 muestra que las secuencias de las clonas positivas (5/21) se caracterizan por la presencia de los aminoácidos Serina (S), Glicina (G), ácido glutámico (E), e Histidina (H) que forman el motivo **SGY (F, M, L) EV (A, L, R) H (F, Q)**. Las clonas 8 y 14 no poseen Histidina, en su lugar se encuentran los aminoácidos Arginina (R) y Glutamina (Q), respectivamente. La secuencia de clonas que resultaron negativas (C4, C5, C6, C7, C11, C12, C13, C18, C19, y C20) comparten los aminoácidos Fenilalanina (F), Histidina (H), Acido glutámico o Acido aspártico (E/D), Triptófano (W), y Prolina (P) exhibiendo la secuencia consenso **FHE (D) N (L, M, P) WS (L, P, Y)** que en estudios realizados anteriormente en el laboratorio, se ha encontrado en clonas inespecíficas. Esta secuencia fue encontrada en las clonas inespecíficas con el suero anti βA_{8-42} : C2, C9, C14, C15, y C17 (ver figura 8).

En un estudio paralelo, se observó que los anticuerpos de ratón anti- βA_{8-42} se unen preferentemente a βA_{8-42} y no se unen o lo hacen en menor proporción a los péptidos βA_{1-42} , βA_{1-16} , βA_{12-28} , y βA_{17-42} . Sin embargo, el péptido completo βA_{1-42} puede inhibir la unión de los anticuerpos al péptido amino truncado βA_{8-42} .

REACTIVIDAD DE CLONAS OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCIÓN CON EL SUERO ANTI- β A₈₋₄₂

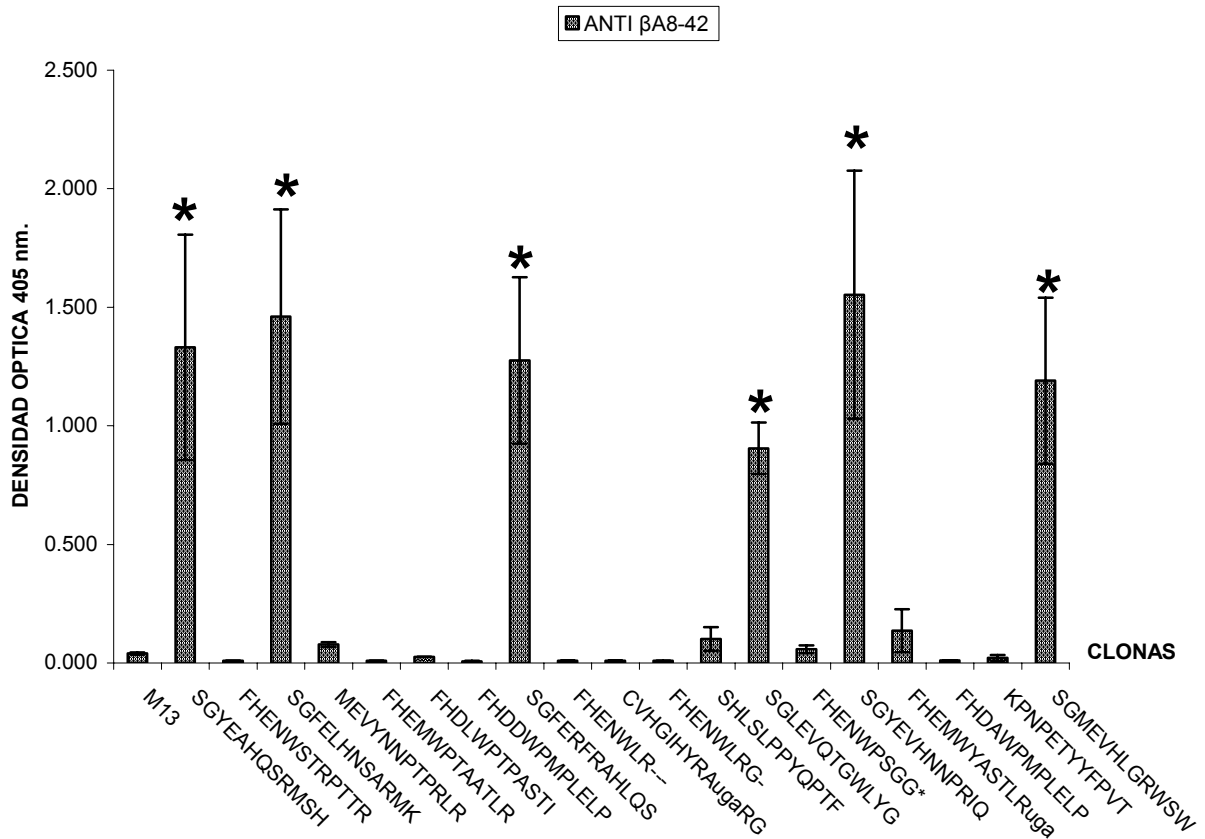


FIGURA 8. Reactividad por ELISA y secuencia de las clonas obtenidas de la tercera ronda de bioselección con el suero del ratón 1, inmunizado con el péptido truncado β A₈₋₄₂. La reactividad se evaluó a 405 nm con el suero problema anti- β A₈₋₄₂, y con el suero anti-ADYUVANTE (suero control). Se utilizó como control negativo de clonas a M13 silvestre y no se utilizó control positivo, por no contar con una clona obtenida y evaluada anteriormente. Con un asterisco (*) se indican aquellas clonas positivas al suero anti- β A₈₋₄₂: **SGYEAHQSRMSH**, **SGFELHNSARMK**, **SGFERFRAHLQS**, **SGYEVHNNPRIQ**, **SGLEVQTGWLYG** y **SGMEVHLGRWSW**.

2.4 ALINEACIÓN DE SECUENCIAS DE LAS CLONAS ANTI- βA_{8-42} CON EL PÉPTIDO NATIVO βA_{1-42} :

Una vez determinadas las secuencias de los insertos de las 21 clonas individuales, éstas se alinearon con la secuencia del péptido βA_{8-42} nativo para evaluar su homología (ver tabla 5).

TABLA 5. Alineación de las secuencias de las clonas positivas anti- βA_{8-42} de acuerdo a su similitud con la secuencia del péptido βA_{8-42}

βA_{8-42}	<u>S</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u>
1	<u>S</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>H</u>
3,10	<u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>K</u>
8	<u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u>
16	* <u>S</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>Q</u>
21	<u>S</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>W</u>

Por primera vez, a través de este estudio se identificó que las clonas positivas con el suero anti βA_{8-42} son similares a la región inicial del péptido βA nativo, comprendida entre los residuos 1 a 6 del péptido βA_{8-42} y a los residuos 8-13 del péptido completo βA_{1-42} . Estos resultados no se habían reportado anteriormente.

2.5 EVALUACIÓN DE CLONAS ESPECÍFICAS CON SUEROS CONTRA DOS FORMAS DE β A: EL PÉPTIDO WILD TYPE β A₁₋₄₂ Y EL PÉPTIDO TRUNCADO β A₈₋₄₂:

Debido a que las secuencias de las clonas positivas C1, C8, C3/10, C16 y C21 resultaron ser similares a la secuencia de inicio del péptido truncado β A₈₋₄₂, se decidió evaluar la reactividad de estas clonas con el suero de ratones inmunizados con el péptido completo β A₁₋₄₂, para determinar si los anticuerpos presentes en este suero reconocerían secuencias diferentes a EFRH.

Las clonas C1, C8, C10, C16 y C21 fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero anti β A₈₋₄₂ y no fueron reconocidas por anticuerpos policlonales del suero anti β A₁₋₄₂, aún cuando la secuencia de estos mimótopos se encuentra incluida en la región 8 a 13 de la secuencia del péptido nativo β A₁₋₄₂. Además se comprobó la reactividad negativa de la clona C19 y la inespecificidad de la clona C2 (ver figura 9).

REACTIVIDAD DE CLONAS POSITIVAS OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCION CON EL SUERO ANTI- β A₈₋₄₂

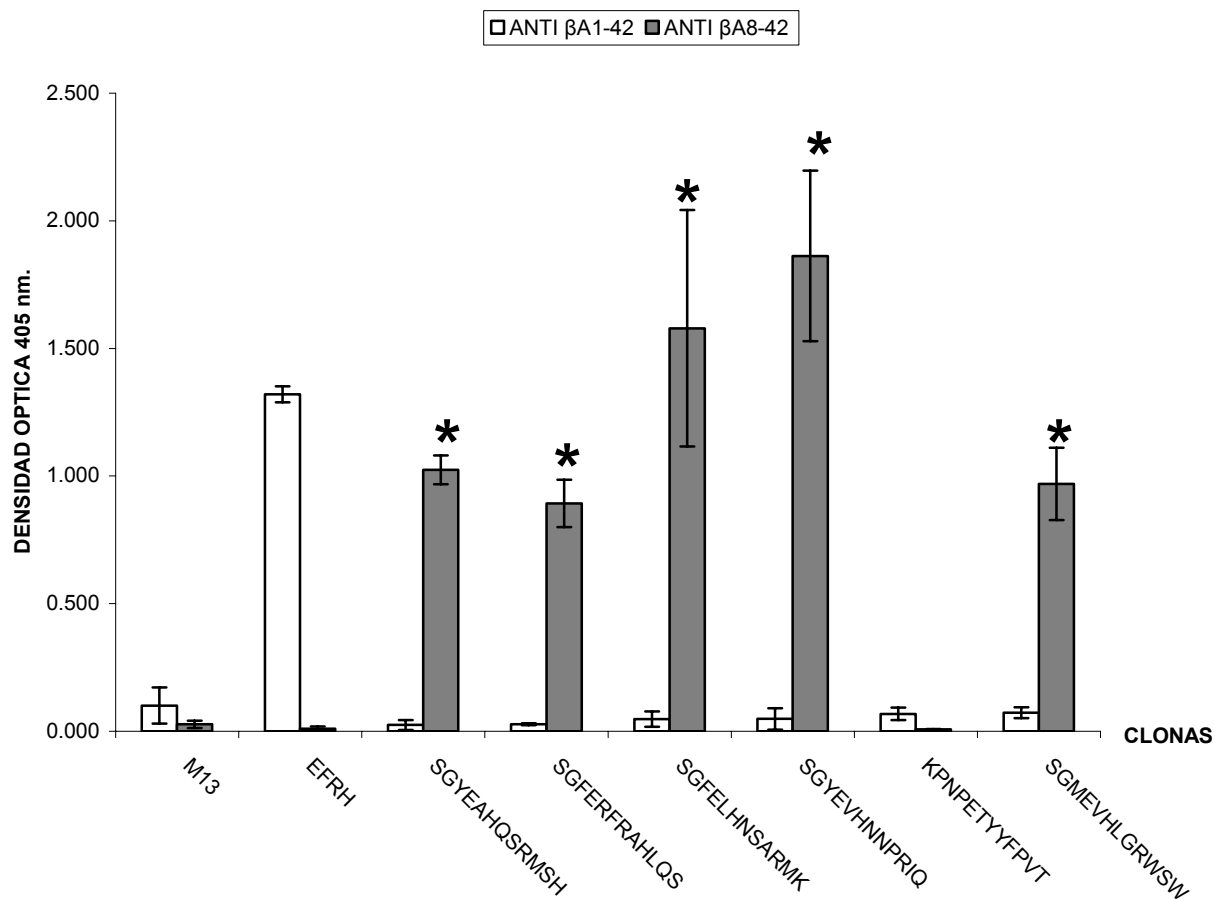


FIGURA 9. Reactividad por ELISA de las clonas positivas obtenidas de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- β A₈₋₄₂. La reactividad se evaluó a 405 nm con los sueros anti- β A₁₋₄₂, anti- β A₈₋₄₂, y anti-ADYUVANTE (suero control). Se utilizó como control positivo una mezcla de clonas que contienen EFRH, correspondiente a la región inmunodominante amino terminal del péptido nativo β A₁₋₄₂, como control negativo se utilizó al fago M13. Las barras marcadas con un asterisco (*) muestran las clonas que fueron reconocidas específicamente con el suero anti- β A₈₋₄₂.

3. TITULACIÓN DE SUEROS ANTI- βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH:

Con el propósito de obtener anticuerpos policlonales contra dos de las variantes del péptido βA_{1-42} : FLEMISH (A21G) y DUTCH (E22Q), se inmunizaron dos grupos de ratones machos Balb/C Ann con 30 μ g de péptido/ratón a intervalos de 0, 2, 4, y 6 semanas por vía subcutánea. Posterior a la cuarta inmunización se obtuvo el suero de los ratones y se evaluó la presencia de anticuerpos específicos mediante un inmunoensayo utilizando como control negativo al suero anti-ADYUVANTE.

Los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH, anti- βA_{1-42} FLEMISH, así como el suero anti-ADYUVANTE se diluyeron a siete diluciones doble seriales: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, y 1:12800, evaluándose con los péptidos βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH como antígenos en placa.

En la figura 10 se muestra la titulación de los sueros experimentales con el péptido βA_{1-42} DUTCH y en la figura 11 la titulación de los sueros experimentales con el péptido βA_{1-42} FLEMISH.

La evaluación de los sueros antimutantes por ELISA indicó una diferencia de entre 0.2 y 0.4 unidades de densidad óptica (DO) con respecto al suero control (anti-ADYUVANTE) para las diluciones de 1:6400 para la mutación DUTCH (ver figura 10) y 1:12800 para la mutación FLEMISH, lo cual demuestra la presencia de anticuerpos contra estas dos formas del péptido βA (ver figura 11).

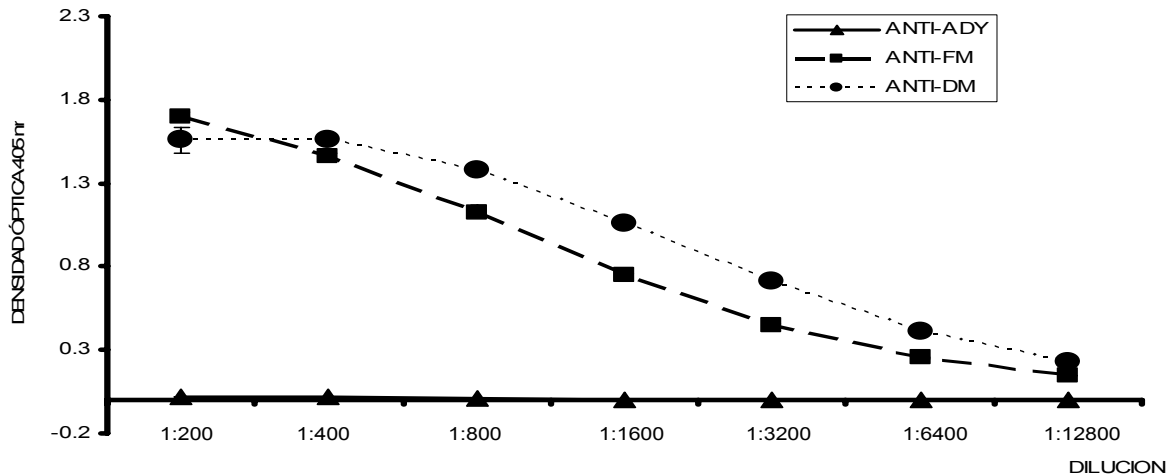


FIGURA 10. Titulación de sueros anti-βA DUTCH y anti-βA FLEMISH a siete diluciones doble seriales por ELISA, utilizando como antígeno en la placa el péptido preagregado βA DUTCH (1 μl/ml en 100 μl por poza de Buffer de carbonatos 0.1M a pH 9.6). Se utilizó el suero anti-ADYUVANTE como suero control. La lectura se hizo a una densidad óptica de 405 nm.

