



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINAS PARA LA  
INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

MARÍA DEL CARMEN CALIXTO MOSQUEDA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## RECONOCIMIENTO A LOS APOYOS RECIBIDOS

»A la *UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.*

»Al *Posgrado en Ciencias Biológicas.*

»Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.*

»Al *Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.*

» *Por su asesoría, a los Miembros del Comité Tutorial:*

*Dra. Gohar Gevorgyan Markosian*

*Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda*

*Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés*


Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de junio del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Calixto Mosqueda María del Carmen** con número de cuenta **505017480** con la tesis titulada: **"Identificación y Caracterización de Fragmentos de Inmunoglobulinas para la Inmunoterapia de la Enfermedad de Alzheimer"** bajo la dirección de la **Dra. Gohar Gevorgyan Markosian**.

Presidente:	Dr. Fernando García Tamayo
Vocal:	Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Secretario:	Dra. Gohar Gevorgyan Markosian
Suplente:	Dra. Penélope Aguilera Hernández
Suplente:	Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 7 de agosto del 2007

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS

»A la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, por la dirección en la elaboración de esta tesis y por darme la oportunidad de trabajar con ella.

» Por la revisión de la tesis al jurado:

Dr. Fernando García Tamayo

Dra. Penélope Aguilera Hernández

»Al Biol. Gonzalo A. Acero Galindo, por su ayuda, paciencia, impulso y por compartir conmigo sus conocimientos y tiempo.

»A la M en C Marielena Munguia Samudio, por su asesoría y consejos.

»A la Biol. Erika Granada Segura, por los consejos y regaños.

»Al Dr. Prisco Sánchez Palma, por su asesoría en biología molecular.

»Al Dr. Gustavo Valencia del Toro, por su ayuda en la estadística de mis resultados.

»A la Ing. Olivia Cruz Islas, por su inmenso apoyo e invaluable amistad.

»A la M en C Ma. De la Paz Alejandra Hernández Melesio, por compartir conmigo esta experiencia y hacerla divertida.

»A mis compañeros de laboratorio:

M. en C Claudia Charles Niño

M en C Jorge López Ordóñez

Biol. Mayra Medécigo Ríos

Biol. César Pedroza Roldan

»A mis compañeros: Matzil, Julia, Erik, Rodrigo y David.

**“Feliz el hombre capacitado para descubrir las causas de las cosas”  
Publio Virgilio Marón  
Georgicas, libro II, verso 490.**

***A DIOS***

***A mis Padres:  
Gabriela L. Mosqueda González  
Ernesto Calixto Quijada***

***A mis Hermanos:  
Isabel, Martha y Enrique.***

***A mi mejor amiga:  
Blanca Rosa***

***A Javier***

***Mis sonrisas tienen nombre:  
Pablo y Gabriel.***

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>1</b>
1.1.1	Principales Características Patológicas en el Cerebro de Pacientes con la EA	2
1.1.1.1	Agregados Difusos y Placas Amiloideas	2
1.1.1.2	Marañas neurofibrilares	3
1.1.2	Péptido Beta-Amiloide $\beta$ A	4
1.1.2.1	APP y Procesamiento Proteolítico	4
1.1.2.2	Modelos de agregación	5
1.1.2.3	Oligómeros	6
1.1.2.4	Agregación y Neurotoxicidad del $\beta$ A	7
1.1.2.5	Hipótesis de la Cascada del Amiloide	7
1.1.3	Estrategias Terapéuticas	8
1.1.3.1	Inhibición de la producción de $\beta$ A	8
1.1.3.2	Inmunoterapia	9
<b>1.2</b>	<b>Técnica de Despliegue en Fagos, Phage Display</b>	<b>14</b>
1.2.1	Fagos filamentosos	14
1.2.2	Bibliotecas de anticuerpos desplegadas en fago	15
<b>1.3</b>	<b>Anticuerpos</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>General</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Construcción de la Biblioteca de VH</b>	<b>19</b>
3.1.1	Generación de Animales Hiperinmunes al Péptido $\beta$ -Amiloide	19
3.1.2	Identificación Inmunológica de Animales Hiperinmunes contra el Péptido $\beta$ -Amiloide	19
3.1.3	Extracción de Esplenocitos	20
3.1.4	Extracción y Purificación de mRNA Total de los Esplenocitos	21
3.1.5	Síntesis de DNA complementario	21
3.1.6	Amplificación de VH	21
3.1.7	Purificación de VH	22
3.1.8	Digestión de VH	22
3.1.9	Digestión del Vector PG8SAET	22
3.1.10	Desfosforilación de Vector PG8SAET	22
3.1.11	Purificación del vector PG8SAET	23
3.1.12	Cuantificación del Vector PG8SAET	23
3.1.13	Ligación del Fragmento VH en el Vector PG8SAET	23
3.1.14	Preparación de Células TG1 Electrocompetentes	24

