



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DEL PÉPTIDO  $\beta$ -  
AMILOIDE PIROGLUTAMADO 3-42 PARA LA  
INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**PAULINA ALEJANDRA PONTIFES CORTES**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GOHAR GEVORGYAN  
2013**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Pontifes

Cortés

Paulina Alejandra

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

30618313-3

### 2. Datos del Tutor

Doctora

Gohar

Gevorgyan

### 3. Datos del sinodal 1

Doctor

Julio César

Carrero

Sánchez

### 4. Datos del sinodal 2

Doctora

Leonor

Huerta

Hernández

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Ignacio

Martínez

Martínez

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Perla del Rocío

Moreno

Castilla

### 7. Datos del trabajo escrito

Identificación de epítomos del péptido  $\beta$ -amiloide piroglutamado 3-42 para la inmunoterapia de la enfermedad de Alzheimer

102p.

2013.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme el espacio, los recursos y la formación que han hecho posible terminar esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y DGAPA-UNAM por el apoyo financiero brindado para realizar este trabajo: CONACyT: proyectos 58081 y 177269, DGAPA-UNAM: proyectos IN209610 e IN200713.

A la Dra. Gohar Gevorgyan por la dirección de esta tesis y por contribuir de forma decisiva a mejorar mi formación académica. Agradezco también su confianza al permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

Al Biól. Exp. Gonzalo Asariel Galindo por su apoyo en la realización de experimentos y la revisión del trabajo escrito.

A la M. En C. Patricia de la Torre por su valioso apoyo para realizar la secuenciación.

A la MVZ. Georgina Díaz Herrera y MVZ. Jorge García Rebollar, encargados del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el cuidado de los animales utilizados en este trabajo.

A los miembros del jurado por enriquecer mi trabajo con sus comentarios, correcciones y sugerencias: Dra. Gohar Gevorgyan, Dra. Leonor Huerta, M. en C. Perla del Rocío Moreno, Dr. Julio César Carrero, M. en C. Ignacio Martínez.

A mis compañeras de laboratorio: Melissa, Myriam, Yess, Susi, Dulce, Roxana. Por la inspiración, las risas, las palabras de aliento, los consejos, las enseñanzas, los jalones de oreja, las hamburguesas y por este tiempo compartido.

A Gonzalo, por tu apoyo constante, tu infinita paciencia y la palabra 'pinacate'. Gracias por inspirarme a dar más de lo simplemente necesario. Uno de los mayores gustos que he tenido en la carrera es trabajar contigo.

A mi familia, porque sin ellos nada de esto habría sido posible.

A mis amigos, por caminar a mi lado, pese a todo.

A las personas que conocí a lo largo de la carrera y que, de alguna u otra forma, contribuyeron a fortalecerme en lo intelectual y emocional.

A Lily, por compartir el entusiasmo y la motivación en este trecho final, antes de empezar nuevas etapas con mejores aires (esperemos).

A Chimal, porque la curiosidad no mata al gato. Pero sí a los ratones.

## **Dedicatoria**

Esta tesis va para los que me han visto crecer desde que era un pequeño feto y que de forma incansable e incondicional me han apoyado en todo y de todas las formas imaginables. Gracias Mamá y Papá por estar ahí a cada momento.

A mis hermanos, abue, tíos y la familia, porque los quiero. Sin su apoyo, cariño y confianza no sería lo mismo.

A todas las personas que me han inspirado a alcanzar mis metas, e ir más allá de ellas.

## Índice

Índice de figuras y tablas i

Abreviaturas ii

1. Resumen iii

2. Introducción

• Características generales de la enfermedad de Alzheimer.....	1
• Manifestación clínica de la enfermedad.....	2
• Incidencia de la enfermedad de Alzheimer.....	4
• Características patológicas.....	4
○ Características macroscópicas.....	4
○ Marañas neurofibrilares.....	5
○ Placas amiloides.....	6
○ $\beta$ -amiloide intracelular.....	8
○ Angiopatía amiloide.....	8
○ Pérdida de sinapsis.....	9
• Bases Genéticas de la enfermedad de Alzheimer.....	9
• Factores de riesgo.....	10
• Procesamiento de APP y generación de $\beta$ -amiloide.....	12
• Péptido $\beta$ -amiloide y sus implicaciones en la EA.....	14
○ Péptido $\beta$ -amiloide de longitud completa.....	14
○ Estados de agregación de $\beta$ -amiloide.....	15
○ Implicaciones de $\beta$ -amiloide en la Enfermedad de Alzheimer-Hipótesis de la Cascada Amiloide.....	18
○ $\beta$ -amiloide intracelular y oligómeros de $\beta$ -amiloide.....	21
○ Efectos de $\beta$ -amiloide en las células.....	23
• Péptidos amino-truncados piroglutamados: moléculas emergentes en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.....	24
• $\beta$ -amiloide piroglutamado 3-42 ( $\beta A_{pE3-42}$ ).....	26
○ Estructura y agregación de $\beta A_{pE3-42}$ .....	27
○ Efectos de $\beta A_{pE3-42}$ en las células.....	28
○ $\beta A_{pE34-2}$ en modelos murinos.....	29
• Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.....	30
• Terapias para la enfermedad de Alzheimer.....	31
○ Tratamientos sintomáticos.....	31
○ Tratamientos de progresión.....	32
• Inmunoterapia: modulación, eliminación y desagregación.....	33
○ Ensayos clínicos actuales con base inmunoterapéutica.....	35
○ Mecanismos de acción de los anticuerpos contra $\beta$ -amiloide.....	38
○ Lecciones aprendidas.....	39
• Mapeo de epítomos.....	40
○ Técnica de despliegue en fago filamentoso y selección por afinidad (biopanning).....	41
• Anticuerpos contra epítomos lineales en $\beta$ -amiloide.....	42
3. Antecedentes de trabajo.....	43
4. Planteamiento del Problema.....	48
5. Objetivos.....	50
• Objetivo General	

•	Objetivos Particulares	
6.	Desarrollo Experimental	51
•	Preparación de $\beta$ A 3-42 piroglutamado en forma oligomérica	51
•	Obtención del suero anti- $\beta$ A 3-42 piroglutamado	52
•	Titulación del suero inmune	52
•	Reactividad del suero de ratón anti- $\beta$ A3-42 piroglutamado contra diferentes variantes de $\beta$ A ( $\beta$ A 11-42, $\beta$ A pE 11-42, $\beta$ A 1-42, $\beta$ A pE 3-42)	52
•	Bioselección (Biopanning)	53
○	Elución de fagos de la primera ronda	54
○	Amplificación- obtención del primer amplificado	54
○	Titulación del eluido y amplificado	55
○	Purificación de clonas individuales	56
○	Purificación de fagos por doble precipitación con PEG/NaCl	56
○	Titulación de clonas obtenidas por biopanning	57
○	Obtención de ADN de cadena sencilla	57
•	Evaluación de la reactividad de clonas individuales	57
•	Secuenciación de las clonas individuales	58
•	Análisis de homología por Blastp	59
•	ELISA de competencia	59
•	Western Blot con sueros inmunes de conejo y ratón anti- $\beta$ A <sub>pE 3-42</sub>	59
7.	Resultados	61
•	Titulación del suero anti- $\beta$ A <sub>pE 3-42</sub>	61
•	Evaluación de la reactividad del suero contra diferentes fragmentos de $\beta$ A	62
•	Bioselección	63
○	Títulos de fagos obtenidos en las rondas de bioselección	63
○	Título de clonas anti- $\beta$ A <sub>pE 3-42</sub>	64
•	Reactividad de clonas individuales	65
•	Secuenciación y análisis de las clonas positivas	66
•	ELISAS de competencia	68
•	Comparación del reconocimiento entre suero de conejo y suero de ratón anti- $\beta$ A <sub>pE 3-42</sub>	70
8.	Discusión	71
9.	Conclusiones	81
10.	Perspectivas	82
	Apéndice A- Estrategias auxiliares para el tratamiento de la EA	83
	Apéndice B- Biología del fago M13	85
	Apéndice C- Esquema metodológico del proceso de biopanning	86
	Apéndice D- Caracterización por Western Blot de la preparación de oligómeros de $\beta$ A <sub>pE 3-42</sub> usada para la inmunización	87
	Referencias	88

## Índice de Figuras y Tablas

### Índice de Figuras

Figura 1. Áreas del cerebro progresivamente afectadas por la enfermedad de Alzheimer

Figura 2. Aspecto del cerebro de un individuo sin EA comparado con uno afectado por la EA.

Figura 3. Marañas neurofibrilares.

Figura 4. Placas amiloides y placas neuríticas

Figura 5. Representación esquemática del procesamiento de APP por la vía no-amiloidogénica y amiloidogénica

Figura 6. Secuencia y estructura tridimensional de  $\beta A_{1-42}$ .

Figura 7. Representación esquemática del proceso de fibrilización de  $\beta A$

Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de diferentes estados de agregación del péptido  $\beta A$

Figura 9. Representación esquemática de la acumulación intraneuronal de  $\beta A$

Figura 10. Formación del péptido  $\beta AN3$  piroglutamado

Figura 11. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los anticuerpos anti- $\beta A$

Figura 12. Representación esquemática de un epítipo continuo y uno discontinuo en el mismo antígeno

Figura 13. Curva de titulación del suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ .

Figura 14. Reactividad del suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  frente a tres variantes del péptido  $\beta A$ :  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE11-42}$ .

Figura 15. Reconocimiento de las clonas obtenidas por bioselección por el suero anti- $A\beta_{pE3-42}$  mediante una prueba ELISA.

Figura 16. Comparación de los agregados de  $\beta A$  reconocidos por sueros anti- $\beta ApE3-42$  de conejo y de ratón

Figura 17. Representación esquemática del fago filamentoso M13.

Figura 18. Esquema metodológico del proceso de bioselección que se realizó para la identificación de epítipos del péptido  $\beta ApE3-42$

Figura 19. Caracterización por Western Blot de la preparación de oligómeros de  $A\beta_{pE3-42}$ .

### Índice de Tablas

Tabla 1 Títulos de los fagos obtenidos en cada ronda de bioselección.

Tabla 2 Títulos en pfu/ml de cada una de las clonas picadas en la 3<sup>o</sup> ronda de bioselección

Tabla 3 Secuencias y densidad óptica de las clonas seleccionadas

Tabla 4 Resumen de resultados del Blastp

Tabla 5 Inhibición con tres concentraciones del péptido  $\beta A_{pE3-42}$

Tabla 6 Comparación de la reactividad de las secuencias obtenidas por bioselección con el porcentaje de inhibición

## Abreviaturas

APP	Proteína precursora amiloide (Amyloid Precursor Protein)
ABTS	2,2-azino-di-(3-etilbenziazolano-6-ácido sulfónico)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ApoE	Apolipoproteína E
$\beta$ A	Beta-amiloide
$\beta$ ApE	Beta-amiloide piroglutamado
$\beta$ ApE3-42	Beta-amiloide piroglutamado 3-42
$\beta$ ApE11-42	Beta-amiloide piroglutamado 11-42
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumine)
D.O.	Densidad óptica
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
EAE	Enfermedad de Alzheimer esporádica
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
HRP	Enzima peroxidasa de rábano
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
NFT's	Marañas neurofibrilares (neurofibrillary tangles)
PBS	Buffer salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline)
pEA $\beta$	péptido beta-amiloide truncado piroglutamado
PEG	Polietilenglicol
Pfu	Unidades formadoras de placas (Plaque forming units)
PNR	Péptido No Relacionado
QC	Glutaminil-ciclasa (Glutaminyl cyclase)
ROS	especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
Rpm	revoluciones por minuto
SD	Síndrome de Down
TBE	Tris Borato EDTA
TBS	Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-buffered saline)
VLP's	partículas tipo-virus (Viral Like Particles)
X-gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-2-D-Galactopiranosido

## Resumen

Pocos diagnósticos causan tanta angustia como ser diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer. Esta es un desorden neurodegenerativo y mortal que se caracteriza clínicamente por un proceso demencial progresivo, donde el individuo que la padece pierde gradualmente la memoria, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y la autovalía. Actualmente la enfermedad de Alzheimer afecta a más de 35 millones de personas en el mundo y está proyectada a cuadruplicarse para el año 2050. Esto la convierte en un problema social y económico de importantes dimensiones.

Una de las cuestiones esenciales ha sido determinar su causa. La evidencia a la fecha señala que la enfermedad de Alzheimer es un desorden de origen proteico. Particularmente, el péptido  $\beta A$  se ha colocado como agente central en la etiología de la enfermedad de Alzheimer, sustentando en evidencias genéticas, bioquímicas y celulares, por lo que gran parte de las estrategias terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer se han enfocado en reducir la acumulación y evitar la agregación del péptido  $\beta A$  en el cerebro. Una de las estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad de Alzheimer que más atención ha recibido es la inmunoterapia. Una amplia gama de estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales ha demostrado que la inmunoterapia es efectiva para reducir los niveles del péptido  $\beta A$ , neutralizar sus efectos tóxicos y mejorar el desempeño en pruebas cognitivas en modelos murinos.

Históricamente, el foco de interés para la inmunoterapia ha sido el péptido  $\beta A_{1-42}$ . Sin embargo se ha encontrado que las especies dominantes de  $\beta A$  en cerebros de pacientes con EA corresponden a péptidos  $\beta A$  amino-truncados piroglutamados, entre los cuales destaca el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  por su toxicidad, su tendencia a la oligomerización, su acumulación progresiva en etapas tempranas de la EA y su capacidad de actuar como semilla de agregación. Dado su papel emergente en la etiología de la EA es importante considerar al péptido  $\beta A_{pE3-42}$  en el diseño de futuros inmunoterapéuticos, ya que hasta el momento, la mayor parte de los tratamientos están basados en un epítipo inmunodominante amino-terminal de  $\beta A_{1-42}$ , que no se encuentra en los péptidos piroglutamados. Uno de los retos de la inmunoterapia es desarrollar inmunoterapéuticos más seguros (que no induzcan una respuesta inmune en detrimento del paciente) y eficaces. Una propuesta para lograr lo anterior es identificar los epítipos o mimótipos de moléculas involucradas en la patogénesis de la EA, ya que esto permitiría desarrollar tratamientos novedosos como vacunas basadas en epítipos/mimótipos.

Con el fin de identificar epítipos del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  que pudieran ser relevantes para la inmunoterapia de la enfermedad de Alzheimer, se realizó una bioselección mediante la técnica de despliegue en fago usando una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos. En el presente trabajo se demostró que el suero policlonal de ratón obtenido a partir de la inmunización con una preparación de oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  puede unirse a péptidos no-homólogos a la secuencia de  $\beta A$  pero que imitan epítipos conformacionales del péptido. Estos mimótipos son capaces de inhibir la interacción de los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE3-42}$  con el antígeno, lo cual indica que son relevantes en el reconocimiento antigénico. La obtención de mimótipos no homólogos a la secuencia lineal de  $\beta A$  indica que los anticuerpos en el suero anti  $\beta A_{pE3-42}$  reconocen epítipos conformacionales en  $\beta A_{pE3-42}$ .

Adicionalmente, en este trabajo se confirmaron hallazgos previamente reportados en nuestro grupo de trabajo, donde el suero anti  $\beta A_{pE3-42}$  reconoce exclusivamente a  $\beta A_{pE3-42}$  sin tener reacción cruzada con otras especies de  $\beta A$ . Con base en lo anterior, se plantea que el epítipo presente en  $\beta A_{pE3-42}$  es de tipo conformacional e involucra al piroglutamato en la región N-terminal.

Estos resultados son importantes puesto que los mimótipos encontrados en este trabajo pueden ayudar a diseñar inmunógenos que induzcan anticuerpos que mimeticen el efecto neutralizante de los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE3-42}$  reportados en la literatura.

## 2. Introducción

### Características generales de la enfermedad de Alzheimer

Se le denomina demencia senil a la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas que no es causada por el envejecimiento sino por algún trastorno cerebral (Nowotny *et al.*, 2001). Las alteraciones en estas capacidades llegan a ser tan severas que interfieren con las actividades cotidianas del individuo, a menudo volviéndolo completamente dependiente de los cuidados de terceras personas (Holtzman *et al.*, 2011).

La causa más común de demencia en adultos mayores es la enfermedad de Alzheimer. Se estima que entre el 60%-70% de los casos de demencia senil son atribuibles a este mal (Castellani *et al.*, 2010; Holtzman *et al.*, 2011).

Descrita por primera vez en 1907 por el médico alemán, Alois Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central. Clínicamente se caracteriza por deterioro cognitivo de progresión gradual pero implacable, y a nivel histopatológico por la presencia de agregados amiloides extracelulares en el parénquima cerebral, marañas neurofibrilares intracelulares, pérdida neuronal y de sinapsis (Castellani *et al.*, 2010). Aunque no es la única causa de demencia, sí es la más común, y se distingue de otras demencias por los marcadores histopatológicos mencionados, su patrón de desarrollo y sus causas.

Aunque su etiología aún no está completamente establecida, la evidencia a la fecha indica que la EA es un desorden de origen proteico que involucra a dos proteínas: beta-amiloide (péptido  $\beta$ A) y tau. Estas son proteínas que se encuentran de forma regular en el cerebro, pero por razones que aún no están del todo claras, en la Enfermedad de Alzheimer se acumulan como agregados extracelulares insolubles llamados placas amiloides (beta-amiloide) o marañas neurofibrilares al interior de las neuronas (tau). En años recientes se ha encontrado que  $\beta$ A también se acumula al interior de las neuronas (Wirhys y Bayer, 2012) y en la vasculatura cerebral (Castellani *et al.*, 2010).

La síntesis de investigaciones en el área señalan al péptido  $\beta$ A como agente causal de la EA. El péptido  $\beta$ A es un producto proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP). Si bien es un producto metabólico celular normal (Castellani *et al.*, 2009), en la EA se presenta una acumulación y agregación anormal del péptido  $\beta$ A en el cerebro. Esto

desencadena una serie de respuestas celulares que culminan en neurodegeneración, muerte neuronal y el declive en capacidades cognitivas asociado a la EA (Ling *et al.*, 2003; Salloway *et al.*, 2008). De acuerdo con esta propuesta, conocida como hipótesis de la cascada amiloide (HCA), la formación de marañas neurofibrilares, daño vascular y pérdida neuronal característicos de la EA son un efecto directo de la cascada de eventos neurodegenerativos causada por la acumulación de  $\beta$ A (Delacourte, 2006; Medeiros *et al.*, 2012). La HCA se sustenta en una diversidad de hallazgos genéticos, celulares, patológicos, biofísicos y de modelos animales, que de forma colectiva demuestran que la acumulación y agregación del péptido  $\beta$ A son eventos asociados a la patogénesis de la EA (Hardy y Selkoe, 2002). La presencia de intermediarios solubles neurotóxicos del péptido  $\beta$ A (Dahlgren *et al.*, 2002; Manzoni *et al.*, 2011) y la asociación entre la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A y muerte celular (Gouras *et al.*, 2010) han reforzado la implicación de  $\beta$ A como agente central en la patología de la enfermedad.

Cabe mencionar que las estrategias terapéuticas dirigidas a la reducción en la acumulación o agregación de  $\beta$ A en estudios pre-clínicos tienen potencial protector (Lemere y Masliah, 2010).

En años recientes, además de la implicación de las proteínas  $\beta$ A y tau en la etiología de la enfermedad, se han destacado otras vías celulares que también son importantes en la patogénesis de la EA (ver Pimplikar *et al.*, 2010 para una revisión del tema) por lo que esta devastadora enfermedad tiene un origen complejo que se desarrolla en el marco de un proceso intrincado como es el envejecimiento.

### **Manifestación clínica de la enfermedad**

La enfermedad de Alzheimer tiene un desarrollo lento pero irreversible y es mortal en todos los casos. Quienes la padecen viven en promedio entre 7-10 años después del diagnóstico aunque hay quienes llegan a vivir hasta 20 años (Holtzman *et al.*, 2011).

La página de la Asociación de Alzheimer (Alz.org) distingue 3 etapas clínicas que describen la progresión de los síntomas de la EA:

- EA temprana
- EA leve a moderada
- Demencia severa por EA

El progreso de la enfermedad es implacable. La patología protéica comienza en áreas muy específicas del cerebro, cuyo deterioro se refleja en los síntomas del paciente (Castellani *et al.*, 2009; Holtzman *et al.*, 2011). Los déficits cognitivos asociados a la enfermedad en cada etapa corresponden a las áreas del cerebro progresivamente afectadas durante el curso de la enfermedad (Fig. 1).

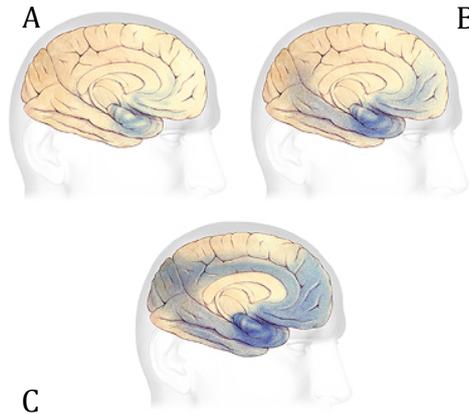


Figura 1. Áreas del cerebro progresivamente afectadas por la enfermedad de Alzheimer. Los déficits cognitivos asociados a la enfermedad en cada etapa corresponden a las áreas del cerebro afectadas durante el curso de la enfermedad. **A.** la EA comienza por afectar el hipocampo y la corteza entorrinal, áreas implicadas en la memoria. **B.** EA moderada: las áreas afectadas ahora incluyen también las áreas de la corteza temporal relacionadas con el lenguaje y emociones y la patología se extiende al lóbulo occipital afectando las áreas relacionadas a la percepción. **C.** Alzheimer severo, la patología se expande por la corteza frontal, afectando la corteza primaria motora, sensorial y el área neocortical. *Imagen modificada de [www.alz.org](http://www.alz.org)*

Los primeros síntomas se presentan como pérdida de memoria episódica, dificultad para encontrar palabras adecuadas para describir un evento y capacidad de juicio disminuido. A nivel del cerebro, las áreas afectadas son la corteza entorrinal, el hipocampo y la corteza prefrontal (Fig. 1A). Al progresar la enfermedad, empeora la pérdida de memoria y se presentan trastornos de personalidad así como dificultad para organizar los pensamientos.

En la etapa moderada (Fig. 1B), el paciente está constantemente confundido, puede perder por completo la noción del día o lugar en que se encuentra, pierde la capacidad de reconocer sus pertenencias, comienza a confundir a familiares o amigos cercanos, sufre cambios profundos en personalidad y puede presentar también alucinaciones. Experimenta también dificultades para ubicarse en relación a su entorno (problemas visuoespaciales). La pérdida de memoria declarativa es más drástica, así como la dificultad en comunicarse. Estas deficiencias comienzan a afectar su desempeño cotidiano.

La demencia severa (Fig. 1C) se caracteriza por la completa inhabilidad de las personas afectadas de cuidarse por sí mismos, requiriendo asistencia de tiempo completo. Sufren de

pérdida de memoria tanto declarativa como no-declarativa, y finalmente, su balance, coordinación y funciones regulatorias como el control de esfínteres y la respiración también son afectados. Los pacientes suelen morir de fallo respiratorio o por alguna infección.

### **Incidencia de la enfermedad de Alzheimer**

Se estima que en la actualidad más de 30 millones de personas en el mundo padecen EA, un número que puede considerarse subestimado ya que sólo incluye a las personas que presentan un cuadro clínico de demencia, y no aquellas en las primeras etapas asintomáticas de la enfermedad (Alzheimer's Disease International, 2010). Conforme aumenta la esperanza de vida y la población mundial, se estima que para el 2050 el número de afectados se cuadruplica (Holtzman *et al.*, 2011).

De acuerdo a un reporte del 2010, (Alzheimer Disease International, 2010), ese año se invirtieron aproximadamente 600 billones de dólares en cuidados para pacientes con EA, el equivalente al 1% del PIB mundial. Es el tercer problema de salud en países desarrollados, superado solamente por enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Además del enorme costo económico, esta enfermedad tiene un impacto emocional fuerte en los familiares de los enfermos por la progresión irreversible de la misma. A pesar de las investigaciones en el área, aún no hay un método de diagnóstico definitivo en vida, ya que hasta la necropsia puede confirmarse si el paciente padeció Alzheimer. Tampoco hay tratamientos efectivos para prevenir o mejorar de manera definitiva la calidad de vida de quienes padecen esta enfermedad.

En México no se cuenta con un número exacto de afectados. Sin embargo, el Instituto de Psiquiatría y Salud mental estima que en el 2010 al menos 350,000 personas padecían esta enfermedad ([www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)) De nuevo, este número está probablemente muy subestimado.

### **Características patológicas**

#### ***Características macroscópicas***

A nivel macroscópico el cerebro de pacientes que padecieron una demencia severa por EA presenta atrofia evidente. Esta se caracteriza por una disminución en el espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y reducción en el peso y el volumen comparación con personas sanas de la misma edad (Castellani *et al.*, 2010). El lóbulo frontal, temporal y gran parte de la corteza

de asociación están especialmente afectados en comparación a cerebros de individuos de la misma edad que no padecieron EA (Pul *et al.*, 2011). La reducción de tamaño en las áreas afectadas se debe a muerte neuronal y sinapsis degenerada (Figura 2).

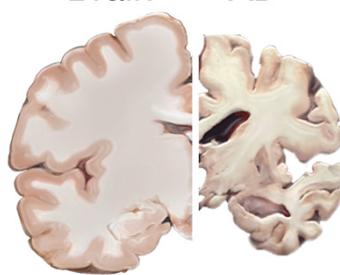


Figura 2. Comparación del cerebro de un individuo sin EA (izquierda) con uno afectado por la EA (derecha). La atrofia cerebral es evidente en la reducción del tamaño y el aumento en la profundidad de los surcos.

A nivel histopatológico la EA se distingue por la presencia de placas amiloides y marañas neurofibrilares. La presencia de estas dos lesiones características da el diagnóstico post-mortem definitivo de que un individuo padeció la enfermedad de Alzheimer.

### ***Marañas neurofibrilares***

Esta lesión se refiere a la presencia de estructuras filamentosas intracelulares (denominadas neurofibrillas o marañas neurofibrilares) conformadas por agregados de la proteína tau en estado hiperfosforilado (Fig. 3). La degeneración neurofibrilar se presenta tanto en el soma como en los axones neuronales. Morfológicamente las marañas están formadas por pares de filamentos helicoidales de aproximadamente 10 nm de diámetro cada uno (Wisniewski *et al.*, 1976).

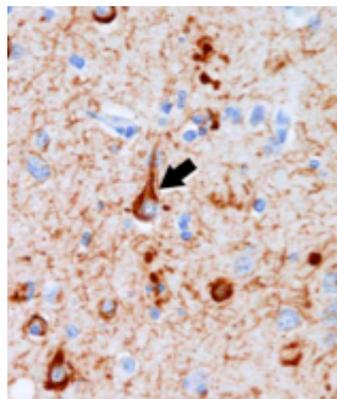


Figura 3. Marañas neurofibrilares. La flecha señala tau hiperfosforilada, proteína acumulada dentro de la neurona. 200X Tinción de inmunohistoquímica con un anticuerpo específico contra tau hiperfosforilada. Imagen tomada de Holtzman *et al.*, 2011.

El principal componente de las marañas es la proteína tau en estado hiperfosforilado. En su forma no hiperfosforilada, tau se asocia a los microtúbulos, brindando estabilidad

estructural al citoesqueleto, por lo que su papel está directamente relacionado con la integridad del sistema de transporte neuronal (Davies, 1994). En la EA, por un mecanismo que aún se desconoce, tau se hiperfosforila. La hiperfosforilación de tau altera sus propiedades de unión a los microtúbulos, favoreciendo su disociación de los mismos, así como su agregación, lo cual induce la formación de las marañas neurofibrilares (Medeiros *et al.*, 2012). La pérdida de la función normal de tau compromete el transporte axonal y contribuye a la degeneración neuronal, que culmina en la muerte celular (Praprotnik *et al.*, 1996).

Aunque la tauopatía es un evento asociado a otras enfermedades neurodegenerativas (Lei *et al.*, 2010), en la EA se distingue por su patrón de desarrollo y las isoformas de tau comúnmente involucradas (de las 6 isoformas de tau presentes en humano, las marañas neurofibrilares están compuestas predominantemente por tau 3R y 4R) (Castellani *et al.*, 2009).

La progresión de la degeneración neurofibrilar ocurre a lo largo de una vía específica de conexiones neuronales, con un orden espacio-temporal que se correlaciona con el avance de los síntomas de la EA. El grupo de trabajo de Delacourte (2006) a través de estudios bioquímicos e histológicos encontraron que en la EA, la patología de tau siempre se extiende a lo largo de diez etapas, que corresponden a áreas cerebrales afectadas de forma sucesiva. Las primeras áreas afectadas comprenden la corteza entorrinal y el hipocampo. Posteriormente la corteza temporal, las áreas de asociación polimodal y finalmente, las áreas neocorticales presentan neurodegeneración fibrilar (Delacourte, 2006). En pacientes mayores a 75 años pero sin EA también se ha encontrado neurodegeneración fibrilar en cantidades variables en la región entorrinal e hipocampal. Esto no indica que la patología de tau es un proceso neurodegenerativo inevitable por la edad, sino que hay poblaciones neuronales especialmente vulnerables a ser afectadas por tau, ya que no todos los individuos mayores a 75 años presentan marañas neurofibrilares. Sin embargo, cuando las marañas se encuentran en corteza y áreas polimodales también están presentes agregados de  $\beta$ A, como si su presencia fuera necesaria para la progresión de la tauopatía (Delacourte, 2006).

### ***Placas amiloides***

Las placas amiloides son agregados de origen protéico que se ubican en el espacio extracelular de las neuronas. Estas lesiones miden entre 10-200  $\mu$ m de diámetro (Castellani *et al.*, 2010) y suelen tener una forma esférica.

En pacientes con EA las placas son abundantes en el sistema límbico (específicamente en la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala) y la corteza cerebral (Musiek y Holtzman, 2012).

Las placas amiloides (Fig. 4) están compuestas principalmente por agregados del péptido beta-amiloide ( $\beta$ A). Análisis bioquímicos detallados han descrito la presencia de una variedad de especies amiloides, que difieren en su longitud (entre 38-43 aminoácidos), en su integridad (péptidos amino-truncados) o en sus modificaciones (péptidos piroglutamados) (Castellani *et al.*, 2010). Estas diferencias se discutirán más tarde al abordar en detalle el procesamiento de APP, ya que las diferentes variantes amiloides poseen propiedades particulares que son importantes en el proceso patológico en el que está implicado  $\beta$ A.

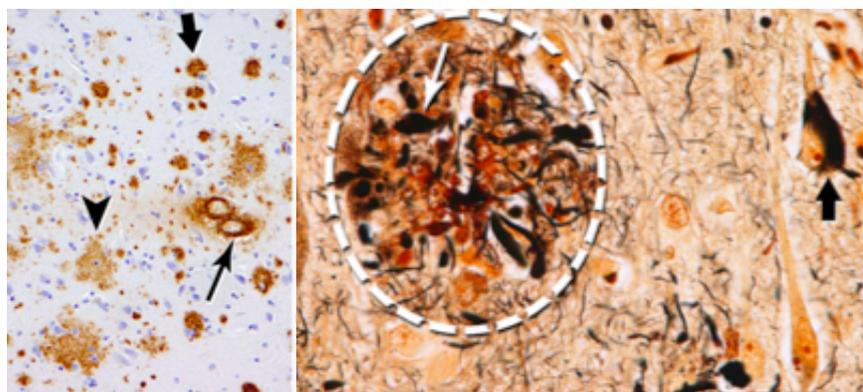


Figura 4. Placas amiloides y placas neuríticas. Izquierda. Una tinción inmunohistoquímica del cerebro de un paciente que padeció EA revela la presencia de placas amiloides difusas (flecha larga), placas compactas (flecha mediana) y angiopatía cerebral amiloide (flecha pequeña) 100X. Derecha. Microfotografía de una placa neurítica (círculo punteado). Las neuritas distróficas están señaladas con la flecha negra, y marañas neurofibrilares señaladas con la flecha blanca. 400X. Imágenes tomadas de Holtzman *et al.*, 2011).

Las placas amiloides también están asociadas a otros componentes como lípidos, colesterol, apoE, metales como Zn y Cu (Jomova *et al.*, 2010) y elementos de la matriz extracelular.