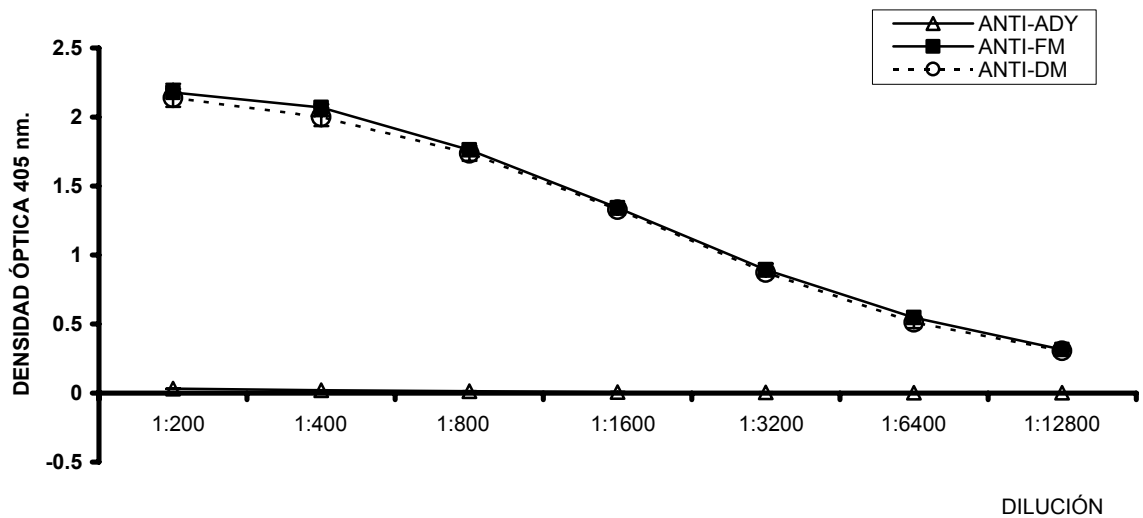


FIGURA 11. Titulación de sueros anti-βA DUTCH y anti-βA FLEMISH a siete diluciones doble seriales por ELISA, utilizando como antígeno en la placa el péptido preagregado βA FLEMISH (1 μl/ml en 100 μl por poza de Buffer de carbonatos 0.1M a pH 9.6). Se utilizó el suero anti-ADYUVANTE como suero control. La lectura se hizo a una densidad óptica de 405 nm.

4. IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DEL PÉPTIDO βA_{1-42} DUTCH:

Para la identificación de epítomos del péptido βA_{1-42} DUTCH se realizaron tres rondas de bioselección con una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en fagos filamentosos M13 (*Phage Display Peptide Library Kit, New England BioLabs, Hertfordshire, England*), y el suero policlonal de ratón anti- βA_{1-42} DUTCH diluido 1:400 e inmovilizado en la placa.

Con el fin de evitar que aquellos anticuerpos específicos para la región inmunodominante del péptido βA seleccionaran fagos que expresaran la secuencia *EFRH*, se añadió en la primera ronda una solución de péptido βA_{1-16} al suero anti- βA_{1-42} DUTCH antes de añadir la biblioteca comercial. Al final de cada ronda de bioselección se cuantificaron los fagos amplificados y eluidos, obteniéndose los siguientes títulos (ver tabla 6):

TABLA 6. Título de fagos (clonas) por ronda de selección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH.

RONDA	ENTRADÁ ^a (*pfu/ml)	SALIDÁ ^b (*pfu/ml)
1	2×10^{12}	1×10^3
2	2×10^{12}	1.4×10^6
3	1×10^{12}	8×10^7

^a Los valores de entrada corresponden al título de los amplificados utilizados para la bioselección.

^b Los valores de salida corresponden al título de los eluidos obtenidos en cada una de las rondas.

* pfu Unidades formadoras de placas (de sus siglas en inglés “*plaque forming units*”).

Los valores de salida, es decir el título de fagos eluidos, se incrementó en cada ronda de bioselección, lo que indica el incremento en la cantidad de clonas específicas, reflejo de la eficiencia en la bioselección por ronda.

4.1 REACTIVIDAD Y SECUENCIA DE CLONAS INDIVIDUALES:

De la tercera ronda del proceso de bioselección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH se seleccionaron al azar 21 clonas individuales que se amplificaron, y titularon (ver tabla 7). Posteriormente, se secuenciaron y se llevó a cabo un ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de estas clonas y determinar si fueron reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con los péptidos βA_{1-42} silvestre, y las formas mutadas βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH (Bachem, Philadelphia, USA).

Tabla 7. Secuencia de aminoácidos, frecuencia y reactividad en ELISA de las 21 clonas individuales obtenidas de la tercera ronda de selección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH seleccionadas al azar y amplificadas.

CLONA/ SECUENCIA	FRECUENCIA	ANTI βA_{1-42} DUTCH ^a (D.O. 405 nm)	ANTI βA_{1-42} FLEMISH ^b (D.O. 405 nm)	ANTI βA_{1-42} Wild Type ^c (D.O. 405 nm)
EFRH		0,792	0,858	0,838
M13		0,199	0,124	0,037
C1,2,8,15,19 LEFRHST	5	1,078	1,047	1,180
C3 WRFRHST	1	0,849	1,247	1,045
C4,5 NLLEFRH	2	1,134	1,018	1,144
C6,11,12,13,16,17,18,20,21 TEFRHYT	9	1,110	1,048	1,162
C7 IEMRHYV	1	0,471	0,200	1,005
C9,14 QEFRHSL	2	1,097	1,054	1,165
C10 SNLEFRH	1	0,765	0,805	0,960

^{a,b,c} Los valores de densidad óptica mostrados son el resultado de la diferencia entre los valores de D.O de las clonas con los sueros anti βA_{1-42} DUTCH, anti βA_{1-42} FLEMISH, anti βA_{1-42} Wild Type y los valores de estas con el suero anti-ADYUVANTE (suero control). Se utilizó M13 como clona control negativa, y como control positivo a la clona 5.8 que expresa la secuencia EFRH amino terminal de βA_{1-42} .

En la figura 12 se observa que 20 de las 21 clonas fueron reactivas con los sueros anti- βA_{1-42} Wild Type, anti- βA_{1-42} DUTCH, y anti- βA_{1-42} FLEMISH. Los valores de densidad óptica de la clona 7 (ver tabla 7) con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH (0.471), anti- βA_{1-42} FLEMISH (0.2), y anti- βA_{1-42} Wild Type (1.005) en relación con los valores de densidad óptica del fago M13 (no contiene inserto) con los mismos sueros (0.199 con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH, 0.124 con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH, y 0.037 con el suero anti- βA_{1-42} Wild Type), indican que la reactividad de la clona 7 (**IEMRHYV**) fue negativa con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH y positiva con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} Wild Type.

Los valores de densidad óptica (DO) registrados para las 20 clonas restantes con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH oscilan en un rango entre 0.765 y 1.134. Para el suero anti- βA_{1-42} Wild Type, los valores de DO oscilan entre 0.960 y 1.180 (ver tabla 7). Al comparar estos valores con los reportados para la clona 7 (0.471 con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH, 1.005 con el suero anti- βA_{1-42} Wild Type y 0.2 con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH) se observa que la reactividad de C7 fue menor que las veinte clonas restantes con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH.

4.2. SECUENCIAS DE CLONAS INDIVIDUALES

En las tablas 7 y 8 se muestran las secuencias de las 21 clonas individuales. Se observa que 18 de 21 clonas tienen la región inmunodominante de βA_{1-42} que contiene los residuos **EFRH**; la clona 3 (1/21) presenta el aminoácido Arginina (R) en lugar del Acido Glutámico (E) siendo su secuencia **RFRH**. La secuencia de la clona 7 (1/21) contiene los aminoácidos **EMRH**, el cambio de Fenilalanina por Metionina podría explicar su menor reactividad con respecto a las otras clonas con los sueros experimentales anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} Wild Type, así como su reactividad negativa con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH. La presencia de EFRH en las clonas seleccionadas comprueba la inmunogenicidad de la región amino terminal del péptido completo.

TABLA 8. Secuencia de aminoácidos de las 21 clonas seleccionadas posterior a la tercera ronda de bioselección con el suero anti- β A₁₋₄₂ DUTCH.

CLONAS	SECUENCIA^a
1,2,8,15,19	L E F R H S T
3	W R F R H S T
4,5	N L L E F R H
6,11,12,13,16,17,18,20,21	T E F R H Y T
7	<u>I E M R H Y V</u>
9,14	Q E F R H S L
10	S N L E F R H

^a La presencia del motivo EFRH fué característico en 19 de las 21 clonas seleccionadas.

EVALUACIÓN DE CLONAS OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE SELECCIÓN CON EL SUERO ANTI βA_{1-42} DUTCH

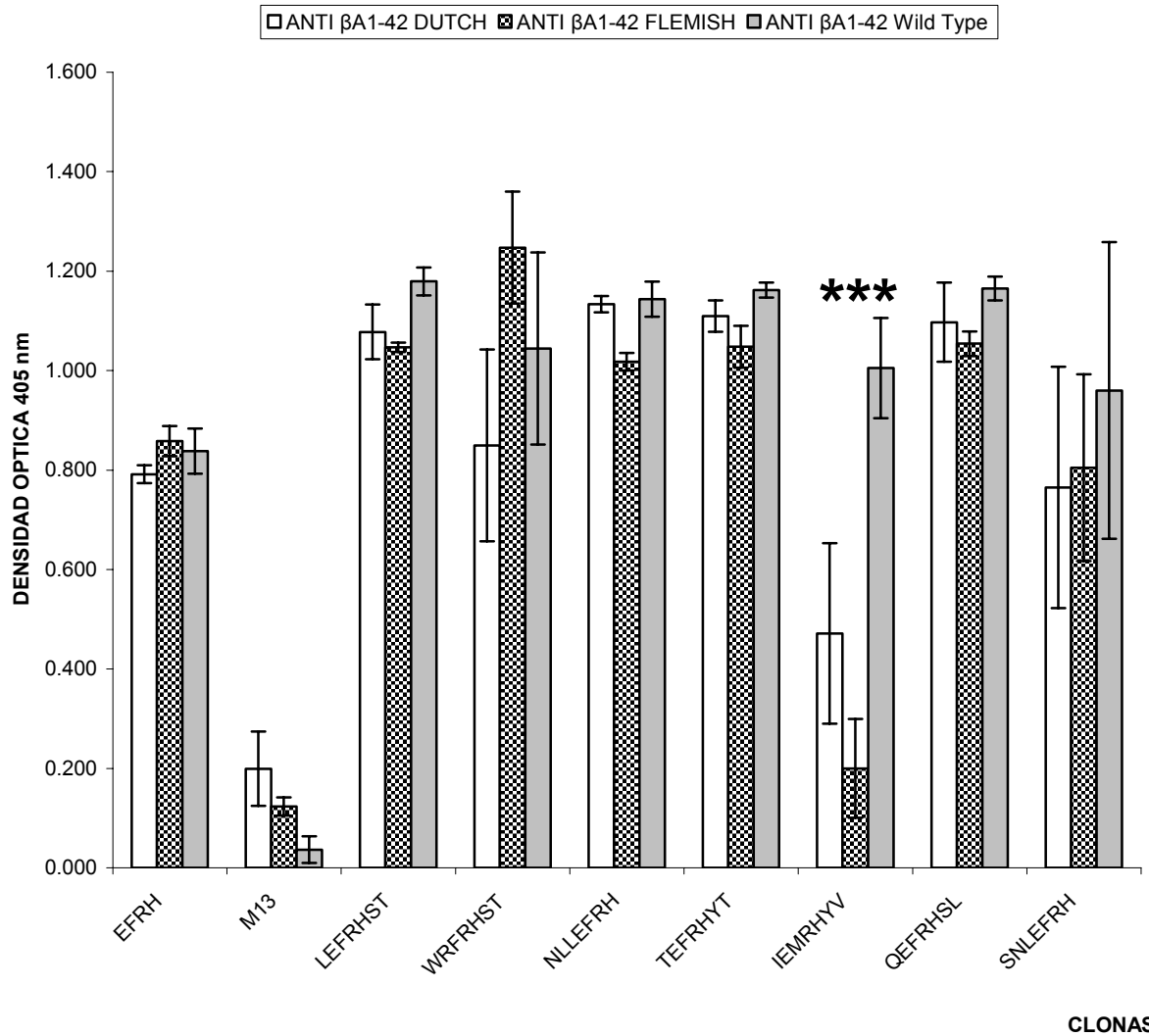


FIGURA 12. Reactividad por ELISA y secuencia de las clonas obtenidas de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH. La reactividad se evaluó a 405 nm con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH, anti- βA_{1-42} FLEMISH, y anti- βA_{1-42} WILD TYPE. Se utilizó como control positivo la clona 5.8 que expresa la secuencia EFRH correspondiente a la región inmunodominante amino terminal del péptido nativo βA_{1-42} , como control negativo se utilizó al fago M13. En la secuencia de la clona 7 señalada con tres asteriscos, se observa el cambio del aminoácido Fenilalanina por Metionina, lo que podría explicar su menor reactividad.

5. IDENTIFICACION DE EPÍTOPOS DEL PEPTIDO βA_{1-42} FLEMISH:

Para la identificación de epítomos del péptido βA_{1-42} FLEMISH se realizaron tres rondas de bioselección utilizando el suero anti-FLEMISH diluido 1:400 e inmovilizado en una placa de microtitulación, y una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados al azar en la proteína pIII de fagos filamentosos M13 (*Phage Display Peptide Library Kit, New England BioLabs, Hertfordshire, England*).

Aunque para la bioselección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH se añadió una solución de péptido βA_{1-16} al suero, se obtuvieron un porcentaje alto de clonas con la secuencia EFRH, razón por la cual no se utilizó dicho péptido en la primera ronda de bioselección con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH. Al final de cada ronda de bioselección se cuantificaron los fagos amplificados y eluidos, obteniéndose los siguientes títulos de salida (ver tabla 9):

TABLA 9. Título de fagos (clonas) por ronda de selección con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH.

RONDA	ENTRADA^a (*pfu/ml)	SALIDA^b (*pfu/ml)
1	10^{11}	3.8×10^3
2	2×10^{12}	1×10^7
3	2×10^{12}	9×10^8

^a Los valores de entrada corresponden al título de los amplificadores utilizados para la bioselección,

^b Los valores de salida corresponden al título de los eluidos obtenidos en cada una de las rondas.

* pfu Unidades formadoras de placas (de sus siglas en inglés “*plaque forming units*”).

El incremento en los valores de salida indica el incremento de la cantidad de clonas específicas, lo que demostró la eficiencia de la selección.