3.1.15	Transformación de la Biblioteca	25
3.1.16	Amplificación, Rescate y Titulación de la Biblioteca	25
3.1.17	Producción del DNA de la Biblioteca	26
3.1.18	Evaluación de fagos que tienen el fragmento VH	26
<b>3.2</b>	<b>Selección de los Fragmentos VH anti b-Amiloide</b>	<b>26</b>
3.2.1	Titulación de los Fagos Seleccionados	27
3.2.2	Rescate y Amplificación de Fagos Seleccionados	27
<b>3.3</b>	<b>Selección de las Clonas que tienen VH del Tamaño Esperado</b>	<b>28</b>
3.3.1	Titulación de los Fagos que Expresan el Fragmento VH del Tamaño Esperado	28
<b>3.4</b>	<b>Evaluación del Reconocimiento del <math>\beta</math>A42 por los Fragmentos VH de las Clonas</b>	<b>28</b>
3.4.1	Amplificación y Purificación de las Clonas Positivas en ELISA	29
<b>3.5</b>	<b>Mapeo de las clonas positivas usando péptidos truncados del <math>\beta</math>A</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Secuenciación de las Clonas Positivas</b>	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensayos de Neuroprotección In Vitro</b>	<b>31</b>
<b>4.8</b>	<b>Análisis de datos</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
4.1	Ligación del Fragmento VH con el Vector PG8SAET	32
4.2	Título y Complejidad de la Biblioteca de VH	32
4.3	Evaluación de fagos que expresan VH de 340pb en al biblioteca	32
4.4	Selección de los Fragmentos VH anti $\beta$ -amiloide por Bioselección	33
4.5	Selección de las Clonas que Tienen VH del Tamaño Esperado	34
4.6	Evaluación de las clonas que contienen el VH del tamaño esperado	35
4.6.1	Confirmación de las clonas positivas en ELISA	36
4.7	Mapeo de las clonas positivas usando fragmentos del péptido $\beta$ A1-42	37
4.8	Secuenciación de las clonas positivas	38
4.9	Neuroprotección de las clonas c2.8, c1.27y c1.28	38
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>
<b>8.1</b>	<b>Esquema Experimental</b>	<b>56</b>
<b>8.2</b>	<b>Secuencias de ADN y Proteínas de las Clonas Positivas</b>	<b>57</b>
8.2.1	Clona 2.8	57
8.2.2	Clona 1.27	58
8.2.3	Clona 1.28	59



## Resumen

En los últimos años se han dirigido esfuerzos para encontrar compuestos que puedan usarse en la inmunoterapia contra la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos están dirigidos a la destrucción y/o a la prevención de la formación de agregados del péptido  $\beta$  Amiloide ( $\beta$ A) que es uno de los agentes causantes de esta enfermedad. En este trabajo se construyó la primera biblioteca inmune y murina de fragmentos variables de cadena pesada de inmunoglobulinas (VH), expresados en la proteína p8 del fago M13. Con esta biblioteca se llevaron a cabo dos rondas de bioselección usando como antígeno al  $\beta$ A. Se recuperaron y evaluaron 40 y 20 clonas de la primera y segunda ronda respectivamente. Las clonas se evaluaron por su capacidad de unirse al  $\beta$ A en ensayos de ELISA. Se encontraron tres clonas positivas: c2.8, c1.27 y c1.28, las cuales fueron mapeadas usando fragmentos del  $\beta$ A. El mapeo con el  $\beta$ A indicó que estas clonas reconocen la región carboxilo del  $\beta$ A. En esta región se encuentra el péptido p3 que es neurotóxico y predominante en los depósitos difusos. Finalmente, se encontró que las clonas c2.8, c1.27 y c1.28 protegen *in vitro* a las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) de la neurotoxicidad provocada por los ADDLs (A $\beta$  derived diffusible ligands).