Cuando las placas amiloides están asociadas a neuritas inflamadas y distróficas se les denomina placas neuríticas. Este tipo de placas presentan un depósito focal o núcleo conformado por agregados de beta-amiloide. El depósito focal se encuentra a menudo rodeado por microglía activada y  $\beta$ A soluble (Duyckaerts *et al.*, 2009).

Alrededor de las placas neuríticas también se observa gliosis reactiva, caracterizada por hipertrofia y alteración en la morfología de astrocitos y microglía, lo cual es indicativo de una respuesta inflamatoria (Weiner y Frenkel, 2006).

Dependiendo del estado de agregación de  $\beta$ A en las placas y la estructura secundaria que adopte, las técnicas de tinción permiten diferenciar placas compactas o difusas. Las placas compactas miden entre 10-50  $\mu$ m de diámetro y predomina la forma fibrilar del péptido que adopta una conformación de beta-plegada, lo cual le permite interactuar y ser detectada por reactivos como rojo de congo y Thioflavina S (ThioS) (Castellani *et al.*, 2010). Las placas difusas no adoptan una conformación  $\beta$ -plegada y no tiñen con estos reactivos.

### ***$\beta$ -amiloide intracelular***

Además de los depósitos extracelulares hay acumulación y agregación de  $\beta$ A al interior de las neuronas, principalmente en neuronas piramidales del hipocampo, así como neuronas de la corteza entorrinal (Gouras *et al.*, 2012; Wirths y Bayer, 2012).

Por Western Blot, inmunohistoquímica y microscopía se ha determinado que el  $\beta$ A intraneuronal en condiciones de EA tiene una acumulación aberrante en endosomas en axones, dendritas y los compartimentos post y pre-sinápticos de las neuronas. Así mismo, se ha reportado pérdida de marcadores sinápticos como la sinaptofisina, la cual se ha asociado a degeneración de sinapsis inducida por la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A (Medeiros *et al.*, 2012). Se ha reportado también que las neuronas donde se encuentra  $\beta$ A intracelular son las que desarrollan marañas neurofibrilares (Oddo *et al.*, 2003; Delacourte, 2006).

Es importante señalar que la acumulación intraneuronal es un evento temprano en la EA. Evidencia creciente señala que este evento es uno de los motores patológicos de la enfermedad, involucrando especies amiloides tóxicas y disfunción en la degradación de monómeros de  $\beta$ A (Wirths y Bayer, 2012).

### ***Angiopatía amiloide***

Además de acumularse extracelular e intracelularmente,  $\beta$ A también se deposita en vasos sanguíneos cerebrales. La angiopatía amiloide es consecuencia de la acumulación del péptido beta-amiloide en la vasculatura cerebral (Gouras *et al.*, 2005). La afección se desarrolla en arteriolas, vénulas y capilares. La acumulación de  $\beta$ A induce anomalías estructurales en los vasos capilares, de tal manera que las células musculares de la vasculatura mueren y la pared arterial es completamente reemplazada por el péptido acumulado (Biron *et al.*, 2011). Como consecuencia de esto se desarrollan en el cerebro hemorragias lobulares e infartos corticales (Vinters, 1987).

Cabe destacar que no todos los pacientes que padecen EA desarrollan angiopatía amiloide,

ni todos los pacientes que padecen angiopatía amiloide padecen esta enfermedad (Castellani *et al.*, 2010).

### ***Pérdida de sinapsis***

Mediante el uso de marcadores sinápticos (como la sinaptofisina) y métodos de cuantificación por microscopía electrónica e inmunohistoquímica, se ha documentado una pérdida en densidad sináptica principalmente en la corteza de asociación y el hipocampo en pacientes que padecieron EA, donde la pérdida de densidad sináptica se correlaciona con el grado de demencia (Walsh y Selkoe, 2004).

La pérdida neuronal en regiones especialmente afectadas como el hipocampo puede llegar hasta un 60%. Sin embargo, en comparación a la pérdida de neuronas por muerte neuronal en áreas como la corteza de asociación, hay una mayor pérdida de densidad sináptica, lo que sugiere que hay un proceso neurodegenerativo que afecta a las sinapsis previo a la pérdida de las neuronas en su totalidad (Dekosky y Scheff, 1990).

Cabe destacar además que las deficiencias en marcadores como la sinaptofisina se han observado incluso antes de la aparición de placas neuríticas.

### **Bases Genéticas de la Enfermedad de Alzheimer**

La EA es una condición heterogénea, que difiere en la edad de inicio, sintomatología clínica, extensión y distribución de los cambios patológicos, presencia o ausencia de mutaciones germinales, o de otros muchos factores de riesgo (Castellani *et al.*, 2009).

De todos los casos reportados de EA, aproximadamente el 5% (Bali *et al.*, 2012) presentan un patrón de herencia autosómico dominante y la enfermedad se desarrolla generalmente entre los 30 y 65 años (Kehoe, 2008). A este subtipo se le conoce como Enfermedad de Alzheimer familiar (EAF). Sin embargo, la mayoría de los casos no presentan un patrón claro de herencia, por lo que se le ha denominado a esta condición Enfermedad de Alzheimer esporádico (EAE) (Bali *et al.*, 2012). Sin embargo, por las similitudes clínicas e histológicas entre la forma familiar y esporádica de la EA se plantea que hay una vía común de neurodegeneración (Nowotny *et al.*, 2001).

Hay tres genes cuyas mutaciones están directamente involucradas en el desarrollo del subtipo de Alzheimer familiar (EAF) : el gen de APP, el gen PSEN1 y PSEN2 (Medeiros *et al.*, 2012).

El gen de APP (cromosoma 21) codifica para la proteína precursora amiloide (APP) cuya proteólisis por la vía amiloidogénica genera al péptido  $\beta$ A. Las mutaciones en APP relacionadas con la EA consisten en cambios en los aminoácidos alrededor de los sitios de corte de las enzimas proteolíticas. Estos cambios provocan un aumento en el procesamiento amiloidogénico de APP (es decir, que se produzca más  $\beta$ A) o que las variantes de  $\beta$ A generadas sean más propensas a formar agregados amiloides (Selkoe, 2001).

PSEN1 y PSEN2 son genes que codifican para las presenilinas 1 y 2, respectivamente, que están involucradas directamente en el procesamiento proteolítico de APP (Kehoe, 2008). Mutaciones en PSEN1 representan la mayor parte de los casos del subtipo familiar de Alzheimer (40%) y son responsables de las formas más severas de la enfermedad. La gran mayoría de estas mutaciones se deben al cambio de una base en el genoma que da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína. Las mutaciones en PSEN2 son menos frecuentes (Rogaeva *et al.*, 2006). Las mutaciones en APP asociadas a la EAE pueden acelerar su agregación o aumentar la producción de especies amiloidogénicas de  $\beta$ A. En cuanto a las mutaciones para PSEN1 y PSEN2 sólo se han encontrado mutaciones que aumentan la producción de especies amiloidogénicas (Tanzi y Bertram, 2005).

Recientemente también se ha reportado que las mutaciones en PSEN1 pueden afectar el metabolismo de  $\beta$ A por mecanismos no proteolíticos. Las presenilinas endógenas juegan un papel en la autofagia, mecanismo esencial de degradación de proteínas agregadas y organelos dañados (Pimplikar *et al.*, 2010). Mutaciones en PSEN1 relacionadas también con la EA inducen una desregulación en el sistema autofágico lisosomal, que exacerba la acumulación de  $\beta$ A (Medeiros *et al.*, 2012).

### **Factores de riesgo**

En el subtipo de EA esporádico (EAE) no se han reportado mutaciones que puedan asociarse directamente al desarrollo de la enfermedad como en el caso del subtipo familiar, pero se han detectado factores genéticos que predisponen a quien los posee a padecer EA.

El más destacado de estos factores de riesgo es poseer el alelo  $\epsilon$ 4 de la Apolipoproteína E (ApoE). Se ha estimado que los homocigotos para el alelo  $\epsilon$ 4 representan sólo entre el 1-

2% de la población mundial, mientras que los heterocigotos para el alelo  $\epsilon 4$  componen aproximadamente el 30% de la población (Golde *et al.*, 2011). Poseer una copia de este alelo aumenta tres veces el riesgo de padecer EA; poseer ambas copias de este alelo lo aumenta hasta doce veces (Hashimoto *et al.*, 2012), hallazgo que se sostiene a nivel de la población humana (Tanzi y Bertram, 2005). Poseer esta isoforma también reduce la edad a la que se presenta la demencia por EA hasta en 20 años (Holtzman *et al.*, 2011).

ApoE es la apolipoproteína predominante en el sistema nervioso central (SNC), producida mayormente por astrocitos. Está involucrada en el metabolismo del colesterol: específicamente regula la distribución y homeostasis del colesterol en el SNC, actividades esenciales para mantener estructura, integridad y función de las membranas celulares y sinapsis (Mahley *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

En el humano, ApoE se presenta en tres isoformas: apoE $\epsilon 2$ , apoE  $\epsilon 3$  y apoE $\epsilon 4$ , que difieren solamente en dos residuos de aminoácidos (Lee *et al.*, 2012).

El mecanismo molecular mediante el cual apo $\epsilon 4$  está implicado en la patogenia de la EA no ha sido del todo esclarecido, pero se ha establecido experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* que ApoE influye en el metabolismo de  $\beta A$  (Cramer *et al.*, 2012). Es capaz tanto de interactuar directamente con el péptido (Hashimoto *et al.*, 2012) como de influir en su proteólisis de manera indirecta a través de la regulación de los niveles de colesterol celular (Lee *et al.*, 2012; Cramer *et al.*, 2012;). La interacción directa es dependiente de la isoforma, donde apo $\epsilon 4$  presenta una mayor capacidad de interactuar con  $\beta A$  (Holtzman *et al.*, 2011) y menor capacidad de promover su degradación (Lee *et al.*, 2012) De hecho, los pacientes que poseen uno o dos alelos de apo $\epsilon 4$  poseen hasta 2.7 veces más  $\beta A$  solubles que los pacientes que poseen cualquiera de las otras dos isoformas (Hashimoto *et al.*, 2012).

Además se ha observado que estos mismos pacientes tienen niveles más altos de  $\beta A$  en forma oligomérica. Los oligómeros de  $\beta A$  a su vez han sido asociado a perturbaciones de la función sináptica y actividad neuronal (Cramer *et al.*, 2012).

Por lo anterior se ha propuesto que apo $\epsilon 4$  fomenta la formación de oligómeros y una vez formados los estabiliza. Además al unirse con  $\beta A$  los oligómeros formados pueden escapar a la proteólisis o fagocitosis (Hashimoto *et al.*, 2012). Por el contrario, la isoforma apo $\epsilon 2$  facilita la degradación de  $\beta A$  y se considera que es un alelo protector (Poirier, 2006). Sin embargo, se ha estimado que sólo el 50% de los pacientes que padecen Alzheimer presentan

el alelo apoε4, por lo cual presentar esta isoforma no es factor suficiente o necesario para inducir la EA.

El factor de riesgo demográfico más importante es la edad- después de los 65 años la probabilidad de padecer EA se duplica cada 5 años, de manera que las personas mayores de 85 años tienen una probabilidad del 40% de presentar la enfermedad, lo que sugiere que hay un proceso relacionado directamente con el envejecimiento en el desarrollo de la EA (Castellani *et al.*, 2010).

Además de los factores mencionados anteriormente, también se han asociados factores de riesgo no genéticos a la enfermedad. Traumatismo craneal, consumo de dietas altas en colesterol, metabolismo desregulado del colesterol, obesidad, padecer diabetes tipo II, exposición a ciertos metales como el cobre y el hierro e incluso tener un estilo de vida sedentario (Mayeux, 2003).

### **Procesamiento de APP y generación de β-amiloide**

Como se mencionó anteriormente, en la EA hay una acumulación específica de especies tóxicas del péptido βA, que derivan de la proteína precursora amiloide, APP.

APP es una glicoproteína integral de membrana tipo I de 120 kDa, codificada en el exón 19 del cromosoma 21. La proteína completa tiene una porción N-terminal extracelular relativamente grande, una porción transmembranal y un dominio C-terminal citoplásmico (Castellani *et al.*, 2009). Esta proteína está altamente conservada filogenéticamente y se expresa de manera constitutiva en plaquetas, linfocitos periféricos, leucocitos, células endoteliales, músculo liso, astrocitos, microglía y neuronas (Holtzman *et al.*, 2011).

La APP tiene al menos un sitio de unión de alta afinidad a heparina en la porción N-terminal (Multhaup *et al.*, 1995), un sitio de unión a colágeno, un motivo de unión a integrina (Ghisso *et al.*, 1992) así como la capacidad de unirse a laminina, colágeno y a proteoglicanos heparán-sulfato (Breen *et al.*, 1991).

Entre las funciones reportadas para APP se le ha implicado como promotor de adhesión celular (Schuber *et al.*, 1989) y en la migración de neuronas recién diferenciadas a corteza cerebral (Weiner y Frenkel, 2006). La similitud entre APP y receptores de superficie

celular (Kang *et al.*, 1987) sugieren que APP podría fungir como receptor en el transporte intracelular de vesículas sinápticas a través de la interacción con kinesinas y microtúbulos (Kamal *et al.*, 2001).

Existen varias isoformas de APP generadas por splicing alternativo, donde los transcritos más comunes son APP751, APP770 y APP695 (Castellani *et al.* 2009). Este último es la isoforma predominante en las neuronas, y a diferencia de las otras dos isoformas no posee el dominio KPI que corresponde a un inhibidor de serín-proteasas (Ling *et al.*, 2003). Sin embargo, el análisis de cerebros de pacientes que padecieron EA ha encontrado que las isoformas con dominio KPI son más abundantes y que estas isoformas son más amiloidogénicas que APP695 (Ling *et al.*, 2003;)

Hay dos vías para el procesamiento de APP: la vía amiloidogénica y la no-amiloidogénica, que difieren en las enzimas de corte y los productos de la proteólisis (Fig. 5).

En la vía no amiloidogénica APP es cortado por  $\alpha$ -secretasa y libera dos fragmentos: el fragmento N-terminal soluble llamado sAPP $\alpha$  y un péptido denominado C83. La vía amiloidogénica involucra a la aspartil-proteasa BACE-1 (también llamada  $\beta$ -secretasa), cuyo corte libera sAPP $\beta$  (fragmento soluble N-terminal) y al péptido C99.  $\beta$ -secretasa es la enzima limitante para la generación de  $\beta$ A (Ling *et al.*, 2003).

Los péptidos generados a partir del primer corte son procesados por  $\gamma$ -secretasa, una enzima multimérica cuya composición incluye a PS1/PS2, nicastrina, APhi y PEN2 (Tanzi y Bertram, 2005). El procesamiento de C83 por  $\gamma$ -secretasa genera al péptido p3, mientras que el corte de C99 por la misma enzima genera al péptido  $\beta$ A (Golde *et al.*, 2000). Dependiendo del sitio de corte de la  $\gamma$ -secretasa en C99, se producen fragmentos de  $\beta$ A de diferentes longitudes (entre 38 y 43 aminoácidos), donde el fragmento fisiológico dominante en personas sanas es A $\beta$ 1-40, al cual se le han atribuido propiedades antioxidantes (Castellani *et al.*, 2009).

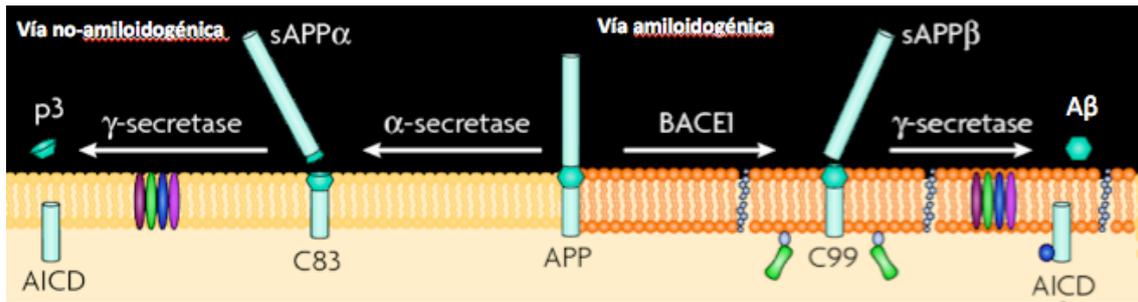


Figura 5. Representación esquemática del procesamiento de APP por la vía no-amiloidogénica y amiloidogénica. Modificado de LaFerla, 2008.

No se sabe con seguridad qué es lo que determina que APP se procese por una u otra vía, pero se ha asociado a las caveolinas con esta determinación (Ikezu *et al.*, 1998): El bloqueo de la expresión de caveolina-1 inhibe el corte por  $\alpha$ -secretasa, mientras que la sobreexpresión de caveolina-1 promueve el procesamiento de  $\beta$ A por la vía no-amiloidogénica (Ikezu *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2003).

El corte por  $\gamma$ -secretasa libera también un dominio intracelular, AICD que forma un complejo multimérico con la proteína adaptora nuclear Fe65 y la histona acetil-transferasa TIP60 (Ling *et al.*, 2003). A este complejo se le ha implicado en la inducción de la expresión de diversos genes (p53, glicógeno sintetasa, neprilisina, ACE1, ACE2 y LRP1, reportados por McLean y colaboradores (1999) y vías de señalización celular mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (De Kimpe *et al.*, 2012)

También se han reportado que el fragmento sAPP $\alpha$  tiene posibles papeles fisiológicos en las terminales presinápticas en respuesta a la actividad eléctrica, ya que reportes indican que puede estar involucrado en la regulación de la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y procesos como el aprendizaje y la memoria, posiblemente a través de unión a receptores de superficie celular que modulen la actividad de canales de potasio y activen la transcripción del factor NF- $\kappa$ B (Scheuner *et al.*, 1996).

Sin embargo, a pesar de los diversos trabajos en el área, aún no está claro el papel fisiológico que estos productos de la proteólisis de APP puedan tener en el organismo (Ling, 2003).

### **Péptido $\beta$ -amiloide y sus implicaciones en la EA**

#### ***Péptido $\beta$ -amiloide de longitud completa***

$\beta$ A es un péptido anfifílico de 4 kDa, entre 38-43 aminoácidos de longitud (Castellani *et al.*, 2009). La generación de péptidos de distintas longitudes depende del corte enzimático de la

$\gamma$ -secretasa.  $\beta$ A se encuentra a concentraciones entre 1-10 nM como un componente normal de fluidos biológicos como fluido cerebroespinal y plasma. Las variantes que se producen predominantemente en condiciones normales son  $\beta$ A<sub>1-40</sub> y  $\beta$ A<sub>1-42</sub>: en personas sanas (sin demencia por Alzheimer), aproximadamente el 90% del  $\beta$ A en circulación es la variante  $\beta$ A<sub>1-40</sub>, que es una variante más soluble. El 10% restante corresponde a  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Sinha y Lieberburg, 1999).

En estado monomérico, a  $\beta$ A se le ha implicado en diversas funciones biológicas como promover la adhesión celular, fungir como neurotrófico y neuroprotector y como regulador negativo de la transmisión sináptica excitatoria (Giuffrida *et al.*, 2010). Se ha encontrado que también presenta actividad antioxidante y como quelante de iones metálicos tóxicos, ya que posee la capacidad de actuar como un secuestrador de radicales libres y unirse a iones metálicos. (Kontush *et al.*, 2001).

El extremo C-terminal de  $\beta$ A es rico en aminoácidos hidrofóbicos, mientras que el extremo N-terminal tiene aminoácidos principalmente hidrofílicos (Perchiacca *et al.*, 2012). Este péptido puede asumir una amplia variedad de estados conformacionales.

### ***Estados de agregación de $\beta$ -amiloide***

Por resonancia magnética nuclear se ha logrado obtener la estructura tridimensional de la conformación nativa del péptido  $\beta$ A (Fig. 6): Los residuos 1-9 poseen un arreglo lineal o extendido; los residuos 10-26 presentan alfa-hélice, hay giro beta (reverse turn) en los residuos 27-30 y de nuevo alfa-hélice en los residuos 31-39) (Castellani *et al.*, 2009).

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA**

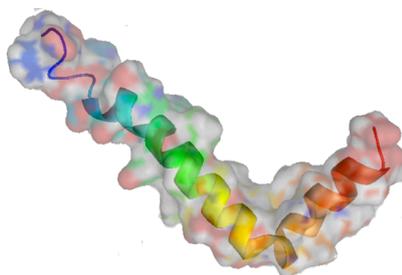


Figura 6. Secuencia y estructura tridimensional de  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. Imagen de estructura tridimensional basada en datos de Protein Data Bank (PDB\_ID 1IYT).

Bajo ciertas condiciones, la conformación nativa de  $\beta$ A se modifica a una estructura diferente, es decir que ocurre un proceso de mal plegamiento o desplegamiento. Se ha propuesto que bajo estas condiciones, la estructura de la alfa-hélice en la porción N-

terminal se desestabiliza por interacciones electrostáticas no favorables. Esta inestabilidad facilita la asociación entre otros monómeros mal plegados de  $\beta A$  (Di Carlo, 2010) lo que genera agregados del péptido (Fig. 7). El proceso de asociación intermolecular genera agregados altamente ordenados en estructura de  $\beta$ -plegada denominados fibrillas, que son la estructura dominante en las placas amiloides (Tycko, 2003). A este proceso se le denomina fibrilización.



Figura 7. Representación esquemática del proceso de fibrilización de  $\beta A$ , indicando los estados de agregación intermedios en la formación de fibrillas. Las flechas indican que el equilibrio de formación de agregados es dinámico. Modificado de Makar *et al.*, 2011.

En el proceso de fibrilización de  $\beta A$  pueden destacarse los siguientes eventos: ocurren cambios conformacionales que promueven la interacción entre monómeros, lo cual conlleva a la oligomerización del péptido, seguido por procesos de nucleación, elongación y ramificación (Di Carlo, 2010).

El primer estado de agregación de  $\beta A$  son los oligómeros. Estos son complejos multiméricos que pueden ser de bajo (dímeros, trímeros, tetrámeros) o alto peso molecular (dodecámeros). Poseen alto grado de polimorfismo y representan los intermediarios más tempranos en el proceso de fibrilización.

En imágenes de microscopía electrónica (ME), los oligómeros parecen esféricos (Fig. 8) Se han propuesto diversos modelos para la estructura de los oligómeros, aunque aún no hay un consenso con respecto a la forma tridimensional de estos. La dificultad radica en que caracterizar la estructura de un estado conformacional por métodos tradicionales como NMR o cristalografía es complicado por su labilidad y su heterogeneidad, ya que la incubación de monómeros genera una variedad de oligómeros e intermediarios (Fändrich, 2012).

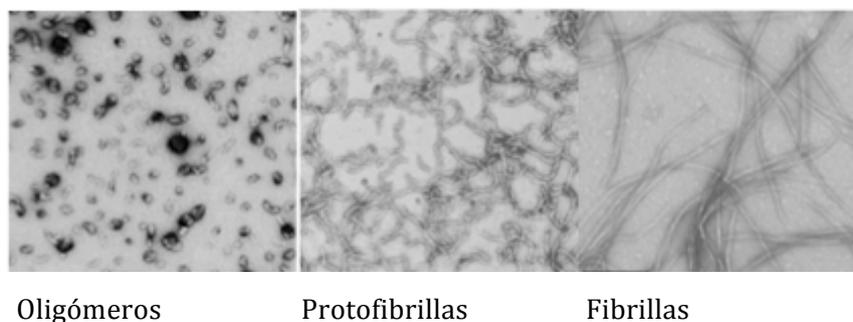


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de diferentes estados de agregación del péptido  $\beta A$ . Barra de escala representa 200 nm. Tomado de Fändrich, 2012.

De acuerdo a estudios de espectroscopía realizados por Ahmed y su grupo (2010), la estructura de los oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  corresponde a pentámeros discoideos y decámeros, donde el extremo hidrofóbico C-terminal se encuentra orientado hacia el centro del oligómero. Estos pueden continuar asociándose entre ellos y formar complejos multiméricos como decámeros y dodecámeros (Ahmed *et al.*, 2010).

En contraste, se ha encontrado que las fibrillas poseen una estructura de  $\beta$ -plegada altamente ordenada. De acuerdo a los datos de diversos grupos de trabajo (Ahmed *et al.*, 2010; Fändrich, 2012; Perchiacca *et al.*, 2012), para la que los oligómeros formen fibrillas debe haber rearrreglos estructurales significativos, involucrando a otros intermediarios.

Los intermediarios estructurales más cercanos a las fibrillas son las protofibrillas. En imágenes de ME se distinguen de los oligómeros por su forma elongada y linear (Fig. 7). Presentan cierto nivel de estructura de  $\beta$ -plegada. Se ha propuesto que las protofibrillas pueden fungir como núcleos de agregación para la formación de fibrillas. En solución se forman lentamente, pero desaparecen con rapidez para originar fibrillas. Sin embargo, por la naturaleza dinámica de la agregación de  $\beta A$ , las protofibrillas también pueden disociarse en oligómeros (Morgado y Fändrich, 2011).

Las fibrillas que conforman las placas son el último estado de agregación de  $\beta A$ . Son estructuras altamente ordenadas, formadas por láminas beta-plegada acomodadas en paralelo al eje fibrilar. En esta estructura, las subunidades de la fibrilla se doblan sobre su extremo C-terminal (hidrofóbico) para adoptar una conformación de  $\beta$ -giro- $\beta$  (Ahmed *et al.*, 2010) Estas subunidades se polimerizan de forma paralela en las fibrillas, que son el componente principal de las placas neuríticas.

Diversos trabajos han encontrado que los agregados (particularmente los oligómeros) se forman preferencialmente al interior de la célula en procesos neuronales y sinapsis. Es posible que las condiciones favorables para la formación de agregados ocurra al interior de las células, ya que se ha encontrado que  $\beta A$  tiende a acumularse en endosomas y otros compartimentos intracelulares (Walsh *et al.*, 2004; Wirths *et al.*, 2009).

Se han reportado además diferencias en la capacidad de agregación de las variantes más largas y amino-truncadas de  $\beta A$ , lo cual influye en sus propiedades (Jawhar *et al.*, 2011;

Manzoni *et al.*, 2011). En estudios recientes se ha demostrado que los oligómeros tienen un papel central en la perturbación de la función sináptica, son significativamente más tóxicos que las fibrillas para las neuronas, y que la toxicidad de  $\beta$ A se reduce conforme se forman fibrillas (Ahmed *et al.*, 2010).

Es importante recalcar que la conformación de  $\beta$ A varía en función de su estado de agregación, y que a su vez, la toxicidad del péptido depende del estado de agregación (Manzoni *et al.*, 2011).

Por ello, a pesar de la complejidad involucrada en determinar su estructura, datos precisos sobre la conformación espacial de los distintos estados de agregación de  $\beta$ A es deseable para entender las propiedades biológicas de los oligómeros así como el diseño de ligandos específicos a la estructura de los oligómeros.

### ***Implicaciones de $\beta$ -amiloide en la EA- Hipótesis de la cascada amiloide***

La producción de  $\beta$ A es un proceso fisiológico normal; puede detectarse el péptido tanto en plasma como en fluido cerebroespinal en controles sanos y en pacientes con EA (Castellani *et al.*, 2009).

Sin embargo, en la EA hay una acumulación anómala y patológica de  $\beta$ A en el parénquima cerebral. La síntesis de las investigaciones en el área han llevado a proponer que la acumulación de  $\beta$ A en el cerebro induce una cascada de eventos neurodegenerativos que incluyen neuroinflamación crónica, muerte neuronal y un declive gradual pero progresivo de las capacidades cognitivas (Golde *et al.*, 2011).

La identificación de  $\beta$ A como el principal componente de las placas amiloides en pacientes que murieron por EA, así como la asociación de las placas con neuritas distróficas en estudios histopatológicos fueron los primeros indicadores de la asociación de la EA y el péptido  $\beta$ A (Verdile *et al.*, 2004).

Posteriores evidencias genéticas contribuyeron a la implicación de  $\beta$ A como factor cardinal en el desarrollo de la EA. La trisomía 21 (o síndrome de Down) es una condición donde el individuo hereda una copia extra del cromosoma 21. APP está localizada en este mismo cromosoma (loci 21q), y los pacientes con SD presentan una patología tipo EA de manera prematura- a los 35 años exhiben una marcada acumulación de  $\beta$ A cerebral, y en promedio a los 50 años desarrollan demencia (Holtzman *et al.*, 2011).

Curiosamente, se reportó el caso de una paciente con SD que presentaba una ruptura en el brazo largo del cromosoma (21q) donde se encuentra codificada APP. Esta paciente no desarrolló ninguna patología tipo Alzheimer (Prasher *et al.*, 1998).

Las mutaciones genéticas asociadas a la forma familiar de la EA están en su mayoría implicadas en la alteración de la producción o las propiedades de  $\beta$ A y ocurren directamente en APP o en las enzimas asociadas a su procesamiento proteolítico: La mutación APP Swe (Lys 595/Met 596 Asn/Leu) promueve el corte de APP por la  $\beta$ -secretasa, mientras que las mutaciones en PSEN1 y PSEN2 generan niveles más altos de A $\beta$ 1-42 (péptido más fibrillogénico) (Gouras *et al.*, 2010).

Otras mutaciones asociadas a la forma familiar de la enfermedad ocurren a nivel de  $\beta$ A, no del proceso proteolítico. Se han encontrado mutaciones C-terminales que aumentan la propensión de  $\beta$ A a oligomerizarse, fibrilizarse o ser más resistente a la degradación (Holtzman *et al.*, 2011), por ejemplo, se ha reportado que la mutación V717F en APP genera oligómeros estables tanto intracelular como extracelularmente (Walsh y Selkoe, 2004).

El estudio de estas mutaciones ha permitido el desarrollo de modelos transgénicos murinos que desarrollan una patología similar a la EA, incluyendo los marcadores histopatológicos característicos de la enfermedad, disfunción neuronal y déficits cognitivos progresivos conforme avanza la patología amiloide, cambios reminiscentes de la EA en humanos (Walsh y Selkoe, 2004).

En estos modelos, las estrategias dirigidas a reducir la carga amiloide han reportado mejoras cognitivas en general (Lemere y Masliah, 2010), lo cual apoya también el papel central de  $\beta$ A.

Otras evidencias que ubican el péptido  $\beta$ A como agente central de la EA es que las estrategias dirigidas a disminuir la acumulación de  $\beta$ A disminuyen también la cantidad de marañas neurofibrilares y otras alteraciones neuronales propias de la EA (Medeiros *et al.*, 2012). Más aún, las estrategias dirigidas a disminuir la fosforilación de tau no afectan a los agregados amiloides u otras características patológicas de la enfermedad.

Los primeros estudios *in vitro* que evaluaron la toxicidad del péptido en cultivos neuronales (Hardy y Higgins, 1992) trabajaron con  $\beta$ A en su conformación fibrilar, ya que esta es la

conformación predominante en las placas neuríticas, y encontraron evidencias de neurotoxicidad del péptido.

Las anteriores resultados llevaron al grupo de trabajo de Hardy y Higgins en 1992 a proponer la hipótesis de la cascada amiloide. De acuerdo a esta hipótesis, la acumulación extracelular de  $\beta$ A fibrilar inducía la cascada de eventos neurodegenerativos asociados a la EA (Hardy y Higgins, 1992). Sin embargo, estudios posteriores tanto en modelos animales como en humanos no lograron establecer una correlación clara entre la cantidad de placas con el progreso de la enfermedad, e incluso en pacientes cognitivamente intactos podían apreciarse placas amiloides de tipo difusas (Golde *et al.*, 2011). También se encontró que las alteraciones fisiológicas y neuríticas (como la pérdida de marcadores sinápticos) están presentes desde antes de la formación de agregados extracelulares, por lo que no podía atribuírseles la etiología de la EA como proponía la hipótesis original. Posteriormente se encontró que no eran las placas amiloides, sino la cantidad de oligómeros solubles de  $\beta$ A que se correlacionaban con la severidad de la enfermedad (Selkoe, 2008).

Aunque las fibrillas ya no se consideran la causa de la neurodegeneración como proponía la hipótesis amiloide original, esto no quiere decir que las placas amiloides no estén involucradas en el proceso patológico de la EA (Fändrich, 2012). Alrededor de las placas neuríticas se ha encontrado microglía activada, lo cual es indicativo de una respuesta inflamatoria. La inflamación crónica observada en pacientes con EA es un fenómeno cuyos efectos pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales dependiendo de la cronología (Castellani *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que las placas inducen la activación de la cascada de complemento (Weiner y Frenkel, 2006), lo cual puede tanto reclutar células de la microglía para degradar las placas, así como activar el complejo de ataque a membrana, lo que puede afectar a las neuronas. Asimismo, la activación de microglía por citosinas proinflamatorias puede ayudar a degradar las placas amiloides, pero una liberación excesiva y una inflamación crónica contribuyen a la neurodegeneración. También se ha reportado en experimentos *in vitro* que la microglía activada por la presencia de  $\beta$ A puede inducir un aumento en la producción de ROS (Coraci *et al.*, 2002).