5.1 REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCIÓN CON EL SUERO ANTI- βA_{1-42} FLEMISH:

Después de llevar a cabo la tercera ronda de bioselección con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH, se seleccionaron 21 clonas individuales que fueron amplificadas, tituladas (ver tabla 9) y secuenciadas (ver tabla 10).

Se analizó por ELISA la reactividad de las 21 clonas utilizando sueros de ratones inmunizados con los péptidos βA_{1-42} Wild Type, y las formas mutadas βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH. Se utilizó el suero de los ratones inmunizados con adyuvante de Freund como suero control (ver figura 13).

Tabla 10. Secuencia, frecuencia y reactividad en ELISA de las 21 clonas individuales obtenidas de la tercera ronda de selección con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH y amplificadas.

CLONA/ SECUENCIA	FRECUENCIA	ANTI βA_{1-42} FLEMISH ^a (D.O. 405 nm)	ANTI βA_{1-42} DUTCH ^b (D.O. 405 nm)	ANTI βA_{1-42} Wild Type ^c (D.O. 405 nm)
M13		0,097	0,162	0,024
EFRH		0,805	0,751	1,644
	2			
C1,16 SLYIPFF		0,616	0,096	0,116
C2,5 CFFGQCV	2	0,996	0,108	0,123
C3 TEFRHQV	1	1,265	0,459	1,745
C4 QQTEFRH	1	0,709	0,361	1,659
C6 YEFRHSS	1	1,015	0,366	1,403
C7 QPFRHSL	1	0,685	0,080	0,802
C8 SLFRHTY	1	1,011	0,083	0,873
C9 QLFRHET	1	0,606	0,177	1,051
C10,20 HAIYPRH	2	0,013	0,011	0,003
C11 SLLDFF	1	0,454	0,065	0,075
	2			
C12,13 WGDLSFW		0,709	0,047	0,064
C14 QHNEFRH	1	0,378	0,335	1,368
C15 SYEFRHH	1	0,637	0,439	1,208
C17 SQFRHDS	1	0,525	0,078	0,556
C18 WGPLAFF	1	0,485	0,084	0,100
C19 SFFRHTV	1	1,184	0,177	1,056
C21 VPFRHDE	1	0,515	0,062	0,175

a, b, c Los resultados de densidad óptica mostrados fueron obtenidos de la resta de los valores de D.O. de las clonas evaluadas con los sueros anti βA_{1-42} FLEMISH, anti βA_{1-42} DUTCH, anti βA_{1-42} Wild Type y los valores de éstas con el suero anti ADYUVANTE (suero control). Se utilizó M13 como clona control negativa, y como control positivo a la clona 5.8 que expresa la secuencia EFRH amino terminal de βA_{1-42} .

5.2 SECUENCIAS DE LAS 21 CLONAS INDIVIDUALES OBTENIDAS DE LA BIOSELECCIÓN CON EL SUERO ANTI- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH:

Se purificó ADN de cadena sencilla y mediante un gel de agarosa 1% se verificó la presencia y calidad del ADN purificado. Las clonas se secuenciaron de acuerdo al método descrito anteriormente (págs. 33-35). La tabla 11 muestra la secuencia de 7 aminoácidos expresados en los insertos de cada clona.

TABLA 11. Secuencia de aminoácidos de las 21 clonas seleccionadas al azar de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH.

CLONA	SECUENCIA	CLONA	SECUENCIA
1,16	SLYIPFF	11	SLLDFF
2,5	CFFGQCV	12,13	WGDLSFW
3	TEFRHQV	14	QHNEFRH
4	QQTEFRH	15	SYEFRHH
6	YEFRHSS	17	SQFRHDS
7	QPFRHSL	18	WGPLAFF
8	SLFRHTY	19	SFFRHTV
9	QLFRHET	21	VPFRHDE
10,20	HAIYPRH		

En la figura 13 se observa que 5 de 21 clonas presentan reactividad únicamente con el suero anti- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH. Al determinar sus secuencias se observó que ninguna incluía el motivo **EFRH**, siendo sus secuencias **C1,16-SLYIPFF**, **C2,5-CFFGQCV**, **C11-SLLDFF**, **C12,13-WGDLSFW** y **C18-WGPLAFF** (ver tabla 11); es importante mencionar que estas clonas presentaron reactividad negativa con los sueros anti $\beta_{A_{1-42}}$ DUTCH y con el suero anti $\beta_{A_{1-42}}$ Wild Type.

Las clonas **C3-TEFRHQV**, **C4-QQTEFRH**, **C6-YEFRHSS**, **C15-SYEFRHH** presentaron reactividad positiva con los tres sueros anti $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH, anti $\beta_{A_{1-42}}$ DUTCH, y anti $\beta_{A_{1-42}}$ Wild Type. Algunas clonas: C7, C8, C9, C17, C19 y 21 resultaron positivas con los sueros anti- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH y anti- $\beta_{A_{1-42}}$ Wild Type, pero con moderada reactividad con el suero anti- $\beta_{A_{1-42}}$ DUTCH. Cabe mencionar que en las secuencias de estas clonas se encontró el cambio del aminoácido Acido Glutámico (E) por los residuos Fenilalanina (F), Glutamina(Q), Leucina (L), o Prolina (P) resultando la secuencia consenso **(P,L,Q,F)FRH**. Las secuencias de las clonas cuya reactividad fue positiva con el suero anti-DUTCH presentan **EFRH** (clonas

3, 4, 6, 14, y 15).

Las clonas **C10, 20-HAIYPRH** resultaron negativas con los tres sueros. La secuencia de las clonas negativas incluye al aminoácido Prolina (P) y no contiene el motivo **EFRH** (ver figura 13, tablas 10 y 11).

Según su reactividad con los sueros experimentales anti- βA_{1-42} DUTCH, anti- βA_{1-42} FLEMISH y anti- βA_{1-42} WILD TYPE, las clonas se distribuyeron en cuatro grupos. El *grupo 1* está integrado por clonas que fueron positivas (5/21) con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH: C1/16, C2/5, C11, C12/13 y C18; las secuencias de estas clonas no poseen el motivo **EFRH**. En el *grupo 2* se encuentran clonas (4/21) cuya reactividad fue alta con los sueros anti- βA_{1-42} FLEMISH y anti- βA_{1-42} WILD TYPE; las secuencias contienen el motivo **EFRH**: C3, C4, C6 y C15. En el *grupo 3* se incluyen las clonas C7, C8, C9, C17, C19 y C21 cuya reactividad con los sueros anti- βA_{1-42} WILD TYPE y anti- βA_{1-42} FLEMISH fue mayor que su reactividad con el suero βA_{1-42} DUTCH; la secuencia de estas clonas presenta el motivo **XFRH**. En el grupo 3 también se incluye la clona **C14-QHNEFRH**, la cual aunque contiene **EFRH** presentó una reactividad moderada con el suero anti- βA_{1-42} FLEMISH. Finalmente en el grupo 4 se colocaron las clonas negativas (1) 10 y 20 con secuencia **HAIYPRH**.

EVALUACIÓN DE CLONAS OBTENIDAS DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCIÓN CON EL SUERO ANTI $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH

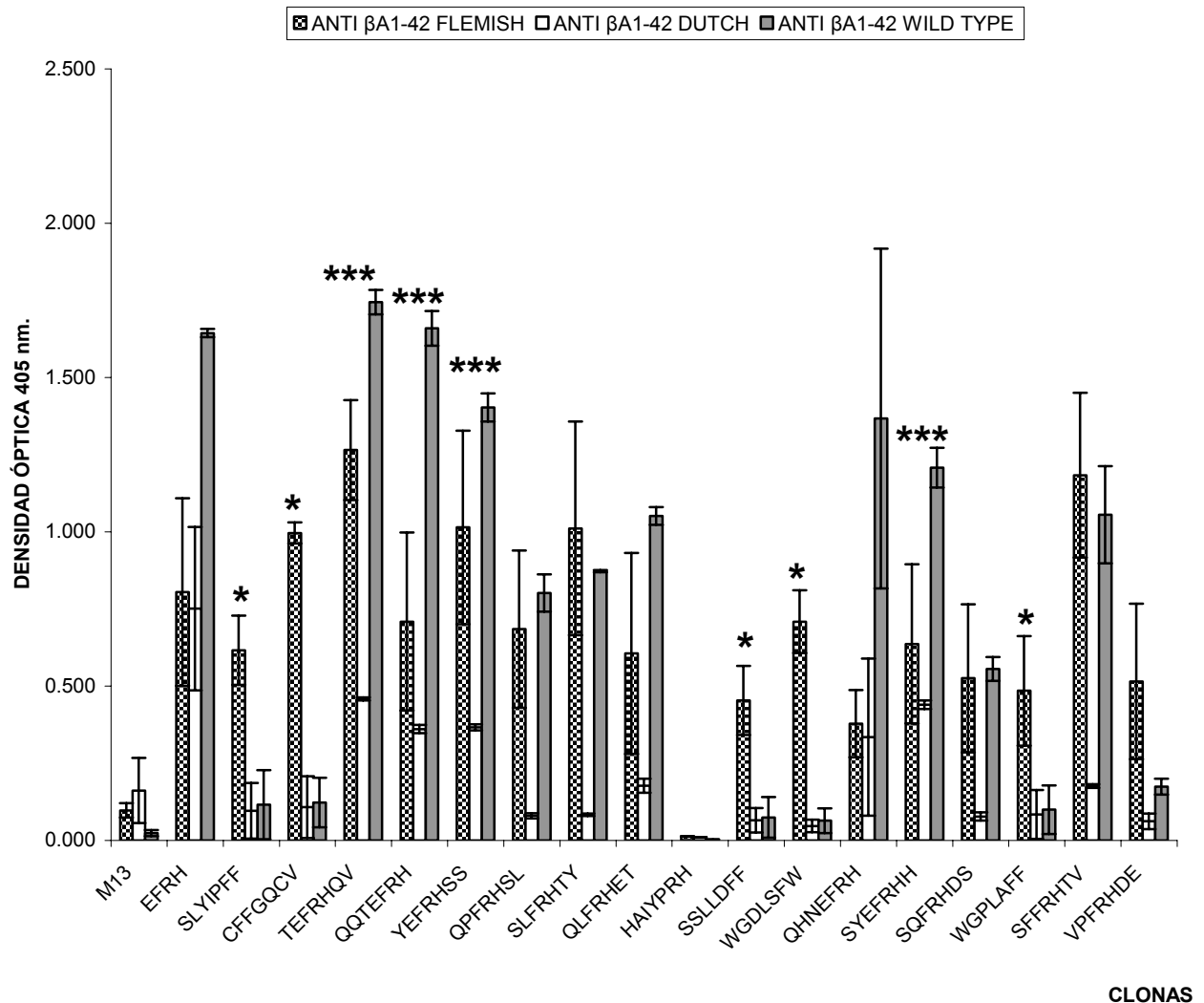


FIGURA 13. Reactividad por ELISA y secuencia de las clonas obtenidas de la tercera ronda de bioselección con el suero anti-FLEMISH. La reactividad se evaluó a 405 nm con los sueros anti- $\beta_{A_{1-42}}$ DUTCH, anti- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH, y anti- $\beta_{A_{1-42}}$ WILD TYPE. Con un asterisco (*) se indican aquellas clonas que fueron reactivas únicamente con el suero anti- $\beta_{A_{1-42}}$ FLEMISH y con tres asteriscos (***) las clonas reactivas con los tres sueros. Se utilizó como control positivo la clona 5.8 que expresa la secuencia EFRH correspondiente a la región inmunodominante amino terminal del péptido nativo $\beta_{A_{1-42}}$, como control negativo se utilizó al fago M13.

5.3. ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS ENTRE β A-FLEMISH₁₋₄₂ Y LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LOS INSERTOS DE LAS 21 CLONAS INDIVIDUALES:

Al alinear la secuencia de las 8 clonas positivas con la secuencia original del péptido β -amiloide variante FLEMISH, se encontraron similitudes en algunos aminoácidos de los insertos. En la tabla 12 se observa la homología que tienen estas clonas con la región central del péptido β A₁₋₄₂ FLEMISH, presentando aminoácidos similares **LV (D, A, S) FF (W)** en la región comprendida entre los residuos 17 a 21 y **FFG₂₁E (Q₂₂) D(C) V** en el epítipo lineal localizado entre los residuos 19-24 de este péptido.

TABLA 12. Alineación de las secuencias de las clonas positivas con la secuencia de aminoácidos correspondientes a la región central del péptido β A-FLEMISH₁₋₄₂ (residuos 14-24).

AB-FM	H	Q	K	L	V	F	F	G₂₁	E	D	V
C-1,16	S	L	Y	I	P	F	F				
C-2,5					C	F	F	G₂₁	Q	C	V
C-11	S	S	L	L	D	F	F				
C-18	W	G	P	L	A	F	F				
C-12,13	W	G	D	L	S	F	W				

Los residuos 17 a 20 de las clonas C11, C12/13, y C18 integran el motivo **LV (D, A, S) FF (W)**, que resultó ser una secuencia homóloga a péptidos con capacidad de romper estructuras β -plegadas reportadas por Soto et al., 1998 y 2000.

La secuencia de las clonas 2/5 presentó similitud con el péptido β A-FLEMISH₁₋₄₂ debido a que presenta al aminoácido mutado Glicina (G) en el residuo 21, presente en la secuencia del péptido mutado β A₁₋₄₂ FLEMISH. Cabe señalar también que al alinear la secuencia de estas clonas con la variante FLEMISH de β A₁₋₄₂, se encontró que el residuo E (Acido glutámico) en la posición 22 del péptido original se encuentra substituido por el aminoácido Glutamina (Q) presente en la variante β A₁₋₄₂ DUTCH. Lo que indica que en la secuencia de aminoácidos expresada en el inserto de las clonas 2 y 5 se encuentran las dos mutaciones de nuestro interés (DUTCH y FLEMISH).

6. EVALUACIÓN DE CLONAS PROVENIENTES DE LA TERCERA RONDA DE BIOSELECCIÓN CON LOS SUEROS ANTI- β A₁₋₄₂ FLEMISH Y ANTI- β A₁₋₄₂ DUTCH QUE FUERON SELECCIONADAS PARA INMUNIZACIÓN:

Debido a la similitud de algunas clonas provenientes de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH con la región central del péptido mutado β A FLEMISH₁₋₄₂, se decidió evaluar las propiedades inmunogénicas de sueros contra epítomos localizados en la región central. El mimótopo expresado por la clona C2/5 es muy importante, ya que en su secuencia **CFFG₂₁Q₂₂CV** se encuentran presentes las dos mutaciones de nuestro interés. Entonces la inmunización de ratones con esta molécula podría resultar en la obtención de un suero específico contra los dos péptidos mutados β A₁₋₄₂ DUTCH y β A₁₋₄₂ FLEMISH.

Para evaluar la inmunogenicidad de los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con la clona C2/5 mencionada anteriormente, se utilizaron las clonas C4, C6, C14, y C15 cuya secuencia contiene EFRH con el propósito de contar un suero positivo y las clonas negativas C10/20 cuya secuencia fue **HAIYPRH** para la obtención de suero negativo. También se consideró la clona **C7-EMRH** obtenida del panning con el suero anti- β A₁₋₄₂ DUTCH para la obtención de anticuerpos específicos contra el péptido mutado β A₁₋₄₂ DUTCH.