Actualmente se sabe que los ADDLs son neurotóxicos y pueden estar relacionados con el daño cognitivo y la disfunción sináptica.

Las tres características más sobresalientes en este trabajo que pueden ser consideradas de importancia en el diseño de vacunas o tratamientos para la enfermedad de Alzheimer son: el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fc, el reconocimiento específico de las clonas hacia la región carboxilo del  $\beta$ A y la capacidad neuroprotectora de las tres clonas.

## Abstract

Over the last years a number of different treatment strategies for Alzheimer's disease (AD) have been investigated including inhibiting or reducing amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide aggregation. The accumulation of  $A\beta$  in the brain and its deposition as plaques has been hypothesized to play a central role in the neuropathology of AD. In this study we constructed the first immune mouse anti-  $A\beta$  variable heavy-chain immunoglobulin fragment (VH) library displayed on p8 protein of the phage M13. VH selection was carried out by performing two rounds of biopanning against the  $A\beta$  peptide. After the first and second rounds of selection 20 and 40 clones, respectively, were isolated and evaluated in ELISA using the  $A\beta$  peptide. The three clones with the highest ELISA values were c2.8, c1.27 y c1.28. Epitope mapping studies using  $A\beta$  fragments indicated that these clones bind to the C-terminal region of  $A\beta$ . Within this region is the p3 peptide, that is known to be toxic to neurones and is a constituent of diffuse plaques in AD. The selected clones neutralize the toxicity of ADDL's ( $A\beta$ -derived diffusible ligands) tested *in vitro* in SH-SY5Y cell cultures.

These results are of importance for design of treatment strategies against AD for several reasons. First, passive administration of VH is not expected to induce the deleterious cellular immune response due to lack of the functional Fc portion of the whole Ig molecule. Second, the clones bind to the C-terminal region of  $A\beta$ , the region that constitutes an additional toxic epitope of the  $A\beta$ . And third, c2.8, c1.27 y c1.28 neutralize the toxicity of ADDL's in SH-SY5Y cells.

# 1 Introducción

## 1.1 Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa y progresiva del cerebro. Las regiones cerebrales más afectadas son aquellas que están relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria, como los lóbulos frontales y temporales, que debido a la degeneración de las neuronas, su tamaño se ve reducido (Mattson, 2004). La EA fue descrita por primera vez en 1907 por el neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en una mujer de 51 años. Alois Alzheimer identificó varias características clínicas cardinales que se observan en la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad. Estas características son: daño progresivo en la memoria, alteración de las funciones cognitivas, comportamiento trastornado (paranoia y pérdida de relaciones sociales) y deterioro progresivo del lenguaje. En las primeras manifestaciones de la enfermedad las funciones motoras y sensoriales permanecen intactas, pero conforme progresa se ven afectadas (Mortimer, et al., 2005).

Genéticamente se pueden distinguir dos manifestaciones de la EA que difieren fenotípicamente de acuerdo a la edad en la cual se presenta esta enfermedad. Cuando la EA se manifiesta antes de los 60 años se le conoce como EA familiar (EAF) o temprano. A la manifestación de la EA después de los 60 años se le conoce como tardío o esporádico (EAE). La EAF es una forma autosómica dominante, en la cual se hereda el gen mutado de cualquiera de los tres genes que se sabe que están involucrados en la EA: el gen de la presenilina 1 (PS1), el gen de la presenilina 2 (PS2) y el de la proteína precursora del amiloide (APP). Cada uno de estos genes puede tener una de varias mutaciones. Cuando un individuo tiene alguna de los tres genes mutados, presenta el 50% de la probabilidad de heredarlo a sus hijos (Alzheimer's Association, 2004). La EAE no es heredada y no se ha encontrado un gen específico que la ocasione; sin embargo, más del 90% de los casos de la EA se desarrolla en gente mayor a 65 años. Actualmente se cree que la EAE puede ser causada por una mezcla de

factores ambientales y asociados al estilo de vida; estos factores y el riesgo de padecer la EAE varía entre individuos (NIH, 2005). Otro factor de riesgo es la presencia de la isoforma 4 del gen ApoE. Este gen codifica para la apolipoproteína E que tiene un papel importante en el transporte de lípidos en la sangre y otros fluidos; además participa en el metabolismo de lípidos. Se han encontrado tres isoformas del gen ApoE conocidas como ApoE2, ApoE3 y ApoE4. La proporción de las diferentes isoformas varían entre diferentes grupos étnicos (Ramassamy et al., 2000).