Aunque se ha modificado a la luz de estos hallazgos, la idea esencial de la hipótesis de la cascada amiloide permanece igual, en el sentido de que la acumulación de  $\beta$ A induce una

cascada de eventos neurodegenerativos que generan déficit cognitivo progresivo (Walsh y Selkoe, 2004), ya que la evidencia reciente señala que la patogénesis de la EA inicia al interior de las neuronas y depende del estado de agregación de  $\beta$ A.

### ***$\beta$ -amiloide intracelular y oligómeros de $\beta$ -amiloide***

El refinamiento de métodos de visualización por inmunohistoquímica permitió observar la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A en pacientes con EA, SD y modelos murinos (LaFerla *et al.*, 2007). En pacientes con SD la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A antecede a la formación de placas amiloides (Gyure *et al.*, 2001), cronología que también se ha reportado para modelos murinos de la EA (Medeiros *et al.*, 2012).

Al interior de las neuronas  $\beta$ A es capaz de oligomerizarse (Walsh *et al.*, 2000), por lo cual se ha sugerido que oligomerización intraneuronal de  $\beta$ A es un evento temprano en la EA (Gouras *et al.*, 2010). Los oligómeros se han detectado principalmente en neuronas de la corteza de asociación e hipocampo, áreas especialmente afectadas en la EA (Walsh y Selkoe, 2004).

Estudios *in vitro* con cultivos neuronales han encontrado que las formas oligoméricas del péptido  $\beta$ A son más tóxicas para las neuronas que las fibrillas (Selkoe, 2008). En un experimento llevado a cabo por el grupo de Selkoe y colaboradores, se administraron pequeñas cantidades de oligómeros de  $\beta$ A de origen celular (es decir, no sintético) intraventricularmente a ratas adultas sanas, y se encontró que exclusivamente la administración de oligómeros interfería con la potenciación a largo plazo (LTP), mecanismo críticamente involucrado en aspectos del aprendizaje y la memoria (Walsh *et al.*, 2002).

Pruebas bioquímicas y conductuales permitieron concluir a este grupo de trabajo que los oligómeros de  $\beta$ A inducen alteraciones estructurales de la sinapsis al reducir la densidad de espinas dendríticas (lo cual se refleja como una pérdida de sinapsis excitatoria) y alteran la señalización glutamérgica en neuronas del hipocampo, a través de la interacción de  $\beta$ A con el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (Walsh *et al.*, 2002). Este es un receptor ionotrópico específico para el glutamato, y se piensa que es el principal regulador de la plasticidad sináptica y la memoria (Hunt y Castillo, 2012). Los oligómeros de  $\beta$ A son capaces de reducir el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del NMDAR (Bloodgood y Sabatini 2007), lo cual se ha asociado depresión a largo plazo (LTD) por una vía dependiente de calcineurina (Mulkey *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 1996). La activación crónica de LTD por la

presencia de oligómeros de  $\beta$ A puede inducir la disfunción sináptica tan característica de la EA, dado que este mecanismo promueve la reducción y retracción de espinas dendríticas, lo cual a su vez promueve la pérdida progresiva de sinapsis glutamatérgicas (Zhou *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2007).

Pruebas con anticuerpos contra epítomos conformacionales dirigidos específicamente contra los oligómeros de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> evitan la pérdida de sinapsis por los mecanismos anteriormente mencionados (Selkoe, 2008), lo cual indica dos cosas: que los oligómeros tienen efectos perniciosos para la función sináptica, y que los anticuerpos contra epítomos conformacionales de oligómeros de  $\beta$ A son vías terapéuticas potenciales.

De hecho, uno de los agentes aprobados para el tratamiento de la EA, la memantina, es antagonista de los receptores NMDA. Se ha propuesto que sus mecanismos de acción incluyen mitigar la excitotoxicidad celular mediada por glutamato así como bloquear la interacción de  $\beta$ A y por tanto los efectos de la depresión a largo plazo (Shankar y Walsh, 2009).



Figura 9 Representación esquemática de la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A. A este evento se le ha asociado con una morfología alterada de neuritas y sinapsis, que induce disfunción. Se ha encontrado que los oligómeros interactúan con la membrana neuronal, formando poros que rompen la homeostasis iónica. Tomado de Gouras *et al.*, 2010.

Se ha encontrado evidencia que los oligómeros de  $\beta$ A pueden formar poros en la membrana lo cual rompe la integridad membranal y la homeostasis iónica (Kagan *et al.*, 2002). Asimismo, los oligómeros de  $\beta$ A aumentan la permeabilidad de la membrana lisosomal, provocando que  $\beta$ A salga de la vesícula al citoplasma, junto con el contenido del lisosoma induciendo muerte celular (Umeda *et al.*, 2011).

De manera reciente se ha implicado también a la mitocondria en un proceso apoptótico mediado por la interacción de  $\beta$ A con la etanol-deshidrogenasa (ABAD por sus siglas en inglés), proteína encargada de descomponer el etanol. Los experimentos realizados por el grupo de investigación de Lustbader y colaboradores encontraron que la interacción entre

ABAD y  $\beta$ A promueve la producción de radicales libres en las neuronas, induciendo estrés oxidante (Lustbader *et al.*, 2004).

El mismo grupo de investigación empleó un modelo murino transgénico para la EA que sobre-expresa ABAD (mAPP/ABAD) para evaluar el desempeño de este modelo en pruebas conductuales comparado a ratones mAPP, ABAD o no transgénicos. Encontraron que mAPP/ABAD presenta déficits severos en memoria espacial y temporal en comparación a los otros modelos, atribuible a una mayor interacción entre  $\beta$ A y ABAD, ya que la inhibición de esta interacción introduce mejoras cognitivas en el modelo (Lustbader *et al.*, 2004).

Además de inducir estrés oxidante por su interacción con ABAD,  $\beta$ A también potencia la producción de radicales libres por su capacidad de unirse a metales reactivos como el cobre y el zinc (Jomova *et al.*, 2010). Se ha encontrado que el estrés oxidante inducido por  $\beta$ A<sub>1-42</sub> estimula la expresión de proteínas que inhiben la actividad de fosfatasa sobre la proteína tau y aumenta la expresión de cinasas de tau, conectando así los dos eventos neurodegenerativos en la EA (Lloret *et al.*, 2011).

En línea con el papel crucial de los oligómeros de  $\beta$ A en la patogénesis de la EA se reportó una mutación conocida como E693delta, cuyo fenotipo clínico corresponde al desarrollo de la EA sin que se presenten placas amiloides, pero sí una acumulación de  $\beta$ A intraneuronal y una mayor cantidad de oligómero (Nishitsuji *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la formación de oligómeros está favorecida en compartimentos intracelulares como vesículas endosómicas, lo cual facilitaría la interacción de oligómeros intraneuronales con tau y otras proteínas (Medeiros *et al.*, 2012).

Aunque los trabajos anteriormente descritos trabajan principalmente con oligómeros de las variantes  $\beta$ A<sub>1-40</sub> y  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, el péptido  $\beta$ A está lejos de ser un producto proteolítico homogéneo, ya que presenta variaciones tanto C-terminales (péptidos  $\beta$ A que difieren en longitud) como N-terminales (como los péptidos amino-truncados y/o modificados). Estas diferencias son relevantes para la patología de  $\beta$ A, ya que además de estados conformacionales tóxicos, en años recientes han emergido nuevos blancos terapéuticos para la EA a partir del estudio de extractos cerebrales de pacientes con EA.

### **Péptidos amino-truncados piroglutamados: moléculas emergentes en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer**

Mientras que  $\beta A_{1-40}$  y  $\beta A_{1-42}$  son productos metabólicos normales, análisis bioquímicos y proteómicos de cerebros de pacientes con EA y SD han revelado la presencia de péptidos con modificaciones N-terminales, entre los cuales destacan los péptidos truncados piroglutamados (pE $\beta$ A) (Piccini *et al.*, 2005). Los cerebros de estos pacientes se encuentran enriquecidos con estas especies truncadas-modificadas, y un cuerpo creciente de evidencias señalan que están fuertemente implicadas en la patología de la enfermedad (Acero *et al.*, 2009; Gunn *et al.*, 2010; Jawhar *et al.*, 2011; Wittnam *et al.*, 2011, Perez-Garmendia y Gevorgyan, 2013).

El estudio comparativo de la composición de las placas amiloides en pacientes con EA e individuos sin deterioro cognitivo reveló que estas difieren considerablemente: Las placas neuríticas de pacientes con EA están conformadas hasta en un 51% por péptidos N-truncados modificados (Kuo *et al.*, 1997), mientras que más del 60% del  $\beta A$  total en estos mismos pacientes corresponde a péptidos N-truncados (Sergeant *et al.*, 2003). En los cerebros de pacientes sin déficit cognitivo, las placas son de tipo difusas y la proporción de péptidos truncados-modificados es mínima. A partir de este y otros trabajos se estableció que hay una correlación positiva entre la cantidad de especies N-truncadas con la severidad de la demencia en pacientes con EA (Guntert *et al.*, 2006), así como con la neurotoxicidad de los agregados (Russo *et al.*, 2002).

La modificación más frecuente de estos péptidos amino truncados es la formación de un péptido piroglutamado. Un péptido piroglutamado se forma por acción de la enzima glutaminil-ciclasa, que cataliza la formación de un anillo pirrólico (piroglutamato) amino-terminal por deshidratación del residuo glutamato. Por lo anterior, un requisito para la formación de péptidos piroglutamados es tener expuesto el glutamato (Jawhar *et al.*, 2011). La secuencia de  $\beta A$  presenta dos glutamatos en la posición 3 y en la 11, por lo que pueden formarse péptidos  $\beta AN3(pE)$  o  $\beta AN11(pE)$ .

En el caso de  $\beta AN3(pE)$  (Fig. 10) se piensa que la exposición del glutamato ocurre después del procesamiento proteolítico de APP, por acción de aminopeptidasas, mientras que el péptido  $\beta AN11(pE)$  se genera cuando  $\beta$ -secretasa corta en el sitio alternativo B', entre Tyr<sup>10</sup> y Glu<sup>11</sup>, liberando el fragmento  $\beta AN11$  (Jawhar *et al.*, 2011)

Algunos estudios han propuesto que la generación de péptidos amiloides truncados puede ocurrir también por procesos no enzimáticos como el ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), donde la interacción del péptido de longitud completa con metales reactivos como el Cu provocan la ruptura de enlaces peptídicos, generando las especies N-truncadas (Kowalik-Jankowska *et al.*, 2004).

La conversión de  $\beta$ AN3(pE) o  $\beta$ AN11(pE) a péptidos piroglutamados depende de la acción de la enzima glutaminil-ciclasa. La glutaminil-ciclasa (QC) se expresa de forma abundante en cerebros de mamíferos. Su función es catalizar la conversión de los residuos de glutamina amino-terminales en piroglutamatos, y tiene por sustratos diversas hormonas importantes como la orexina A, gastrina, gonadotropina y neurotensina (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011). Se ha propuesto que esta conversión es necesaria para la actividad biológica de algunas proteínas (Pohl *et al.*, 1991) o bien como una modificación para estabilizar las proteínas y evitar su degradación por aminopeptidasas (Rink *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que en individuos con EA la QC se expresa en niveles más altos en comparación a pacientes no-enfermos, correlacionándose el nivel de expresión de esta enzima con la severidad de la demencia (De Kimpe *et al.*, 2013). En ratones bigénicos 5XFAD/hQC se encontraron niveles de  $\beta$ AN3(pE) más altos que en ratones 5XFAD, así como un déficit cognitivo y motoro más severo (Jawhar *et al.*, 2011)

Por inmunohistoquímica se ha colocalizado a  $\beta$ A y QC en vesículas secretoras ácidas, lo cual sugiere que la conversión de péptidos N-truncados a piroglutamados es favorecido en compartimentos intracelulares (Cynis *et al.*, 2008).

La pérdida de cargas (3 cargas en el caso de  $\beta$ AN3(pE) y 6 cargas en el caso de  $\beta$ AN11(pE)) induce cambios en las propiedades bioquímicas de estos péptidos, principalmente en sus propiedades de agregación y la estabilidad de los mismos (Gunn *et al.*, 2010). Los péptidos piroglutamados forman agregados más rápidamente y a una concentración 10 veces menor de monómeros en comparación a  $\beta$ A<sub>1-42</sub>.

Se piensa que este aumento en la estabilidad y en su propensión a agregarse y formar oligómeros se ve favorecido por la pérdida de cargas, que reduce la repulsión entre monómeros.

La presencia del anillo pirrol en el extremo amino les confiere resistencia a la degradación por peptidasas, lo que hace que estos péptidos permanezcan más tiempo sin degradar en el tejido cerebral (Gunn *et al.*, 2010; Jawhar *et al.*, 2011).

Su toxicidad en comparación a oligómeros del péptido  $\beta A_{1-42}$  es controversial, ya que algunos estudios señalan que tienen igual o mayor toxicidad que este último (Gunn *et al.*, 2010) Sin embargo, cabe recordar que por la resistencia a la degradación que les confiere el anillo pirrónico estos péptidos están en contacto por más tiempo con los componentes neuronales.

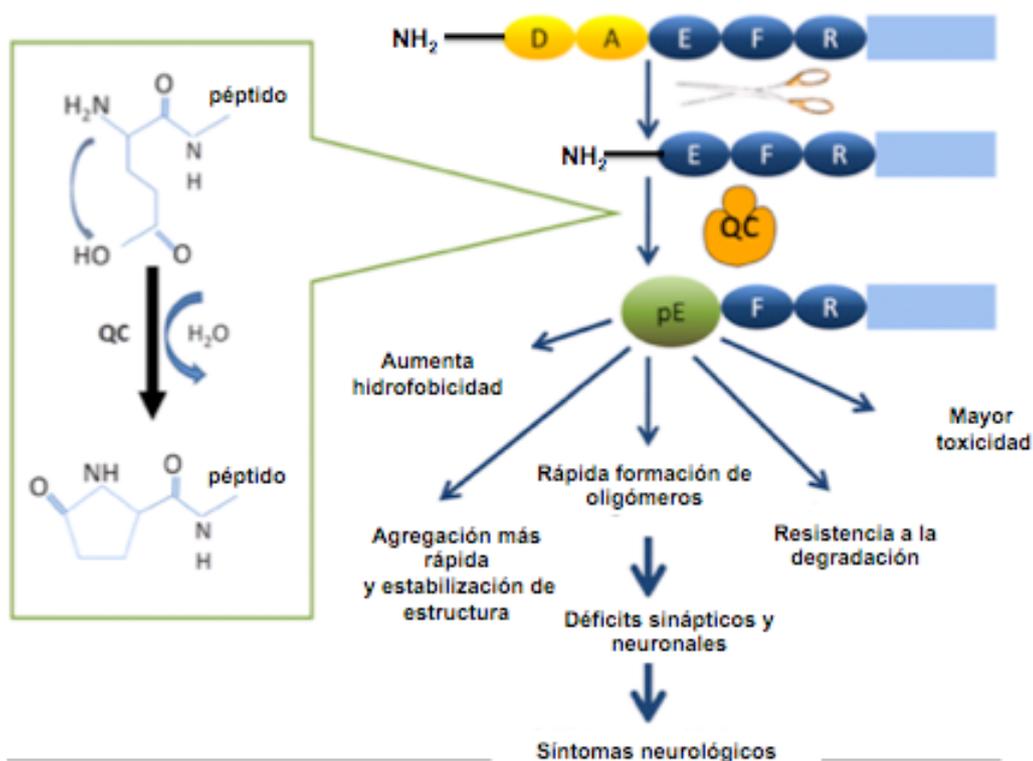


Figura 10 Formación del péptido  $\beta A_{pE3-42}$ . El glutamato queda expuesto en la posición 3 del extremo N-terminal. La enzima QC cataliza la conversión del glutamato a piroglutamato por deshidratación. Ocurre la misma reacción en el caso de  $\beta A_{pE11}$ , sólo que el glutamato expuesto se encuentra en la posición 11 del péptido  $\beta A$ . Las propiedades bioquímicas del péptido se ven afectadas con severas consecuencias patológicas. Modificado de Jawhar *et al.*, 2011.

### ***$\beta$ -amiloide piroglutamado 3-42 ( $\beta A_{pE3-42}$ )***

De los péptidos piroglutamados,  $\beta A_{pE3-42}$  es la especie más abundante. Representa la fracción dominante tanto en  $\beta A$  soluble (es decir que no se encuentra en placas) (Russo *et al.*, 1997) como en las placas neuríticas (Saido *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1996), por lo que esta variante de  $\beta A$  es la más abundante de todas las especies de  $\beta A$ .

El análisis detallado de tejidos cerebrales de pacientes con SD y EA esporádico reveló que el depósito focal de las placas neuríticas de estos pacientes estaba formado principalmente por el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  (Sullivan *et al.*, 2011)

Se encontró además que los casos de EAF con una mutación en la PS1 asociado a un fenotipo clínico severo de la EA, generaba una mayor proporción entre las especies piroglutamadas en comparación con los casos de EA esporádica de edad similar (Russo *et al.*, 2000)

En modelos murinos, la aparición de oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  se han detectado al mismo tiempo que el inicio de cambios de comportamiento que indican déficit cognitivo (Bayer y Wirths, 2011). Adicionalmente, se ha co-localizado a  $\beta A_{pE3-42}$  con sinaptofisina en tejidos *post-mortem* de personas que padecieron EA (Mandler *et al.*, 2012).

Estos hallazgo y el análisis de la progresión de la acumulación de  $\beta A$  en pacientes con síndrome de Down (Saido *et al.*, 1995; Sergeant *et al.*, 2003) sugiere que  $\beta A_{pE3-42}$  se acumula de manera progresiva en las etapas más tempranas de la EA, antes de la aparición de síntomas clínicos, por lo que se ha propuesto que puede fungir como una semilla de agregación (Schilling *et al.*, 2006) y que está involucrado en procesos neurodegenerativos tempranos como la disfunción sináptica por interacción con proteínas presinápticas como la sinaptofisina.

### ***Estructura y agregación de $\beta A_{pE3-42}$***

La pérdida de tres cargas asociadas a la formación del anillo de piroglutamato aumentan la hidrofobicidad de  $\beta A_{pE3-42}$ .

Estudios realizados sobre las propiedades biofísicas de estos péptidos indican que tienen una mayor tendencia a formar agregados a menor concentración y a mayor rapidez que otras variantes de  $\beta A$  (D'Arrigo *et al.*, 2009), por lo cual se ha sugerido que pueden fungir como un núcleo de agregación. Esta propuesta es también apoyada por la evidencia mencionada anteriormente, que los núcleos de las placas neuríticas están formados predominantemente por  $\beta A_{pE3-42}$ .

Uno de los pocos estudios que se ha realizado con respecto a la estructura de los péptidos  $\beta AN3(pE)$  (Sun *et al.*, 2012) señala que la modificación N-terminal tiene un efecto significativo en la propensión del péptido a formar estructuras secundarias no helicoidales en condiciones fisiológicas, es decir que  $\beta AN3(pE)$  tiende a formar agregados con estructura de  $\beta$ -plegada.

Los agregados de  $\beta A_{pE3-42}$  se han localizado principalmente en lisosomas y células gliales, y se ha encontrado, además, que estos agregados se forman de manera temprana y que su cantidad aumenta con la edad (De Kimpe *et al.*, 2013). Cabe recordar que la edad es el principal factor de riesgo para padecer EA.

### ***Efectos de $\beta A_{pE3-42}$ en las células***

Se ha reportado que  $\beta A_{pE3-42}$  es capaz de interactuar con  $\beta A_{1-42}$ , favoreciendo el mal plegamiento de los péptidos con los que interactúa y promoviendo la formación de oligómeros (Nussbaum *et al.*, 2012). Adicionalmente, se encontró que  $\beta A_{pE3-42}$  también es inhibidor de la fibrillogénesis de  $\beta A_{1-42}$ . Se ha sugerido que esto puede tener el efecto de mantener a los péptidos en conformación oligomérica y prefibrilar, potenciando los efectos tóxicos de estas estructuras.

El grupo que realizó estos experimentos (Nussbaum *et al.*, 2012), sugiere que la potenciación de los efectos tóxicos de  $\beta A_{1-42}$  al interactuar con  $\beta A_{pE3-42}$  es reminiscente de un mecanismo tipo prión, dado que  $\beta A_{pE3-42}$  fomenta el mal plegamiento de los péptidos  $\beta A_{1-42}$  con los que interactúa, promoviendo la formación de oligómeros híbridos. En los experimentos de este trabajo, se demuestra que los oligómeros híbridos de  $\beta A_{pE3-42}/\beta A_{1-42}$ , junto con los oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  inhiben el proceso de LTP en un modelo murino y poseen una mayor toxicidad que los oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  (Nussbaum *et al.*, 2012).

Experimentos realizados con cultivos neuronales para evaluar la toxicidad de  $\beta A_{pE3-42}$  encontraron que estos inducen una liberación entre el 30-40% de LDH, lo cual es indicativo de lisis membranal, por lo que se propone que  $\beta A_{pE3-42}$  comparte mecanismos de citotoxicidad similares a  $\beta A_{1-42}$ , cuyos oligómeros también afectan la integridad de la membrana (Russo *et al.*, 2002)

Otros efectos que se han reportado *in vivo* e *in vitro* del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  incluyen: activación de apoptosis por vías proinflamatorias dependientes de ácido araquidónico (Youssef *et al.*, 2007), inducción de la externalización de fosfatidil-serina por daño membranal (Acero *et al.*, 2009), inhibición de procesos de potenciación a largo plazo (LTP) (Schlenzig *et al.*, 2012) y permeabilización de la membrana de lisosomas, liberando sus contenidos al citoplasma (De Kimpe *et al.*, 2013).

### **$\beta$ ApE<sub>3-42</sub> en modelos murinos**

Existe una diversidad de modelos murinos transgénicos para diversas mutaciones humanas en APP y/o presenilinas, que les inducen cambios patológicos reminiscentes de la EA, aunque ninguno de ellos recapitula en su totalidad el progreso de la enfermedad. Una de las observaciones que se había hecho en estos modelos es que a pesar del desarrollo abundante de agregados extracelulares e incluso la presencia de marañas neurofibrilares acoplados a déficits cognitivos, en estos ratones no se reportaba pérdida neuronal, como en el caso de pacientes con EA.

Un estudio comparativo de las variantes de  $\beta$ A en ratones transgénicos de la cepa APP23 (mutación Swedish KM670/671NL) y humanos (Schieb *et al.*, 2011) reportó que hay diferencias sustanciales en las abundancias relativas de las variantes de  $\beta$ A. Particularmente, se reportó que los péptidos N-truncados modificados conformaban más del 60% en humanos, mientras que en modelos murinos transgénicos, incluso en los de edad avanzada que presentaban una mayor patología amiloide, conformaban una fracción muy pequeña del  $\beta$ A total, menor al 1%. Otros grupos de trabajo caracterizaron distintas cepas de ratones transgénicos para la EA, y encontraron que en general, una fracción mínima cercana al 5% en algunos casos, correspondía a péptidos piroglutamados (Gunn *et al.*, 2010).

Posteriormente se encontró que los modelos murinos que producen más  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> con respecto a otras variantes, desarrollan deficiencias neurológicas, pérdida neuronal y una patología tipo Alzheimer más severa que modelos murinos que expresan péptidos intactos en su extremo amino (Jawhar *et al.*, 2011; Wittnam *et al.*, 2012). Un ejemplo de lo anterior es la cepa APP<sub>SL</sub>PS1K1, que presenta pérdida neuronal en la región CA1/CA2 del hipocampo a los 6 meses de edad, lo cual coincide con la aparición del péptido piroglutamado  $\beta$ -amiloide 3-42 (Casas *et al.*, 2004).

Estas diferencias en abundancias de péptidos piroglutamados entre ratones transgénicos y humanos se postularon como una posible explicación a la ausencia de pérdida neuronal generalizada en los modelos murinos para la EA, dada la baja presencia de péptidos piroglutamados (Kawarabayashi *et al.*, 2001). Con el fin de evaluar el efecto directo de una expresión alta de  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> en un modelo murino de la EA, el grupo de Thomas Bayer (Wittnam *et al.*, 2012) generó un nuevo transgénico, TBA42, que produce cantidades de  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> mayores a las de cualquier otro modelo transgénico. En sus resultados reportan

que TBA42 desarrollan de forma temprana deficiencias sinápticas y conductuales, microgliosis, astrocitosis, atrofia del hipocampo y pérdida neuronal, que se correlaciona con la cantidad de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  soluble y en agregados, lo que corrobora la naturaleza tóxica de los péptidos piroglutamados *in vivo*.

Los resultados en estos modelos animales, aunada a la acumulación en etapas tempranas de la EA de  $\beta AN3(pE)$  (Saido *et al.*, 1995; Sergeant *et al.*, 2003) y sus efectos tóxicos en las neuronas (Russo *et al.*, 2002; Nussbaum *et al.*, 2012), postulan a esta especie como un objetivo terapéutico potencial (Jawhar *et al.*, 2011; Wirths *et al.*, 2010, Pérez-Garmendia y Gevorkian, en imprenta).

### **Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

El diagnóstico en vida de la EA consiste en una serie de pruebas neuropsicológicas y revisión del historial clínico del paciente. Estas pruebas son de exclusión, y establecen si el paciente tiene probable, posible o definitivamente Alzheimer, cuando todas las demás causas de demencia se han excluído (Nowotny, 2001).

La única manera de diagnosticar con certeza si un paciente padeció Alzheimer es el análisis *post-mortem* de cerebro, donde la presencia de marañas neurofibrilares, placas amiloides y atrofia cerebral dan el diagnóstico certero.

En años recientes la búsqueda de biomarcadores que puedan servir de diagnóstico complementario a las pruebas neuropsicológicas es un campo activo.

El amiloide agregado en placas puede visualizarse *in vivo* con un compuesto llamado PIB (Pittsburg Compound B), una forma modificada de thioflavina-T que cruza la barrera hematoencefálica (BHE) y se une a  $\beta A$  en conformación fibrilar (Jawhar *et al.*, 2011). Actualmente se está evaluando su uso como herramienta de diagnóstico de la EA. Sin embargo, este compuesto no puede unirse a agregados no-fibrilares, lo cual algunos autores señalan que puede generar falsos positivos, además de que se cuestiona su utilidad como marcador de etapas tempranas de la EA (Castellani *et al.*, 2010).

Uno de los biomarcadores que se ha propuesto como un marcador temprano de la EA es el nivel de  $\beta A_{1-42}$  en fluído cerebroespinal. Investigaciones señalan que uno de los mejores predictores para determinar la conversión de déficit cognitivo moderado a EA es un decremento en los niveles de  $\beta A_{1-42}$  en el fluído cerebroespinal (Fagan *et al.*, 2006).

De forma complementaria se han propuesto que mediciones de tau en el líquido cefalorraquídeo y análisis de neuroimagen, junto con biomarcadores de niveles de  $\beta A_{1-42}$  podrían dar un diagnóstico en vida de la EA (Holtzman *et al.*, 2011).

Sin embargo, estos biomarcadores aún no se usan de forma rutinaria en el diagnóstico.

### **Terapias para la enfermedad de Alzheimer**

Dado el impacto económico y social de la EA, se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de terapéuticos que incidan en los síntomas y el progreso de la enfermedad.

A la fecha, sin embargo, no se cuentan con medicamentos efectivos para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Las terapias disponibles para tratar la enfermedad pueden dividirse en dos grandes grupos: tratamientos sintomáticos y de progresión.

#### ***Tratamientos sintomáticos***

Los terapéuticos de tratamiento sintomático consisten esencialmente en inhibidores de acetilcolinestara y memantina.

Los beneficios de estos tratamientos son moderados a corto plazo en el mejor de los casos. Sus efectos consisten en aminorar los síntomas cognitivos, funcionales y de comportamiento de los pacientes, sin embargo, no impactan la progresión de la enfermedad (Galimberti *et al.*, 2013).

Aunque se desconoce la razón, el sistema colinérgico es especialmente afectado en la EA, y se han reportado pérdidas hasta del 60% en neuronas colinérgicas.

Los inhibidores de acetilcolinesterasa son un tratamiento ampliamente usado dado que inhiben la degradación de la acetilcolina para prolongar su efecto (Nowotny *et al.*, 2001).

La memantina es un antagonista del receptor para glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Anteriormente (Ver Oligómeros de  $\beta A$ ) se mencionó el mecanismo por el cual los oligómeros de  $\beta A$  induce LTD a través del receptor NMDA (Walsh *et al.*, 2002), por lo cual la inhibición del receptor elimina los efectos de esta interacción, además de proteger a las células restantes de la citotoxicidad mediada por glutamato, rescatando por un tiempo funciones cognitivas de forma moderada. Sin embargo es un recurso de última instancia por sus efectos secundarios (Shankar y Walsh, 2009).

Estos tratamientos tienen una eficacia moderada por un periodo entre 6-18 meses, posterior a los cuales los pacientes sufren de los mismos déficits cognitivos que los pacientes que no tuvieron tratamiento alguno. Los anteriores son los únicos medicamentos aprobados por la FDA para tratar la EA (Galimberti *et al.*, 2013).

### ***Tratamientos de progresión***

Por el papel central del péptido  $\beta$ -amiloide en la patología de la EA las investigaciones en el área se han enfocado principalmente a terapias que tengan por objetivo reducir la carga amiloide (Weiner y Frenkel 2006; Wang *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2012).

Dado que el péptido es generado por proteólisis, se ha propuesto que modular la producción de  $\beta$ A podría ser efectivo para tratar la EA. Estos agentes tienen por blanco a las enzimas involucradas en el corte de APP o la degradación de  $\beta$ A. Inhibidores de la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa se encuentran en ensayos clínicos (Salloway *et al.*, 2008), aunque el desarrollo de moduladores efectivos y seguros no ha sido exitoso dada la variedad de sustratos de estas enzimas que pueden estar involucrados en procesos celulares importantes, como es el caso de la PS1 que se encuentra involucrada en la vía de señalización Notch, importante para definir el destino celular durante el desarrollo embrionario (Nowotny *et al.*, 2001).

Asimismo, se ha propuesto que promover la expresión de las enzimas degradadoras de  $\beta$ A podría tener un efecto benéfico. La degradación de  $\beta$ A está mediada principalmente por dos metaloproteasas dependientes de zinc, la neprilisina y la IDE (enzima degradadora de insulina) (Wang *et al.*, 2006).

El sitio catalítico de la neprilisina es extracelular, por lo que se le ha propuesto como candidato para la degradación de agregados extracelulares (Wang *et al.*, 2006).

La IDE degrada en general sustratos con tendencia a adoptar estructuras de  $\beta$ -plegada, y se le ha asociado particularmente a la degradación de formas monoméricas de  $\beta$ A, pero tiene otros sustratos fisiológicamente importantes como la insulina (Tanzi *et al.*, 2004).

En pacientes con EA, los niveles de ambas enzimas se encuentran subexpresados en comparación a controles sanos de la misma edad, particularmente en las áreas mayormente afectadas por la EA como el hipocampo y la corteza de asociación (Wang *et al.*, 2006).

Sin embargo, el diseño de agentes que modulen la expresión de estas enzimas es difícil dado que ninguna de estas enzimas es exclusiva para  $\beta$ A y se afectarían otras funciones, con posibles efectos no deseados.

Otra estrategia para estimular la eliminación de  $\beta$ A involucra modular la actividad de receptores de  $\beta$ A. El receptor LRP (receptor de lipoproteína) y el p-gp medían el transporte de cerebro a plasma sanguíneo de  $\beta$ A (Shibata *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2001). Se ha encontrado que ambos se encuentran subexpresados en presencia de abundante  $\beta$ A cerebral (Vogelgesang *et al.*, 2001; Deane *et al.*, 2004). En cambio, el receptor RAGE (receptor para productos de glicosilación avanzado) es capaz de unir  $\beta$ A en plasma y transportarlo a través de la barrera hematoencefálica (BBB) al cerebro (Deane *et al.*, 2003); este receptor es regulado positivamente en presencia de  $\beta$ A y es capaz de reducir la expresión de LRP, aumentando los niveles de  $\beta$ A en cerebro (Deane *et al.*, 2004). Se han propuesto como estrategias terapéuticas el desarrollo de fármacos que bloqueen la interacción de  $\beta$ A con RAGE o bien bloqueen la actividad de RAGE (Wang *et al.*, 2006) para modular los niveles de  $\beta$ A en cerebro. A pesar de que podría parecer un blanco atractivo, en 2011 se detuvo abruptamente un estudio clínico en fase II de un inhibidor de RAGE por la falta de evidencia que indicara un beneficio en los pacientes (Bonetta, 2011).