Antes de llevar a cabo la inmunización de los ratones machos Balb c/Ann, las clonas referidas anteriormente se amplificaron y titularon para tener un volumen suficiente para inyectar a los ratones. Posteriormente se comprobó su reactividad por ELISA para los sueros anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH y anti-ADYUVANTE, utilizando la clona 5.8 (EFRH) como control positivo y a M13 silvestre como control negativo.

En la figura 14 se muestra que la reactividad de la clona 2 fue alta y similar a la reactividad del control positivo (clona 5.8) y de la mezcla de clonas con secuencia EFRH (C4, C6, C14, y C15). La reactividad de la clona C7 proveniente del panning anti-DUTCH es menor que las anteriores y las clonas negativas 10/20 presentaron reactividad negativa con el suero experimental anti-FLEMISH.

EVALUACIÓN DE CLONAS PARA INMUNIZACIÓN

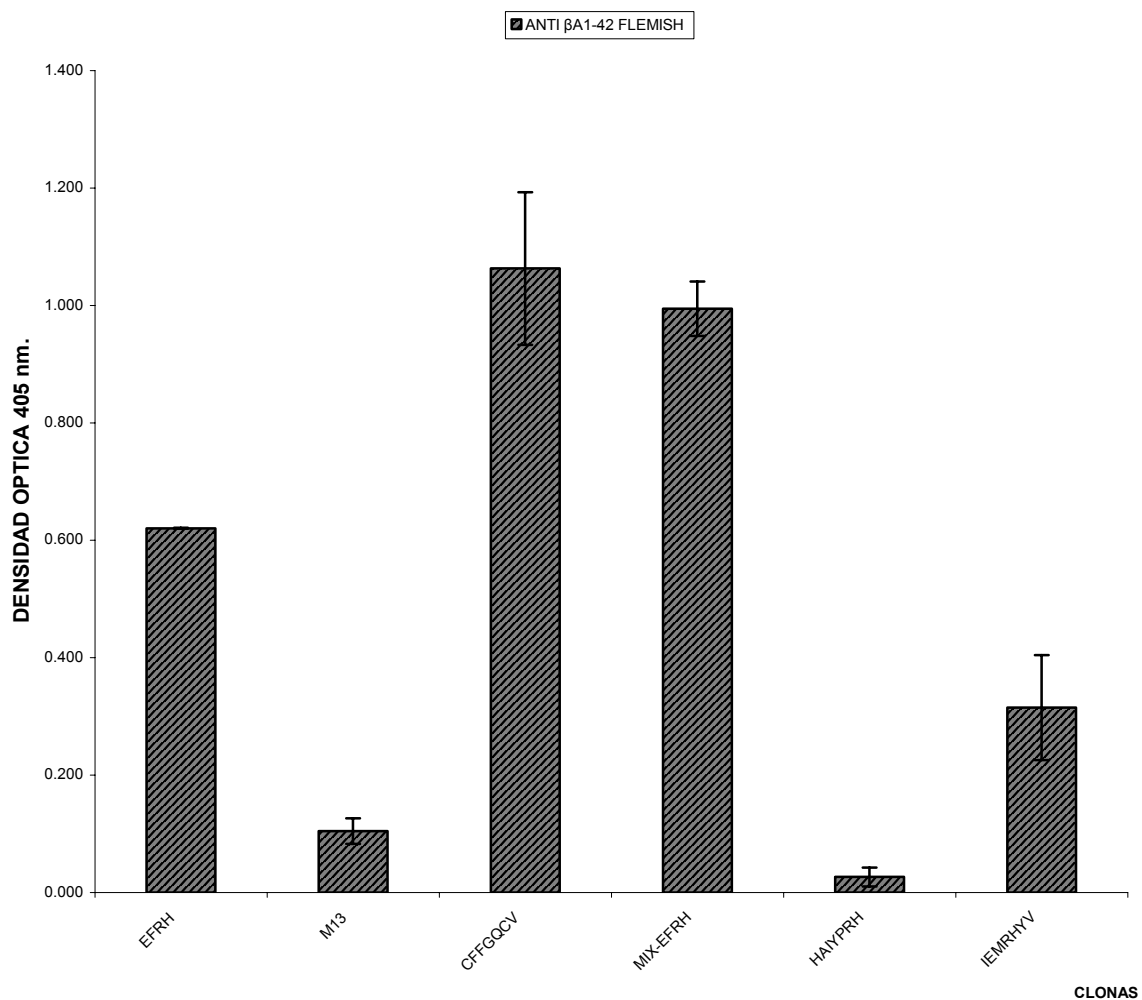


FIGURA 14. Reactividad por ELISA de las clonas seleccionadas para la inmunización de ratones Balb c/ANN ♂. Como control positivo se utilizó una clona que expresa EFRH (clona 5.8) y como control negativo M13. La reactividad de las clonas se evaluó con el suero anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH a 405 nm.

6.1 EVALUACIÓN DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON PÉPTIDOS EXPRESADOS EN FAGOS FILAMENTOSOS:

Una vez que se comprobó la reactividad de las clonas destinadas a la generación de anticuerpos específicos, se llevó a cabo la inmunización de 20 ratones machos Balb/C Ann, alternando inyecciones intraperitoneales y subcutáneas sin adyuvante de Freund a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, y 75 días.

El primer grupo se inmunizó con las clonas positivas 2/5 (secuencia *CFFGQCV*), el segundo grupo con la mezcla de clonas con la secuencia *EFRH* (clonas C4, C6, C14, y C15), y el tercer grupo con las clonas negativas 10/20 (secuencia *HAIYPRH*). El cuarto grupo fue inmunizado con la clona 7 obtenida de la tercera ronda de selección con el suero anti- βA_{1-42} DUTCH (secuencia *IEMRHYV*), con el fin de obtener suero específico para este mimótopo. Las clonas se administraron a una concentración de 7×10^{11} partículas de fago/ratón (ver apéndice 3).

Posterior a la tercera, quinta y sexta inmunización se extrajo sangre del plexo retro ocular de los ratones y se evaluaron los sueros por ELISA a una longitud de onda de 405 nm con los péptidos en placa βA FLEMISH₁₋₄₂, βA_{1-42} WILD TYPE, y un péptido no relacionado (secuencia *AALSPGSSAYPSATVLA*), utilizando como control positivo el suero anti βA_{1-42} WILD TYPE y como control negativo suero anti-ADYUVANTE.

Las tablas 13, 14, y 15 muestran los valores promedio de densidad óptica a 405 nm presentados por los sueros de los veinte ratones inmunizados con las clonas negativas y las clonas cuyos insertos expresan mimótopos del péptido βA FLEMISH₁₋₄₂ y del péptido βA DUTCH₁₋₄₂. En las figuras 15, 16, y 17 se observa que ninguno de los ratones inmunizados con los mimótopos de los péptidos βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH generó respuesta de anticuerpos.

Tabla 13. Reactividad en ELISA de los sueros de 20 ratones Balb/C (♂) inmunizados con clonas obtenidas de la bioselección con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} FLEMISH posterior a la tercera inmunización (2º boost).

CLONA UTILIZADA EN LA INMUNIZACIÓN	SECUENCIA DEL MIMÓTOPO O CLONA	No. ANIMAL ^a	βA_{1-42} FLEMISH ^b	βA_{1-42} WILD TYPE ^c	PEPTIDO NO REL. ^d	M13 ^e
C2-FM	CFFGQCV	1	0.13	0.09	0.05	2.29
		2	0.28	0.09	0.05	2.28
		3	0.08	0.07	0.05	2.25
		4	0.11	0.08	0.04	2.25
		5	0.20	0.09	0.06	2.26
	*PROMEDIO		0.16	0.08	0.05	2.27
CFM-4 6 14 15	QQTEFRH YEFRHSS	1	0.08	0.07	0.04	2.12
		2	0.10	0.10	0.06	2.14
	QHNEFRH	3	0.05	0.05	0.06	2.10
		4	0.06	0.06	0.05	2.17
	SYEFRHH	5	0.08	0.07	0.09	2.24
		*PROMEDIO		0.07	0.07	0.06
C10/20-FM	HAIYPRH	1	0.05	0.07	0.06	2.20
		2	0.09	0.08	0.09	2.26
		3	0.10	0.12	0.10	2.16
		4	0.31	0.06	0.06	2.16
		5	0.11	0.10	0.14	2.26
	*PROMEDIO		0.13	0.09	0.09	2.21
C7-DM	IEMRHYV	1	0.15	0.14	0.10	2.03
		2	0.12	0.09	0.07	1.99
		4	0.07	0.08	0.04	2.00
		5	0.15	0.13	0.09	1.93
	*PROMEDIO		0.12	0.11	0.07	1.99
ANTI βA_{1-42} WT			2.39	2.18	0.12	0.13
ANTI ADY			0.16	0.14	0.12	0.11

^a Suero de cada uno de los ratones inmunizados.

^{b, c, d} Estos sueros se evaluaron con los péptidos βA_{1-42} FLEMISH, βA_{1-42} WILD TYPE, y un péptido no relacionado de secuencia AALSPGSSAYPSATVLA. La reactividad se evaluó a 405 nm.

^e Se utilizó M13 silvestre como control positivo.

* La DO promedio de los sueros evaluados con cada péptido se comparó con la DO promedio obtenida de evaluar la especificidad de estos sueros con M13.

Tabla 14. Reactividad en ELISA de los sueros de 20 ratones Balb/C (♂) inmunizados con clonas obtenidas de la bioselección con los sueros anti- β A₁₋₄₂ DUTCH y anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH posterior a la quinta inmunización (4^o boost).

CLONA UTILIZADA EN LA INMUNIZACIÓN	SECUENCIA DEL MIMÓTOPO O CLONA	No. ANIMAL ^a	β A ₁₋₄₂ FLEMISH ^b	β A ₁₋₄₂ WILD TYPE ^c	PÉPTIDO NO REL. ^d	M13 ^e
C2-FM	CFFGQCV	1	0.12	0.11	0.05	2.16
		2	0.18	0.10	0.04	2.21
		3	0.07	0.08	0.04	2.12
		4	0.06	0.05	0.02	2.13
		5	0.19	0.12	0.06	2.17
	*PROMEDIO		0.12	0.09	0.04	2.16
CFM-4 6 14 15	QQTEFRH YEFRHSS	1	0.15	0.14	0.06	2.12
		2	0.05	0.08	0.05	2.04
	QHNEFRH	3	0.04	0.06	0.03	1.88
		4	0.08	0.10	0.04	2.08
	SYEFRHH	5	0.05	0.06	0.03	1.83
		*PROMEDIO		0.07	0.09	0.04
C10/20-FM	HAIYPRH	1	0.05	0.07	0.03	1.89
		2	0.07	0.12	0.05	1.85
		4	0.09	0.09	0.07	2.14
		5	0.11	0.13	0.10	1.98
	*PROMEDIO		0.08	0.10	0.06	1.97
C7-DM	IEMRHYV	1	0.05	0.07	0.03	1.69
		2	0.04	0.06	0.03	1.53
		4	0.04	0.08	0.04	2.03
		5	0.04	0.07	0.06	1.98
	*PROMEDIO		0.04	0.07	0.04	1.81
ANTI β A ₁₋₄₂ WT			1.86	1.75	0.03	0.03
ANTI ADY			0.03	0.05	0.03	0.03

^a Suero de cada uno de los ratones inmunizados.

^{b, c, d} Estos sueros se evaluaron con los péptidos β A FLEMISH₁₋₄₂, β A₁₋₄₂ WILD TYPE, y un péptido no relacionado de secuencia AALSPGSSAYPSATVLA. La reactividad se evaluó a 405 nm.

^e Se utilizó M13 silvestre como control positivo.

* La DO promedio de los sueros evaluados con cada péptido se comparó con la DO promedio obtenida de evaluar la especificidad de estos sueros con M13.

Tabla 15. Reactividad en ELISA de los sueros de 20 ratones Balb/C (♂) inmunizados con clonas obtenidas de la bioselección con los sueros anti- βA_{1-42} DUTCH y anti- βA_{1-42} FLEMISH posterior a la sexta inmunización (5° boost).

CLONA UTILIZADA EN LA INMUNIZACIÓN	SECUENCIA DEL MIMÓTOPO O CLONA	No. ANIMAL ^a	βA_{1-42} FLEMISH ^b	βA_{1-42} WILD TYPE ^c	PÉPTIDO NO REL. ^d	M13 ^e
C2-FM	CFFGQCV	1	0.40	0.30	0.16	2.27
		3	0.28	0.24	0.19	2.26
		4	0.38	0.23	0.18	2.29
		5	0.30	0.22	0.18	2.32
	*PROMEDIO		0.34	0.25	0.18	2.29
CFM-4 6 14 15	QQTEFRH YEFRHSS	1	0.37	0.19	0.17	2.29
		2	0.20	0.16	0.14	2.35
	QHNEFRH	3	0.19	0.17	0.13	2.30
		4	0.30	0.22	0.15	2.30
		5	0.28	0.23	0.18	2.25
	*PROMEDIO		0.27	0.19	0.16	2.30
C10/20-FM	HAIYPRH	1	0.27	0.27	0.19	2.34
		2	0.35	0.31	0.25	2.30
		4	0.26	0.20	0.29	2.31
		5	0.28	0.25	0.27	2.31
	*PROMEDIO		0.29	0.26	0.25	2.31
C7-DM	IEMRHYV	1	0.14	0.13	0.11	2.16
		2	0.15	0.13	0.11	2.17
		4	0.23	0.23	0.19	2.17
		5	0.21	0.20	0.17	2.19
	*PROMEDIO		0.18	0.17	0.15	2.17
ANTI βA_{1-42} WT			2.27	2.32	0.20	0.22
ANTI ADY			0.27	0.27	0.26	0.26

^a Suero de cada uno de los ratones inmunizados.

^{b, c, d} Estos sueros se evaluaron con los péptidos βA FLEMISH₁₋₄₂, βA_{1-42} WILD TYPE, y un péptido no relacionado de secuencia AALSPGSSAYPSATVLA. La reactividad se evaluó a 405 nm.

^e Se utilizó M13 silvestre como control positivo.

* La DO promedio de los sueros evaluados con cada péptido se comparó con la DO promedio obtenida de evaluar la especificidad de estos sueros con M13.