La Organización Mundial de la Salud en el 2005 estimó que aproximadamente 18 millones de personas en el mundo padecen la EA y para el 2025 la cifra se duplicará. Más del 50% de los pacientes con EA viven en países en vías de desarrollo, presentando una tendencia a incrementar la cifra a un 70% para el 2025, debido a que la tasa de población de edad avanzada es elevada. Mundialmente el 5% de los hombres y el 6% de las mujeres mayores de 60 años padecen esta enfermedad. En México, la EA es considerada como la segunda enfermedad neurodegenerativa que prevalece (XXI Reunión Anual de Investigación INNN- Mex; 2006).

### 1.1.1 Principales Características Patológicas en el Cerebro de Pacientes con la EA

Actualmente, el diagnóstico de la EA no es preciso y se basa en estudios como la Resonancia Magnética. Las escalas para la evaluación de demencia clínica son utilizadas para observar la severidad del deterioro mental. La confirmación decisiva y precisa de la EA se hace post-mortem, utilizando técnicas histológicas, inmunoquímicas y microscopía electrónica. Estos estudios morfológicos han mostrado dos características patológicas de la EA: los depósitos amiloideos y las marañas neurofibrilares.

#### 1.1.1.1 Agregados Difusos y Placas Amiloideas

Entre los principales depósitos amiloideos encontrados en los cerebros con la EA se encuentran los agregados difusos y las placas amiloideas. Los agregados

difusos se encuentran en estadios tempranos de la formación de las placas amiloideas, son más abundantes que las placas amiloideas y no se encuentran asociadas a neuritas distróficas (Morgan et al., 2004).

Las placas amiloideas o placas neuríticas son agregados extracelulares compuestos por un centro amiloideo cuyo principal componente es el péptido  $\beta$ A42. Están rodeadas por neuritas distróficas y algunas veces contienen estructuras subcelulares llamados filamentos helicoidales asociados a astrocitos reactivos y a microglia (Mandybur y Chuirazzi, 1990). Las tres especies predominantes en las placas amilodeas son:  $\beta$ A42,  $\beta$ A40 y  $\beta$ Ax-42, siendo  $\beta$ A42 la más amiloidogénica (Iwatsubo et al., 1994; Gravina et al., 1995). Se ha observado poca correlación entre la gravedad de EA y las placas amiloideas, sin embargo, si hay correlación con los agregados difusos (Lue et al., 1999).

#### 1.1.1.2 Marañas neurofibrilares

Las marañas neurofibrilares (MNF) son depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada. La proteína tau normalmente se encuentra asociada a microtúbulos, componentes citosqueléticos asociados al transporte celular (Gartner y Hiatt, 2001). Las MNF se encuentran principalmente en la corteza entorrinal, el hipocampo y la amígdala, que son regiones involucradas con la conducta, el aprendizaje y la memoria (Mattson, 2004). La formación de MNF en estas regiones ocasiona pérdida neuronal y en consecuencia un daño al circuito neuronal provocando daño cognitivo (Spires y Hyman 2005). Mutaciones en el gen de la proteína tau pueden provocar enfermedades neurodegenerativas, pero no con las características asociadas con la EA, como sí ocurre en el caso de los genes de PS1/PS2 y APP. La presencia de MNF en otras enfermedades neurodegenerativas como enfermedades tipo Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras, sugiere que la formación de estas estructuras no es una respuesta neuronal específica a una condición estresante en particular, como ocurre con la acumulación de  $\beta$ A (Hooper, 2000).

Tanto la presencia de placas amiloideas como la de marañas neurofibrilares pueden ocurrir independientemente. Pero en la EA se sugiere que la formación de

las marañas representa una de varias respuestas neuronales a la acumulación de  $\beta$ A (Selkoe, 2001).

### 1.1.2 Péptido Beta-Amiloide $\beta$ A

El término amiloide se refiere a los depósitos de proteínas en tejidos que presentan una coloración verde en tejidos teñidos con rojo congo. Al observarse al microscopio electrónico estas proteínas tienen una apariencia fibrosa, además tienen la capacidad de reaccionar con el fluorocromo tioflavina (Morgan et al., 2004). En 1986 utilizando difracción de rayos X se determinó la conformación del  $\beta$ A de centros amiloideos, los cuales fueron purificados de placas amiloideas de cerebros humanos. Se encontró que el péptido tenía características típicas de difracción de láminas  $\beta$  (Kirschner et al., 1986).