Se ha encontrado que la inyección intravenosa de sustancias que tienen afinidad por  $\beta$ A, aún sin que estas sustancias atraviesen la BHE, también inducen una reducción en los niveles de  $\beta$ A soluble cerebral, así como un aumento en los niveles de  $\beta$ A en plasma (Matsuoka *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005), lo cual se ha atribuido a un mecanismo de ‘sumidero periférico’, donde la administración intravenosa de sustancias con afinidad por  $\beta$ A fungen como atractores periféricos capaces de alterar el equilibrio entre el  $\beta$ A en plasma y el  $\beta$ A cerebral, induciendo un eflujo de  $\beta$ A del cerebro a plasma disminuyendo así los niveles del péptido en cerebro (Salloway *et al.*, 2008).

También se están evaluando agentes que posean la capacidad de inhibir la agregación de  $\beta$ A mediante su interacción con el péptido, entre los cuales destaca el caso del tramiprosato (homotaurina, ALZHEMED<sup>TM</sup>), un compuesto análogo a la taurina capaz de interactuar con  $\beta$ A (Aisen *et al.*, 2011). Aunque en ensayos preclínicos demostró capacidad de unirse a monómeros de  $\beta$ A e inhibir su agregación, en 2011 luego de llegar a la fase III de ensayos clínicos fue declarado ineficiente para mejorar los síntomas cognitivos de los pacientes con EA (Khairallah y Kassem, 2011).

Además de los tratamientos mencionados, hay una gama de agentes que se han propuesto como estrategias auxiliares para la EA (ver apéndice A).

### **Inmunoterapia: modulación, eliminación y desagregación**

Una de las estrategias que más atención ha atraído en los últimos años, tanto en el ámbito de investigación como en la industria farmacéutica, es la inmunoterapia para la EA.

La inmunoterapia es el tratamiento de enfermedades mediante la inducción, estimulación o supresión de la respuesta inmune.

La inmunoterapia para el EA consiste en la administración de anticuerpos específicos contra  $\beta$ A (inmunoterapia pasiva) o bien la inducción de anticuerpos anti- $\beta$ A. Estos anticuerpos son capaces de inhibir la agregación del péptido y prevenir la citotoxicidad celular asociada a los oligómeros de  $\beta$ A (Pul *et al.*, 2011; Weiner y Frenkel 2006).

Una de las grandes ventajas de esta estrategia en comparación al desarrollo de medicamentos es que permitiría vacunar a la población en riesgo contra la enfermedad, lo cual hace de la inmunoterapia un campo de investigación activo.

Las primeras investigaciones en el área comenzaron en los 90s, cuando el grupo de Solomon y colaboradores demostró por primera vez que anticuerpos anti- $\beta$ A eran capaces de disolver agregados de  $\beta$ A así como prevenir la agregación de los monómeros (Solomon *et al.*, 1996).

En 1999 el grupo de Schenk y colaboradores reportaron por primera vez que la inmunización de ratones transgénicos para APP humano (PDAPP) con el péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> fibrilar en combinación con adyuvante inducía la producción de anticuerpos específicos contra  $\beta$ A. En este trabajo reportaron una reducción en las lesiones de origen amiloide en el parénquima cerebral y mejor desempeño en pruebas cognitivas en los ratones transgénicos inmunizados en comparación a los transgénicos que no habían sido tratados, iniciando así el campo de estudio de la inmunoterapia para la EA (Schenk *et al.*, 1999). A partir de estos hallazgos se decidió evaluar la inmunización activa con  $\beta$ A<sub>1-42</sub> fibrilar en un ensayo clínico, luego de las mejoras que el grupo de Schenk había reportado.

El primer ensayo clínico para evaluar el enfoque inmunoterapéutico para el tratamiento de la EA fue llevado a cabo por Elan Pharmaceuticals Inc, donde se administró péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> sintético (denominado AN1792) junto con QS21 como adyuvante, vía intramuscular por 12 meses (Lemere y Masliah, 2010). Se reclutaron aproximadamente 300 pacientes con demencia por EA leve a moderada. Sin embargo, el estudio se detuvo luego de las primeras inmunizaciones cuando 6% de los pacientes desarrollaron meningoencefalitis.

Estudios longitudinales sobre el caso reportaron que no todos los pacientes tratados presentaban anticuerpos anti- $\beta$ A en plasma. Se reportaron mejoras sólo un en subgrupo de 30 pacientes, que había desarrollado un título alto de anticuerpos, donde estos perdieron menos volumen cerebral y además su declive cognitivo se estabilizó, pero estos resultados no pudieron sostenerse a nivel del ensayo clínico debido al reducido número de pacientes que respondió al tratamiento. Los pacientes que no desarrollaron anticuerpos y fueron tratados tuvieron un desempeño aún peor que los pacientes no tratados (Vellas *et al.*, 2009).

Análisis histopatológicos de los pacientes tratados encontraron zonas en la corteza con placas amiloides en recesión, rodeadas de abundante microglía activada.

Los casos de meningoencefalitis fueron atribuidos a una infiltración de células T reactivas. QS21, el adyuvante empleado en este ensayo es un inductor de la respuesta Th1. En los cerebros de los pacientes que padecieron meningoencefalitis se reportó la presencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, de lo cual se concluyó que sería más conveniente utilizar adyuvantes que indujeran una respuesta Th2 para evitar la respuesta pro-inflamatoria (Schenk *et al.*, 2004). Además, el péptido  $\beta$ A de longitud completa presenta epítomos para las células T en su porción central y carboxilo terminal, lo cual se cree que también pudo haber coadyuvado al desarrollo de meningoencefalitis en algunos pacientes (Monsonogo *et al.*, 2003), consideraciones que se volvieron muy importantes para el diseño de futuros inmunoterapéuticos.

A pesar de los efectos secundarios, este estudio asentó las bases para la inmunoterapia para la EA, ya que demostró que  $\beta$ A es capaz de inducir una respuesta inmune y que los anticuerpos anti- $\beta$ A tienen un efecto protector (Pul *et al.*, 2011). Estudios posteriores tanto de inmunoterapia pasiva (Bard *et al.*, 2000; DeMattos *et al.*, 2001; Dodart *et al.*, 2002) como activa (Morgan *et al.*, 2000; Janus *et al.*, 2000) empleando una diversidad de modelos murinos transgénicos, adyuvantes e inmunógenos han reafirmado el potencial de la inmunoterapia para interferir con la formación de agregados de  $\beta$ A, la citotoxicidad asociada al péptido y atenuar el déficit cognitivo en estos modelos (Brody *et al.*, 2008).

### ***Ensayos clínicos actuales con base inmunoterapéutica***

A partir del ensayo clínico de AN1792 se hicieron esfuerzos subsecuentes para diseñar vacunas de segunda generación cuyo blanco fuera el péptido  $\beta$ A, pero en las cuales se favoreciera la respuesta humoral y no celular con el fin de evitar los efectos adversos asociados.

La inmunoterapia activa tiene como ventajas el ser un tratamiento de larga duración, ya que es capaz de inducir memoria inmunológica una vez administrada. Sin embargo, esta opción también tiene la posibilidad de estimular respuestas inmunológicas robustas que no se desearían en un paciente con EA.

Entre las vacunas de segunda generación que se encuentran actualmente en ensayos clínicos encontramos a CAD106 (Novartis), vacuna que presenta múltiples copias de  $\beta A_{1-6}$  acoplado a una partícula tipo-virus (VLP's), del bacteriófago Q $\beta$ . En ensayos preclínicos se encontró que en los ratones tratados, había una reducción en carga amiloide cerebral.

En la fase I del ensayo clínico se reclutaron pacientes con EA leve a moderada y se les administraron tres inyecciones vía subcutánea. Aunque no se presentaron casos de meningoencefalitis, se reportaron efectos adversos en casi todos los pacientes, siendo los más comunes nasofaringitis y eritema en el sitio de administración. Sin embargo, más del 50% de pacientes desarrollaron anticuerpos contra  $\beta A$  (Winblad *et al.*, 2012).

Otras vacunas que se encuentran en ensayo clínico incluyen a ACI-21 (AC Immune), que usa el fragmento  $\beta A_{1-13}$  embebido en membrana de liposoma y se encuentra en fase II y Affitope AD-02, una vacuna de péptido de 6 aminoácidos dirigidos al extremo N-terminal, que se encuentra en fase II (Galimberti *et al.*, 2013).

La inmunización pasiva ofrece una solución alternativa para evitar la inflamación inducida por la activación de la respuesta celular. Como ventajas sobre la inmunoterapia activa incluye que, de haber efectos adversos, sólo debe detenerse la administración de anticuerpos. Sin embargo, es una opción a largo plazo y cabe la posibilidad que los pacientes desarrollen anticuerpos contra los anticuerpos terapéuticos e inhiban el efecto de la terapia (Lemere y Masliah, 2010).

Bapineuzumab (Wyeth & Elan) es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el extremo N-terminal de  $\beta A$ . Se probó en un ensayo clínico fase II con 200 pacientes con EA leve-moderado, donde se no se demostró una eficacia global, pero un subgrupo de pacientes (los que no portaban el alelo ApoE4) respondieron bien al tratamiento. Recientemente la fase III del estudio, que evaluaba la eficiencia a largo plazo en pacientes con y sin el genotipo se detuvo dada la ausencia de resultados (Khorassani e Hilas, 2013).

Solanezumab (Ely Lilly) es otro anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido contra la porción central de  $\beta A$  que se encuentra en fase III, con pacientes con EA moderada. Se

reportó que en los pacientes tratado había un aumento de  $\beta$ A (incluyendo péptidos truncados modificados) en sangre, lo cual es indicativo que el anticuerpo tiene la capacidad de cambiar el equilibrio de  $\beta$ A y actuar como un atractor en la periferia, como propuesto por la hipótesis del sumidero periférico (Lemere y Masliah, 2010). Los resultados que se reportaron para la evaluación de la función cognitiva luego del tratamiento revelaron que el declive cognitivo en los pacientes tratados se estabilizó, pero no generó mejoras funcionales. Este anticuerpo se encuentra actualmente en un ensayo clínico importante que incorpora a 1000 pacientes para probar su efecto en etapas pre-sintomática de la EA (Strobel y Zakaib, 2013).

Se encuentran en ensayos clínicos también anticuerpos que están dirigidos contra estados de conformación de  $\beta$ A y otras regiones del péptido además de la N-terminal.

Entre estos anticuerpos están: MABT5102A (Crenezumab, Genetech) que se une con afinidad a monómeros, oligómeros y fibrillas (Adolfsson *et al.*, 2012) y que actualmente se encuentra comenzando la fase II, después de haber evaluado su seguridad en la fase I; R1450 (Gantenerumab, Hoffman-LaRoche) que se une específicamente a placas amiloides con conformación fibrilar (Bohrmann *et al.*, 2012) y cuya evaluación en fase III inició en 2012.

Tanto en pacientes con EA como individuos sanos se han detectado autoanticuerpos contra  $\beta$ A (nAbs $\beta$ A) en el plasma sanguíneo. Curiosamente, en pacientes con EA estos autoanticuerpos se presentan en menor cantidad, y su nivel se correlaciona con la edad de padecimiento de la EA. Se ha reportado además que estos autoanticuerpos están dirigidos de forma preferencial a los oligómeros de  $\beta$ A y que son específicamente estos nAbs $\beta$ A contra estados conformacionales los que se encuentran disminuídos en pacientes con EA (Wang *et al.*, 2006).

IVIg (Gammagard, Baxter Health Care) es un pool de inmunoglobulinas humanas que contiene nAbs $\beta$ A. Previamente se había evaluado la administración intravenosa de Gammagard en ocho pacientes, donde se encontró que declive cognitivo se estabilizó. Sin embargo, el estudio en fase III que reclutó a 390 pacientes con Alzheimer moderado no encontró que su administración estabilizara el deterioro cognitivo ni funcional en estos pacientes en comparación al grupo que recibió placebo, por lo que Baxter detuvo los ensayos clínicos con Gammagard (Rogers, 2013).

### ***Mecanismos de acción de los anticuerpos contra $\beta$ A***

Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales los anticuerpos contra  $\beta$ A ejercen sus efectos (Fig. 11) (Weiner y Frenkel, 2006)

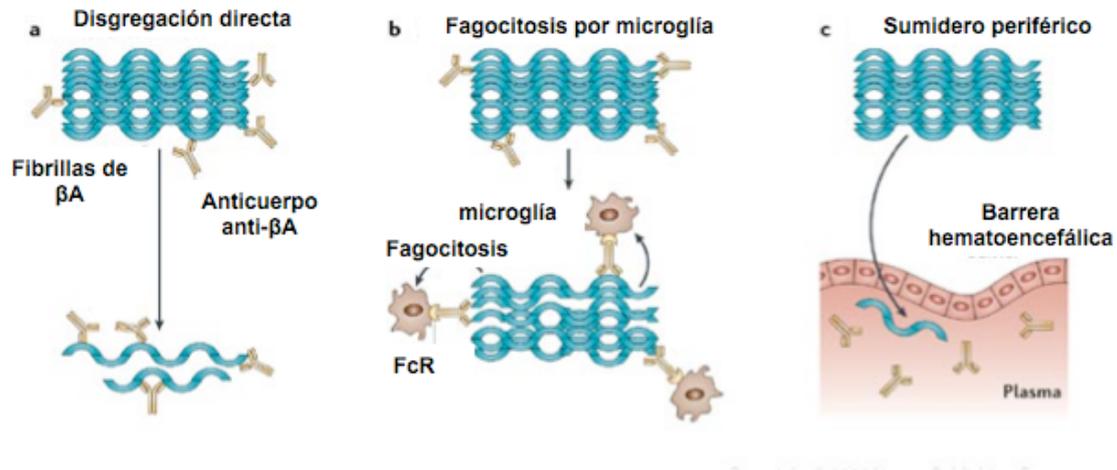


Figura 11. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los anticuerpos anti- $\beta$ A. a. desagregación o neutralización mediada por interacción directa de anticuerpos con  $\beta$ A. b. Fagocitosis del complejo anticuerpo-  $\beta$ A mediada por el receptor Fc. c. Mecanismo del consumo o sumidero periférico. Moléculas atractoras en la circulación inducen una salida de  $\beta$ A del cerebro al plasma. Modificado de Weiner y Frenkel, 2006.

- Por interacción o neutralización de las especies tóxicas de  $\beta$ A. Los anticuerpos inhiben la fibrillogénesis y la formación de oligómeros, cambiando el equilibrio entre agregados y monómeros hacia monómeros, los cuales pueden ser más fácilmente degradados. Este mecanismo está sustentado en evidencia experimental *in vitro*, donde la adición de anticuerpos anti-  $\beta$ A impide la agregación del péptido o bien revierte la agregación de fibrillas (Brody y Holtzman, 2008).
- Por activación de microglía mediante el receptor Fc. La microglía activa es capaz de fagocitar agregados amiloides extracelulares. Este mecanismo requiere que los anticuerpos lleguen al parénquima cerebral para activar la microglía residente. Los anticuerpos con isotipo IgG2 poseen mayor afinidad por los receptores Fc, y se ha encontrado que promueven una mayor eliminación de los agregados extracelulares de  $\beta$ A (Burbach *et al.*, 2007).
- Mecanismo del sumidero periférico. Este mecanismo se propuso luego de que la administración intravenosa de anticuerpos anti- $\beta$ A indujo una mejora cognitiva y niveles de  $\beta$ A más altos en el plasma sanguíneo en el modelo murino PDAPP (DeMattos *et al.*, 2001). Por las restricciones de la BHE, sólo el 0.1% de anticuerpos pasa a través de ella. A pesar de este porcentaje bajo, los anticuerpos anti-  $\beta$ A sin unirse a  $\beta$ A cerebral, median un decremento en la carga amiloide en cerebro, por lo cual se le atribuye a los anticuerpos anti- $\beta$ A un efecto atractor, como

el que se discutió previamente para las sustancias con afinidad por  $\beta$ A. La implicación de este mecanismo es que hay un equilibrio entre el  $\beta$ A en plasma y el  $\beta$ A cerebral.

### ***Lecciones aprendidas***

La revisión de la información disponible acerca de los ensayos clínicos de inmunoterapéuticos contra la EA muestra que la tendencia general de estos ensayos es que cuando se evalúan los efectos en la función cognitiva no hay una mejora en ésta, siendo el mejor de los casos una estabilización del declive, a pesar de los prometedores resultados que se obtienen en los ensayos preclínicos.

En todos los ensayos, los pacientes reclutados ya presentan síntomas (Alzheimer leve o moderado), lo cual es inevitable en el sentido que gracias a los síntomas se diagnostica que el paciente tiene EA con alta probabilidad. Sin embargo, de acuerdo con los descubrimientos de años recientes, los eventos que conducen a la neurodegeneración, como la acumulación de especies oligoméricas intracelulares que inducen pérdida de sinapsis y estrés oxidante, ocurren 10-20 años antes de la aparición de síntomas clínicos. Esto quiere decir que los pacientes con EA leve o moderada ya presentan pérdida sináptica y otros eventos neurodegenerativos. Más aún, en los pacientes que se ha reportado alguna estabilización del declive cognitivo, son pacientes que presentan Alzheimer leve (Galimberti *et al.*, 2013).

Atacar solamente a  $\beta$ A en etapas tardías o medias de la enfermedad puede ser inefectivo, porque en esa etapa ya se presenta pérdida neuronal y es posible que algunos eventos de la cascada neurodegenerativa se vuelvan independientes del estímulo inicial (acumulación de  $\beta$ A) y actúen en concierto con  $\beta$ A (Golde *et al.*, 2011). Por lo anterior, es evidente un desfase entre las terapias que buscan reducir la carga amiloide en etapas tardías de la enfermedad, si no se acopla este tratamiento a alternativas para restaurar o atenuar los efectos de la pérdida neuronal (Medeiros *et al.*, 2012).

De acuerdo a la progresión patológica de la enfermedad propuesta por la hipótesis de la cascada amiloide, la acumulación intraneuronal de  $\beta$ A es el estímulo que detona los eventos neurodegenerativos que resultan en la demencia asociada a la EA. Por ello es razonable decir que los tratamientos contra  $\beta$ A deberían probarse en las etapas tempranas del curso de la enfermedad, lo cual implica que se requieren marcadores más precisos que permitan el

diagnóstico temprano de la EA, antes de que el daño neuronal sea irreversible (Galimberti *et al.*, 2013).

Otro punto a considerar para el diseño de futuras terapias es que la mayoría de los anticuerpos que se han probado en ensayos clínicos están dirigidos al epítipo inmunodominante en la porción N-terminal  ${}_{3}\text{EFRH}_6$  la cual no está presente en los péptidos N-truncados piroglutamados. La presencia dominante de péptidos piroglutamados en pacientes con EA y las implicaciones que estos tienen en la patogénesis de la enfermedad, sugiere que no debería subestimarse el papel de los péptidos amino-truncados piroglutamados en el diseño de futuros terapéuticos e incluso posiblemente de marcadores de diagnóstico, dada su acumulación en etapas tempranas de la EA.

Existen dos grandes presiones en el campo de la investigación de la inmunoterapia para la EA, tanto por desarrollar nuevos inmunoterapéuticos efectivos que tengan el máximo beneficio con el mínimo efecto secundario, como por encontrar marcadores tempranos de la EA. El cumplir estos dos objetivos implica que se requieren tomar en cuenta los hallazgos recientes sobre la enfermedad y enfocar los nuevos tratamientos a interrumpir los eventos patológicos tempranos de la EA, que involucran principalmente al péptido  $\beta\text{A}$ , antes que su acumulación conlleve a la cascada neurodegenerativa asociada a la EA.

Para lo anterior, se requiere mejorar el entendimiento de los mecanismos moleculares que implican a  $\beta\text{A}$  en la disfunción celular temprana, así como caracterizar los determinantes antigénicos en las especies patogénicas relevantes para la EA con el fin de desarrollar inmunógenos capaces de reconocerlas e inducir una respuesta inmune protectora para su tratamiento. Una herramienta importante para la caracterización de los determinantes antigénicos de las proteínas de interés es el mapeo de epítomos.

### **Mapeo de epítomos**

Un epítipo o determinante antigénico de células B es la región de un antígeno que es capaz de estimular la producción de anticuerpos y de combinarse con los anticuerpos específicos producidos por dicha respuesta hacia ese epítipo particular. Un mismo antígeno puede presentar más de un epítipo, que pueden clasificarse en dos grandes grupos: epítomos continuos o discontinuos (Gershoni *et al.*, 2007).

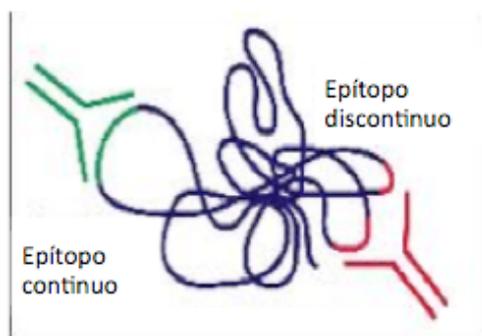


Figura 12. Representación esquemática de un epítipo continuo y uno discontinuo en el mismo antígeno.

Un epítipo continuo está formado por aminoácidos adyacentes en la estructura primaria de la cadena polipeptídica. Los anticuerpos específicos para un epítipo continuo reconocen 3 ó 4 aminoácidos críticos que permiten la interacción específica entre epítipo/anticuerpo, y que se encuentran en secuencia lineal (Fig. 12).

En cambio, los anticuerpos contra epítipos discontinuos reconocen una estructura en el antígeno. La superficie de una proteína no es sólo una cadena de aminoácidos, sino que presenta estructura tridimensional que está determinada por la interacción entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que conforman a la proteína (Moreau *et al.*, 2006). Los epítipos discontinuos están compuestos por residuos de aminoácidos que están alejados en la estructura primaria de la proteína, pero que se encuentran en cercanía en la estructura tridimensional de esta, precisamente por los pliegues y bucles que presenta una proteína (Fig. 12).

El mapeo de epítipos es el método mediante el cual pueden identificarse los determinantes antigénicos específicos de anticuerpos en la proteína contra la cual se desarrollaron.

La identificación y caracterización de estos sitios de interacción antígeno/anticuerpo son importantes para el desarrollo de nuevos terapéuticos, vacunas y marcadores de diagnóstico (Gershoni *et al.*, 2007), objetivos urgentes para la EA.

#### ***Técnica de despliegue en fago filamentoso y selección por afinidad (biopanning)***

Una de las estrategias para llevar a cabo la identificación de epítipos es el proceso de bioselección con bibliotecas de péptidos expresados por despliegue en fagos filamentosos (Phage Display). Esta es una técnica que permite expresar un conjunto de péptidos fusionados genéticamente a la proteína de superficie pIII del fago filamentoso M13, de manera que el inserto peptídico también se expresa en la proteína pIII. Una de las ventajas de esta técnica es que pone a prueba insertos con millones de combinaciones de aminoácidos en un proceso de bioselección que permite recuperar aquellos fagos que

poseen los insertos con las características deseadas (Gershoni *et al.*, 2007), lo cual se denomina biopanning o selección por afinidad. ya que la presión de selección está dada por la unión del inserto en los fagos a los anticuerpos que se usen en la bioselección.

Los fagos que sobrevivan los ciclos de selección por su unión a los anticuerpos pueden ser posteriormente aislados para caracterizar el inserto que poseen (Inbar y Benhar, 2012).

De esta forma, al finalizar los ciclos de selección se obtiene una población de fagos enriquecida en clonas con insertos específicos para la molécula blanco. Generalmente se recomienda realizar entre 3 y 4 rondas de biopanning, ya que las secuencias se vuelven menos diversas en cada ronda, lo cual podría limitar el repertorio de resultados, pero menos rondas resultaría en muchos insertos con baja especificidad por los anticuerpos con los que se evalúe (Derda *et al.*, 2011)

Esta técnica se ha usado ampliamente para la identificación de epítomos, y es una alternativa importante contra otras técnicas costosas y laboriosas para el hallazgo de blancos terapéuticos. Además, esta tecnología permite encontrar insertos peptídicos que mimeticen epítomos naturales del antígeno (mimótopos), así como caracterizar la especificidad de unión de péptidos (Mayrose *et al.*, 2007).

### **Anticuerpos contra epítomos lineales en $\beta$ -amiloide**

$\beta$ A presenta epítomos tanto para células T como para células B: la región N-terminal (a.a. 1~15) presenta un epítomo inmunodominante para las células B, mientras que la región central (a.a. ~17~32) y C-terminal (a.a. ~32~42) presentan epítomos para las células T (Monsonego *et al.*, 2001). De acuerdo al sitio de unión de los anticuerpos anti- $\beta$ A en la secuencia lineal de este péptido, los anticuerpos se han clasificado en tres grupos: N-terminal (a.a.1~15), anticuerpos contra la región central (a.a. ~17~32), anticuerpos contra la región C terminal (a.a. ~32~42). En general se ha encontrado que los anticuerpos dirigidos contra epítomos lineales de  $\beta$ A son capaces de reducir la patología amiloide mediante los mecanismos descritos anteriormente, aunque los resultados en ensayos clínicos no han logrado reproducir, a gran escala, los resultados pre-clínicos.

A pesar de que el énfasis de los inmunoterapéuticos empleados en ensayos clínicos ha caído en anticuerpos dirigidos contra secuencias lineales, en desórdenes como la EA que implican proteínas mal plegadas (desórdenes conformacionales), tener anticuerpos que reconozcan estas conformaciones patológicas son invaluable para la investigación, el diagnóstico y el tratamiento, dada la relevancia de los oligómeros de  $\beta$ A en la patogénesis de la EA (Kayed y Glabe, 2006).

### 3. Antecedentes de Trabajo

Cuando se realiza una identificación de epítomos por un proceso de bioselección por despliegue en fago, a menudo es posible mapear el epítomo a una región determinada del antígeno nativo, por comparación entre la secuencia del inserto expresada en las clonas con la secuencia del ligando natural, de manera que el motivo peptídico coincide con la secuencia lineal de los aminoácidos de la proteína nativa. Sin embargo, el mapeo también puede revelar epítomos no-lineales.

Se sabe que  $\beta$ A presenta diferentes estados de agregación con conformaciones distintas (Fändrich *et al.*, 2011). Esto implica que hay diferencias en la estructura de los múltiples estados de agregación de  $\beta$ A, y que según la conformación pueden estar expuestos distintos residuos, por lo cual estos estados de agregación presentan epítomos conformacionales particulares (Glabbe, 2004).

La generación de anticuerpos contra epítomos conformacionales, particularmente de oligómeros, proporciona una herramienta para profundizar en los mecanismos de patogénesis en los que está implicado este estado conformacional, ya que permiten localizar y cuantificar los niveles de oligómeros (Kayed *et al.*, 2003; Oddo *et al.*, 2003), lo cual es importante para evaluar, por ejemplo, el efecto de tratamientos que tengan por blanco terapéutico a los oligómeros (Kayed y Gable, 2006).

Evidencias experimentales indican que  $\beta$ A posee epítomos conformacionales que inducen una respuesta humoral; a partir de la inmunización con fibrillas (Gaskin *et al.*, 1993; O'Nuallain y Wetzel, 2002; Miller *et al.*, 2003; Gevorkian *et al.*, 2004) u oligómeros (Yang *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 2001; Kayed *et al.*, 2003) se han generado en modelos animales anticuerpos que reconocen a su respectivo estado conformacional.

Trabajos con mapeo de epítomos de  $\beta$ A fibrilar u oligomérico han encontrado péptidos que pueden interactuar con los anticuerpos dirigidos contra dichos estados de agregación. Estos péptidos imitan a los epítomos conformacionales de  $\beta$ A fibrilar u oligomérico, pero no presentan homología en su secuencia con  $\beta$ A (Gevorkian *et al.*, 2004; Scheeberger *et al.*, 2009; Pérez-Garmendia *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010), por lo cual se denominan mimótopos antigénicos. El término mimótopo se usa para referirse a péptidos de tamaño pequeño que pueden unirse de forma específica al sitio de unión de su receptor sin coincidir con la secuencia del antígeno original (Geysen *et al.*, 1984). También llamados imitadores

antigénicos, los mimótopos son seleccionados por afinidad en la interacción antígeno/anticuerpos dada precisamente su capacidad de imitar al epítopo en estructura, aún si su secuencia primaria es distinta a la del epítopo (Moreau *et al.*, 2006). Si estos mimótopos son capaces de inducir anticuerpos que presentan reacción cruzada con el epítopo natural, entonces también son inmunogénicos.

La identificación de mimótopos se ha usado en la investigación para el desarrollo de vacunas para diversas enfermedades (Wang *et al.*, 2007; Wierzbicki *et al.*, 2008; Knittelfelder *et al.*, 2009), el diseño de moléculas agonistas o antagonistas para enzimas o receptores (Wang *et al.*, 2004) y el desarrollo de marcadores de diagnóstico (Marston *et al.*, 2002; Beckmann *et al.*, 2005).

Para el caso de la EA, identificar mimótopos que induzcan la producción de anticuerpos contra oligómeros de  $\beta$ A proveería nuevos blancos moleculares que permitirían generar terapéuticos más eficientes, como vacunas de epítomos. Las ventajas de las vacunas de epítomos son el bajo costo de su manufactura, su baja toxicidad, que generan anticuerpos que presentan reacción cruzada con el epítopo natural y además, al ser un antígeno no propio, se potenciaría la respuesta humoral, características deseables en un terapéutico (Gershoni *et al.*, 2007). Además, las vacunas basadas en epítomos podrían ayudar a reducir la producción de anticuerpos no efectivos y aumentar la actividad específica de los anticuerpos neutralizantes.

Las variantes de  $\beta$ A que más ampliamente han sido investigadas para la inmunoterapia son  $\beta$ A1-40 y  $\beta$ A1-42, dada su prevalencia en las placas amiloides. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado que una porción significativa (más del 50%) del  $\beta$ A total en cerebros de pacientes con EA y SD corresponde a variantes amino-truncadas piroglutamadas del péptido  $\beta$ A, de las cuales el péptido  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> es el más abundante (Saido *et al.*, 1995; Sergeant, 2003). En contraste, en pacientes con placas amiloides pero sin déficit cognitivo, la proporción de péptidos piroglutamados es mínima (Guntert *et al.*, 2006). Se ha encontrado que los péptidos piroglutamados son más proclives a la agregación por su mayor hidrofobicidad (Schlenzig *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2012), poseen resistencia a la degradación por aminopeptidasas (Drew *et al.*, 2010) y sus agregados son altamente tóxicos para las neuronas (Piccini *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2002).

Particularmente, el péptido  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> se ha encontrado en los depósitos focales de las placas neuríticas, y se ha reportado también que sus niveles se correlacionan con la severidad de la

demencia (Sullivan *et al.*, 2011).

Se ha encontrado que la presencia de la modificación N-terminal en los péptidos piroglutamados promueve su agregación en oligómeros (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2010), que se consideran el estado de agregación patológico de  $\beta A$  en la EA (Haass y Selkoe 2007; Walsh y Selkoe, 2007).

Un modelo murino transgénico que producen altas cantidades de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  (en comparación a otras cepas) presenta pérdida neuronal y déficits cognitivos a las 8 semanas, que se correlaciona con los niveles de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  (Wirhth *et al.*, 2009). La administración intraventricular de agregados de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en ratones C57BL/6 indujo deficiencias en el desempeño en pruebas conductuales para evaluar memoria en comparación al control (Youssef *et al.*, 2007).

Adicionalmente,  $\beta A_{pE\ 3-42}$  es capaz de co-oligomerizar con  $\beta A_{1-42}$ , formando oligómeros mixtos de bajo peso molecular que poseen una estructura distinta a los oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  y presentan mayor citotoxicidad neuronal (Nussbaum *et al.*, 2012).

Los anteriores hallazgos han postulado al péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  como relevante en la patogénesis de la EA, reconociéndolo como un blanco terapéutico potencial (Gunn *et al.*, 2010; Jawhar *et al.*, 2011; Nussbaum *et al.*, 2012; Pérez-Garmendia y Gevorkian, *por publicar*).