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON PEPTIDO β A Y NO RELACIONADO POSTERIOR AL 2º BOOST

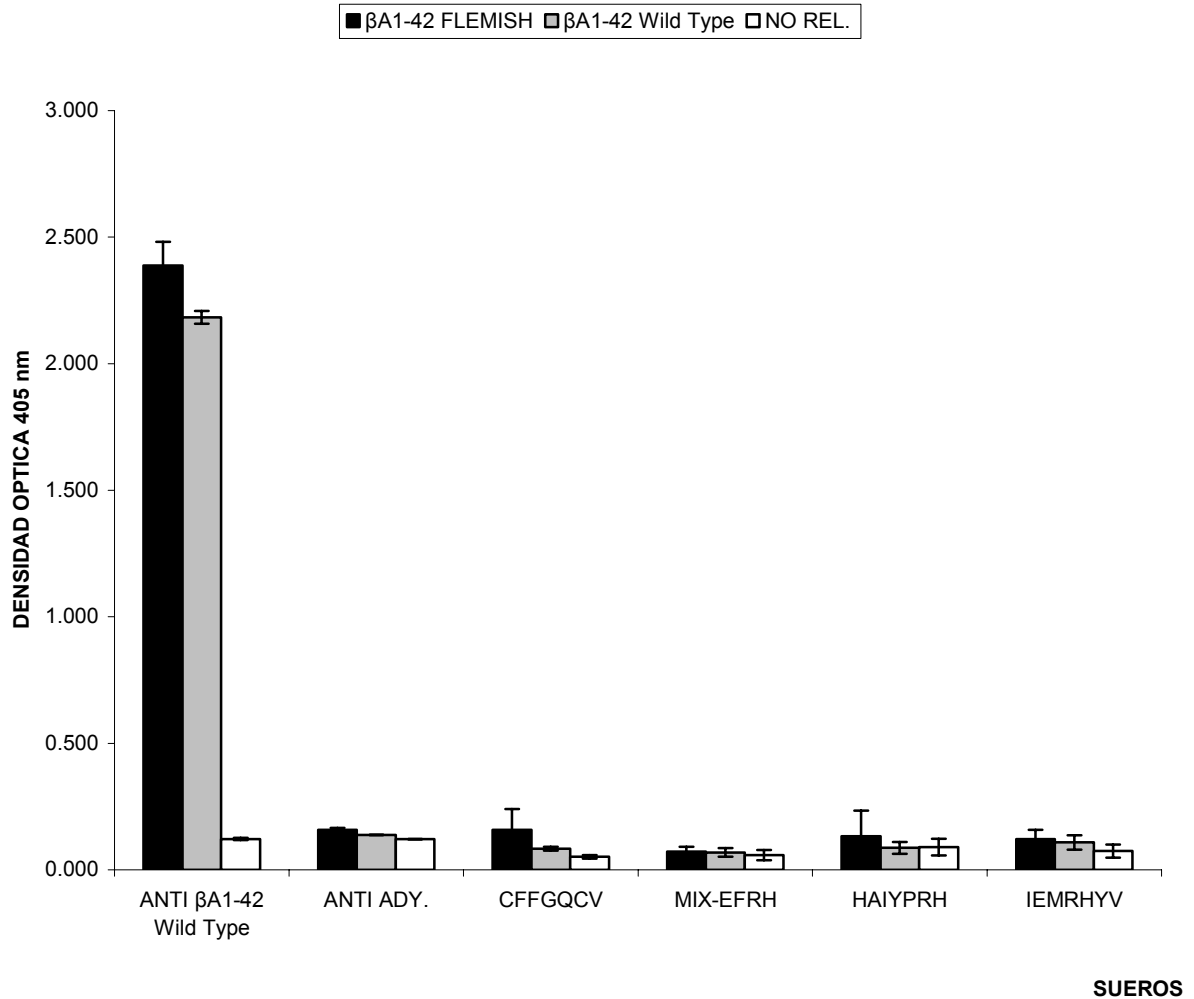


FIGURA 15. Reactividad promedio por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con clones de la bioselección con los sueros anti- β A₁₋₄₂ DUTCH y anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH. La reactividad se evaluó a 405 nm con los péptidos β A₁₋₄₂ FLEMISH, β A₁₋₄₂ WILD TYPE, y un péptido no relacionado. En cada bloque de resultados se indica la secuencia de la clona seleccionada para la inmunización. Se utilizó suero anti- β A₁₋₄₂ WILD TYPE como control positivo y suero anti-ADYUVANTE como control negativo.

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON PEPTIDO β A Y NO RELACIONADO POSTERIOR AL 4^o BOOST

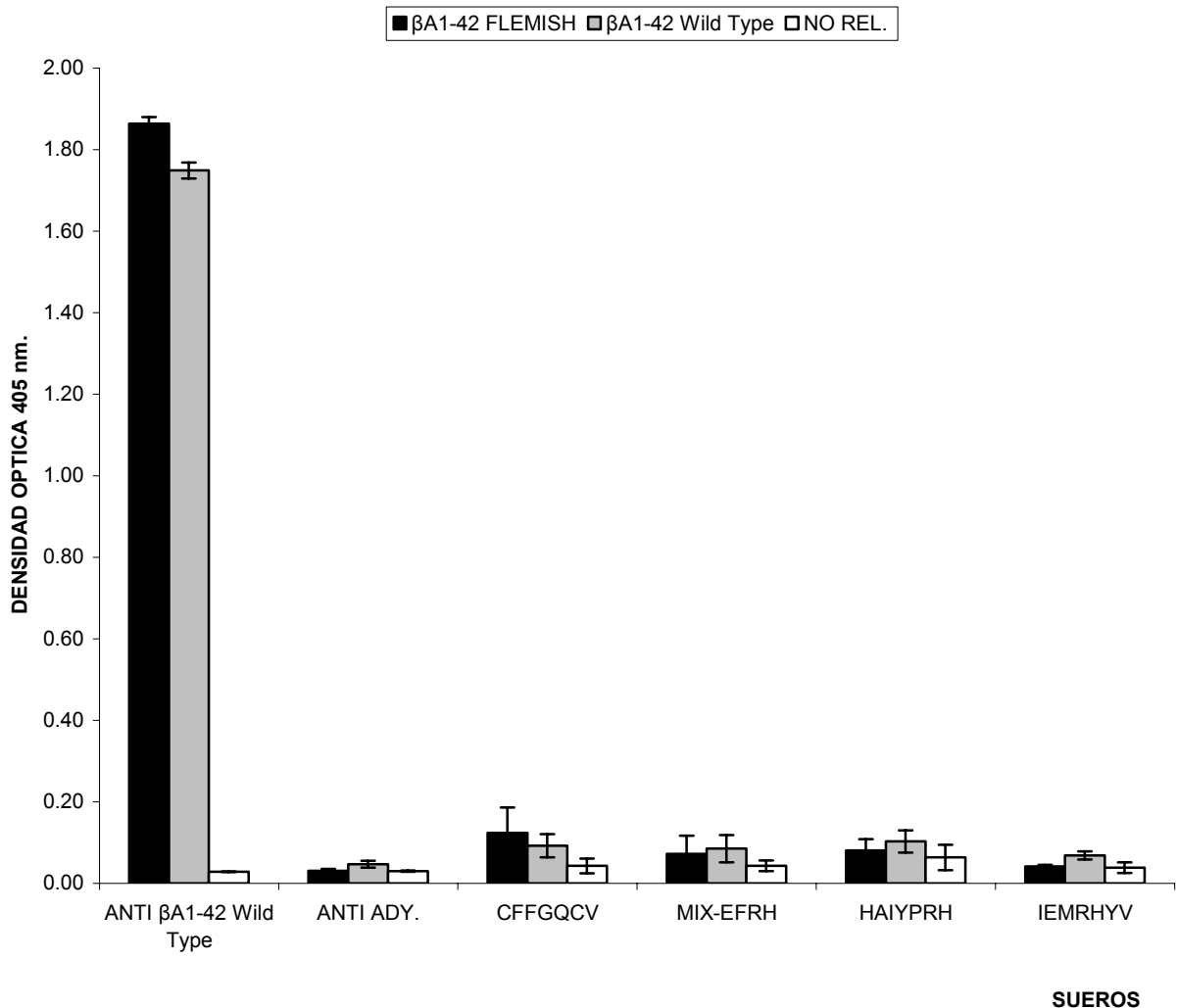


FIGURA 16. Reactividad promedio por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con clones de la bioselección con los sueros anti- β A₁₋₄₂ DUTCH y anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH. La reactividad se evaluó a 405 nm con los péptidos β A₁₋₄₂ FLEMISH, β A₁₋₄₂ WILD TYPE, y un péptido no relacionado. En cada bloque de resultados se indica la secuencia de la clona seleccionada para la inmunización. Se utilizó suero anti- β A₁₋₄₂ WILD TYPE como control positivo y suero anti-ADYUVANTE como control negativo.

REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON PEPTIDO β A Y NO RELACIONADO POSTERIOR AL 5^o BOOST

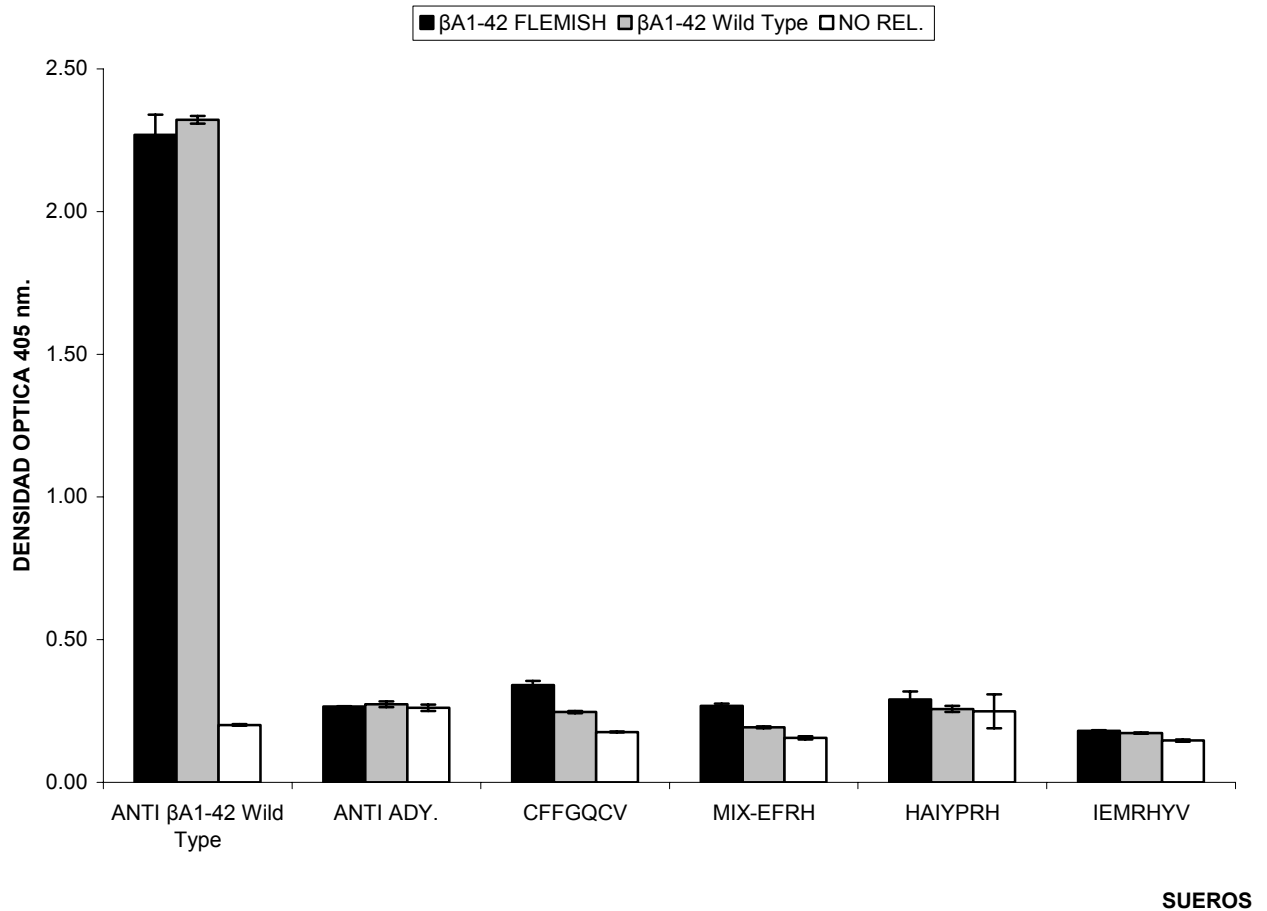


FIGURA 17. Reactividad promedio por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con clonas de la bioselección con los sueros anti- β A₁₋₄₂ DUTCH y anti- β A₁₋₄₂ FLEMISH. La reactividad se evaluó a 405 nm con los péptidos β A₁₋₄₂ FLEMISH, β A₁₋₄₂ WILD TYPE, y un péptido no relacionado. En cada bloque de resultados se indica la secuencia de la clona seleccionada para la inmunización. Se utilizó suero anti- β A₁₋₄₂ WILD TYPE como control positivo y suero anti-ADYUVANTE como control negativo.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que la región inmunodominante del péptido amino truncado βA_{8-42} humano está constituida al menos por seis residuos continuos de aminoácidos localizados en su extremo amino terminal. Las clonas positivas seleccionadas mediante biopanning, utilizando una biblioteca comercial de péptidos de doce aminoácidos expresados en fago filamentoso y anticuerpos policlonales de ratón anti βA_{8-42} humano, contienen en sus insertos de péptidos la secuencia consenso: **SGY (F, M, L) EV(A, L, R) H (F, Q)**.

Un aspecto de gran importancia del estudio descrito en esta tesis se refiere a la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados con el péptido sintético amino truncado βA_{8-42} . Lo anterior se demostró al evaluar la reactividad de los anticuerpos anti βA_{8-42} que no se unieron ni en fase sólida ni en solución al péptido βA_{1-16} , a pesar de que este último contiene en su secuencia al epítipo reconocido por estos anticuerpos (residuos 1-6 de βA_{8-42} y residuos 8-13 del péptido completo βA_{1-42}). Estos resultados podrían sugerir que el epítipo 8-13 solamente se encuentra expuesto y es reconocido de manera específica por los anticuerpos generados contra el péptido amino truncado βA_{8-42} cuando contiene en su extremo amino terminal un residuo de serina no modificado. Lo anterior se podría relacionar con lo propuesto por Tekirian, Saido, Mori y colaboradores (1998, 1995 y 1992) quienes exponen que ciertas modificaciones post-traduccionales que ocurren en el extremo amino terminal de péptidos βA podrían impedir la interacción entre el anticuerpo y su epítipo por restricciones conformacionales (Tekirian et al., 1998; Saido et al., 1995; Mori et al., 1992). Las modificaciones amino terminales que se presentan mayormente en diferentes especies de βA son la formación de piroglutamato en el residuo 3 de βA ($\beta A_{3-40/42}$), y la isomerización o racemización del residuo Aspartato (1) del péptido completo $\beta A_{1-40/42}$. Es posible sugerir también que el epítipo 8-13 se localiza expuesto en el péptido completo βA_{1-42} cuando éste último se encuentra en fase soluble, ya que de acuerdo con otros experimentos realizados en la presente investigación, este epítipo (residuos 8-13 del péptido completo βA_{1-42}) podría quedar oculto quizás por la unión del péptido al plástico o bien por la presencia de las proteínas de la cubierta del fago.

Otro hallazgo importante de este estudio es que los anticuerpos generados por la inmunización de ratones con el péptido completo βA_{1-42} no reconocieron a aquellos péptidos expresados en fago que contenían la secuencia de aminoácidos 8-13, aun cuando este epítipo se encuentra presente en el péptido completo y a pesar de que se verificó la unión

moderada de los anticuerpos anti βA_{1-42} al péptido sintético βA_{8-42} . Es posible deducir que los anticuerpos anti- βA_{1-42} no se unieron al epítipo 8-13 expresado por las clonas positivas (residuos 1-6 de βA_{8-42}) porque estos anticuerpos podrían reconocer epítopos diferentes presentes en el péptido βA_{8-42} probablemente localizados en el extremo carboxilo de este péptido truncado. Estos resultados coinciden con los resultados reportados recientemente por Kutzler y colaboradores (2006), quienes demostraron que anticuerpos presentes en suero anti βA_{1-42} no se unen a un péptido sintético cuya secuencia de aminoácidos contiene los residuos 6-15, presentes en el péptido completo βA_{1-42} . Con base en lo anterior, la inmunización activa con el péptido completo βA_{1-42} no sería una estrategia inmunoterapéutica eficaz dirigida contra las distintas especies de péptidos βA amino truncados, en particular βA_{8-42} .