#### 1.1.2.1 APP y Procesamiento Proteolítico

La purificación del  $\beta$ A de depósitos cerebrovasculares permitió elucidar su conformación e identificar a la proteína precursora del  $\beta$ A (APP) (Kang et al, 1987). La APP es una proteína de membrana que contiene una porción N-terminal extramembranal, un dominio transmembranal y un dominio C-terminal citoplasmático (Hendriks y Van1996). Existen varias isoformas de la APP que se originan por “splicing” alternativo, dentro de estas se encuentran las isoformas de 695, 751 y 770 aminoácidos. La isoforma APP695 es predominante en neuronas, mientras que APP751 y APP770 se expresan tanto en células neuronales como en no neuronales. La función de APP aún no está totalmente descrita, pero hay evidencias que indican que es importante en actividades neuronales como el crecimiento neuronal, la plasticidad sináptica y la adhesión celular (Selkoe, 2001). La APP es procesada en tres diferentes sitios por las enzimas conocidas como  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa o BACE1 (Beta-site APP- clearing enzyme 1) y  $\gamma$ -secretasa. Por lo tanto, el procesamiento proteolítico de APP puede generar  $\beta$ A de diferentes tamaños, este procesamiento de la APP puede ser amiloidogénico o no amiloidogénico. En el procesamiento amiloidogénico, la APP es cortada por la  $\beta$  –

secretasa en la región N-terminal del  $\beta$ A, produciendo el péptido  $\beta$ -APP y un sustrato conocido como C99, este residuo puede ser internalizado en endosomas y procesado por  $\gamma$ -secretasa para generar  $\beta$ A 40/42. Se ha sugerido que el fragmento resultante puede ser procesado endocíticamente de una forma lisosomal/endosomal (Hass, 1992). En el procesamiento no amiloidogénico el primer corte de APP lo realiza la  $\alpha$ -secretasa, liberando un fragmento conocido como  $\alpha$ -APP, el fragmento C-terminal restante que permanece en la membrana es cortado por  $\gamma$ -secretasa, produciendo el péptido p3 ( $\beta$ A 17-42). A este procesamiento se le denominó no amiloidogénico, estudios posteriores demostraron que también el péptido p3 se agrega en el cerebro y es tóxico (Pike et al., 1995; Lalowski et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones de los genes de la PS1 (que se encuentra en el cromosoma 14) y de la PS2 (en el cromosoma 1) causan EAF. Se ha sugerido que la PS1 y la PS2 son componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa y la mayoría de las mutaciones en estas proteínas incrementan la producción de  $\beta$ A42 (Takasugi et al., 2003). Por otro lado las mutaciones en APP están localizadas adyacentes a los sitios de corte de  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa o en la región que corresponde al  $\beta$ A. Las mutaciones cercanas al sitio de corte de  $\beta$ -secretasa inducen la producción de  $\beta$ A. La angiopatía cerebral amiloide (ACA) en EAF esta ligada a las mutaciones en la región del  $\beta$ A de APP. Entre estas mutaciones se encuentran A21G (Flemish), E22G (Arctic), E22Q (Dutch), E22K (Italian) y D23N (Iowa). En este tipo de amiloidosis cerebral el péptido predominante es  $\beta$ A40 (Irie et al., 2005).

#### 1.1.2.2 Modelos de agregación

Se han propuesto 4 modelos que explican la cinética de agregación del  $\beta$ A: el modelo de polimerización dependiente de la nucleación, el de la dinámica de la agregación y desagregación, el de “dock and lock” y el de vías alternativas de agregación. En el modelo de polimerización dependiente de la nucleación se sugiere que la formación de oligómeros termodinámicamente desfavorables pudiera representar un núcleo en el cual la polimerización o el crecimiento de