Por la modificación N-terminal de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ , los anticuerpos dirigidos contra el extremo amino intacto no reconocen a éste péptido piroglutamado. Más aún, se ha reportado que los agregados formados por  $\beta A_{pE\ 3-42}$  presentan una conformación distinta a los oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  (Sun *et al.*, 2010), por lo que los anticuerpos contra epítomos conformacionales de  $\beta A_{1-42}$  o  $\beta A_{1-40}$  tampoco reconocen los agregados de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  piroglutamado (Pérez-Garmendia y Gevorkian, *por publicar*).

La importancia emergente de los péptidos piroglutamados en la patogénesis de la EA ha interesado a algunos grupos de investigación, entre ellos el nuestro, para evaluar el potencial inmunoterapéutico de los péptidos piroglutamados.

Se ha establecido experimentalmente que la inmunización con  $\beta A_{pE\ 3-42}$  genera anticuerpos contra  $\beta A_{pE\ 3-42}$  (Acero *et al.*, 2009; Wirhth *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2012; DeMattos *et al.*, 2012; Nava-Catorce, 2012).

La evaluación *in vitro* de estos anticuerpos ha reportado que inhiben la agregación y efectos tóxicos de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ , por lo que puede considerarse que tienen un efecto protector (Wirhth *et al.*, 2010).

Distintos grupos de trabajo han desarrollado anticuerpos monoclonales contra  $\beta A_{pE\ 3-42}$  que se han empleado en ensayos de inmunización pasiva. En estos experimentos se ha encontrado que son capaces de reducir la cantidad de oligómeros intracelulares de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ , reducir el déficit cognitivo, disminuir la carga amiloide total e incluso reducir la formación de placas amiloides en hipocampo y corteza cerebral sin efectos adversos (Wirhth *et al.*, 2010; Frost *et al.*, 2012). La reducción en carga amiloide total es indicativo que  $\beta A_{pE\ 3-42}$  tiene efectos en otras variantes de  $\beta A$ , por lo cual puede ser un objetivo terapéutico estratégico (Bayer y Wirhth, 2011).

En un trabajo reportado en el 2009, Acero y colaboradores determinaron que los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE\ 3-42}$  inducidos en conejos reconocían de manera exclusiva a agregados oligoméricos del péptido, sin presentar reacción cruzada con otras variantes de  $\beta A$  (Acero *et al.*, 2009). Posteriores trabajos de este mismo grupo confirmaron el hallazgo (Nava-Catorce, 2012) en ratones de la cepa Balb/c.

El grupo de Wirhth y colaboradores reportó en 2010 un anticuerpo monoclonal (9D5) desarrollado específicamente contra oligómeros de bajo peso molecular de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ . 9D5 presenta un patrón de inmunoreactividad diferente a anticuerpos dirigidos contra el extremo N-terminal de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  tanto en tejidos de ratones transgénicos como de pacientes con EA. En este mismo trabajo encontraron que las placas en pacientes no-dementes no presentaban reacción con 9D5, mientras que los cerebros de los pacientes con EAF y EA sí presentaron inmunoreactividad, corroborando la presencia de oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en estados patológicos (Wirhth *et al.*, 2010). Este anticuerpo monoclonal tampoco reconoce agregados de otras variantes.

Se ha reportado que los oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  se acumulan al interior de las células en etapas tempranas del subtipo familiar de la EA (EAF) y en pacientes con SD (Huse *et al.*, 2002; Sergeant *et al.*, 2003). Tomando en cuenta su mayor propensión a formar agregados y los estudios anteriormente mencionados, se ha propuesto que  $\beta A_{pE\ 3-42}$  puede actuar como semilla de agregación en etapas tempranas de la EA (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2010), por lo cual los oligómeros del péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  podrían servir como un marcador de diagnóstico temprano de la EA (Wirhth *et al.*, 2010).

La especificidad de los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE\ 3-42}$  por el péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  sugiere que presenta epítomos particulares que no son reconocidos por anticuerpos desarrollados contra otras variantes de  $\beta A$ . Considerando las implicaciones que tienen los oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en la patogénesis de la EA y que estos no presentan el epítomo inmunodominante N-

terminal EFRH, sería conveniente mapear sus epítomos para el diseño de terapéuticos específicos como vacunas de epítomos o bien para generar marcadores moleculares de  $\beta A_{pE 3-42}$  de diagnóstico.

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios sobre la inmunogenicidad de  $\beta A_{pE 3-42}$  tanto en conejos (Acero *et al.*, 2009) como en ratones (Nava-Catorce, 2012), donde se ha demostrado la capacidad de preparaciones oligomerizada de  $\beta A_{pE 3-42}$  de inducir anticuerpos en ambas especies, así como una respuesta tipo Th2 en ratones de la cepa Balb/c (Nava-Catorce, 2012). Asimismo, se realizó la identificación de epítomos (mediante la técnica de despliegue en fago filamentoso) para anticuerpos anti- $\beta A_{pE 3-42}$  producidos en conejo. (Acero *et al.*, 2009). Las clonas obtenidas por bioselección con base en su reactividad con el suero anti- $\beta A_{pE 3-42}$  presentaron una secuencia concenso homóloga (QFRH) que coincide con el motivo FRH presente en la secuencia lineal N-terminal de  $\beta A$ . A pesar de esta homología, las clonas no fueron capaces de unirse a anticuerpos anti- $\beta A_{1-42}$ , lo cual indica que son específicas para  $\beta A_{pE 3-42}$  (Acero *et al.*, 2009).

No obstante los resultados obtenidos con suero de conejo, sería deseable realizar el mapeo de epítomos de  $\beta A_{pE 3-42}$  empleando suero de ratón, no sólo porque gran parte de los trabajos experimentales pre-clínicos en el área de investigación sobre la EA se desarrollan empleando este modelo animal, sino porque las secuencias nativas de ambas especies  $\beta A$  difieren. En el caso de los conejos la secuencia del  $\beta A$  es idéntica a la del humano, por lo que representa un autoantígeno ya que los péptidos empleados para inmunizar tienen la secuencia humana. En los ratones la secuencia difiere en tres aminoácidos del extremo amino-terminal (Arg5-Gly, Tyr10-Phe e His13-Arg) (Jankowsky *et al.*, 2007), por lo cual  $\beta A$  humano o de péptido sintético sería reconocido como no propio (Gevorkian *et al.*, 2004).

#### 4. Planteamiento del Problema

La enfermedad de Alzheimer se considera un enorme problema económico y de salud pública; sin embargo, no se cuenta con tratamientos eficaces para controlarla. El reto que ha significado encontrar tratamientos efectivos para esta enfermedad radica en la complejidad de factores que afectan su desarrollo, que ocurre en el marco de un proceso complejo como es el envejecimiento y que hasta ahora no se cuenta con marcadores de diagnóstico efectivos que permitan identificar a la población en riesgo de padecer EA. Esto es particularmente importante, debido a que se ha establecido que los cambios patológicos asociados al proceso neurodegenerativo que caracteriza a los pacientes con EA comienzan entre 10-20 años antes de la aparición de síntomas clínicos, por lo que las terapias evaluadas en etapas tardías pueden no ser efectivas en influir en su desarrollo.

En cuanto al origen de la EA, la hipótesis dominante es la de la cascada amiloide, la cual propone la acumulación anómala del péptido  $\beta A$  en el cerebro como el agente etiológico de la EA, por lo cual las investigaciones en el área se han enfocado en encontrar agentes capaces de reducir la carga amiloide en el cerebro. La inmunoterapia se ha posicionado como una estrategia con resultados prometedores en estudios pre-clínicos, donde se ha demostrado que tanto la inmunoterapia activa como pasiva reducen la acumulación de  $\beta A$  en el cerebro, inhiben su agregación en estados conformacionales tóxicos y mejoran el desempeño en pruebas cognitivas en los modelos murinos que han sido tratados. Sin embargo, en ensayos clínicos con inmunoterapéuticos no se han logrado reproducir las mejoras cognitivas a gran escala.

La especie de  $\beta A$  que más atención ha recibido en el diseño de inmunoterapéuticos es  $\beta A_{1-42}$ . Sin embargo se ha encontrado que las especies dominantes de  $\beta A$  en cerebros de pacientes con EA corresponden a péptidos N-truncados piroglutamados, entre los cuales destaca el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  por su toxicidad, su tendencia a la oligomerización, su acumulación progresiva en etapas tempranas de la EA y su capacidad de actuar como semilla de agregación. Asimismo, se ha demostrado que la reducción en niveles de  $\beta A_{pE3-42}$  cerebral también reduce la cantidad total de todas las especies de  $\beta A$ . Las anteriores evidencias postulan al péptido  $\beta A_{pE3-42}$  como un blanco terapéutico y un marcador diagnóstico potencial, por lo que es importante considerarlo en el diseño de futuras estrategias de inmunoterapia, ya que hasta el momento la mayor parte de los anticuerpos

desarrollados para el tratamiento inmunoterapéutico de la EA están basados en un epítipo amino-terminal del péptido de longitud completa ( $\beta A_{1-42}$ ) que no se encuentra presente en  $\beta A_{pE3-42}$  dado su truncamiento en el extremo amino.

Uno de los retos de la inmunoterapia es desarrollar inmunoterapéuticos más seguros (que no induzcan una respuesta inmune en detrimento del paciente) y eficaces. Una propuesta para lograr lo anterior es identificar los epítipos o mimótopos de moléculas involucradas en la patogénesis de la EA, ya que esto permitiría desarrollar tratamientos novedosos como vacunas basadas en epítipos/mimótopos.

Dada la importancia emergente del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  y su potencial de uso tanto en inmunoterapéuticos como en el diagnóstico se propone realizar la identificación de epítipos/mimótopos en un modelo murino, ya que gran parte de los trabajos experimentales pre-clínicos en el área de investigación sobre el Alzheimer se desarrollan empleando este modelo animal.

## 6. Objetivos

### *Objetivo General*

Identificar epítomos del péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  reconocidos por un suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  de origen murino mediante un proceso de bioselección empleando la técnica de despliegue en fago filamentoso (Phage Display).

### *Objetivos Particulares*

- Obtener un suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  mediante la inmunización de ratones BALB/C con una preparación oligomerizada del péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$
- Llevar a cabo el proceso de bioselección utilizando el suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  y una biblioteca de péptidos desplegados en fago filamentoso
- Evaluar por ELISA la reactividad de las clonas obtenidas después de 3 rondas consecutivas de bioselección
- Secuenciar y analizar los insertos de las clonas seleccionadas para identificar epítomos/mimótopos del péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$
- Evaluar la especificidad de los insertos en las clonas seleccionadas en ensayos ELISA de competencia.

## 7. Desarrollo Experimental

### *Preparación de $\beta$ A 3-42 piroglutamado en forma oligomérica*

Para preparar los oligómeros del péptido  $\beta$ A<sub>pE3-42</sub> se siguió el protocolo reportado por Klein (2002). Primero se monomerizó el péptido sintético (AnaSpec, California EUA) a través de su dilución en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (Sigma-Aldrich, Francia) a 4°C a una concentración de 1 mM y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se evaporó toda la noche a temperatura ambiente en la campana de humos y se liofilizó por tres días. Para obtener los oligómeros, el péptido liofilizado se resuspendió en esterilidad con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Francia) a una concentración de 5mM y se llevó a 230  $\mu$ M con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) estéril. Para formar los oligómeros se dejó la preparación a 37°C toda una noche, posterior a la cual se incubó a 4°C.

### *Obtención del suero anti- $\beta$ A 3-42 piroglutamado.*

Todos los ratones usados en este trabajo se trataron de acuerdo a los lineamientos de manejo animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Un grupo de ocho ratones machos de la cepa BALB/c de 9 semanas de edad se dividió en dos grupos: uno de cinco y otro de tres ratones. El primer grupo se estableció como el experimental; estos ratones se inmunizaron con la preparación de  $\beta$ A<sub>pE3-42</sub>, excipiente (PBS 1X estéril) más adyuvante de Freund. El grupo de tres ratones fue el grupo control y recibió PBS 1X estéril más adyuvante de Freund. Este adyuvante potencia la activación y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Billiau y Matthys, 2001). Los ratones en ambos grupos recibieron inyecciones de sus respectivos tratamientos por dos meses, de la siguiente manera:

Cada ratón del grupo experimental se inmunizó con 20  $\mu$ g de péptido  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> emulsionado con adyuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich, Francia), volumen 1:1 vía intraperitoneal. Posterior a la primera inmunización se realizaron 4 refuerzos con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Francia) a los 7, 14, 28 y 42 días posterior a la primera inyección. A los ratones control se les administró, con el mismo esquema, únicamente PBS estéril 1X con adyuvante. Previo al sangrado a blanco se verificó la existencia de anticuerpos contra  $\beta$ A<sub>pE 3-42</sub> por una prueba ELISA del suero de cada uno de los ratones en el grupo experimental. El suero de cada grupo se colectó en un pool, el cual se dividió en alícuotas de 1.0 ml.

### *Titulación del suero inmune*

Para la titulación se realizaron diluciones doble seriales desde 1:100 a 1:12, 800 del suero inmune y del suero no-inmune (sólo adyuvante) como control negativo.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca) con 0.2 µg por pozo de  $\beta A_{pE3-42}$  preparado como se indicó en el primer apartado de la metodología, en un volumen final de 100 µL de buffer de carbonatos (pH 9.6), y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa en un lavador automático de 4 ciclos (WellWash, Thermo Electron Corporation, EUA) con PBS-Tween al 0.2%. Luego del lavado se bloqueó la placa con 200 µL de PBS-Leche-TritónX-100 al 0.2% durante una hora a 37°C. Se lavó nuevamente la placa y luego se agregaron 100µL por pozo del suero anti- $\beta A_{pE 3-42}$  en diluyente (PBS-Leche-2% TritónX-100 al 0.2%), en las siguientes diluciones: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 y 1:12, 800. Se hizo lo mismo para el suero control. Se incubó por una hora a 37°C y después del lavado, se agregó como anticuerpo secundario anti IgG total de ratón hecho en cabra, conjugado a la enzima HRP (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA), diluido 1:5000 en PBS-leche 2% TritónX-100 0.2%. Se incubó durante una hora a 37°C, posterior a la cual se lavó y se adicionaron 200 µL de sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed, San Francisco, CA, EUA). Se dejó reaccionar por aproximadamente media hora a 37°C para acelerar la reacción. Finalmente, se tomó la lectura de la placa en un lector de placas automático (Dynex, Virginia, EUA) a 405 nm.

### *Reactividad del suero de ratón anti-pE $\beta A_{3-42}$ contra diferentes especies de $\beta A$ ( $\beta A_{11-42}$ , $\beta A_{pE 11-42}$ , $\beta A_{1-42}$ , $\beta A_{pE 3-42}$ ).*

Para determinar si el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  presentaba reactividad cruzada con otras especies de  $\beta A$  se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca) con 0.2µg por pozo de diferentes especies de  $\beta A$ :  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{pE3-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE11-42}$  (AnaSpec, California EUA) en un volumen final de 100 µL de buffer de carbonatos (pH 9.6) por pozo y se incubó toda la noche a 4°C. Adicionalmente, como control negativo se empleó un péptido no relacionado (PNR). Este péptido presenta una secuencia no relacionada con  $\beta A$  y fue generado en nuestro laboratorio. A esta preparación se le incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la placa en un lavador automático de 4 ciclos (WellWash, Thermo Electron Corporation, EUA) con PBS-Tween al 0.2%. Luego del lavado se bloqueó la placa con 200 µL por pozo de PBS-Leche-TritónX-100 al 0.2% durante una hora a 37°C.

Se lavó nuevamente la placa y luego se agregaron 100 $\mu$ L por pozo del suero de ratón anti- $\beta A_{pE3-42}$  en diluyente (PBS-Leche-2% TritónX-100 al 0.2%) 1:100.

Como control positivo se emplearon sueros inmunes contra cada uno de los péptidos evaluados: anti- $\beta A_{11-42}$ , anti $\beta A_{pE11-42}$  y anti $\beta A_{1-42}$ , en dilución 1:100. Estos sueros fueron obtenidos en nuestro laboratorio.

Se incubó por una hora a 37°C y después del lavado, se agregó como anticuerpo secundario anti IgG de ratón hecho en cabra, conjugado a la enzima HRP (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA), dilución 1:5000 en PBS-leche 2% TritónX-100 0.2%. Se incubó durante una hora a 37°C, posterior a la cual se lavó y se adicionaron 200  $\mu$ L de cromógeno (ABTS single solution, Invitrogen, Oregon, EUA). Se dejó reaccionar por aproximadamente 0.5 hora a 37°C para acelerar la reacción. Finalmente, se tomó la lectura de la placa en un lector de placas automático (Dynex, Virginia, EUA) a 405 nm.

#### *Bioselección (Biopanning)*

Para identificar los epítomos del péptido  $\beta A_{pE 3-42}$  se empleó una biblioteca comercial de péptidos de 7 aminoácidos (heptapéptidos) fusionados a la proteína pIII del fago filamentoso M13 (ver apéndice B) (New England Biolabs, Herfordshire, Inglaterra).

La bioselección se realizó en una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca). Cuatro pozos de la placa se sensibilizaron con 0.2 $\mu$ g por pozo de anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA) en buffer de carbonatos (pH 9.6) para un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo.

Se incubó durante una hora a 37°C, posterior al cual se lavaron los pozos manualmente; 5 lavados de 300  $\mu$ l de PBS-Tween al 0.2% por pozo, a temperatura ambiente. Luego del lavado se bloquearon las cuatro pozas con 200  $\mu$ L cada una de PBS-leche 2% TritónX-100 0.2% por una hora a 37°C, posterior a lo cual se volvieron a lavar manualmente los pozos.

Se agregó el suero de ratón anti  $\beta A_{pE 3-42}$  en dilución 1:200, usando como diluyente PBS-leche 2% Tritón-100 0.2% y se incubó por una hora a 37°C. Después de la incubación se volvió a lavar manualmente 5 veces.

Después de los lavados, a cada una de las cuatro pozas se le agregaron 100  $\mu$ l de la biblioteca comercial de péptidos expresados en fagos (New England Biolabs, Herfordshire, Inglaterra), a una concentración de  $2 \times 10^{11}$ /mL en PBS-leche (2%)-TritónX-100(0.2%) y se incubó toda la noche a 4°C (para un esquema del método ver apéndice C).

- *Elución de fagos de primera ronda*

Al día siguiente se lavaron manualmente los pozos diez veces con PBS-Tween 0.2%. Para recuperar los fagos que se habían unido a los anticuerpos por afinidad al suero inmune, a cada pozo se añadieron 100  $\mu$ l de Gly-HCl pH 2.2, y se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente, y luego 10 min a 37°C. Posteriormente se colectó el volumen de las cuatro pozas (400  $\mu$ L totales) en un microtubo estéril de 1.5  $\mu$ L y se neutralizó con 60 $\mu$ l de Tris-HCl 1M pH 9.1. Esta preparación se dejó a 4°C toda la noche.

Paralelamente, ese día se inoculó una colonia de TG1 (*Escherichia coli*) en 5 ml de medio de cultivo 2YT y se dejó toda la noche (TLN) a 200 rpm a 37°C, para amplificar al día siguiente.

- *Amplificación:*

*Obtención del primer amplificado*

Del cultivo de TG1 de TLN se tomaron 500  $\mu$ l y se diluyeron en 50 ml de 2YT (1:100) en un matraz estéril de 250 ml. Se incubó por 45 minutos en agitación (250 rpm a 37°C), verificando la turbidez que corresponde a la fase de la media logarítmica de crecimiento D.O. 600 nm=0.5. Posteriormente se realizó la infección con los fagos eluidos, empleando el volumen total que se obtuvo en la elución excepto 20  $\mu$ l que se guardaron para titular el primer eluido. Para permitir la expresión del pili, necesario para que el fago penetre a la bacteria, luego de la infección el matraz se incubó 15 minutos sin agitación a 37°C.

Pasado este tiempo, se incubó el matraz por 4.5 horas a 37°C en agitación constante (250 rpm).

El contenido del matraz se dividió en dos tubos de centrifuga (25 ml a cada uno), y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante que contenía los fagos, y se transfirió a un tubo fresco y estéril, al cual se le agregó 1/5 parte de su volumen en PEG/NaCl. Se mezcló y se guardó toda la noche el contenido a 4°C para favorecer la precipitación de los fagos.

El precipitado de toda la noche se centrifugó a 10,000 rpm 10 minutos a 4°C al día siguiente. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet, que se resuspendió en 1.0 ml de TBS 1X estéril y se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml. A esto se le agregaron 200  $\mu$ l de PEG/NaCl. Esta preparación se dejó enfriar una hora en hielo para promover la precipitación de los fagos. Pasado este tiempo se centrifugó 10 min a 10,000 rpm a 4°C.

El pellet obtenido de esta centrifugación se resuspendió en 200  $\mu$ l de TBS 1X estéril. Para deshacerse de los restos de bacterias que pudieron haber quedado, se volvió a centrifugar dos veces más por 10 min, a 10,000rpm 4°C.

Se recuperó el sobrenadante de estas centrifugaciones y se pasó a un tubo estéril, y esto constituyó el primer amplificado.

*- Titulación de eluido y amplificado*

Se sembró una colonia de *E. coli* TG1 en 10 ml de medio 2YT y se dejó toda la noche incubando a 200 rpm y 37°C. En tubos de 1.5 ml se colocaron 200  $\mu$ l del cultivo bacteriano, que se infectaron con las diluciones apropiadas del eluido y el amplificado. Las células se dejaron infectar por 20 minutos a 37°C sin agitación.

A cada tubo de infección (eluido y amplificado) se añadieron 10  $\mu$ l de Xgal/IPTG, se agitó en vórtex y se tomó el volumen completo por cada tubo. Este volumen se vertió en 4 ml de Top Agar en estado líquido. A la mezcla se le agitó en vórtex y se vació en una caja Petri con 10 mL de LB agar. Se repitió este paso para cada una de las diluciones. Las cajas Petri se incubaron toda la noche a 37°C.

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

Se realizaron 3 rondas más de bioselección; el procedimiento para la segunda y la tercera ronda fue el mismo que se describió para la primera ronda, empleando el eluido de la primera ronda para infectar a las bacterias de la segunda ronda, y el eluido de la segunda ronda para infectar a las bacterias de la tercera ronda.

Se determinaron los títulos para los eluidos y amplificados de cada ronda.

Luego de la tercera ronda de bioselección se picaron al azar 20 clonas individuales de la dilución apropiada en la titulación del tercer eluido, que fueron amplificadas y tituladas, y que se emplearon posteriormente para evaluar su reactividad contra el suero anti- $\beta$ A<sub>pE3-42</sub> y determinar su secuencia.

### *Purificación de clonas individuales*

Cada clona picada se amplificó en 5 mL de medio 2YT en tubos de 15 ml en una dilución 1:100 de bacterias *E. coli* TG1 crecidas toda la noche, y se incubó en agitación constante de 250 rpm por 4.5 horas a 37°C.

Pasadas las cuatro horas, el amplificada obtenido de cada una de las clonas individuales se centrifugó a 4°C por 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante recuperado por clona se dividió en dos alícuotas en tubos de 1.7 ml. Uno de estos se usó para la purificación de fagos para su evaluación en ELISA y su titulación, y la otra para obtener ADN de cadena sencilla.

### *Purificación de fagos por doble precipitación con PEG/NaCl*

Del sobrenadante obtenido del paso anterior se tomaron 1.2 ml y se le agregaron 200 µl de PEG/NaCl. Este paso se repitió para cada una de las 20 clonas. Los tubos se invirtieron para mezclar y se dejaron a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de TBS 1X estéril, se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril y se agregó 165 µl de PEG/NaCl. Se invirtieron los tubos para mezclar y se dejó una hora en hielo. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µl de TBS 1X estéril. Se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo y estéril.

Se obtuvieron 20 tubos que corresponden a cada una de las clonas obtenidas en el proceso de biopanning. Los fagos purificados obtenidos en este proceso se titularon y se usaron para evaluar la reactividad de cada clona contra el suero inmune.

### *Titulación de clonas obtenidas del biopanning*

Para determinar el título de cada una de las clonas se sembró una colonia de TG1 en 10 ml de medio 2YT a 200 rpm y 37°C TLN.

Al día siguiente, en un matraz con 50 ml de medio 2YT se tomaron 500 µl del cultivo de TLN, y se dejó crecer por 45 min. De cada clona se hicieron tres diluciones en medio 2YT de la siguiente forma: 1:1000, 1:1000 y 1:100. De esta última dilución se tomaron 100 µl para infectar 200 µl de bacterias respectivamente. Este proceso se repitió para cada una de las clonas. Para la infección se dejaron los tubos 20 min a 37°C. Pasado este tiempo a cada tubo de infección se añadieron 10 µl de Xgal/IPTG, se agitó en vórtex y se tomó el volumen

completo por cada tubo. Este volumen se vertió en 4 ml de Top Agar en estado líquido. A la mezcla se le agitó en vórtex y se vació en una caja Petri con 10 mL de LB agar. Se repitió este paso para cada una de las clonas. Las cajas Petri se incubaron toda la noche a 37°C y a la mañana siguiente se contaron las unidades formadoras de placa.

#### *Obtención de ADN de cadena sencilla*

Del sobrenadante obtenido en el paso de purificación de clonas individuales se tomó 1 ml en un tubo de 1.7 ml para cada una de las clonas (20 en total). A cada uno de los tubos se le agregaron 400 µl de PEG/NaCl, se invirtieron los tubos para mezclar y se dejaron toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró al vacío y se volvió a centrifugar el tubo rápidamente para retirar todo el sobrenadante remanente por aspiración.

El pellet se resuspendió en 200 µl de buffer de yoduro de sodio y 500 µl de etanol absoluto (Baker, México). Se dejó incubar a 10 minutos a temperatura ambiente.

La preparación se centrifugó 10 minutos a 13,400 rpm (Minispin Eppendorf) a temperatura ambiente.

Luego de centrifugar se desechó el sobrenadante por aspiración, asegurándose de retirar todo el sobrenadante, y se lavó el pellet en 200 µl de etanol 70%. Se centrifugó 10 minutos a temperatura ambiente (Minispin Eppendorf) a 13,400 rpm. Se volvió a aspirar el sobrenadante a cada uno de los tubos, y se dejaron secar abiertos en la campana de flujo laminar por 10 minutos.

Pasado este tiempo el pellet se resuspendió en 17 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

De este procedimiento se obtuvo ADN de cadena sencilla que se usaría para secuenciar las clonas. El ADN purificado se guardó a -20°C hasta su secuenciación.

#### *Evaluación de la reactividad de clonas individuales*

La reactividad de cada clona contra el suero inmune anti-βA<sub>PE3-42</sub> se evaluó mediante un ensayo de ELISA, con el fin de determinar su reconocimiento por el suero.

Para ello se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca) con un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón hecho en cabra (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA) en buffer de carbonatos pH 9.6 en una concentración de 5 µg/ml, con 100 µl por pozo.

Se incubó la placa durante 1 hora a 37°C, posterior al cual se lavó en un ciclo de lavado 4X con PBS-Tween al 0.2% en un lavador automático de placas (WellWash, Thermo Electron

Corporation, EUA). Luego del lavado se bloquearon las pozas con 200  $\mu$ L cada una de PBS-leche 2% por una hora a 37°C, al término de la cual se lavaron de la forma anteriormente indicada.

Posterior al bloqueo, en una mitad de la placa se agregó el suero de ratón anti- $\beta$ A<sub>pE3-42</sub> en dilución 1:200, usando como diluyente PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2% y se incubó por una hora a 37°C. Como control negativo, en la otra mitad de la placa se agregó el suero control (ratones a los que sólo se les administró adyuvante y PBS estéril) en la misma dilución.

Mientras se incubaba el suero, por cada clona se preincubaron 405 ml de PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2% en tubos de 1.5 ml a los cuales se agregaron 45  $\mu$ l de cada una de las clonas (dilución 1:10).

Pasada la hora de incubación y luego del ciclo de lavados, a cada pozo se añadió, por duplicado, 100  $\mu$ l de la preparación de clonas. La placa se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, después del ciclo de lavados se incubó la placa por una hora a 37°C con un anticuerpo anti-M13 hecho en conejo (Invitrogen) en una dilución 1:2,000 con 100  $\mu$ l por pozo, usando como eluyente PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2%.

Pasado este tiempo se volvió a lavar la placa con PBS-Tween al 0.2%. Posteriormente, se incubó la placa por una hora a 37°C con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa (Goat Anti-Rabbit IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA), en una dilución 1:4,000 en PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2%, con 100  $\mu$ l por pozo.

Se realizaron nuevamente cuatro lavados con PBS-Tween al 0.2%. Una vez lavado, a cada pozo se le agregaron 200  $\mu$ l de ABTS (ABTS single solution, Invitrogen, Oregon, EUA) como cromógeno y sustrato para la peroxidasa. La placa se protegió de la luz directa y se incubó aproximadamente por 20 min a 37°C, posterior a los cuales se leyó a una densidad óptica de 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, EUA).

#### *Secuenciación de las clonas individuales*

La secuenciación de ADN de cadena sencilla se realizó usando el primer 28 gIII incluido en el kit Ph.D. de New England Biolabs, con la secuencia 5'-<sup>HO</sup>GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C -3', 100 pmol, 1 pmol/ $\mu$ l. Las secuencias se enviaron al secuenciador Genetic Analyser 3500 XL y se llevó a cabo con el kit Big Dye Terminator V3 (Applied Biosystems) en el Instituto de Biología de la UNAM.

### *Análisis de homología por BLASTp*

Se realizó una búsqueda de homología entre los insertos secuenciados de las clonas positivas y secuencias conocidas de proteínas haciendo uso del programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), ajustando los parámetros para una búsqueda usando secuencias pequeñas.

### *ELISA de competencia*

Una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca) se sensibilizó con péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en una concentración de 0.2  $\mu\text{g}$  por pozo en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de carbonatos (pH 9.6). La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche.

Simultáneamente, en tubos independientes de 1.7 ml se preincubó el suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  en una dilución 1:800 en PBS-leche 2% TritónX-100 0.2%, con diluciones seriadas de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  pfu/ml de los amplificadores de las clonas positivas y se incubaron a 4°C toda la noche. Además se incluyó un blanco sólo con suero y diluyente (dilución 1:800), un control negativo con M13 ( $10^9$  pfu/ml) y como control positivo, tres tubos con suero, diluyente y péptido  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en las siguientes concentraciones: 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Al día siguiente, después del lavado con PBS-Tween 0.2% con 4 ciclos de un lavador automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, EUA), se bloqueó la placa con PBS 1X-leche 2% durante una hora a 37°C. La placa se volvió a lavar automáticamente. Después se agregaron, a las pozas sensibilizadas y bloqueadas, los sueros preincubados con fago y los correspondientes controles descritos anteriormente por una hora a 37°C.

Pasado este tiempo, la placa se volvió a lavar y luego se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón hecho en cabra, acoplado a peroxidasa (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA) a una dilución 1:2500 en PBS-leche 2% TritónX-100 0.2% como diluyente por una hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados nuevamente, posterior a los cuales la placa se incubó por media hora con ABTS (ABTS single solution, Zymed, San Francisco, CA, EUA) como sustrato para la peroxidasa. La lectura se tomó a 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, EUA).

### *Western Blot con sueros inmunes de conejo y ratón anti $\beta A_{pE3-42}$*

Este experimento se realizó para comparar el reconocimiento de  $\beta A_{pE3-42}$  por sueros de conejo y de ratón inmunizados con este mismo péptido.

Se corrió un gel comercial en gradiente del 4-12% NuPage (Invitrogen, CA, EUA) con tres péptidos ( $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{pE3-42}$  y  $\beta A_{pE11-42}$ ) oligomerizados de acuerdo al protocolo anteriormente descrito (Klein, 2002). Por cada carril se cargó 1  $\mu$ g de péptido, además de un marcador de peso molecular de 3.5-260 kDa (Novex) en una preparación que contenía buffer de carga (colorante, glicerol, Tris y SDS).

El gel se corrió a voltaje constante de 200 V. Posteriormente se transfirieron los péptidos a una membrana de nitrocelulosa usando buffer de transferencia (Tris-glicina) en una cámara semiseca para transferencia (Bio-Rad, EUA) 1 hora a 25 V.

Luego de transferir, se recuperó la membrana y se enjuagó con agua miliQ. La membrana se tiñó con rojo Ponceau para marcar las bandas de proteína y poder cortar las tiras en tripletes ( $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{pE3-42}$  y  $\beta A_{pE11-42}$ ) que se incubarían con los sueros.

Las tiras de tripletes se colocaron en tubos de 50 ml, y se bloquearon toda la noche a 4°C con PBS-leche 2%. Posteriormente cada membrana se lavó con PBS-Tween al 0.2% cada 5 minutos, con un total de 3 lavados.