Vanderstichele y colaboradores (2005) encontraron que el péptido amino truncado βA_{8-42} se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer (Vanderstichele et al., 2005). En estudios previos llevados a cabo en 1994 por Näslund y colaboradores se reportó que entre las especies amino truncadas de βA encontradas en cerebros de pacientes con esta enfermedad están βA_{4-42} y βA_{8-42} . Al año siguiente (1995) Pike y colaboradores manifestaron que en estudios realizados con cultivos primarios de neuronas hipocampales, la neurotoxicidad y agregación de βA_{8-42} en comparación con el péptido completo βA_{1-42} fue mayor (Pike et al., 1995; Näslund et al., 1994). En un estudio paralelo demostramos en el laboratorio en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, que este péptido amino truncado βA_{8-42} exhibe una mayor toxicidad *in vitro* que el péptido completo (manuscrito en preparación).

Es importante mencionar que la presencia de especies amino truncadas de βA (βA_{4-42} , βA_{8-42} , βA_{11-42} , βA_{17-42} , etc.) se relaciona con las placas difusas y/o con las neuritas distróficas, siendo estos péptidos los principales antígenos tóxicos característicos de los primeros estadios de la enfermedad de Alzheimer (Sergeant, 2003; Larner, 1999; Saido et. al., 1995). Con base en lo anterior, se podrían considerar estas especies amino truncadas como blancos terapéuticos útiles para la prevención de los síntomas tempranos de la enfermedad como lo son el daño sináptico y la formación inicial de las placas seniles. Lo anterior podría lograrse a través de la generación de inmunógenos basados en la secuencia de los epítopos reconocidos por los anticuerpos específicos contra el péptido βA_{8-42} .

Como se mencionó en la introducción, la interacción del péptido β -amiloide con la membrana de las células neuronales se asocia con un severo daño celular y degeneración. Uno de los mecanismos que involucra a βA con dicha patología es la alteración de la homeostasis del

calcio por el incremento de dicho ión hacia el interior de las neuronas (Singer and Dewji, 2006; Quist et al., 2005; Mattson, 2004; Bathia, 2000; Arispe et al., 1993; Loo et al., 1993).

Con respecto a los canales iónicos mencionados anteriormente, Arispe y Simakova (2004 y 2006) explican que un péptido conocido como N4 el cual contiene la región 8-14 del péptido Wild Type βA_{1-42} podría intervenir en el bloqueo de canales iónicos (Simakova y Arispe, 2006; Arispe, 2004). Por su parte, Durrell y colaboradores (1994) explican mediante un modelo teórico de membrana, que dicha región del péptido completo βA_{1-42} podría alinearse con la estructura que forma el poro del canal. De esta manera y con base en la secuencia de aminoácidos de las clonas positivas seleccionadas en este trabajo, las cuales contienen los residuos 8-13 presentes en el péptido N4, podrían compartir propiedades bloqueadoras de canales con este péptido así como también los anticuerpos generados a partir de estos epítomos.

Otro mecanismo que se ha propuesto para explicar el daño celular asociado a βA es el propuesto por Larner (1999) quien describe que la región 6-28 del péptido se asocia con estrés oxidativo por la unión de iones como Zn^{2+} , Cu^{2+} o Fe^{3+} a βA y que la región 1-16 de βA_{1-42} está directamente relacionada a la activación del complemento por la unión a C1q. Debido a que los epítomos aquí descritos forman parte de la región de βA_{1-42} que se relaciona con el daño oxidativo y la respuesta autoinmune, los anticuerpos generados por la inmunización activa en modelos animales con péptidos sintéticos basados en la secuencia de estos epítomos podrían presentar un efecto antioxidante asociado a cambios conformacionales inhibidores de la unión de los iones antes mencionados a βA . Cabe señalar que se pueden generar diferentes respuestas de anticuerpos hacia un mismo antígeno dependiendo del tipo de adyuvante que se utilice en la inmunización (Ghochikyan et al., 2006; Gevorkyan et al., 2004). Con respecto a la activación del complemento asociada a βA , se considera importante evaluar el efecto supresor de la autoinmunidad por la unión de los anticuerpos específicos anti- βA_{8-42} al sitio de unión de este péptido con C1q.

La identificación de la región inmunodominante del péptido truncado βA_{8-42} podría sugerir su utilización como blanco inmunoterapéutico potencial minimizando la posibilidad de generar hemorragias cerebrales, las cuales son efectos secundarios asociados con la respuesta de anticuerpos específicos contra la región inmunodominante EFRH correspondiente a los residuos 3-6 del péptido completo βA_{1-42} (Gandy y Walker, 2004; Pfeifer et. al., 2002; Wolfe et. al., 2002). En la presente investigación también se evaluó la especificidad de los anticuerpos generados por la inmunización de ratones con los péptidos mutados βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH, los cuales se asocian a formas autosomales tempranas de EA. Un aspecto

relevante de esta investigación fue la identificación de un epítipo lineal diferente a la región inmunodominante ${}_{3}\text{EFRH}_6$ del péptido Wild type βA_{1-42} . Este epítipo se localiza entre los residuos 17-20 del péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH.

Como ya se mencionó, la toxicidad de βA se relaciona con la presencia de especies solubles del péptido que adquieren la conformación β anormal, que promueve la formación de agregados insolubles del péptido. Soto y colaboradores (1998 y 2000) han propuesto una posible estrategia para el tratamiento de la enfermedad a través de la inhibición de la agregación de especies tóxicas de βA por la unión de pequeños péptidos sintéticos de secuencia *LPFFD* a la estructura β plegada de los intermediarios amiloidogénicos, con el fin de desestabilizar al confórmero y evitar así la conversión del péptido soluble en intermediarios oligoméricos. El péptido sintético fue diseñado tomando como base la secuencia de los cinco residuos *LVFFA* localizados en la región central hidrofóbica de βA (residuos 17-21). Al llevar a cabo ensayos “*in vitro*” con células de neuroblastoma e “*in vivo*” en ratas que fueron inyectadas intracerebralmente con βA_{1-42} soluble, estos autores demostraron que el péptido sintético inhibió la neurotoxicidad de βA y la fibrilogénesis de βA_{1-40} y βA_{1-42} . La importancia de la presente investigación radica en que las clonas positivas obtenidas por bioselección, utilizando una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en fago filamentoso y anticuerpos policlonales de ratón anti βA_{1-42} FLEMISH humano, contienen en sus insertos de péptidos la secuencia consenso ***LV (D, A, S) FF (W)*** que debido a su similitud con el péptido sintético construido por Soto, es posible sugerir que estos epítopos podrían compartir propiedades antiagregantes.

Se sabe que un evento patológico asociado con βA es la alteración de la función endotelial y la presencia de hemorragias cerebrales en personas con antecedentes familiares de angiopatía vascular amiloide. De manera similar, Gandy y Walker (2004) describieron que la administración de anticuerpos monoclonales que reconocen al epítipo inmunodominante EFRH en ratones transgénicos no disminuyó la amiloidosis vascular que aunada a la reacción inflamatoria generada por la unión de los anticuerpos a su epítipo, contribuyó a la presencia de hemorragias cerebrales (Gandy y Walker, 2004). Un aspecto de suma importancia descrito en esta tesis es que el epítipo que se identificó no se ubica en la región amino terminal del péptido, región identificada como promotora de la respuesta inmune inflamatoria. Lo anterior permite sugerir que el epítipo ubicado entre los residuos 17-20 del péptido βA_{1-42} FLEMISH podría considerarse como blanco terapéutico para la prevención de la enfermedad, particularmente en personas de alto riesgo con antecedentes familiares de amiloidosis vascular por la mutación FLEMISH, descartando los efectos adversos generados

por autoinmunidad al ser un epítipo distinto a EFRH. Otro aspecto importante es que a pesar de que la secuencia de los insertos de las clonas positivas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero contra el péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH, la inmunización de ratones con estos péptidos no generó una respuesta de anticuerpos. Lo anterior podría deberse a que dichos péptidos se encontraban en baja copia es decir, que se encontraban expresados en una proporción de 3 a 5 copias en la proteína pIII del fago. Debido a lo cual, se considera importante clonar estos péptidos en la proteína pVIII de M13 para evaluar la especificidad de anticuerpos generados por la inmunización de ratones con los mimótopos expresados en alta copia, así como su posible efecto protector de células endoteliales.

Otro descubrimiento importante de este trabajo fue la obtención de un mimótopo del péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH cuya secuencia **CFFGQCV** es similar al epítipo lineal comprendido entre los residuos 19-24 de este péptido. Aun cuando se identificó en la secuencia del mimótopo la presencia del aminoácido Glutamina, el cual se encuentra presente en el péptido mutado βA_{1-42} DUTCH, los anticuerpos de ratón generados por la inmunización contra éste último no reconocieron a dicho mimótopo. Lo anterior no descarta la posibilidad de desarrollar moléculas inmunogénicas a partir de la secuencia del mimótopo **CFFGQCV** que sean útiles para la prevención de la amiloidosis vascular asociada a los péptidos mutados βA_{1-40} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH, a través de la inmunización activa con dichas moléculas, así como la administración pasiva de los anticuerpos específicos contra este inmunógeno.

La toxicidad del péptido mutado $\beta A_{1-40/42}$ DUTCH se relaciona con eventos tales como la exposición de residuos con gran afinidad por el endotelio y con la resistencia del péptido mutado a la degradación por la acción de las proteasas, lo cual favorece su depósito en las paredes de los vasos sanguíneos y promueve la generación de hemorragias cerebrales masivas asociadas a este péptido. De igual manera, la administración de anticuerpos dirigidos contra el epítipo inmunodominante EFRH de βA contribuye al incremento de la patología vascular (Gandy y Walker, 2004; Kumar-Singh, et al., 2000, Walsh, et al. 2001; Van Duinen, et al. 2000). Con base en lo anterior se consideró importante la identificación de epítipos ubicados en la región centro o carboxilo terminal del péptido mutado βA_{1-42} DUTCH. A través del monitoreo de una biblioteca comercial de heptapéptidos expresados al azar en fago filamentoso y la selección de clonas mediante biopanning utilizando el suero de ratones inmunizados con la variante mutada βA_{1-42} DUTCH se obtuvieron resultados importantes, pues se demostró que este péptido mutado comparte el mismo epítipo inmunodominante EFRH que el péptido Wild type, lo cual es un aspecto relevante de este estudio ya que no

había sido reportado anteriormente. Los resultados obtenidos además demuestran la inmunogenicidad de la región comprendida entre los residuos 3-6 del péptido βA_{1-42} , pues 20 de las 21 clonas obtenidas presentaron en su secuencia a este epítipo.

El presente estudio es la primera investigación que demuestra la especificidad de anticuerpos contra la especie amino truncada βA_{8-42} y las formas mutadas del péptido completo β -amiloide: βA_{1-42} DUTCH y βA_{1-42} FLEMISH. Los epítipos y mimótipos descritos en esta tesis podrían favorecer el desarrollo de moléculas terapéuticas útiles para generar una respuesta inmune efectiva, dirigida hacia la prevención de casos de inicio temprano de la enfermedad de Alzheimer, en contra de algunos epítipos de βA sin causar efectos secundarios.

CONCLUSIONES

1. Se generó y caracterizó un suero policlonal de ratón contra el péptido amino truncado βA_{8-42} .
2. Se identificó la región inmunodominante 1-6 del péptido amino truncado βA_{8-42} a partir del monitoreo de una biblioteca de doce aminoácidos expresados al azar en fago filamentoso y el suero de ratones inmunizados con βA_{8-42} .
3. Se obtuvieron cinco clonas positivas que contienen la secuencia consenso ***SGY(F,M,L)EV(A,L,R)H(F,Q)***, la cual es similar a la secuencia de la región inmunodominante del péptido amino truncado βA_{8-42} y se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti βA_{8-42} contra estos mimótopos.
4. Se generaron y caracterizaron dos sueros policlonales de ratón contra las formas mutadas del péptido βA_{1-42} FLEMISH y βA_{1-42} DUTCH.
5. Se identificó un epítipo lineal del péptido βA_{1-42} FLEMISH ubicado entre los residuos 17-20 de este péptido a partir del monitoreo de una biblioteca de siete aminoácidos expresados al azar en fago filamentoso y el suero de ratones inmunizados con el péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH.
6. Se obtuvieron cuatro clonas positivas que contienen la secuencia consenso ***LV (D, A, S) FF (W)***, la cual es similar a la secuencia del epítipo identificado y se determinó la similitud de estos mimótopos con un péptido sintético con la capacidad de romper estructuras β .

7. Se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti βA_{1-42} FLEMISH contra estos mimótopos.

8. Se comprobó la inmunogenicidad de la región EFRH comprendida entre los residuos 3-6 del péptido βA_{1-42} .

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se identificaron epítomos/mimótopos distintos a EFRH en diferentes formas del péptido β -amiloide. Con base en la relevancia de los resultados encontrados consideramos de gran importancia continuar el desarrollo de experimentos que permitan:

- Determinar “*in vivo*” y en cultivos celulares si los anticuerpos generados contra el epítomo inmunodominante de βA_{8-42} son capaces de inhibir la formación de agregados compactos de βA y neutralizar el daño sináptico.
- Evaluar en cultivos celulares y ratones transgénicos si los anticuerpos específicos generados contra epítomos diferentes a EFRH son capaces de neutralizar el efecto tóxico vascular y prevenir la agregación del péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH.
- Caracterizar el tipo de respuesta inmune asociada a la inmunización con moléculas generadas a partir de la secuencia del epítomo inmunodominante del péptido amino truncado βA_{8-42} así como de los mimótopos del péptido mutado βA_{1-42} FLEMISH, para descartar posibles efectos secundarios como inflamación cerebral y hemorragias.
- Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se sugiere, una vez realizados los aspectos anteriores, la posibilidad de desarrollar moléculas inmunoterapéuticas a partir de múltiples epítomos de diferentes especies de βA , útiles para la prevención de la Enfermedad de Alzheimer sin generar efectos secundarios.

ABREVIATURAS

ABTS.- 2, 2-azino-di-(3-etilbenziazolano-6-ácido sulfónico). Sustrato revelador de la enzima peroxidasa.

ACAT.- Colesterol-acil-coenzima A-aciltransferasa

α S³⁵.- Azufre radioactivo

Alum.- Sulfato potásico de aluminio

ATP.- Adenosín trifosfato

β A.- Péptido beta amiloide

BSA.- Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumine)

CMH I.- Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I

ddNTP's.- Didesoxinucleótidos

DTT.- Ditiotreitól

EA.- Enfermedad de Alzheimer

EDTA.- Ácido etilendiaminotetracético

EFRH.- Secuencia altamente inmunogénica del péptido β -amiloide formada por los aminoácidos: ácido glutámico, fenilalanina, arginina e histidina. Esta secuencia comprende los residuos 3-6 del extremo amino terminal del péptido.

ELISA.- Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ER2537.- Cepa F+ de *Escherichia coli*

HRP.- Enzima peroxidasa

IgG.- Anticuerpo del tipo inmunoglobulina G

IPTG.- (Isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida)

NFT's.- Marañas neurofibrilares

PBS.- Buffer salino de fosfatos

PEG.- Polietilenglicol

PPA.- Proteína precursora del amiloide

QS21.- Fracción purificada de extractos de saponina, proveniente de *Quillarja saponaria*.

Quil A.- Mezcla de saponinas extraídas de *Q. saponaria* que contiene a QS21 como principal componente del adyuvante.

rpm.- Revoluciones por minuto

SNC.- Sistema Nervioso Central

SW.- Mutación Swedish (PPA: Lys/Met670/Asn/Leu)

TBE.- Tris Borato EDTA

TBS.- Buffer salino TRIS

TCD4+.- Células T colaboradoras

TCD8+.- Células T citotóxicas

TCR.- Receptor de células T

Th1.- Respuesta inmune inflamatoria

Th2.- Respuesta inmune dependiente de anticuerpos

VUP.- Vía ubiquitina-proteasoma

APENDICE 1: CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON BASE EN SUS GRUPOS R.

1. ALIFÁTICOS NO POLARES:

- G.-** Glicina (Gly)
- A.-** Alanina (Ala)
- V.-** Valina (Val)
- L.-** Leucina (Leu)
- I.-** Isoleucina (Ile)
- M.-** Metionina (Met)

2. AROMATICOS:

- F.-** Fenilalanina (Phe)
- Y.-** Tirosina (Tyr)
- W.-** Triptófano (Trp)

3. POLARES SIN CARGA:

- S.-** Serina (Ser)
- P.-** Prolina (Pro)
- T.-** Treonina (Thr)
- C.-** Cisteína (Cys)
- N.-** Asparagina (Asn)
- Q.-** Glutamina (Gln)

4. CON CARGA POSITIVA:

- K.-** Lisina (Lys)
- H.-** Histidina (His)
- R.-** Arginina (Arg)

5. CON CARGA NEGATIVA:

- D.-** Acido aspártico o aspartato (Asp)
- E.-** Acido glutámico o glutamato (Glu)

OTROS:

- B.-** Asparagina o aspartato (Asx)
- X.-** Aminoácido desconocido o no estudiado
- Z.-** Glutamina o glutamato (Glx)

APÉNDICE 2: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y SOLUCIONES

BUFFER:

1. LB (Luria Bertani) 1L:

10g Bacto Tryptone
5g Extracto de Levadura
5g NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

2. Top Agar 1L:

10g Bacto Tryptone
5g Extracto de Levadura
5g NaCl
1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
7g Agarosa

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

3. Medio 2XYT 1L:

16g Bacto Tryptone
10g Extracto de Levadura
5g NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

4. PEG/NaCl (8000):

2.5M NaCl
20%p/v Polietilenglicol (8000)

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

5. Buffer Salino de Fosfatos:

80g NaCl 1.37M
2g KCl 0.027M
14.4g Na_2HPO_4 1M
2.4g KH_2PO_4 0.01M

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a 1L

6. Buffer de Carbonatos:

31.8mg Solución de Na_2CO_3 0.05M. Aforar a 200 ml.

21mg Solución NaHCO_3 0.05M

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 9.6 y aforar a 500ml.

7. Buffer Salino TRIS:

50mM Tris HCl pH 7.5.

150 mM NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

8. Buffer de Yoduro:

10mM Tris HCl pH 8.0

1 mM EDTA.

1mM NaI

Proteger de la luz a temperatura ambiente.

9. TBE 1L:

54g Tris HCl

27.5g Acido Bórico

20ml EDTA

10. TBS:

50 mM Tris HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

11. X-Gal/IPTG:

1g X-Gal

1.25g IPTG

25 ml Dimetil formamida

Mantener a -20°C

12. Acrilamida/Bisacrilamida 38/2% (500ml):

190 g Acrilamida

10 g Bisacrilamida

Aforar a un volumen final de 500 ml de agua miliQ. Filtrar y almacenar enfrasco ámbar a 4°C.

13. Gel Acrilamida/Bisacrilamida 8%:

39.6 g Urea

26.4 ml Agua miliQ

16 ml Acril/Bisacril 38/2

8 ml TBE 10X

★ PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA:

Se recomienda lavar los vidrios utilizados para la secuenciación con EXTRAN, aplicar una solución de NaOH 1M y etanol absoluto para eliminar polvo o grasa. Es necesario utilizar 700 µ de un agente siliconizante (SIGMACOTE) en las caras útiles antes de ensamblar los vidrios.

Para polimerizar la acrilamida, añadir 0.675 µl de persulfato de amonio y 25 µl de TEMED a una solución de acrilamida/bisacrilamida 8%. Esta solución se vacía en los vidrios ensamblados y se deja polimerizar en posición horizontal toda la noche.

APÉNDICE 3: REACTIVOS

★ **ABTS.-** 2,2-azino-di-(3-etilbenziazolano-6-ácido sulfónico). Al reaccionar con la enzima peroxidasa produce un color azul que permite cuantificar por densidad óptica la reacción antígeno-anticuerpo.

★ **ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND.-** Contiene aceite mineral, monooleato de manida como agente emulsificante y micobacterias muertas. El muramil-dipéptido, componente de la pared celular de las micobacterias, activa el proceso de fagocitosis por macrófagos.

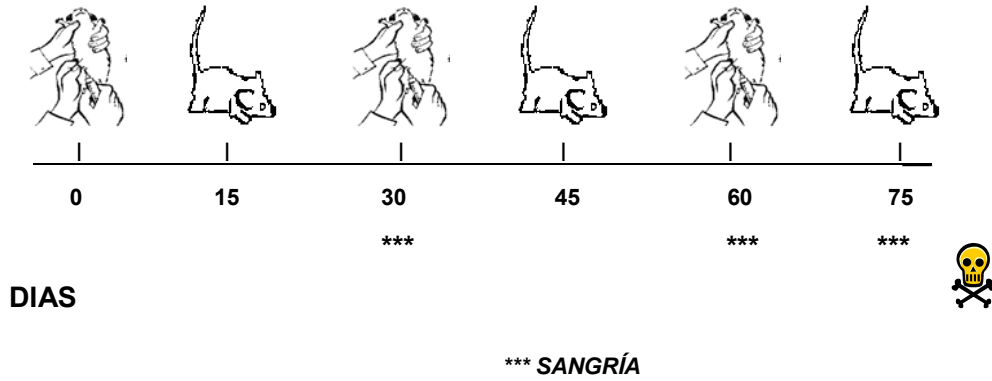
★ **ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND.-** Prolonga la persistencia del antígeno, pues el monooleato de manida dispersa al aceite mineral en pequeñas gotas que rodean al antígeno, permitiendo así una liberación lenta de éste del sitio de la inyección. Los componentes de este adyuvante son los mismos que el adyuvante completo, a excepción de las micobacterias.

★ **IPTG.-** (Isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida). Induce la actividad de la enzima beta-galactosidasa, la cual promueve la utilización de la lactosa inhibiendo al represor Lac. En experimentos de reproducción IPTG se utiliza para inducir la expresión del gen LacZ.

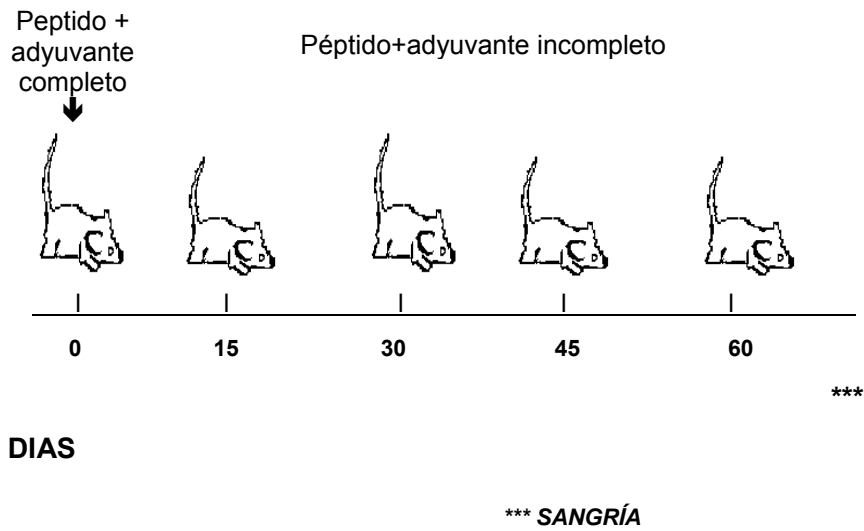
★ **X-Gal.-** (5-Bromo-4-Cloro-3-Idolyl-2-D-Galactopyranosido). Se utiliza como sustrato para la detección de β -galactosidasa que produce un color azul claro. Generalmente se utiliza conjuntamente con IPTG para distinguir bacterias recombinantes con el genotipo Lac+. También se utiliza para reportar la selección de la actividad del gene de β -galactosidasa en la transfección de células eucariotas.

APÉNDICE 4: PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN.

★ ESQUEMA DE INMUNIZACION CON PÉPTIDOS EXPRESADOS EN FAGO



★ ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE RATONES INMUNIZADOS CON EL PÉPTIDO βA_{8-42}



BIBLIOGRAFÍA:

Adamson P., Greenwood J. (2003). How do statins control neuroinflammation?. *Inflam. Res.* 52: 399-403.

Allsop D. (2000). Alzheimer's disease, methods and protocols. Human Press, USA. Pp: 1-43.

Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. (1993). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-1-40] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10573-10577.

Arispe N. (2004). Architecture of the Alzheimer's A β P ion channel pore. *J. Membrane Biol.* 197: 33-48.

Atwood C., Obrenovich M., Liu T., Chan H., Perry G., Smith M., Martins R. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews* 43: 1-16.

Azzazy H.M.E., Highsmith Jr. W.E., (2002). Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.* 35: 425-445.

Baril L., Nicolas L., Croisile B., Crozier P., Hessler C., Sassolas A., McCormick J.B., Trannoy E. (2004). Immune response to A β -peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neuroscience Letters* 355: 226-230.

Bathia R., Lin H., Lal R. (2000). Fresh and globular amyloid b protein induces rapid cellular degeneration. A possible implication for calcium-uptake via A β P-channel. *FASEB J.* 14: 1233-1243.

Bayer T.A., Wirths O., Majtényi K., Hartmann T., Multhaup G., Beyreuther K., Czech C. (2001). Key factors in Alzheimer's disease: β -amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathology* 11: 1-11.

Broytman O., Malter J.S. (2004). Anti-A beta: The good, the bad, and the unforeseen. *Journal of Neuroscience Research* 75(3): 301-306.

Ciechanover A., Brundin P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40: 427-466.

Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature reviews* 5: 667-685.

Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J., Shankar G.M., Kuskowsky M.A., Selkoe D.J., Ashe K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8(1): 79-84.

Cruz L., Urbanc B., Borreguero J.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Stanley H.E. (2005). Solvent and mutation effects on the nucleation of amyloid β -protein folding. *PNAS* 102 (51): 18258-18263.

Datki Z., Papp R., Zádori D., Soós K., Fülöp L., Juhász A., Laskay G., Hetényi C., Mihalik E., Zarándi M., Penke B. (2004). In vitro model of neurotoxicity of A β 1-42 and neuroprotection by a pentapeptide: irreversible events during the first hour. *Neurobiology of Disease* 17: 507-515.

De Jonghe C., Zehr C., Yager D., Prada C.M., Younkin S., Hendriks L., Van Broeckhoven C., Eckman C.B. (1998). Flemish and Dutch mutations in amyloid β precursor protein have different effects on amyloid β secretion. *Neurobiology of Disease* 5: 281-286.

Delmastro P., Meola A., Monaci P., Cortese R., Galfrin G. (1997). Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine* 15 (11): 1276-1265.

Dickey C.A., Morgan D.G., Kudchodkar S., Weiner D.B., Bai Y., Cao C., Gordon M.N., Ugen K.E. (2001). Duration and Specificity of Humoral Immune Responses in Mice Vaccinated with the Alzheimer's Disease-associated β -Amyloid 1-42 peptide. *DNA and Cell Biology* 20(11): 723-729.

Dodart J.C., Bales K.R., Gannon K.S., Greene S.J., DeMattos R.B., Mathis C., De Long C.A., Wu S., Wu X., Holtzman D.M., Paul S.M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience* 5(5): 452-457.

Dong J., Robert P., Lynn A. and D.G. (2005). Imaging amyloid β peptide oligomeric particles in solution. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13: 5213–521.

Durrell S.R., Guy H.R., Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. (1994). Theoretical models of the ion channel structure of amyloid- β -protein. *J. Biophys.* 67: 2137-2145.

El-Agnaf O.M.A., Guthrie D.J.S., Walsh D.M., Irvine G.B. (1998). The influence of the central region containing residues 19-25 on the aggregation properties and secondary structure of Alzheimer's β -amyloid peptide. *Eur. J. Biochem.* 256: 560-569.

Esteban J.A. (2004). Living with the enemy: a physiological role for the β -amyloid peptide. *Trends in Neurosciences* 27(1): 1-3.

Gandy S. (2005). The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Inv.* 115(5): 1121-1129.

Gandy S., Walker L. (2004). Toward modeling hemorrhagic and encephalitic complications of Alzheimer amyloid- β vaccination in nonhuman primates. *Current Opinion in Immunology* 16: 607-615.

Gevorkian G., Petrushina I., Manoutcharian K., Ghochikyan A., Acero G., Vasilevko V., Cribbs D. H., Agadjanyan M.G. (2004). Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar β -amyloid. *J. Neuroimmunol.* 156:10– 20.

Ghochikyan A., Vasilevko V., Petrushina I., Movsesyan N., Babikyan D., Tian W.Q., Sadzikava N., Ross T.M., Head E., Cribbs D.H., Agadjanyan M.G. (2003). Generation and characterization of the humoral immune response to DNA immunization with chimeric beta-amyloid-interleukin-4 minigene. *Eur. J. Immunol.* 33(12): 3233-3241.

Gilman S. (2005). Is amyloid- β -peptide immunization clinically effective in patients with Alzheimer's disease?. *Nat. Neurol.* 1(2): 84-85.

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. (2004). Inmunología. *Mc.Graw Hill Interamericana*. 5ª ed. México: 665 p.

Götz J., Streffer J.R., David D. Schild A., Hoerndli F., Pennanen L., Kurosinski P, Chen F. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Molecular Psychiatry* 9: 664-683.

Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., Vincent B., Edgar M., Checler F., Greenfield J.P., Haroutunian V., Buxbaum J.D., Xu H., Greengard P., Relkin N.R. (2000): Intraneuronal A β 42 Accumulation in Human Brain. *Am. J. Pathol.* 156(1): 15-20.

Guénette S. (2003). Astrocytes: a cellular player in A β clearance and degradation. *TRENDS in Molecular Medicine*. 9(7): 279-280.