La incubación con los anticuerpos primarios se hizo de la siguiente forma: una membrana con suero de conejo anti- $\beta A_{pE3-42}$  dilución 1:200, otra membrana con el suero de ratón anti- $\beta A_{pE3-42}$  y como control positivo, se incubó la tercera membrana con BAM90, anticuerpo dirigido contra la región central de  $\beta A$  en dilución 1:1000. Como diluyente se empleó PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2%. La incubación se realizó toda la noche, a 4°C.

Al día siguiente se lavaron las membranas 4 veces por 5 minutos cada vez.

Posteriormente, a la membrana que había sido incubada con suero de ratón, y la membrana incubada con BAM90, se le añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA) en dilución 1:5,000, y a la membrana con suero de conejo se le agregó un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Goat Anti-Rabbit IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, Oregon, EUA) a la misma dilución, usando como diluyente PBS-leche 2% Tritón X-100 0.2%. Transcurrida la hora de incubación a temperatura ambiente la membrana se lavó nuevamente. Finalmente, se usó el kit de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, EUA) para revelar en placas fotográficas (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, Reino Unido), con un tiempo de exposición entre 3-5 segundos, dependiendo del bandeo y del fondo.

## 9. Resultados

### *Titulación del suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$*

Después del 4º boost los ratones fueron sangrados para determinar la presencia de anticuerpos en el suero de cada uno de ellos por un ensayo ELISA. Luego de evaluar que todos los ratones del grupo experimental presentaron anticuerpos contra  $\beta A_{pE\ 3-42}$  se sangraron a blanco y se obtuvo el suero inmune. Ninguno de los ratones del grupo control presentaron anticuerpos contra el péptido a ninguna de las diluciones, lo cual confirma que los anticuerpos producidos en el grupo experimental se indujeron por la presencia del inmunógeno.

Con el fin de determinar el título de anticuerpos en el suero así como las diluciones a las cuales se mantiene un reconocimiento eficiente entre el suero y el péptido, se realizó una curva de titulación mediante una prueba ELISA. Se evaluó el suero en las siguientes diluciones: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 y 1:12800.

En la Fig. 13 se muestra la curva de titulación resultante de 3 repeticiones de la prueba.

Esta curva indica las diluciones a las cuales se observa un reconocimiento eficiente entre el suero y el péptido. El título de anticuerpos en el suero corresponde a la dilución en donde se observa una diferencia aproximada de 0.2 unidades de D.O. (a 405 nm) con respecto al suero control correspondiente. El título del suero anti-  $\beta A_{pE\ 3-42}$  es 1:3,200.

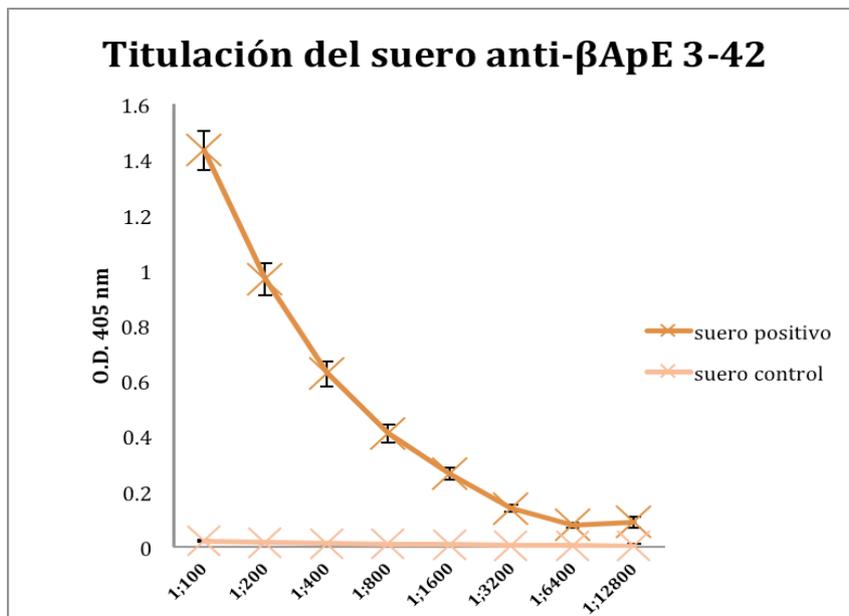


Figura 13 . Curva de titulación del suero inmune anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$ . Los valores del suero del grupo control se encuentran en la parte inferior de la gráfica. Para cada suero se realizaron tres repeticiones experimentales, por lo que la curva representa la media de los tres experimentos independientes con su desviación estándar.

### Evaluación de la reactividad del suero contra diferentes especies de $\beta A$

Para determinar si el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  puede reconocer a otras variantes de  $\beta A$ , se sensibilizó una placa de ELISA con diferentes especies de  $\beta$ -amiloide ( $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE 11-42}$ ,  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{pE 3-42}$ ). Se realizaron tres experimentos independientes. La Fig. 14 muestra el promedio y la desviación estándar de los tres ensayos.

Como control negativo, se usó un péptido no relacionado (PNR) que no fue reconocido por el suero  $\beta A_{pE3-42}$ . Como control positivo se utilizaron sueros de ratones inmunizados con  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE 11-42}$  o  $\beta A_{1-42}$ . El valor de las unidades de D.O. obtenidas para los controles positivos indican que reconocen al antígeno con el que fueron generados estos sueros. Esto nos permite aseverar que el suero anti-  $\beta A_{pE3-42}$  únicamente reconoce a  $\beta A_{pE3-42}$  y no a las otras variantes.

La figura 14 también nos permite observar que a la dilución de suero a la que se realizó la prueba ELISA (1:100), el suero  $\beta A_{1-42}$  es el que presenta mayores valores de D.O., seguido por  $\beta A_{pE3-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$  y finalmente  $\beta A_{pE 11-42}$ .

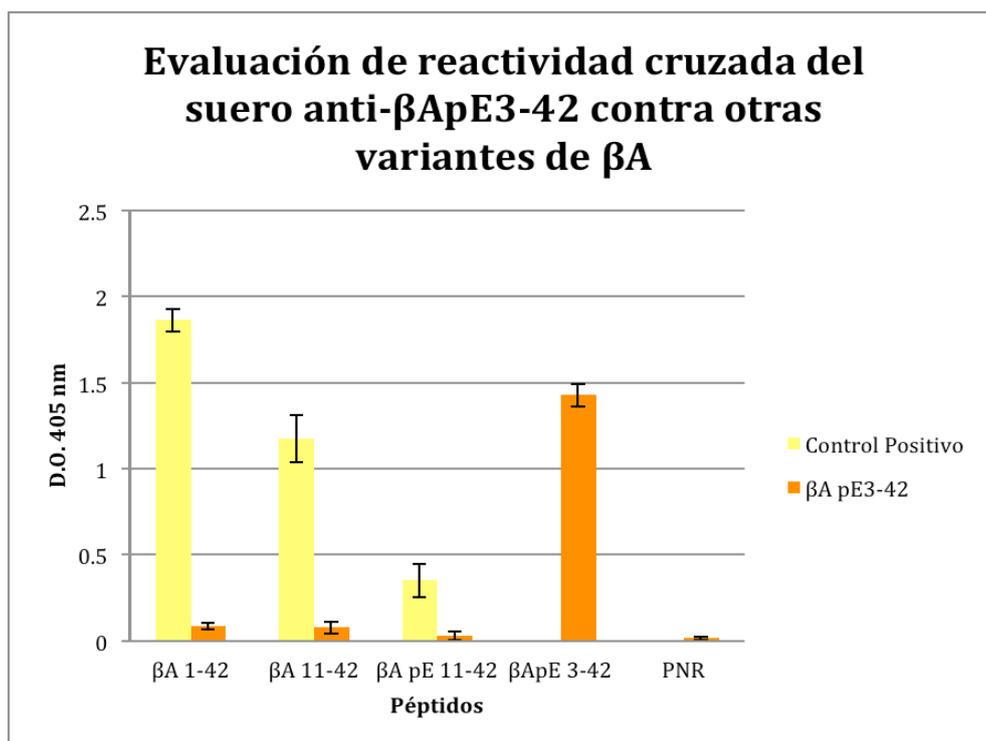


Figura 14. Reactividad del suero anti- $\beta A_{pE 3-42}$  frente a tres variantes del péptido  $\beta A$ :  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE11-42}$ . Cada una de las barras representa el valor promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar. Como control positivo se emplearon los sueros inmunes contra cada uno de las variantes de  $\beta A$ , y como control negativo un péptido no relacionado (PNR) evaluado en reactividad contra el suero anti- $\beta A_{pE 3-42}$ .

*Bioselección**-Títulos de fagos obtenidos en las rondas de bioselección*

Para identificar los epítomos del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  reconocidos por el suero de ratón anti- $\beta A_{pE3-42}$  se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresada en la proteína pIII del fago filamentoso M13 y el suero inmune anti- $\beta A_{pE3-42}$ .

Un esquema del proceso de bioselección puede encontrarse en el apéndice D.

Se realizaron tres rondas de bioselección, al final de las cuales se tituló la cantidad de fagos obtenida en cada una (Tabla 1). El título, expresado en unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/mL) refleja la eficiencia de cada una de las rondas de bioselección. La tabla 1 muestra los títulos de los fagos recuperados por elución (valores de salida) y el título del amplificado (valores de entrada) obtenidos en cada ronda.

Tabla 1. Títulos de los fagos obtenidos en cada ronda de bioselección

<b>Ronda de bioselección</b>	<b>Título de entrada (pfu/ml)</b>	<b>Título de salida (pfu/ml)</b>
<b>1º</b>	$2 \times 10^{13}$	$8.35 \times 10^5$
<b>2º</b>	$3.16 \times 10^{13}$	$1.85 \times 10^8$
<b>3º</b>	$1.6 \times 10^{14}$	$1.7 \times 10^{10}$

El valor de entrada de la primera ronda corresponde al título de fagos en la biblioteca. Puede notarse que hubo una reducción de 8 órdenes de magnitud en el primer valor del título de salida en comparación con el valor de entrada. Esto indica que hubo un proceso de selección donde se perdieron clonas de baja especificidad para el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ . Con cada ronda posterior, el título de salida aumenta. Considerando el factor de selección por afinidad, puede decirse que al final de cada una de las rondas de amplificación se obtuvo una población de fagos enriquecida en clonas con insertos de heptapéptidos capaces de interactuar o ser reconocidos por el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ . Los valores del título de entrada de la 2º y 3º ronda nos indican que la amplificación aumentó el número de copias de los fagos que quedaron luego del proceso de bioselección.

*Título de clonas anti-βApE3-42*

De la tercera ronda del proceso de bioselección (3° eluído) se picaron 20 clonas al azar del cultivo, las cuales se amplificaron, titularon y purificaron por doble precipitación con PEG/NaCl. La Tabla 2 muestra los títulos de cada una de las clonas. Los valores se encuentran en el rango de  $10^{10}$ - $10^{12}$  unidades formadoras de placas por mililitro, lo cual indica que cada clona se amplificó de modo exitoso.

Tabla 2. Título en pfu/ml de cada una de las clonas picadas en la 3° ronda de bioselección.

<b>Clona</b>	<b>Título (pfu/ml)</b>
<b>1</b>	$1.75 \times 10^{11}$
<b>2</b>	$1.0 \times 10^{11}$
<b>3</b>	$5.40 \times 10^{11}$
<b>4</b>	$1.32 \times 10^{12}$
<b>5</b>	$2.35 \times 10^{11}$
<b>6</b>	$3.65 \times 10^{11}$
<b>7</b>	$9.80 \times 10^{11}$
<b>8</b>	$9.20 \times 10^{11}$
<b>9</b>	$1.02 \times 10^{12}$
<b>10</b>	$1.54 \times 10^{11}$
<b>11</b>	$2.90 \times 10^{11}$
<b>12</b>	$1.77 \times 10^{11}$
<b>13</b>	$3.04 \times 10^{11}$
<b>14</b>	$9.10 \times 10^{10}$
<b>15</b>	$6.00 \times 10^{11}$
<b>16</b>	$6.9 \times 10^{10}$
<b>17</b>	$6.00 \times 10^{10}$
<b>18</b>	$5.00 \times 10^{11}$
<b>19</b>	$2.06 \times 10^{11}$
<b>20</b>	$4.5 \times 10^{12}$

### Reactividad de clonas individuales

Para determinar cuáles de las 20 clonas obtenidas tras las tres rondas de bioselección son reconocidas de manera específica por los anticuerpos en el suero anti-A $\beta_{pE3-42}$  se realizó una prueba ELISA.

En la Fig. 15 se muestra la reactividad de las clonas obtenidas por bioselección en 3 ensayos de ELISA. De las 20 clonas seleccionadas, un total de 11 fueron reconocidas por los anticuerpos del suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  (clonas 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15 y 17), por sus valores de D.O. $>0.2$  nm. Este es un valor de corte que se determinó experimentalmente en nuestro laboratorio (ref), donde se estableció que con un valor de D.O. en ELISA  $<0.02$  nm no hay diferencia con el fondo de reacción.

Las clonas 2, 3, 4, 12, 13, 16, 18, 19 y 20 se consideraron negativas por su densidad óptica  $<0.2$  nm, lo cual indica que no fueron reconocidas por los anticuerpos del suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ . El suero control no mostró reacción frente a las clonas.

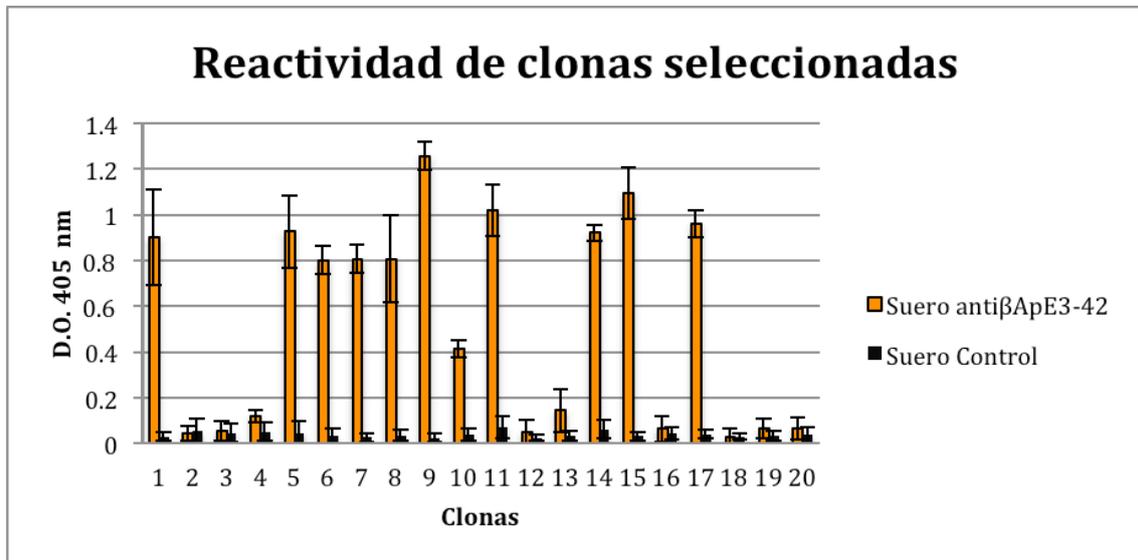


Figura 15. Reconocimiento de las clonas obtenidas por bioselección por el suero anti-A $\beta_{pE3-42}$  mediante ELISA. Los datos mostrados representan la media de 3 experimentos independientes más su desviación estándar.

### Secuenciación y análisis de las clonas positivas

Después de haber determinado por la prueba ELISA qué clonas eran positivas, se realizó la purificación de ADN de cadenas sencillas de 11 clonas positivas (1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15 y 17) y 2 negativas (4 y 18), para enviarlas a secuenciar, con el fin de obtener la secuencia de aminoácidos del inserto peptídico expresado en la proteína de superficie pIII en el fago M13. Conocer la secuencia de estos insertos permite hacer el mapeo de epítomos e identificar insertos que imiten epítomos de  $\beta A_{pE3-42}$ .

En la Tabla 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de los insertos de las clonas positivas (reconocidas por el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ ) y negativas, así como la reactividad en ELISA de las clonas secuenciadas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes y su desviación estándar. Las secuencias están ordenadas de mayor a menor D.O.

Tabla 3. Secuencias y densidad óptica de las clonas

Clona	I	II	III	IV	V	VI	VII	D.O.
<b>9</b>	H	F	S	H	N	D	F	1.2572±0.060
<b>15</b>	H	Y	S	H	A	H	S	1.0970±0.112
<b>11</b>	H	Y	S	H	A	H	S	1.0190±0.112
<b>17</b>	H	D	L	G	L	D	W	0.9588±0.060
<b>5</b>	H	F	W	G	M	Y	A	0.9273±0.159
<b>14</b>	T	V	L	F	R	K	Y	0.9223±0.034
<b>1</b>	H	F	W	G	M	Y	A	0.9013±0.208
<b>7</b>	E	C	F	W	G	M	C	0.8078±0.063
<b>8</b>	G	P	F	S	H	G	G	0.8060±0.191
<b>6</b>	H	H	L	G	M	A	A	0.8008±0.061
<b>10</b>	F	Y	S	A	Q	Q	G	0.4163±0.034
<b>4</b>	A	S	F	L	T	H	S	0.1200±.0256
<b>18</b>	N	L	Q	I	Y	A	V	0.06466±0.048

Las clonas 11 y 15 presentan la misma secuencia (HYSHAHS), al igual que las clonas 1 y 5 (HFWGMYA). La presencia de secuencias repetidas sugiere un enriquecimiento de clonas con insertos específicamente reconocidos por el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ .

Al comparar los aminoácidos en las secuencias de los insertos pueden formarse los siguientes grupos:

Las clonas 1 y 5 (que son iguales), comparten los siguientes aminoácidos en la misma posición con la clona 6: **H(F,H,W,L)GM(Y,A)A**. La clona 7 comparte la secuencia (E,C)**FWGM(C)** con las clonas 1 y 5, aunque los aminoácidos no ocurren en la misma posición. Lo mismo se presenta en las clonas 11 y 15 con la clona 9, que comparten

**H(Y,F)SH(A,H,S,N,D,F)**. La tirosina y fenilalanina son ambos aminoácidos aromáticos por lo cual se repite un motivo compartido entre estas clonas que puede escribirse como Histidina-Aromático-Serina-Histidina.

La clona 8 comparte el motivo (G,P)**FSH(G,G)** con las clonas 11/15, que repite el patrón mencionado anteriormente, pero en una posición distinta en la secuencia (ver Tabla 3).

Las tres clonas positivas restantes (TVLFRKY, HDLGLDW y FYSAQQG) no pueden agruparse en función de motivos compartidos. Cabe resaltar la importancia de los patrones compartidos en las secuencias, ya que estas similitudes podrían ser indicativas de la importancia de ciertos residuos para el reconocimiento molecular del epítipo del antígeno. Las clonas seleccionadas como negativas por su baja reactividad al suero, que indica poco reconocimiento, tampoco comparten los motivos de las clonas positivas.

El análisis realizado en Blastp reveló que los insertos de las clonas positivas tienen secuencias que no presentan homología con la secuencia lineal de  $\beta A$ , lo que indica que son péptidos que imitan epítopos de  $\beta A$ , es decir que son mimótopos. Sin embargo, la búsqueda de homología de las secuencias encontró similitud en la secuencia lineal de proteínas distintas a  $\beta A$ . En la Tabla 4 se presentan algunos de los resultados obtenidos en Blastp para las secuencias de clonas positivas. En negritas se marca la secuencia de la clona, y debajo de ella las coincidencias reportadas en la búsqueda. Cabe resaltar que sólo se muestran los resultados para secuencias en humanos, ya que el alineamiento reportó homologías con proteínas de otros organismos.

Tabla 4. Resumen de resultados del análisis Blastp

<b>Secuencia y alineación</b>	<b>ID en NCBI</b>	<b>Función</b>
<b>HFWMGYA</b> HFWM	FUCT1_HUMAN Transportador de GDP-fucosa.	Transportador de fucosa acoplada a GDP ubicado en la membrana de Golgi. Involucrado en la regulación de la señalización de la vía Notch por fucosilación de EGF's (Ishikawa <i>et al.</i> , 2010).
FWGM	GPHRB_HUMAN Regulador de pH de Golgi	Canal aniónico dependiente de voltaje requerido para la acidificación y funciones del aparato de Golgi (Maeda <i>et al.</i> , 2008)
<b>FYSAQQG</b> <b>FFSAQQ</b>	NEP_HUMAN Neprilisina	Enzima involucrada en la degradación de péptidos opioides y $\beta A$ . En la EA se ha encontrado que su expresión está disminuída (Wang <i>et al.</i> , 2010).
<b>HDLGLDW</b> <b>LGLDW</b>	PIDD_HUMAN Proteína inducida por p-53 con dominio de muerte.	Se asocia con CASP2, molécula reguladora de vías apoptóticas. Su expresión es inducida por p53 e interviene en la activación de apoptosis en la vía de respuesta a daño o estrés al ADN (NCBI).
<b>HHLGMA</b> <b>HHLGLA</b>	RBGP1_HUMAN Proteína Rab activadora de GTP-asa	Activación de GTP-asa. Se ha encontrado que la expresión de esta proteína está reducida en el hipocampo de pacientes con EA (Yebara <i>et al.</i> , 2004)

*ELISAS de competencia*

Para confirmar el reconocimiento específico de las clonas positivas por el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  se realizó un ELISA de competencia. Este ensayo es un indicador de la capacidad de los insertos de las clonas obtenidas por bioselección de inhibir la interacción entre los anticuerpos del suero (anti- $\beta A_{pE3-42}$ ) y su antígeno ( $\beta A_{pE3-42}$ )

Como control del ensayo se usaron M13 y dos clonas negativas que no mostraron reactividad frente al suero a la misma concentración de fagos que las clonas positivas ( $10^9$  fagos). Adicionalmente como control positivo se realizaron inhibiciones del suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  con tres concentraciones de péptido  $\beta A_{pE3-42}$ : 0.125  $\mu\text{g/ml}$ , 0.25  $\mu\text{g/ml}$  y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Inhibición con tres concentraciones de péptido  $\beta A_{pE3-42}$

Concentración del péptido ( $\mu\text{g/ml}$ )	% inhibición
0.125	64.22% $\pm$ 3.457
0.25	80.81% $\pm$ 1.854
0.5	84.70% $\pm$ 1.478

El porcentaje de inhibición es dependiente de la concentración del péptido, donde a mayor concentración hay mayor inhibición. Los resultados son la media de dos experimentos  $\pm$  desviación estándar.

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de inhibición obtenido en los ELISA's de inhibición comparado con la reactividad de la misma clona frente al suero (resultados presentados anteriormente en la Tabla 3), ya que se desea determinar si hay correlación entre la reactividad de la clona y su capacidad de inhibición. Las clonas positivas están ordenadas de mayor a menor capacidad inhibitoria. Los porcentajes de inhibición se tomaron respecto de la lectura del suero (dilución 1:800) sin fagos. Las clonas con el signo (-) son negativas. Cada resultado de la tabla es la media de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

Tabla 6. Comparación de la reactividad de las secuencias obtenidas por bioselección con el porcentaje de inhibición obtenido en los ensayos de ELISA de competencia

Nº de Clona	Secuencia del inserto de la clona	Reactividad ELISA	% de inhibición (10 <sup>9</sup> fagos)
6	HHLGMAA	0.8008±0.061	49.89%±8.398
1,5	HFWMGYA	0.91425±0.018	47.34%±9.120
9	HFSHNDF	1.2572±0.060	45.76% ±9.688
11, 15	HYSHAHS	1.058±0.055	43.98%±11.276
10	FYSAQQG	0.4163±0.034	40.43%±8.618
14	TVLFRKY	0.9223±0.034	33.90%±5.131
8	GPFSSHG	0.8060±0.191	14.34%±6.121
7	ECFWGMC	0.8078±0.063	13.31%±16.941
17	HDLGLDW	0.9588±0.060	4.58%±15.257
18	(-)NLQITAV	0.06466±0.048	8.03%±10.368
4	(-)ASFLTHS	0.1200±0.0256	1.35%±10.091
	M13		5.83%±2.666

Encontramos que las clonas que comparten el motivo **H(F,H,W,L)GM(Y,A)A** presentan porcentajes de inhibición más altos, seguidas por las clonas que presentan el motivo **H(Y,F)SH(A,H,S,N,D,F)**.

Curiosamente, la secuencia ECFWGMCM que comparte el motivo **FWGM** con una de las clonas con mayor capacidad de inhibición (**HFWMGYA**) y que presentó una reactividad de 0.8060±0.191 con el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  no fue capaz de inhibir la interacción del suero con el péptido. Llama la atención la presencia de dos cisteínas así como el cambio de una histidina por glutamato. En comparación, las clonas con más reactividad así como las que mostraron mayor inhibición (excepto en el caso de la secuencia HDLGLDW) comienzan con una histidina, por lo que podría especularse que este residuo es importante en el reconocimiento del epítipo. Asimismo, la presencia de dos cisteínas podría influir en la conformación de esta secuencia.

Otra de las secuencias que mostró una alta reactividad pero una baja inhibición en ELISA es GPFSSHG. Esta clona presenta el motivo **F(S)SH** pero en una posición diferente a las clonas con las cuales lo comparte. Lo anterior podría implicar que el orden espacial de los aminoácidos en las secuencias influye en su capacidad de unirse al parátipo del anticuerpo e inhibir su interacción con el antígeno.

*Comparación del reconocimiento entre suero de conejo y suero de ratón anti- $\beta A_{pE3-42}$*

Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento de  $\beta A_{pE3-42}$  oligomerizado por parte de dos sueros anti- $\beta A_{pE3-42}$ , uno hecho en conejo y el suero de ratón obtenido en este trabajo para determinar si reconocían los mismos agregados en una preparación de  $\beta A_{pE3-42}$  oligomerizada. Asimismo, se evaluó la capacidad del suero anti-  $\beta A_{pE3-42}$  para reconocer oligómeros de las variantes  $\beta A_{pE11-42}$  y  $\beta A_{1-42}$ .

Para ello se realizó un WB y se comparó el reconocimiento de ambos sueros frente a tres preparaciones de oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$ ,  $\beta A_{pE11-42}$  y  $\beta A_{1-42}$ . Ambos sueros, tanto el de conejo como el de ratón, reconocen monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros entre 40-60 kDa de  $\beta A_{pE3-42}$ . Sin embargo, ninguno de los dos sueros reconoce agregados de las otras variantes de  $\beta A$ .

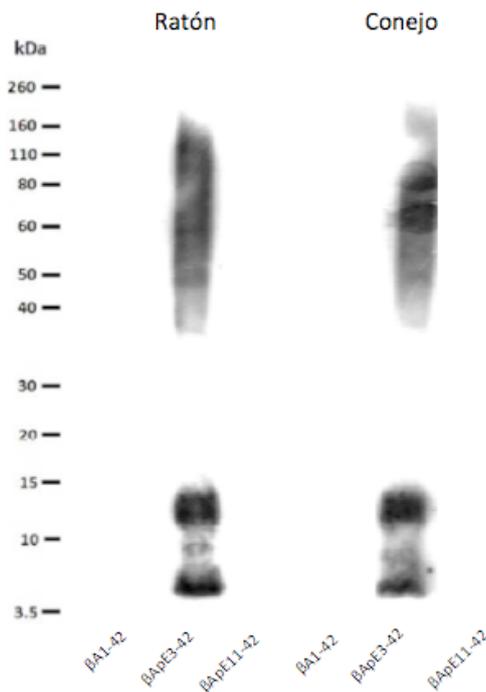


Fig. 16 Comparación del los agregados BA reconocidos por sueros anti-BApE3-42 de conejo y de ratón. Ambos reconocen oligómeros de bajo peso molecular y de mayor peso molecular. Nótese que no hay reconocimiento, en ninguno de los dos casos, de agregados de las otras variantes de BA.

## 10. Discusión

La enfermedad de Alzheimer es un problema mayúsculo de salud pública cuyo tratamiento efectivo aún no está resuelto. Las investigaciones en el área apuntan a que la acumulación y agregación del péptido  $\beta A$  es un evento involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Particularmente, se ha encontrado que los oligómeros de  $\beta A$  son capaces de interferir con la función sináptica y la integridad membranal de las neuronas y juegan un papel importante en la cascada de eventos neurodegenerativos característicos de la EA (Haas y Selkoe, 2007).

Por el papel central del péptido  $\beta A$  en la EA, se han propuesto terapias enfocadas a reducir la carga amiloide (Weiner y Frenkel 2006; Wang *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2012). Una manera de lograrlo es a través de la inmunoterapia, que consiste en la administración de anticuerpos específicos contra  $\beta A$  o la inducción de anticuerpos anti- $\beta A$ . Ensayos preclínicos han encontrado que estos anticuerpos son capaces de inhibir la agregación de  $\beta A$  y prevenir la toxicidad celular asociada al péptido (Pul *et al.*, 2011; Weiner y Frenkel 2006). La mayoría de los estudios y estrategias inmunoterapéuticas se han enfocado en el péptido de longitud completa  $\beta A_{1-42}$ , sin embargo, en años recientes se ha encontrado que los cerebros de pacientes con EA y SD están enriquecidos con formas amino-truncadas y modificadas de  $\beta A$ , donde estas conforman más del 50% del  $\beta A$  total (Saido *et al.*, 1995; Sergeant *et al.*, 2003). Estas variantes difieren del péptido intacto en que presentan modificaciones en la porción amino-terminal.

Estudios previos han demostrado que estos péptidos son más resistentes a la degradación por aminopeptidasas (Drew *et al.*, 2010), tienden a formar agregados rápidamente (He *et al.*, 1999; Schlenzig *et al.*, 2009), y son altamente tóxicos para las neuronas *in vitro* (Russo *et al.*, 2002; Acero *et al.*, 2009).

El más abundante de los péptidos piroglutamados es  $\beta A_{pE3-42}$ . Se caracteriza por la ciclización del glutamato en el extremo amino-terminal en la posición 3. Los modelos murinos que producen niveles altos de  $\beta A_{pE3-42}$  desarrollan deficiencias neurológicas, pérdida neuronal y una patología tipo Alzheimer más severa que modelos murinos que expresan primordialmente péptidos intactos en su extremo amino (Jawhar *et al.*, 2001; Wittnam *et al.*, 2012). Se ha reportado también la presencia y agregación intracelular de  $\beta A_{pE3-42}$  en etapas tempranas de la EA, y que su acumulación intraneuronal se correlaciona con la severidad de la demencia y la pérdida neuronal tanto en modelos animales como en humanos (Huse *et al.*, 2002, Sullivan *et al.*, 2012). Este péptido actúa como semilla de

agregación para la formación de oligómeros, incluso a menor concentración que otras variantes de  $\beta A$  (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2010). Además de su tendencia a formar oligómeros,  $\beta A_{pE3-42}$  es capaz de interactuar con  $\beta A_{1-42}$ , favoreciendo la formación de oligómeros y potenciado los efectos tóxicos de éste estado de agregación (Nussbaum *et al.*, 2012).

La administración de anticuerpos dirigidos contra oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  así como la administración de inhibidores de la QC en modelos murinos redujeron la cantidad total de  $\beta A$  en cerebro, la formación de placas amiloides, gliosis reactiva y reportó una mejora en el desempeño en pruebas diseñadas para evaluar memoria contextual y pruebas de aprendizaje espacial (Schilling *et al.*, 2008). Estos resultados señalan que la reducción en especies piroglutamadas impacta la acumulación y agregación de otras variantes de  $\beta A$ .

Por estas evidencias y debido a su alta proporción en cerebros de pacientes, se propone que  $\beta A_{pE3-42}$  tiene un papel central en la patogénesis de la EA.

Por la modificación N-terminal de  $\beta A_{pE 3-42}$ , los anticuerpos dirigidos contra el extremo amino intacto no reconocen a éste péptido piroglutamado.

Más aún, se ha reportado que los agregados formados por  $\beta A_{pE 3-42}$  presentan una conformación distinta a los oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  (Sun *et al.*, 2010), por lo que los anticuerpos contra epítomos conformacionales de  $\beta A_{1-42}$  o  $\beta A_{1-40}$  tampoco reconocen los agregados de  $\beta A_{pE 3-42}$  (Pérez-Garmendia y Gevorkian, en imprenta).

Dada la relevancia del estado de agregación en la toxicidad del  $\beta A$  y la importancia emergente de los péptidos piroglutamados en la patogénesis de la EA, se propone que identificar epítomos o mimótopos de  $\beta A_{pE 3-42}$  facilitaría desarrollar nuevos inmunoterapéuticos más eficientes que tengan por blanco a esta variante y sus estados conformacionales, así como marcadores de diagnóstico de la EA.

La primera etapa para identificar epítomos relevantes para la inmunoterapia de la EA consiste en la obtención y caracterización de anticuerpos contra  $\beta A$ . Esto a menudo se realizó induciendo una respuesta inmune humoral en animales de laboratorio, principalmente ratones.

La secuencia nativa de  $\beta A$  en ratones difiere en tres aminoácidos a la del humano: Arg5/Gly, Tyr10/Phe e Hist13/Arg (Jankowsky *et al.*, 2007). Estas diferencias se ubican en la región N-terminal, por lo que sería razonable esperar que los anticuerpos producidos por los ratones

Balb/c contra el péptido  $\beta A$  estuvieran dirigidos predominantemente a la región N-terminal donde se encuentran las diferencias entre la secuencia nativa y la secuencia del humano, que permitirían reconocer al péptido como ajeno al ratón y por tanto inducir una respuesta inmune. Lo anterior se reportó en el trabajo de Gevorkian y colaboradores (2004), donde se encontró que 4 cepas de ratones no transgénicos respondieron a la inmunización con  $\beta A_{1-42}$  fibrilar produciendo anticuerpos dirigidos principalmente contra el epítipo lineal  ${}_3\text{EFRH}_6$  en la región amino-terminal.

El reconocimiento preferente del epítipo  ${}_3\text{EFRH}_6$  también se ha reportado en humanos. La identificación de epítipos de los anticuerpos generados en el ensayo clínico AN1792 demostró que los anticuerpos producidos reconocían primordialmente los residuos 3-6 de  $\beta A_{1-42}$ . Un estudio realizado por Dalgediene et al., (2013) encontró que los anticuerpos inducidos por la inmunización con oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  estaban dirigidos primordialmente contra la región N-terminal en  $\beta A_{1-42}$ . Este mismo artículo plantea que la razón por la cual éste sea el epítipo inmunodominante para células B radica en su accesibilidad. Los primeros 9 aminoácidos de  $\beta A$  no presentan estructura, de ahí que los epítipos en esa región sean lineales, independientes de la conformación o el estado de agregación (Lee, 2005).

Sin embargo, los péptidos piroglutamados, cuya importancia en la EA ya se ha discutido, no poseen este epítipo inmunodominante por ser péptidos truncados en el extremo amino. Está reportado además que la modificación N-terminal tiene un efecto significativo en el tipo de estructura que tienden a formar los oligómeros de  $\beta A$  (N3)pE en comparación a  $\beta A$  de término intacto (Sun et al., 2010).

En el presente trabajo se obtuvo un suero de ratón de la cepa Balb/c generado contra oligómeros del péptido  $\beta A_{\text{pE3-42}}$ . Este suero se utilizó en un proceso de bioselección con la finalidad de identificar los epítipos del péptido  $\beta A_{\text{pE3-42}}$  oligomerizado que pudieran ser de relevancia para la inmunoterapia de la EA.

El protocolo para la obtención de oligómeros del péptido  $\beta A$  (Klein, 2002) es empleado de forma rutinaria en nuestro laboratorio, y la caracterización por WB de las preparaciones de oligómeros del péptido  $\beta A_{\text{pE3-42}}$  reporta la presencia de dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de alto peso molecular entre 30-160 kDa (ver apéndice D Fig. 19).

Todos los ratones inmunizados con la preparación de oligómeros generaron anticuerpos contra el antígeno, lo cual concuerda con resultados anteriormente reportados en nuestro grupo de trabajo donde se asienta que  $\beta A_{pE3-42}$  en presencia de adyuvante de Freund es inmunogénico (Pérez-Garmendia, 2010; Nava-Catorce, 2012), e induce la producción de anticuerpos capaces de reconocer a  $\beta A_{pE3-42}$ .

El suero presentó un título de 1:3,200 (Fig. 13). Este valor es un indicador de la inmunogenicidad del antígeno, ya que da la máxima dilución a la cual el suero es capaz de detectar el antígeno; una respuesta inmune alta genera un suero que puede diluirse en muchos factores, sin perder la reactividad. Comparado a trabajos desarrollados en nuestro laboratorio, 1:3,200 es el título que se suele reportar para  $\beta A_{pE3-42}$ . En comparación, sueros anti- $\beta A_{1-42}$  tiene títulos de hasta 1:48,000, lo cual la hace la variante más inmunogénica (Nava-Catorce, 2012). La inmunogenicidad es un factor importante, aunque no el único, que debe tomarse en cuenta para el diseño de inmunoterapéuticos, ya que el epítipo más inmunogénico no necesariamente es el más importante para inducir protección (Gershoni *et al.*, 2007). A pesar de que  $\beta A_{1-42}$  es más inmunogénico, los anticuerpos contra  $\beta A_{1-42}$  no reconocen a  $\beta A_{pE3-42}$  en un modelo murino (Nava-Catorce *et al.*, 2012) por lo cual sería improbable que puedan interferir con la agregación de este péptido o generar protección contra su toxicidad.

La evaluación de la reactividad cruzada con otras variantes de  $\beta A$  por ELISA encontró que el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  no reconoce a  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta A_{pE11-42}$  o  $\beta A_{1-42}$  (Fig. 14). El mismo resultado se obtuvo en el WB (Fig. 16), donde tanto el suero murino como el suero de conejo anti- $\beta A_{pE3-42}$  reconocen exclusivamente agregados de alto y bajo peso molecular del péptido  $\beta A_{pE3-42}$ . Esta especificidad de reconocimiento se había reportado anteriormente en el trabajo de Nava-Catorce (2012) con suero inmune de ratones de la cepa Balb/c. En dicho trabajo se encontró que el suero anti- $\beta A_{pE11-42}$  podía reconocer oligómeros de bajo peso molecular de  $\beta A_{pE3-42}$ ,  $\beta A_{1-42}$  y  $\beta A_{pE11-42}$ . Sin embargo, el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  reconoció exclusivamente agregados del péptido  $\beta A_{pE3-42}$ .

La misma especificidad de reconocimiento se observó en anticuerpos anti- $\beta A_{pE3-42}$  inducidos en conejos, reportado en el artículo de Acero *et al.*, (2009), de manera que los resultados presentados en la Fig. 14 y Fig. 16 son consistentes con lo reportado.

La incapacidad del suero inmune anti- $\beta A_{pE3-42}$  de reconocer variantes de  $\beta A$ , a pesar de presentar esencialmente la misma secuencia (salvo la modificación N-terminal) sugiere la

presencia de un epítipo en  $\beta A_{pE3-42}$  que no está presente en las otras variantes.

En el caso de este trabajo el objetivo fue identificar epítipos en el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  mediante un proceso de bioselección usando una biblioteca de heptapéptidos desplegada en la proteína III en el fago filamentoso M13. Esta técnica es útil para obtener mapear los epítipos inmunogénicos en el antígeno así como identificar péptidos que sirvan como epítipos por su capacidad de imitar al epítipo original (mimótipos), lo cual tiene aplicaciones de relevancia terapéutica para el diseño por ejemplo de vacunas de epítipos.

Las secuencias obtenidas en este trabajo provienen de clonas seleccionadas en un proceso de biopanning por afinidad al suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ . Además se determinaron las clonas que eran reconocidas por el suero mediante una prueba de ELISA (Fig. 15) y se encontró que algunas de ellas fueron capaces de inhibir la interacción entre los anticuerpos en el suero y el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  en ensayos de competencia hasta en un 49.89% ( $\pm 8.398$ ) (Tabla 5), indicando su especificidad por el mismo parátipo que reconoce al antígeno.

Sin embargo, el análisis en Blastp no encontró homologías con las secuencias obtenidas por bioselección y la secuencia de  $\beta A$  (Tabla 4), por lo cual se concluye que estas secuencias corresponden a mimótipos del péptido  $\beta A_{pE3-42}$ . Es importante recalcar que los mimótipos imitan la estructura de los epítipos contra los que están dirigidos en función de las similitudes entre las propiedades fisicoquímicas y la disposición espacial de los aminoácidos en la secuencia de los insertos.

El mapeo preciso de los epítipos en el antígeno a partir de un mimótipo es difícil por la discontinuidad del epítipo conformacional y la diferencia en la secuencia del mimótipo y el antígeno. Actualmente, se cuenta con algunos programas que ayudan a analizar una serie de secuencias y guiar al usuario en la identificación de la región que los mimótipos imitan del antígeno, siempre y cuando se cuente con la estructura tridimensional del antígeno de interés (Mayrose et al., 2007), lo cual en este caso no es aplicable ya que las bases de datos de estructuras protéicas más extensas (como Protein Data Bank) sólo disponen de información tridimensional para  $\beta A_{1-42}$  en conformación monomérica nativa.

Aunque no se cuenta con la estructura tridimensional del monómero o los agregados oligoméricos de  $\beta A_{pE3-42}$  debido a las dificultades técnicas que esto implica, se ha reportado que los cambios en propiedades bioquímicas inducidos en el péptido  $\beta A_{pE3-42}$  por la

formación del anillo piroglutamato inducen a su vez cambios en el plegamiento de los estados conformacionales. Específicamente, el análisis estructural de oligómeros de  $A\beta_{N3(pE)}$  encontró que la modificación N-terminal tiene un efecto significativo en la propensión del péptido a formar estructuras secundarias no helicoidales en condiciones fisiológicas, es decir que  $\beta_{AN3(pE)}$  tiende a formar agregados con estructura de  $\beta$ -plegada en comparación a  $\beta_A$  de término amino intacto (Sun et al., 2010). Estas evidencias dan sustento a que los cambios en estructura producto de la presencia del anillo piroglutamato exponen epítomos conformacionales particulares en comparación a  $\beta_{A_{1-42}}$ , cuyo epítomo inmunodominante es  ${}_3\text{EFRH}_6$  y es independiente del estado de agregación.

La especificidad de reconocimiento del suero anti- $\beta_{A_{pE3-42}}$  por  $\beta_{A_{pE3-42}}$  es evidencia para la presencia de un epítomo particular en este péptido. La obtención de mimótopos no homólogos con la secuencia lineal de  $\beta_A$  indica que al menos la región inmunodominante ( ${}_3\text{EFRH}_6$ ) no está presente en su totalidad (por el truncamiento del péptido) ni expuesta como en el caso de  $\beta_{A_{1-42}}$ , por lo que los anticuerpos más bien reconocen estructuras en  $\beta_{A_{pE3-42}}$ .

Con base en lo anterior, se plantea que el epítomo presente en  $\beta_{A_{pE3-42}}$  es de tipo conformacional e involucra a la modificación post-traducciona (i.e. modificación al anillo piroglutamato) en la región N-terminal. El reconocimiento de este epítomo le confiere el comportamiento específico al suero anti- $\beta_{A_{pE3-42}}$  (que no presenta reacción cruzada con otras variantes de  $\beta_A$ ), dada la ausencia de este epítomo en las otras variantes.

Esto tiene importantes implicaciones para la inmunoterapia, dado que la gran mayoría de ensayos clínicos se enfocan en el péptido  $\beta_{A_{1-42}}$ . Modificaciones en la estructura secundaria o terciaria del péptido como las reportadas para  $\beta_{A_{pE3-42}}$  no permitirían la interacción entre un anticuerpo diseñado contra un epítomo lineal  ${}_3\text{EFRH}_6$ . Más aún, recientemente se ha descrito que los oligómeros de  $\beta_{A_{pE3-42}}$  pueden inducir cambios en la estructura de agregados de  $\beta_{A_{1-42}}$  al formar oligómeros mixtos que presenten epítomos conformacionales distintos a los que reconocerían los anticuerpos inducidos contra el extremo N-terminal de  $\beta_{A_{1-42}}$  (Nussbaum et al., 2012), por lo que identificar epítomos de  $\beta_{A_{pE3-42}}$  que permitieran inhibir su agregación e interacción con  $\beta_{A_{1-42}}$  es un objetivo deseable. Por lo anterior, en trabajos posteriores sería importante evaluar la capacidad de anticuerpos derivados del suero  $\beta_{A_{pE3-42}}$  de interferir con la formación de oligómeros.

La especificidad de reconocimiento de  $\beta_{A_{pE3-42}}$  lo posiciona como un candidato importante

para marcador diagnóstico de la EA. Como se ha mencionado antes, la aparición de agregados de  $\beta A_{pE3-42}$  al interior de las neuronas es un evento temprano en la EA (Wirhth et al., 2010). Podría aprovecharse el comportamiento específico de anticuerpos contra  $\beta A_{pE3-42}$  para detectar agregados oligoméricos en poblaciones en riesgo de padecer Alzheimer.

Por las razones anteriores, en desórdenes de origen conformacional como la EA, contar con anticuerpos que permitan diferenciar entre proteínas nativas y mal plegadas es de suma importancia tanto para el diagnóstico como el tratamiento.

Otros trabajos han reportado que la inmunización con fibrillas (Gevorkian et al., 2004) u oligómeros (Wirhth et al., 2010) de  $\beta A$  inducen anticuerpos que reconocen exclusivamente a los estados de agregación correspondientes.

Es importante tomar en cuenta que en este trabajo se usó un suero policlonal para la identificación de epítomos y que el antígeno empleado fue una preparación del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  oligomerizado. Como se muestra en la Fig. 19 (ver apéndice D), las preparaciones de este tipo presentan una mezcla heterogénea de agregados oligoméricos de  $\beta A_{pE3-42}$  y monómeros del péptido, donde en proporción al monómero hay una mayor cantidad de distintos agregados oligoméricos (dímeros, trímeros, tetrameros y oligómeros de mayor peso molecular). Esto implica que el suero contiene anticuerpos dirigidos tanto contra monómeros como contra oligómeros de distintos pesos moleculares.

Por la composición de la preparación, es difícil determinar si la respuesta inmune fue inducida en mayor o menor forma por agregados particulares, es decir si hay oligómeros más o menos inmunogénicos. Tampoco puede descartarse que haya habido clonas con insertos que reconocía parte del epítomo inmunodominante reportado para  $\beta A$ , y que estas simplemente se hayan perdido en las rondas de biopanning.

Sin embargo, por la proporción total de oligómeros contra monómeros, es probable que las células de la respuesta inmune hayan tenido mayor exposición a neoepítomos de oligómeros, y que por esta razón las secuencias relevantes para la interacción entre el antígeno y el anticuerpo no coincidan con la secuencia de aminoácidos de su ligando natural, dado que se unen por reconocimiento estructural.

Sin embargo, se ha reportado para  $\beta A_{1-42}$  que los oligómeros de menor peso molecular (dímeros, trímeros y tetrameros) son más inmunogénicos (Dalgediene et al., 2013) que oligómeros de mayor peso molecular o monómeros. Si esto se mantiene para  $\beta A_{pE3-42}$ , podría

suponerse que los mimótopos obtenidos están imitando principalmente epítopos conformacionales de oligómeros de bajo peso molecular.

Esta hipótesis podría ponerse a prueba inmunizando a ratones con oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  de distinto peso molecular y evaluando las subclases de inmunoglobulinas mediante una prueba ELISA.

La identificación de epítopos del péptido  $\beta A_{pE3-42}$  oligomerizado se había realizado en nuestro laboratorio anteriormente utilizando suero de conejo (Acero et al., 2009). En ese trabajo se reportó que la mayoría de las clonas positivas (reconocidas por el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  hecho en conejo) obtenidas por biopanning presentaban una secuencia homóloga (QFRH) a la región N-terminal de  $\beta A_{pE3-42}$ : los aminoácidos  $_4FRH_6$  forman parte de la secuencia lineal en la región amino-terminal del péptido  $\beta A$ , que es a su vez el epítipo inmunodominante en  $\beta A_{1-42}$ .

El mapeo de epítopos realizado en el presente trabajo con un suero anti- $\beta A_{pE3-42}$  inducido en ratón no reporta la secuencia QFRH (excepto en el caso de la secuencia TVLFRKY, donde aparece el motivo FR seguido de una lisina, aunque no puede descartarse que la presencia de este motivo sea azarosa ya que K no tiene propiedades similares a H), sino que los péptidos obtenidos no son homólogos a la secuencia  $\beta A$ , pero imitan epítopos conformacionales en  $\beta A_{pE3-42}$  oligomérico.

A pesar de lo anterior, la comparación entre el reconocimiento de ambos sueros en WB indica que ambos reconocen esencialmente los mismos agregados de  $\beta A_{pE3-42}$  (Fig. 16).

La razón para esta diferencia en las secuencias de los mimótopos obtenidos para conejo y para ratón es incierta y amerita más investigación. Dos posibles explicaciones radican en las diferencias en la secuencia de  $\beta A$  entre ratón y conejo, así como las diferencias en el sistema inmune de ambos, sin embargo, esto es meramente especulativo.

La inmunoterapia para la EA dirigida particularmente contra el péptido  $\beta A$ , es una propuesta atractiva que ha tenido resultados prometedores en modelos animales, particularmente en ratones transgénicos en estudios pre-clínicos.

No obstante los resultados positivos obtenidos en estudios pre-clínicos, esto no se ha logrado reproducir en humanos. Sin embargo, se han aprendido valiosas lecciones sobre la respuesta inmune de los pacientes hacia el péptido  $\beta A$ , principal agente implicado en la

patogénesis de la EA. Esto ha redirigido la investigación a la búsqueda de terapias efectivas que no induzcan respuestas inmunes no deseadas como las observadas en el ensayo AN1792. Además el descubrimiento en años recientes de estados de agregación tóxicos y variantes modificadas de  $\beta$ A más amiloidogénicas y con comportamiento priónico ( $\beta$ A<sub>pE3-42</sub>) han planteado nuevos blancos para el desarrollo de inmunoterapéuticos más efectivos para impactar en la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

La base de la inmunoterapia para la EA es la capacidad neutralizante de las propiedades tóxicas de  $\beta$ A que poseen los anticuerpos y la alta especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. Esta especificidad está mediada por el reconocimiento de epítomos en el antígeno por parte del anticuerpo. La mayoría de los ensayos clínicos se basan en la inducción de anticuerpos contra  $\beta$ A o bien la administración de anticuerpos contra este péptido. Sin embargo, puede irse en reversa y tomar a los anticuerpos más efectivos y determinar el epítomo que reconocen y que les confiere esas propiedades protectoras. De lo anterior se deriva que la inmunización con un epítomo deseado (por ejemplo uno que estimule la producción de anticuerpos neutralizantes) inducirá la generación selectiva de anticuerpos contra este epítomo (Gershoni et al., 2007).

La posibilidad que ofrecen las vacunas de epítomos de enfocar la respuesta inmune es relevante si se toma en cuenta que no todos los epítomos de un antígeno son igualmente útiles en generar una respuesta inmunoprotectora. Identificar los epítomos inmunorelevantes permitiría crear un coctel de epítomos definidos y eficientes que inducirían un repertorio de anticuerpos con propiedades protectoras.

El primer requisito para la generación de vacunas de epítomos es desde luego la identificación del epítomo que induce los anticuerpos neutralizantes.

Sin embargo, la gran mayoría de los epítomos para células B son discontinuos, por lo cual reconstituir al epítomo en un inmunógeno efectivo puede ser una tarea ardua.

Una solución a la anterior complicación es el uso de mimótopos como inmunógenos. Estos mimetizan propiedades de los epítomos sin ser homólogos en la secuencia de aminoácidos del antígeno.

En este trabajo se obtuvieron mimótopos contra epítomos conformacionales de  $\beta$ A<sub>pE3-42</sub>, los cuales sería interesante evaluar en un esquema de inmunización para determinar si son

inmunogénicos e inducen la producción de anticuerpos que mimeticen el efecto neutralizante de los anticuerpos  $\beta A_{pE3-42}$  que se ha reportado en la literatura.

Adicionalmente, el uso de mimótopos tendrían al menos dos ventajas importantes: al ser no propios podrían potenciar la respuesta inmune, lo cual en conjunto con un adyuvante adecuado, es de suma importancia tener en cuenta para el tratamiento de la EA ya que la población afectada presenta también un deterioro progresivo dependiente de la edad de la respuesta inmune (inmunosenescencia).

La inmunización con mimótopos evitarían además la activación de células T autoreactivas que se ha reportado como uno de los efectos secundarios no deseados de la inmunización con  $\beta A_{1-42}$ .

Uno de los aspectos que tendría que evaluarse al usar mimótopos como inmunógenos es la posibilidad de que la estructura imitada por el mimótomo se encuentre en proteínas distintas del antígeno y que sean biológicamente relevantes. El análisis Blastp de los mimótopos obtenidos en este trabajo encontró coincidencias en la secuencia de aminoácidos de proteínas con funciones conocida en el humano (Tabla 4). Sin embargo, es necesario hacer notar que incluso si los mimótopos coinciden con la secuencia, nada garantiza que esta no adopte una estructura distinta en la proteína donde se encuentra a la que reconocería el mimótomo, por lo cual se requerirían experimentos adicionales para evaluar el significado biológico de estos resultados, ya que no es posible asegurar o descartar una interferencia funcional con base en un alineamiento.

La importancia de  $\beta A_{pE3-42}$  en la patogénesis de la EA y las ventajas que ofrece la inmunización con mimótopos se está explorando ya en un ensayo clínico por la compañía Affiris. AFFITOPE AD-03 es a la fecha el único inmunoterapéutico basado en mimótopos contra péptidos piroglutamados. Actualmente se encuentra en fase II, habiendo aprobado la primera fase de evaluación de tolerancia y seguridad.

Finalmente, es importante resaltar que se esperaría que los anticuerpos inducidos por los mimótopos obtenidos en este trabajo presentaran la misma especificidad por  $\beta A_{pE3-42}$  que el suero anti- $\beta A_{pE3-42}$ , lo cual les permitiría reconocer selectivamente a agregados de  $\beta A_{pE3-42}$  que se forman en etapas tempranas de la EA abriendo así la posibilidad de tener un marcador diagnóstico, que tanta falta hace para poder evaluar el potencial protector de inmunoterapéuticos en el progreso de la EA en etapas previas a la neurodegeneración.

## 11. Conclusiones

Oligómeros de  $\beta A_{pE3-42}$  en presencia de adyuvante de Freund inducen la producción de anticuerpos en ratones de la cepa Balb/c que reconocen al monómero y oligómeros de bajo y alto peso molecular de  $\beta A_{pE3-42}$

Los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE3-42}$  no reconocen a  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$  o  $\beta A_{pE11-42}$ .

El suero policlonal contra una preparación oligomerizada de  $\beta A_{pE3-42}$  puede unirse a péptidos no homólogos con la secuencia de  $\beta A$  pero que imitan epítomos conformacionales del péptido, de ahí que se denominen mimótopos.

Los mimótopos son capaces de inhibir la interacción de los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE3-42}$  con el antígeno, lo cual indica que son relevantes en el reconocimiento antigénico.

El epítomo para  $\beta A_{pE3-42}$  se encuentra en la región N-terminal e involucra a la modificación piroglutamato.

El uso de los mimótopos encontrados en este trabajo puede ayudar a diseñar inmunógenos que induzcan anticuerpos que mimeticen el efecto neutralizante de los anticuerpos anti-  $\beta A_{pE3-42}$  reportados en la literatura con la ventaja ofrecida por las vacunas basadas en epítomos.

Anticuerpos contra  $\beta A_{pE3-42}$  pueden ser una herramienta importante de diagnóstico en etapas tempranas de la EA. Por su reconocimiento exclusivo hacia monómeros y agregados de  $\beta A_{pE3-42}$ , puede permitir identificar las proteínas mal plegadas y distinguirlas de las proteínas con conformación nativa y función biológica.

## 12. Perspectivas

Este trabajo es meramente un paso en un proceso de caracterización de la respuesta inmune hacia  $\beta A_{pE3-42}$  y la evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti- $\beta A_{pE3-42}$ .

Una caracterización completa incluiría las siguientes propuestas:

Evaluar propiedades inmunogénicas de los mimótopos identificados en la bioselección para determinar si son capaces de desarrollar anticuerpos protectores contra los efectos de  $\beta A_{pE3-42}$ .

42.

Evaluar si hay reacción cruzada de anticuerpos producidos por inmunización con mimótopos con otras variantes de  $\beta A$  o se mantiene la especificidad.

Adicionalmente, sería interesante realizar la identificación de epítomos del péptido  $\beta A_{3-42}$  sin la modificación amino-terminal para determinar el papel del residuo de glutamato.

## **Apéndice A**

### **Estrategias auxiliares para el tratamiento de la EA**

Además hay una gama de agentes que se han propuesto como estrategias auxiliares para la EA. Entre estos destacan los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS), dada la prevalencia de una neuroinflamación crónica en pacientes con EA. El mecanismo de acción de estos fármacos es inhibir la enzima COX (ciclo-oxigenasa), que medía la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas. En pacientes con EA hay una sobre-expresión de COX2, por lo cual se ha propuesto que los NSAIDS reducen la inflamación crónica (Weiner y Frenkel, 2006).

Recientemente se ha descrito que estos medicamentos también tienen la capacidad de modular la actividad de la  $\gamma$ -secretasa de manera independiente a sus efectos anti-inflamatorios, reduciendo así niveles de  $\beta$ A (Tanzi y Bertram, 2005). A pesar de lo anterior, ensayos clínicos hasta ahora con NSAIDS no han reportado beneficios globales para pacientes con EA (Weiner y Frenkel, 2006).

Algunos estudios sugieren que los efectos neuroprotectores de los NSAIDS ocurren antes de que la patología de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares estén presentes (Potter, 2010), ya que estos marcadores se presentan cuando la pérdida neuronal es extensa.

Se ha encontrado que  $\beta$ A también induce estrés oxidante al aumentar la producción de  $H_2O_2$  en las células así como la generación de radicales libres tanto por su capacidad de interactuar con metales reactivos como con ABAD (alcohol deshidrogenasa), interacción que medía directamente la disfunción mitocondrial observada en pacientes con EA (Lustbader, 2004). Por lo anterior se han incluido a quelantes metálicos y la ingesta periódica de antioxidantes como la vitamina E como estrategias para atenuar el estrés oxidante producido por  $\beta$ A (Engelhart *et al.*, 2002).

De estudios epidemiológicos se ha derivado que las mujeres en terapia de estrógenos tienen menor riesgo de desarrollar EA. Entre los efectos del estrógeno destacan que aumenta los niveles de la enzima de síntesis, acetil-colintransferasa, así como promover el crecimiento de dendritas en neuronas dañadas, por lo que su uso como tratamiento para la EA también está siendo investigado, aunque hasta ahora los resultados son controversiales (Brinton, 2004).

De igual manera, estudios epidemiológicos sugirieron una relación entre el consumo de estatinas y una disminución en el riesgo de desarrollar EA (Haag et al., 2009). Las estatinas aparentemente promueven la degradación de  $\beta$ A extracelular por promover la secreción de IDE por microglía (Tamboli et al., 2010). El ensayo clínico con atorvastatina produjo una mejora cognitiva en pacientes con EA moderada, pero no hubo impacto en pacientes con demencia severa por EA, lo cual sugiere que las estatinas podrían retardar el progreso de la neurodegeneración, pero no revertir la degeneración neuronal (Castellani *et al.*, 2010)

También se ha evaluado el uso de agentes neurotróficos y derivados naturales (*Ginkgo biloba*), pero ninguno ha reportado eficiencia para reducir el declive cognitivo (McCaffrey, 2008).

## Apéndice B

### Biología del fago M13

El fago M13 es un bacteriófago filamentoso del género Inovirus. Posee ADN de una sola cadena con 6,407 pares de bases, empackado en un cilindro protéico de 7 nm de ancho y 900-2000 nm de largo. El genoma codifica para 11 genes, de los cuales 5 son proteínas de la cápside (Böttger y Böttger 2009).

La principal proteína de la cápside es pVIII, presente en al menos 2,700 copias, seguida por la proteína pVII que posee cinco copias en cada uno de los extremos del fago. En el extremo proximal del fago, éste presenta entre 4 ó 5 copias de las proteínas pIII y pVI (Fig. 13).

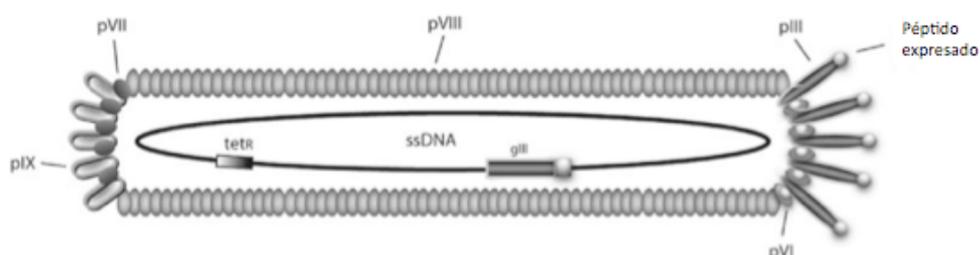


Figura 17. Representación esquemática del fago filamentoso M13. La cápside protéica encapsula al DNA de cadena sencilla (ssDNA). La cápside está compuesta por 5 proteínas: pVIII, pIII, pVI, pVII y pIX. El inserto peptídico está codificado en el DNA del fago, en la parte del genoma que corresponde a la proteína pIII. Al expresarse esta proteína de superficie se expresa también el péptido insertado. El fago filamentoso infecta a bacterias *E. coli* que poseen el plásmido F. Modificado de Böttger y Böttger, 2009.

Para infectar a las bacterias, el fago requiere que estas expresen un pili, ya que el proceso de infección ocurre a través de la interacción de la proteína pIII con el pili de la bacteria.

El pili bacteriano es una estructura formada por polimerización de subunidades de pilina que se requiere para la transferencia por conjugación del plásmido F (o de DNA cromosómico que contenga al plásmido) a una bacteria receptora que no posea el plásmido (Inbar y Benhar, 2012).

M13 es un fago que no lisa a la bacteria una vez infectada, sino que continua replicándose en ella y se libera de la membrana en múltiples copias, mientras la bacteria continúa dividiéndose. En la primera generación después de la infección hay un brote de aproximadamente 1000 partículas de fagos, y luego las bacterias producen cerca de 100 a 200 partículas por generación. El proceso continúa por varias generaciones, dando títulos entre  $10^{10}$ - $10^{12}$  partículas virales por ml.

Los fagos M13 son altamente inmunogénicos y se sabe que inducen respuestas inmunes de tipo humoral y celular dirigidas contra proteínas de la cápside (Böttger y Böttger, 2009).