Gutte B. (1995). *Peptides. Synthesis, Structures and Applications*. Academic Press, USA. 511pp.

Hardy J., Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(19): 353-356.

Haas C., Huang A.Y., Selkoe D.J, Teplow D.B. (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid β -protein precursor. *J. Biol. Chem* 269 (26): 17741-17748.

Head E., Barrett E. G., Murphy M. P., Das P., Nistor M., Sarsoza F., Glabe C.C., Kaye R., Milton S., Vasilevko V., Milgram N.W., Agadjanyan M.G., Cribbs D.H., Cotman C. W. (2006). Immunization with fibrillar A β 1-42 in young and aged canines: Antibody generation and characteristics, and effects on CSF and brain A β . *Vaccine* 24: 2824-2834.

Herzig M.C., Winkler D.T., Burgermeister P., Pfeifer M., Kohler E., Schmidt S.D., Danner S., Abramowski D., Stürchler-Pierrat C., Bürki K., Van Duinen S.G., Maat-Schieman M.L.C.,

Staufenbiel M., Mathews P.M., Jucker M. (2004). A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nature Neuroscience* 7(9): 954-960.

Hock C., Konietzko U., Papassotiropoulos A., Wollmer A., Streffer J., Von Rotz R.C., Davey G., Moritz E., Nitsch R.M. (2002). Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat. Med.* 8: 1270-1275.

Huse J. T., Liu K., Pijak D. S., Carlin D., Lee V.M.-Y, Doms R.W. (2002). β -Secretase processing in the Trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 277, (18):16278–16284.

Irie K., Murakami K., Masuda Y., Morimoto A., Ohigashi H., Ohashi R., Takegoshi K., Nagao M., Shimizu T., Shirasawa T. (2005). Structure of β -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(5): 437-447.

Janus C. (2003). Vaccines for Alzheimer's disease-How close are we?. *CNS DRUGS*: 17(7): 457-474.

Kheterpal I., Williams A., Murphy C., Bledsoe B., Wetzel R. (2001). Structural features of the A β amyloid fibrils elucidated by limited proteolysis. *Biochem.* 40: 11757-11767.

Kumar-Singh S., Dewachter I., Moechars D., Lübke U., De Jonghe C., Ceuterick C., Checler F., Naidu A., Cordell B., Cras P., Van Broeckhoven C., Van Leuven F. (2000). Behavioral Disturbances without Amyloid Deposits in Mice Overexpressing Human Amyloid Precursor Protein with Flemish (A692G) or Dutch (E693Q) Mutation. *Neurobiology of Disease* 7: 9–22.

Kumar-Singh S., Julliams A., Nuydens R., Ceuterick C., Labeur C., Serneels S., Vennekens K., Van Osta P., Geerts H., De Strooper B., Van Broeckhoven C. (2002). In vitro studies of Flemish, Dutch, and Wild-Type β -Amyloid provide evidence for two-staged neurotoxicity. *Neurobiology of Disease* 11: 330-340

Kumar-Singh S., Cras P., Wang R., Kros J.M., Van Swieten J., Lübke U., Ceuterick C., Serneels S., Vennekens K., Timmermans J.P., Van Marck E., Martin J.J., Van Duijn C.M., Van Broeckhoven C. (2002). Dense-Core Senile Plaques in the Flemish Variant of Alzheimer's Disease Are Vasocentric. *American J. Pathol.* 161(2): 507-515.

Kutzler M.A., Cao C., Bai Y., Dong H-Q., Choe P., Saulino V., McLaughlin L., Whelan A., Choo A.Y., Weiner D.B., Ugen K.E. (2006). Mapping of immune responses following wild-type and mutant A Beta 42 plasmid or peptide vaccination in different mouse haplotypes and HLA class II transgenic mice. *Vaccine* 24: 4630-4639.

Larner A.J. (1999). Hypothesis: amyloid β -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 20: 65-69.

Le Vine III, H. (2004). The amyloid Hypothesis and the clearance and degradation of Alzheimer's β -peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* 6: 303-314.

Lee V.M.Y. (2001). A β immunization: Moving A β peptide from brain to blood. *PNAS* 98(16): 8931-8932.

Liu R., McAllister C., Lyubchenko Y., Sierks M.R. (2004). Residues 17-20 and 30-35 of Beta-Amyloid play critical roles in aggregation. *Journal of Neuroscience Research* 75: 162-171.

Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittermore R.E., Walencewicz A.J., Cotman C.W. (1993). Apoptosis is induced by β amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7951-7955.

López de la Paz M., Serrano L. (2004). Sequence determinants of amyloid fibril formation. *PNAS* 101(1): 87-92.

Maier M., Seabrook T.J., Lazo N.D., Jiang L., Das P., Janus C., Lemere C.A. (2006). Short amyloid- β (A β) immunogens reduce cerebral A β load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A β -specific cellular immune response. *J. Neurosci.* 26 (18): 4717-4728.

Manoutcharian K., Acero G., Munguía M.E., Montero J.A., Govezensky T., Cao C., Ugen K., Gevorkian G. (2003). Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145: 12-17.

Mattson M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639.

McGeer E.G., McGeer P.L. (2003). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27: 741-749.

Meloen R.H., Puijk W.C., Slootstra J.W. (2000). Mimotopes: realization of an unlikely concept. *Journal of Molecular Recognition* 13: 352-359.

Meola A., Delmastro P., Monaci P., Luzzago A., Nicosia A., Felici F., Cortese R., Galfre G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. of Immunol.* 154(7): 3162-3172.

Miravalle L., Tokuda T., Chiarle R., Giaccone G., Bugiani O., Tagliavini F., Frangione B., Ghiso J. (2000). Substitutions at codon 22 of Alzheimer's A β peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J. Biochem. Chem.* 275(35): 27110-27116.

Mizushima N. (2005). A β generation in autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 171(1): 15-17.

Monsonogo A., Imitola J., Petrovic S., Zota V., Nemirosky A., Baron R., Fisher Y., Owens T., Weiner H.L. (2006). A β -induced meningoencephalitis is IFN- γ -dependent and is associated with T cell-dependent clearance of A β in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS* 103 (13): 5048-5053.

Montero J. A. (2004). Identificación de Biomoléculas Inhibidoras de agregados de Péptido Beta-Amiloide. Facultad de Ciencias, UNAM. 63 pp.

Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E., Ugen K.E., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen

P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., Arendash G.W. (2000). A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985.

Mori H., Takio K., Ogawara M., Selkoe D.J. (1992). Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267: 17082-17086.

Mullen L.M., Nair S.P., Ward J.M., Rycroft A.N., Henderson B. (2006). Phage display in the study of infectious diseases. *TRENDS in Microbiology* 14(3): 141-147.

Munch G., Robinson R. (2002). Potential neurotoxic inflammatory responses to A β vaccination in humans. *J. Neural Transm.* 109: 1081-1087.

Näslund J., Schierhorn A., Hellman U., Lannfelt L., Roses A.D., Tjernberg L.O., Silberring J., Gandy S.E., Winblad B., Greengard P., Nordstedt C., Terenius L. (1994). Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 8378-8382.

Oh S., Hong H.S., Hwang E., Sim H.J., Lee W., Shin S.J., Mook-Jung I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1292–1299.

Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., Stalder A., S  ller T., Staunfelbiel M., Mathews P.M., Jucker M. (2002). Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science* 298: 1379.

Pike C.J., Overman M.J., Cotman C.W. (1995). Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* 270(41): 23895-23898.

Pravat K.M., Pettegrew J.W. (2004). Alzheimer's Disease: Soluble Oligomeric Ab(1–40) Peptide in Membrane Mimic Environment from Solution NMR and Circular Dichroism Studies. *Neurochem. Res.* 29(12): 2267–2272.

Price D.L., Sisodia S.S. (1994). Cellular and Molecular Biology of Alzheimer's disease and

animal models. *Annu. Rev. Med.* 45: 435-446.

Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. (2005). Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 10427-10432.

Racke M.M., Boone L.I., Hepburn D.L., Parsadainian M., Bryan M.T., Ness D.K., Piroozi K.S., Jordan W.H., Brown D.D., Hoffman W.P., Holtzman D.M., Bales K.R., Gitter B.D., May P.C., Paul S.M., De Mattos R.B. (2005). Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid β . *J. Neurosci.* 25 (3): 629-636.

Ribé E.M., Pérez M., Puig B, Gich I., Lim F., Cuadrado M., Sesma T., Catena S., Sánchez B., Nieto M., Gómez-Ramos P., Morán M.A., Cabodevilla F., Samaranch L., Ortíz L., Pérez A., Ferrer I., Avila J., Gómez-Isla T. (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiology of disease* 20: 814-822.

Robner S. (2004). New players in old amyloid precursor protein-processing pathways. *Int. J. Devl. Neuroscience* 22: 467-474.

Roks G., Van Harskamp F., De Koning I., Cruts M., De Jonghe C., Kumar-Singh S., Tibben A., Tanghe H., Niermeijer M.F., Hofman A., Van Swieten J.C., Van Broeckhoven C., Van Duijn C. (2000). Presentation of amyloidosis in carriers of the codon 692 mutation in the amyloid precursor protein gene (APP692). *Brain* 123: 2130-2140.

Rossor M.N., Fox N.C., Freeborough P.A., Harvey R.J. (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 5: 393-397.

Saido T.C., Iwatsubo T., Mann D.M.A., Shimada H., Ihara Y., Kawashima S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct β amyloid peptide species, $A\beta_{N3(PE)}$, in senile plaques. *Neuron* 14: 457-466.

Sánchez de Groot N., Aviles F. X., Vendrell J., Ventura S. (2006). Mutagenesis of the central hydrophobic cluster in A β 42 Alzheimer's peptide. Side-chain properties correlate with aggregation propensities. *FEBS Journal* 273: 658–668.

Santamaría H., Manoutcharian K., Rocha L., González E., Acero G., Govezensky T., Gevorkian G. (2001). Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papilloma virus infected patients using phage display libraries. *Clin. Immunol.* 101: 296-302.

Santamaría H. (2003). Phage Display y su aplicación en el diagnóstico clínico. *Revista de Investigación Clínica* 55(6): 711-718.

Selkoe D.J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* 81(2): 741-763.

Selkoe D.J., Schenk D. (2003). Alzheimer's Disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 545-584.

Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberbug I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandeventer C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. (2004). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177.

Schenk D., Hagen M., Seubert P. (2004). Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 16: 599-606.

Sergeant N., Bombois S., Ghestem A., Drobecq H., Kostanjevecki V., Missiaen C., Watzet A., David J.P., Vanmechelen E., Sergheraert C., Delacourte A. (2003). Truncated beta-amyloid peptide species in the pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J. Neurochem.* 85: 1581-1591.

Shoosmith Berke S.J., Paulson H.L. (2003). Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPer hand on neurodegeneration. *Current Opinion in*

Genetics and Development 13: 253-261.

Sidhu S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering* 18: 57-63.

Simakova O., Arispe N.J. (2006). Early and late effects of external application of the Alzheimer's A β result from the initial formation and function of A β ion channels. *Biochem.* 45: 5907-5915.

Singer S.J., Dewji N. (2006). Evidence that Perutz's double- β -stranded subunit structure for β -amyloid also applies to their channel-forming structures in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 1546-1550.

Skovronsky D.M., Doms R.W., Lee V.M.Y. (1998). Detection of a Novel Intraneuronal Pool of Insoluble Amyloid β Protein that Accumulates with Time in Culture. *J. Cell Biol.* 141 (4): 1031–1039.

Small D.H., San Mok S., Bornstein J.C. (2001). Alzheimer's disease and A β toxicity: from top to bottom. *Nature Rev.Neurosci.* 2: 595-598.

Sompuram S.R., Kodela V., Ramanathan H., Wescott C., Radcliffe G., Bogen S. A. (2002). Synthetic Peptides Identified from Phage-displayed Combinatorial Libraries as Immunodiagnostic Assay Surrogate Quality-Control Targets. *Clin. Chem.* 48 (3): 410–420.

Soto C., Sigurdsson E.M., Morelli L., Kumar R.A., Castaño E.M., Frangione B. (1998). β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4(7): 822-826.

Soto C., Saborio G.P., Permanne B. (2000). Inhibiting the conversion of soluble amyloid- β peptide into abnormally folded amyloidogenic intermediates: relevance for Alzheimer's disease therapy. *Acta Neurol. Scand. Supplement* 176: 90-95.

Spooner E.T., Desai R.V., Mori C., Leverone J.F., Lemere C.A. (2002). The generation and characterization of potentially therapeutic A β antibodies in mice: differences according to strain and immunization protocol. *Vaccine* 21: 290-297.

Stopar D., Spruijt R.B., Wolfs C.J.A.M., Hemminga M.A. (2003). Protein-lipid interactions of bacteriophage M13 major coat protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1611: 5-15.

Tekirian T.L., Saido T.C., Markesbery W.R., Russell M.J., Wekstein D.R., Patel E., Geddes J.W.(1998). N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A β deposits. *J. of Neuropathology and Experimental Neurology* 57(1): 76-94.

Teplow D.B. (1999). Truncating the amyloid cascade hypothesis: the role of C-terminal A β peptides in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 20: 71-73.

Van Gassen G., Annaert W. (2003). Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist* 9(2): 117-126.

Vanderstichele H., De Meyer G., Andreasen N., Kostanjevecki V., Wallin A., Olsson A., Blennow K., Vanmechelen E. (2005). Amino-truncated β -Amyloid peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment. *Clin. Chem.* 51(9): 1650-1660.

Vispo N.S., Puchades Y. (2001). Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada* 18: 135-147.

Walsh D.M., Hartley D.M., Condron M.M., Selkoe D.J., Teplow D.B. (2001). In vitro studies of amyloid β -protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala⁶⁹² \rightarrow Gly) Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 355: 869-877.

Wang Z., Dickson R.D.W., Trojanowsky J.Q., Lee V.M.Y. (1999). The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Experimental Neurology* 158: 328-337.

Wang Z., Natté R., Berliner J.A., Van Duinen S.G., Vinters H.V. (2000). Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) Mutant Amyloid β -Proteins to Human Cerebral Microvessel and Aortic Smooth Muscle Cells. *Stroke* 31: 534-538.

Webster R. (2001). *Phage Display a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 1^a ed. Pp: 1.1-1.11.

Weiner H.L., Frenkel D. (2006). Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Rev. Immunol.* 6: 404-417.

Wirhth O., Multhaup G., Bayer A. (2004). A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* 91: 513-520.

Wolfe M. (2002). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Rev.* 1: 859-866.

Yu W.H., Kumar A., Peterhoff C., Shapiro Kulnane L., Uchiyama Y., Lamb B.T., Cuervo A.M., Nixon R.A. (2004). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for β -amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 2531-2540.

Yu W.H., Cuervo A.M., Kumar A., Peterhoff C., Schmidt S.D., Lee J.H., Mohan P.S., Mercken M., Farmery M.R., Tjernberg L. O., Jiang Y., Duff K., Uchiyama Y., Näslund J., Mathews P.M., Cataldo A.M., Nixon R.A. (2005). Macroautophagy-a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 171(1): 87-98.

Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Ségalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006). Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid β -peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J. Biol. Chem. Rev.* 281(4): 2151-2161.