## Apéndice C

### Esquema metodológico del proceso de bioselección

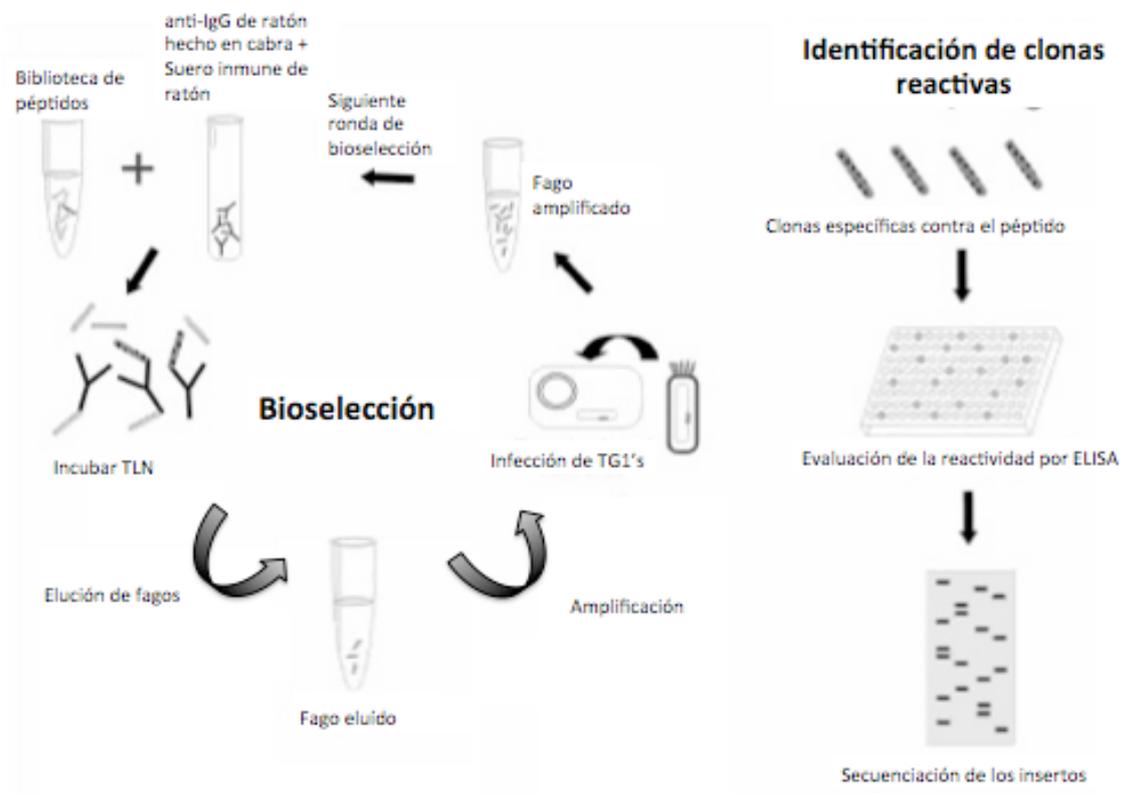


Figura 18. Esquema metodológico del proceso de bioselección que se realizó para la identificación de epítomos del péptido  $\beta$ ApE3-42

## Apéndice D

### Caracterización por Western Blot de la preparación de oligómeros de $\beta A_{pE\ 3-42}$ usada para la inmunización

Emplear oligómeros de  $\beta A$  como inmunogénos permite generar anticuerpos contra este estado conformacional (Lambert *et al.*, 2001; Kaye *et al.*, 2003). Dada la importancia patológica de los oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en la EA (Russo *et al.*, 2002; Acero *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2012), la obtención del suero anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  se realizó empleando como inmunógeno una preparación de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  oligomerizado. Los oligómeros se prepararon de acuerdo al protocolo de Klein (Klein, 2002), descrito en los métodos. Éste es un protocolo ampliamente utilizado en nuestro grupo de trabajo y genera un patrón característico de agregados como el que se presenta en la siguiente figura

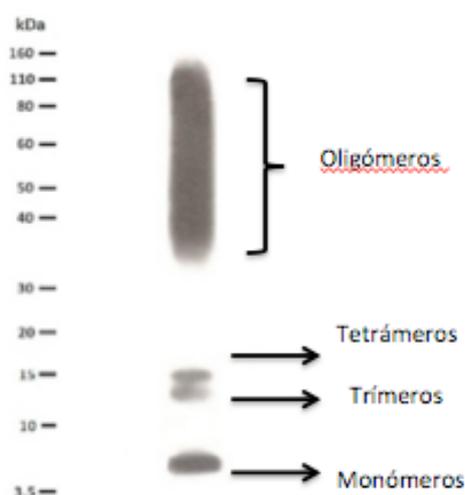


Figura 19. Caracterización por Western Blot de la preparación de oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ . Se prepararon los oligómeros a partir de monómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$ . Se empleó suero de ratón anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  para detectar a los oligómeros en la preparación. Sobre la imagen se indican los agregados presentes de acuerdo a su peso molecular. La imagen fue tomada del artículo de Pérez-Garmendia *et al.*, 2013 (en imprenta), con permiso de sus autores, para reproducirla en este trabajo como un ejemplo característico del bandeo obtenido al evaluar una preparación de oligómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  con suero de ratón anti- $\beta A_{pE\ 3-42}$  como anticuerpo primario

Evaluar la preparación por Western Blot nos permite determinar qué tipos de agregados presenta. En este caso, las tres bandas que se detectan en la parte inferior corresponden a tetrámeros, trímeros y monómeros. La banda prominente en la parte superior corresponde a oligómeros de mayor peso molecular (entre 30-160 kDa). Esto confirma la presencia de oligómeros de alto y bajo molecular, así como monómeros de  $\beta A_{pE\ 3-42}$  en la preparación empleada para inmunizar.

### 13. Referencias

Acero G, Manoutcharian K, Vasilevko V, Munguia ME, Govezensky T, Coronas G, Luz-Madrigal A, Cribbs DH, Gevorkian G. 2009. Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A $\beta$ -specific antibodies produced in rabbits. *J. Neuroimmunol.* 213 (1-2): 39-46.

Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, Lohmann S, Piorkowska K, Gafner V, Atwal JK, Maloney J, Chen M, Gogineni A, Weimer RM, Mortensen DL, Friesenhahn M, Ho C, Paul R, Pfeifer A, Muhs A, Watts RJ. 2012. An effector-reduced anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) antibody with unique A $\beta$  binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A $\beta$ . *J. Neurosci.* 32(28):9677-9689.

Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saumier D, Haine D, Garceau D, Duong A, Suhy J, Oh J, Lau WC, Sampalis J. 2011. Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease – a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch. Med. Sci.* 7 (1): 102-111.

Ahmed A, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, Elliott JI, Van Nostrand WE, Smith SO. 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid- $\beta$ 1–42 oligomers to fibrils. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 17(5): 561-568.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia. Available: [http://www.alz.co.uk/research/files/World Alzheimer Report 2010.pdf](http://www.alz.co.uk/research/files/World%20Alzheimer%20Report%202010.pdf).

Bali J, Gheinaia AH, Zurbriggen S, Rajendran L. 2012. Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of  $\beta$ -amyloid peptides. *PNAS.* 109 (38): 15307-15311.

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid  $\beta$ -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med.* 6 (8): 916–919.

Bayer, TA y Wirths, O. 2011. Intraneuronal A $\beta$  is a trigger for neuronal loss: can this be translated into human pathology? *Biochem. Soc. Trans.* 39 (4), 857-861.

Beckmann C, Brittnacher M, Ernst R, Mayer-Hamblett N, Miller SI, Burns JL. 2005. Use of phage display to identify potential *Pseudomonas aeruginosa* gene products relevant to early cystic fibrosis airway infections. *Infect Immun.* 73 (1): 444-452

Billiau A, Matthys P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70 (6): 849-860.

Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA. 2011. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PLoS. One.* 6 (8): 1-10

Bloodgood BL y Sabatini BL. 2007. Nonlinear regulation of unitary synaptic signals by CaV(2.3) voltage-sensitive calcium channels located in dendritic spines. *Neuron.* 53: 249–260.

Bonetta, L. Door Slams on Rage. *Alzheimer Research Forum.* 9 de noviembre 2011.

Disponible en <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2960>. Accesado 20 abril, 2013.

Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, Messer J, Oroszlan K, Rauchenberger R, Richter WF, Rothe C, Urban M, Bardroff M, Winter M, Nordstedt C, Loetscher H. 2012. Gantenerumab: A Novel Human Anti-A $\beta$  Antibody Demonstrates Sustained Cerebral Amyloid- $\beta$  Binding and Elicits Cell-Mediated Removal of Human Amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis.* 28(1): 49-69.

Böttger V y Böttger A. 2009. Epitope Mapping Using Phage Display Peptide Libraries. *Methods in Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols.* 524: 181-201.

Breen KC, Bruce M y Anderton BG. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell- surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 28 (1): 90-100.

Brinton, RD. 2004. Impact of estrogen therapy on Alzheimer's disease: a fork on the road? *CNS Drugs.* 18 (7): 405-422.

Brody DL y Holtzman DM. 2008. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (1): 175-193.

Burbach GJ, Vlachos A, Ghebremedhin E, Turco DD, Coomaraswamy J, Staufenbiel M, Jucker M, Deller T. 2007. Vessel ultrastructure in APP23 transgenic mice after passive anti-A $\beta$  immunotherapy and subsequent intracerebral hemorrhage. *Neurobiol. Aging.* 28 (2): 202-212

Buttini M, Masliah E, Barbour R, Grajeda H, Motter R, Johnson-Wood K, Khan K, Seubert P, Freedman S, Schenk D. 2005. Beta-Amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *The J. Neuroscience, Society for Neuroscience,* 25 (40): 9096-9106

Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A $\beta$ 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* 165 (4): 1289-300

Castellani RJ, Zhu X, Lee HG, Smith MA y Perry G. 2009. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Reductionist versus Expansionist Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 1386-1406.

Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. 2010. Alzheimer Disease. *Dis. Mon.* 56 (9): 484-546.

Coraci IS, Huseman JB, Hulette JWC, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC y El-Khoury JB. 2002. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to  $\beta$ -amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* 160 (1): 101-112.

Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Lendreth GE. 2012. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear  $\beta$ -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science.* 335 (6075): 1503-1506.

Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. 1996. *Neurobiol. Aging* 17: 921-33.

- Cynis H, Scheel E, Saido TC, Schilling S y Demuth HU. 2008. Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47 (28): 7405–7413
- Dahlgren K, Manelli N, Stine AM, Baker WB, Krafft LK, GAY MJ LaDu. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-B peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 277 (35): 32046–32053.
- Dalgediene I, Lasickiene R, Budvytyte R, Valincius G, Morkuniene R, Borutaite V y Zvirbliene. 2013. Immunogenic properties of amyloid beta oligomers. *J. Biomed. Sciences.* 20 (10): 1-7.
- D'Arrigo C, Tabaton M, Perico A. 2009. N-terminal truncated pyroglutamy  $\beta$  amyloid peptide A $\beta$ py3-42 shows a faster aggregation kinetics than the full-length A $\beta$ 1-42. *Biopolymers.* 91(10): 861-873.
- Davies M. 1994. Strategies for the development of therapeutics for Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging.* 15: 53-54.
- Deane R, Du Yan S, Submamaryan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Lilinsiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9 (7): 907–913
- Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovi BV. 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A $\beta$  isoforms. *Neuron* 43 (3): 333–344
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. 2004. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35. 11 (S1): 2628–2631
- De Kimpe L, Bennis A, Zwart R, van Haastert ES, Hoozemans JJM. (2012) Disturbed Ca<sup>2+</sup> Homeostasis Increases Glutaminyl Cyclase Expression; Connecting Two Early Pathogenic Events in Alzheimer's Disease *In Vitro*. *PLoS One.* 7(9):1-8.
- De Kimpe L, van Haastert ES, Kaminari A, Zwart R, Rutjes H, Hoozemans JJM y Scheper W. 2013. Intracellular accumulation of aggregated pyroglutamate amyloid beta: convergence of aging and A $\beta$  pathology at the lysosome. *Age* 35(3): 673-687.
- DeKosky ST y Scheff SW. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27(5): 457-464.
- Delacourte A. 2006. The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer Disease.* 9 (3S): 187-194.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. 2001. Peripheral anti-A $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 (15): 8850–8855.
- DeMattos RB, Lu J, Tang Y, Racke MM, Delong CA, Tzaferis JA, Hole JT, Forster BM, McDonnell PC, Liu F, Kinley RD, Jordan WH, Hutton ML. 2012. A Plaque-Specific Antibody

- Clears Existing b-amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice. *Neuron*. 76 (5):908-20.
- Derda R, Tang SKY, Li C, Simon Ng, Matochko W, Jafari MR. 2011. Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification. 16: 1776-1803.
- Di Carlo M. 2010. Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J*. 39: 877-88
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Green SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM. 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A $\beta$  burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neurosci*. 5 (5): 452-457.
- Drew SC, Masters CL, Barnham KJ. 2010. Alzheimer's A $\beta$  Peptides with Disease-Associated N-Terminal Modifications: Influence of Isomerisation, Truncation and Mutation on Cu<sup>2+</sup> Coordination. *PLoS ONE* 5(12): 1-13.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*. 118: 5-36
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, y Breteler MM. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 287: 3223-3229.
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC y Holtzman DM. 2006. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol*. 59: 512-519.
- Fändrich M, Schmidt M, Grigorieff N. 2011. Recent progress in understanding Alzheimer's  $\beta$ -amyloid structures. *Trends Biochem. Sci*. 36 (6): 338-345.
- Fändrich, M. 2012. Oligomeric Intermediates in Amyloid Formation: Structure Determination and Mechanisms of Toxicity. *J. Mol. Biol*. 421: 427-440
- Frost JL, Liu B, Kleinschmidt M, Schilling S, Demuth HU, Lemere CA. 2012. Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid- $\beta$  reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study. *Neurodegenerative Dis*. 10 (1-4): 265-270.
- Galimberti D, Ghezzi L y Scarpini E. 2013. Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci*. Disponible en línea 5 enero.
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S, Fu SM. 1993. Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med*. 177 (4): 1181-1186.
- Glabbe CG. 2004. Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 29(10): 542-547
- Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tarnovitski Freund N y Weiss Y. 2007. Epitope Mapping The First Step in Developing Epitope-Based Vaccines. *Biodrugs*. 21(3): 145-156.
- Gevorkian G, Petrushina I, Manoutcharian K, Ghocikyan A, Acero G, Vasilevko V, Cribbs DH y Agadjanyan MG. 2004. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amyloid. *Journal of Neuroimmunology* 156: 10-20

- Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (13): 3998-4002
- Ghiso J, Rostagno A, Gardella JE, Liem L, Gorevi PD, Frangione B. 1992. A 109-aminoacid C-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein contains a sequence, RHDS, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288: 1053-1059.
- Gimenez-Llort L, Maté I, Manassra R, Vida C y De la Fuente M. 2012. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation in Health and Disease. Annals of the New York Academy of Sciences.* 1262: 74-84.
- Giuffrida ML, Caraci F, Bona PD, Pappalardo G, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. 2010. The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev. Neurosci.* 21 (2): 83-93
- Golde TE, Eckman BC y Younkin GS. 2000. Biochemical detection of A $\beta$  isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta* 1502: 172-187
- Golde TE, Schneider LS y Koo EH. 2011. Anti-Ab Therapeutics in Alzheimer's Disease: The Need for a Paradigm Shift, *Neuron* 69: 203-213.
- Gouras GK, Almeida CG y Takahashi RH. 2005. Intraneuronal A $\beta$  accumulation and origin of plaques in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging.* 26: 1235-1244
- Gouras, GK, Tampellini D, Takahashi RH y Capetillo-Zarate E. 2010. Intraneuronal  $\beta$ -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 119: 523-541
- Gouras GK, Willén K y Tampellini D. 2012. Critical role of intraneuronal A $\beta$  in Alzheimer's disease: Technical challenges in studying intracellular A $\beta$ . *Life Sciences* 91: 1153-1158
- Gunn AP, Masters CL, Cherny RA. 2010. Pyroglutamate-A $\beta$ : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 42: 1915-1918.
- Guntert A, Dobeli H, Bohrmann B. 2006. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience.* 143 (2): 461-475.
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC. 2001. Intraneuronal A $\beta$ -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125: 489-492
- Haag MDM, Hofman A, Koudstaal PJK, Stricker BHC, Breteler MMB. 2009. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. *The Rotterdam Study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 80: 13-17.
- Haass C y Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(2): 101-112.
- Hardy JA y Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256: 184-185

- Hardy J y Selkoe DJ. 2002. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*. 297: 353-356
- Hartlage-Rübsamen M, Morawski M, Waniek A, Jäger C, Zeitschel U, Koch B, Cynis H, Schilling S, Schliebs R, Demuth HU y Roßner S. 2011. Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-Ab deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol*. 121: 705-719
- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM y Hyman BT. 2012. Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid Peptide. *The Journal of Neuroscience*. 32(43): 15181-15192
- He W y Barrow CJ. 1999. The A $\beta$  3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater  $\beta$ -sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A $\beta$ . *Biochemistry*. 38(33): 10871-10877
- Holtzman DM, John CM, Goate A. 2011. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci. Transl. Med.* 3(77): 1-35.
- Hunt LD y Castillo PE. 2012. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Current Opinion in Neurobiology* 22(3): 496-508
- Huse JT, Liu K, Pijak DS, Carlin D, Lee VM y Doms RW. 2002. Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*. 277: 16278-16284
- Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP y Okamoto T. 1998. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 10485-10495.
- Inbar NH y Benhar I. 2012. Selection of antibodies from synthetic antibody libraries. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526: 87-98
- Ishikawa HO, Ayukawa T, Nakayama M, Higashi S, Kamiyama S, Nishihara S, Aoki K, Ishida N, Sanai Y y Matsuno K. 2010. Two pathways for importing GDP-fucose into the endoplasmic reticulum lumen function redundantly in the O-fucosylation of Notch in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 285(6): 4122-41229
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG y Borchelt DR. 2007. Rodent A Modulates the Solubility and Distribution of Amyloid Deposits in Transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(31): 22707-22720.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. 2000. Abeta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408 (6815): 979-82
- Jawhar S, Wirths O, Schilling S, Graubner S, Demuth HU, Bayer TA. 2011. Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate Ab formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J. Biol. Chem.* 286(6): 4454-4460.

- Jawhar S, Wirths O y Bayer TA. 2011. Pyroglutamate Amyloid-A $\beta$ : A Hatchet Man in Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 38825-38832.
- Johnson RD, Schauerte JA, Wisser KC, Gafni A y Steel DG. 2011. Direct Observation of Single Amyloid $\beta$ (1-40) Oligomers on Live Cells: Binding and Growth at Physiological Concentrations. *PLoS ONE* 2011. 6(8): e23970.
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M y Valko M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 345(1-2): 91-104
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing  $\gamma$ -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*. 414(6864): 643-648.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 325(6106): 733-736.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 300(5618): 486-489.
- Kayed R y Glabe CG. 2006. Conformation-Dependent Anti-Amyloid Oligomer Antibodies. En "Methods in Enzymology", Indu Kheterpal and Ronald Wetzel, ed. Academic Press, pp. 326–344.
- Kehoe PG. 2008. Genetics of Alzheimer Disease. En *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 9pp.
- Khairallah MI y Kassem AKL. 2011. Alzheimer's disease: Current status of etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 14(4): 257-272.
- Khorassani F, Hilas O. 2013. Bapineuzumab, an investigational agent for Alzheimer's Disease. *Pharmacy & Therapeutics*. 38 (2): 89-91.
- Klein WL. 2002. Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int*. 41: 345-52
- Knittelfelder R, Riemer A, Jensen-Jarolim E. 2009. Mimotope vaccination--from allergy to cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther*. 9 (4): 493–506.
- Kontush A, Berndt C, Weber W, Akopyan V, Arlt S, Schippling S y Beisiegel U. 2001. Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic. Biol. Med*. 30(1): 119-128.
- Kowalik-Jankowska T, Ruta M, Wisniewska K, Lankiewicz L, Dyba M. 2004. Products of Cu(II)-catalyzed oxidation in the presence of hydrogen peroxide of the 1–10, 1–16 fragments of human and mouse beta-amyloid peptide. *J Inorg Biochem*. 98(6): 940–950.
- Kuo YM, Emmerling MR, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE. 1997. Isolation, Chemical characterization and quantitation of A $\beta$  3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 237: 188-191.
- LaFerla FM, Green K, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 8: 499-509

- LaFerla FM. 2008. Amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's Disease. En <http://www.nature.com/nrn/posters/index.html>
- Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, Reiner PB. 2001. Beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J. Neurochem.* 76 (4): 1121–1128
- Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, Chang L, Morgan TE, Yu J, Venton DL, Krafft GA, Finch CE, Klein WL. 2001. Vaccination with soluble A $\beta$  oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J. Neurochem.* 79 (3): 595–605.
- Lee M, Johnson-Wood, Lee C, Hu K, Griffiths SG, Black RS, Schenk D y Seubert P. 2005. Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann Neurol.* 58: 430-435
- Lee CY, Lee D, Tse W, Smith JD y Landreth GE. 2012. Apolipoprotein E Promotes - Amyloid Trafficking and Degradation by Modulating Microglial Cholesterol Levels. *The Journal of Biological Chemistry.* 287(3): 2032–2044
- Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Adlard PA, Masters LC y Bush AI. 2010. Tau Protein: Relevance to Parkinson's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 42: 1775-1778.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* 3, 16 –32
- Lemere CA y Masliah E. 2010. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-B immunotherapy? *Nat. Rev. Neurol.* 6(2): 108-119
- Ling Y, Morgan K y Kalsheker N. 2003. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 35(11): 1505-1535.
- Lloret A, Badia MC, Giraldo E, Gennady E, Alonso MD, Pallardo FV, Davide JAK y Viñas J. 2011. AB mediated toxicity & tau hiperphosphorylation linked via RCAN1 in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 27: 701-709.
- Lustbader W, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS y Wu H. 2004. ABAD Directly Links A $\beta$  to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science.* 304(5669): 448-452.
- Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y y Kinoshita T. 2008. GPBR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nature Cell Biology.* 10(10): 1135-1145
- Mahley RW, Weisgraber KH y Huang Y. 2009. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 50: Supl: S183–S188.
- Mandler M, Rockenstein E, Ubhi K, Hansen L, Adame A, Michael S, Galasko D, Santic R, Mattner F y Masliah E. 2012. Detection of peri-synaptic amyloid-b pyroglutamate aggregates in early stages of Alzheimer's disease and in AbPP transgenic mice using a novel monoclonal antibody. *J. Alzheimers Dis.* 28(4): 783-794.

- Manzoni C, Colombo L, Bigini P, Diana V, Cagnotto A. 2011. The Molecular Assembly of Amyloid A $\beta$  Controls Its Neurotoxicity and Binding to Cellular Proteins. *PLoS ONE*; 6(9): e24909.
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW. 2002. Newly characterized species-specific immunogenic *Chlamydomonas reinhardtii* peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (2): 446-452
- Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, Saito M, Gaynor K, Olm V, Wang L, Caset E, Lu Y, Shiratori C, Lemere C y Duff K. 2003. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta- amyloid. *J. Neurosci.* 23(1): 29–33
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 81-104.
- Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Tarnovitski Freund N, Bublil E, Rupin E, Sharan R, Gershoni JM, Martz E, Pupko T. 2007. Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 23(23): 3244-3246
- McCaffrey, P. Big Ginkgo Prevention Trial Comes Up Negative. 22 de noviembre, 2008. Disponible en <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1976>. Accesado 10 abril 2013.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller S, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46(6): 860-866.
- Medeiros R, Chabrier M y LaFerla F. 2012. Elucidating the Triggers, Progression, and Effects of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 30: 1–16.
- Monsonogo A, Maron R, Zota V, Selkoe D, Weiner H. Immune hyporesponsiveness to amyloid- $\beta$  peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. 2001. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 10273–10278.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL. 2003. Increased T cell reactivity to amyloid  $\beta$  protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 112 (3): 415–422.
- Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D y Molina F. 2006. Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. *Bioinformatics.* 22(9): 1088–1095
- Morgado I y Fändrich M. 2011. Assembly of Alzheimer's A $\beta$  peptide into nanostructured amyloid fibrils. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16(6): 508–514
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. 2000. Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408 (6815) :982-985
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature.* 369: 486–488.

- Multhaup G, Mechler H y Masters CL. 1995. Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease  $\beta$ A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc (II). *J. mol. Recognit.* 8(4): 247-257.
- Musiek ES y Holtzman DM. 2012. Origins of Alzheimer's disease: reconciling cerebrospinal fluid biomarker and neuropathology data regarding the temporal sequence of amyloid-beta and tau involvement. *Current Opinion in Neurology.* 25(6): 715-720.
- Nava-Catorce M. 2012. Evaluación de la inmunogenicidad de tres especies patogénicas del péptido beta-amiloide en ratones. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 63p.
- Nishitsuji K, Tomiyama T, y Ishibashi K. 2009. The E693Delta mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid beta oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. *Am J Pathol* 174(3): 957-969
- Nowotny P, Kwon JM y Goate AM. Alzheimer Disease. 2001. *Encyclopedia of Life Sciences.* 6pp.
- Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Ronicke R, Reymann K, Hutter-Paier B, Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Glabe CG, Demuth HU, Bloom GS. 2012. Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- $\beta$ . *Nature.* 485(7400): 651-655.
- Oddo S, A Caccamo, JD Shepherd1, MP Murphy, TE Golde, R Kaye, R Metherate, MP Mattson, Y Akbari y FM LaFerla. 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron.* Vol. 39(3): 409-421
- Praprotnik D, Smith MA, Richey PL, et al. Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;91:226-35.
- Perchiccia JM, Ladiwala ARA, Bhattacharya M y Tessier PM. 2012. Structure-based design of conformation- and sequence-specific antibodies against amyloid A $\beta$ . *PNAS*, 109(1): 84-89
- Pérez-Garmendia R, Ibarra-Bracamontes V, Vasilevko V, Luna-Muñoz J, Mena R, Govezensky T, Acero G, Manoutcharian K, Cribbs DH, Gevorkian G. 2010. Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid  $\beta$  antibodies cross-react with other pathological A $\beta$  species: relevance for immunotherapy. *J. Neuroimmunol.* 229 (1-2): 248-255.
- Pérez-Garmendia R y Gevorkian G. Por publicar. *Pyroglutamate-modified amyloid beta peptides: emerging targets for Alzheimer's disease immunotherapy.*
- Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torrassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P y Tabaton M. 2005.  $\beta$ -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280(40): 34186-34192.
- Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J y Tsai LH, 2010. Amyloid-Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *The Journal of Neuroscience* 30(45): 14946-14954.
- Pohl T, Zimmer M, Mugele K, Splett J. 1991. Primary Structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (22): 10059-10063.

- Poirier J. 2006. Apolipoprotein E4: From synaptic remodeling to genetic risk factor in both familial and sporadic Alzheimer's disease p163-170. En Jucker et al. Alzheimer: 100 Years and Beyond. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 541p.
- Potter PE. 2010. Investigational medications for Alzheimer disease. The Journal of the American Osteopathic Association. 110(9) supl 8: S27-36.
- Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EM, West RJ, Barber PC y Butler AC. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. Ann Neurol. 43(3): 380-383.
- Pul R, R Dodel y M Stangel. 2011. Antibody-based therapy in Alzheimer disease. Expert Opin. Biol. Ther. 11(3): 343-357
- Rink R, Arkema-Meter A, Baudoin I, Post E, Kulpers A, Nelemans SA, Akanbi MH, Moll GN. 2010. To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 61 (2): 210-218.
- Rogaeva E, Kawarai T, and St George-Hyslop P. 2006. Genetic complexity of Alzheimer's disease: Successes and challenges. Journal of Alzheimer's Disease. 9: Supl: 3: S381-387.
- Rogers BM. 8 de mayo de 2013. Gammagard™ Misses Endpoints in Phase 3 Trial. Alzheimer Research Forum. Disponible en <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=3485>. Accesado el 23 de mayo de 2013.
- Russo C, Saido TC, DeBusk LM, Tabaton M, Gambetti P, Teller JK. 1997. Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. FEBS Lett. 409 (3): 411-416
- Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton, y Teller JK. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. Nature 2000. 405: 531-532.
- Russo C, Violani E, Salis S, Venezia V, Dolcini V, Damonte G. 2002. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides – Aβ<sub>N3(pE)</sub> – strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem. 82: 1480-9.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y y Kawashima S. 1995. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Aβ<sub>N3(pE)</sub>, in senile plaques. Neuron 14(2): 457-466
- Sakono M y T Zako. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Ab oligomers. FEBS Journal 277(6): 1348-1358
- Salloway S, J Mintzer, MF Weiner y JF Cummings. 2008. Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's disease. Alzheimer & Dementia 4(2): 65-79.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature. 400: 173-177
- Schenk D, Hagen M y Seubert P. 2004. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. Curr Opin Immunol. 16(5): 599-606.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. 1996. Secreted amyloid beta protein similar to that in senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2(8): 864-70.

Schieb H, Kratzin H, Jahn O, Möbius W, Rabe S, Staufenbiel M, Wiltfang J y Klafki HW. 2011. B-Amyloid Peptide Variants in Brains and Cerebrospinal Fluid from Amyloid Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. Comparison with Human Alzheimer Amyloid. *The Journal of Biological Chemistry.* 286(39): 33747–33758.

Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Böhm G y Demuth HU. 2006. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry.* 45(41), 12393- 12399.

Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, Jagla W, Schlenzig D, Lindner C, Rudolph T, Reuter G, Cynis H, Montag D, Demuth HU y Rossner S. 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology *Nat. Med.* 10: 1106 –1111

Schlenzig D, Ronicke R, Cynis H, Ludwig HH, Scheel E, Reymann K, Saido T, Hause G, Schilling S, Demuth HU. 2012. N-terminal pyroglutamate formation of Aβ38 and Aβ40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.* 121(5): 774-784.

Schuber D, Jin LW, Saitho T y Cole G. 1989. The regulation of amyloid B protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3: 689-694

Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzel A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C y Delacourte A. 2003. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach, *J Neurochem.* 85: 1581-91

Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81: 741–766.

Selkoe, DJ. 2008. Soluble oligomers of the amyloid  $\beta$ -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research* 192: 106–113.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor- dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27: 2866–75.

Shankar GM y Walsh DM. 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Aβ. *Molecular Neurodegeneration.* 4(48): 1-13.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. 2000. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106 (12): 1489–1499

Sinha S e I Lieberburg. 1999. Cellular mechanisms of  $\beta$ -amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11049–11053,

Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T. 1996. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 452–455.

Strobel G y Zakaib, GD. Solanezumab Selected for Alzheimer's A4 Prevention Trial. *Alzheimer Research Forum*. 18 de enero 2013. Disponible en <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=3379>. Accesado 23 de mayo, 2013.

Sullivan CP, Berg EA, Elliot-Bryant R, Fishman JB, McKee AC, Morin PJ, Shia MA, Fine RE. 2011. Pyroglutamate-A $\beta$  3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A $\beta$  11 forming the central core. *Neuroscience Letters*. 505: 109–112.

Sun N, Hartmann R, Lecher J, Stoldt M, Funke SA, Gremer L, Ludwig HH, Demuth HU, Kleinschmidt M, Willbold D. 2012. Structural analysis of the pyroglutamate-modified isoform of the Alzheimer's disease-related amyloid- $\beta$  using NMR spectroscopy. *J. Pept. Sci.* 18: 691–695.

Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, Tolksdorf K, Heneka MT, Lütjohann D, Wunderlich P, Walter J. 2010. Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J. Biol. Chem.* 285 (48): 37405–37414.

Tanzi RE y L Bertram, 2005, Twenty Years of the Alzheimer's Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell*. Vol. 120(4): 545–555

Tanzi RE, Moir RD y Wagner SL. 2004. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43: 605–608.

Tycko R. 2003. Insights into the amyloid folding problem from solidstate NMR. *Biochemistry*. 42: 3151–3159.

Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL. 2011. Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J. Neurosci. Res.* 89: 1031–1042.

Vellas B. 2009. Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr. Alzheimer Res.* 6: 144–151.

Verdile G, Fuller S, Atwood CS, Laws SM, Gandy SE y Martins RN. 2004. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacological Research* 50: 97–409

Vinters HV. 1987. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke* 18: 311–324.

Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, Kunert-Keil C, Walker LC, Warzok RW. 2002. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12 (7): 535–541

Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. 2000. The oligomerization of

amyloid  $\beta$ -protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39: 10831–10839.

Walsh D, Klyubin I, Fadeeva J, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe M. 2002. Naturally secreted oligomers of the Alzheimer amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 416: 535–539.

Walsh DM y Selkoe DJ. 2004. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 44: 181–193

Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. 2006. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug Discovery Today*. 11 (19-20): 931-938.

Wang YJ, Zhou HD y Zhou XF. 2010. Modified Immunotherapies Against Alzheimer's Disease: Toward Safer and Effective Amyloid- $\beta$  Clearance *Journal of Alzheimer's Disease* 21: 1065–1075

Weiner HW y Frenkel D. 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews Immunology*. 6: 404-416

Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T. 2012. Safety, tolerability, and antibody response of active A $\beta$  immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol*. 11 (7): 597–604.

Wirhth O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU y Bayer TA. 2009. Intraneuronal pyroglutamate-A $\beta$  3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model, *Acta Neuropathol*. 118:487–496

Wirhth O, Erck C, Martens H, Harmeier A, Geumann C, Jawhar S, Kumar S, Multhaup G, Walter J, Ingelsson M, Degerman-Gunnarsson M, Kalimo H, Huitinga I, Lannfelt L, Bayer TA. 2010. Identification of low molecular weight pyroglutamate A $\beta$  oligomers in Alzheimer Disease. A novel tool for therapy and diagnosis. *J. Biol. Chem*. 285(53): 41517-41524.

Wirhth O y Bayer TA. 2012. Intraneuronal AB accumulation and neurodegeneration: Lessons from transgenic models. *Life Sciences*. 91: 1148-1152.

Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD. 1976. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol. Sci*. 27: 173-81.

Wittnam JL, E Portelius H Zetterberg, MK Gustavsson, S Schilling, B Koch, HU Demuth, K Blennow, O Wirhth y TA Bayer. 2012. Pyroglutamate A $\beta$  Aggravates Behavioral Deficits in 5XFAD Mice

Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem*. 280: 5892–5901

Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T y Pilot T. 2007. N-truncated amyloid- $\beta$  oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol. Aging*. 29: 1319-1333.

Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 44: 749–757.

<http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html> última modificación 3 de agosto del 2010.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>