fibrillas sucede espontáneamente (Morgan et al., 2004). La validez de este modelo se ve afectada debido a que las cantidades y las condiciones en las cuales el  $\beta$ A se agrega *in vivo*, difícilmente se reproducen en modelos experimentales. El modelo de la dinámica de la agregación y desagregación explica el mecanismo por el cual los procesos de agregación y desagregación están en un equilibrio dinámico. Este modelo no excluye al modelo anteriormente descrito. En el modelo de “dock and lock” se propone que el proceso ocurre en dos fases: en la primera fase, “docking”, la agregación de  $\beta$ A es un mecanismo reversible, pero en la segunda fase, “locking”, la agregación es irreversible. Las fases “dock” y “lock” son dependientes del tiempo de agregación. El modelo de vías alternativas de agregación sugiere que la forma monomérica de  $\beta$ A es inestable en solución y que conlleva a la agregación ordenada o desordenada. En la agregación ordenada, el  $\beta$ A alcanza un estado plegado caracterizado por la conformación rica en  $\beta$  hélices, que es la base para la formación de protofibrillas. La agregación ordenada sucede cuando hay una concentración crítica de  $\beta$ A (Morgan et al., 2004).

En la vía de agregación desordenada los monómeros de  $\beta$ A son incorporados en pseudoesferas y alcanzan un tamaño crítico e inestable, estos agregados amorfos pueden ser degradados por proteasas. La agregación desordenada ocurre bajo condiciones fisiológicas normales, mientras que la agregación ordenada ocurre en la EA (Morgan et al., 2004).

### 1.1.2.3 Oligómeros

Los oligómeros de  $\beta$ A también conocidos como ADDLs son agregados de 2 a 12 monómeros (mer) del  $\beta$ A. Actualmente se han generado evidencias que sustentan que los oligómeros solubles del  $\beta$ A son neurotóxicos y pueden estar relacionados con el daño cognitivo (Cleary et al., 2005) y la disfunción sináptica (Kokubo et al., 2005). En ratones transgénicos, Tg2576, que expresan la APP humana se ha encontrado que el deterioro de la memoria es causado por la acumulación extracelular de oligómeros de 12 mer. Este daño es independiente de la formación de placas amiloideas (Lesné et al., 2006).



#### 1.1.2.4 Agregación y Neurotoxicidad del $\beta$ A

El peso molecular del  $\beta$ A es aproximadamente de 4 KDa y su tamaño varía de 38 a 43 aminoácidos. Este péptido se encuentra de manera constitutiva en líquido cerebroespinal y en el plasma de personas sanas. En esta enfermedad se encuentran dos formas predominantes del  $\beta$ A: el fragmento  $\beta$ A40, más abundante en circulación y con mayor solubilidad; y el fragmento  $\beta$ A42, menos soluble y presente en mayor cantidad en las placas amiloideas sin embargo, la agregación de estos péptidos se ha relacionado con la patogénesis de la EA. Particularmente, el  $\beta$ A42 tiene un papel más importante en esta patogénesis, debido a que se agrega con mayor facilidad y es más neurotóxico que el  $\beta$ A40. La concentración del  $\beta$ A42 soluble en el cerebro es un factor importante en la regulación de la agregación. Se ha considerado que el  $\beta$ A es una molécula iniciadora de la patogénesis de la EA (Levites et al., 2006).

Con base en la estructura del  $\beta$ A42 fibrilar, se han propuesto varios mecanismos de neurotoxicidad. En estos mecanismos se señala el papel de la Tyr<sub>10</sub> e His<sub>13</sub> en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediada por metales como Cu(II), Zn(II) o Fe(III) (Butterfield, 2003). También se ha reportado que la Met<sub>35</sub> es crucial en el proceso de neurotoxicidad y en los efectos oxidativos del  $\beta$ A. Un modelo nuevo explica que en presencia de iones metálicos el  $\beta$ A42 produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando un radical tirosilo en la posición 10 del péptido. El plegamiento del péptido en las posiciones 22 y 23 podría aproximar al radical tirosilo con el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> para producir el catión S-oxidado. El catión puede ser estabilizado por el anión carboxilato del extremo C-terminal. Esta serie de eventos pueden acelerar la oligomerización de  $\beta$ A42 (Irie et al., 2005).

#### 1.1.2.5 Hipótesis de la Cascada del Amiloide

Esta hipótesis propone en una secuencia los eventos patogénicos que culminan en la EA. Esta cascada de eventos es iniciada por los cambios en el metabolismo del  $\beta$ A42. La alteración en la producción de  $\beta$ A42 es causada por mutaciones en los genes de APP, PS1 y PS2. En EAF después de la acumulación de  $\beta$ A42 ocurre la oligomerización y la deposición de  $\beta$ A42 como agregados difusos (Hardy et al., 2002). En la EA la microglia y los astrocitos se colocan con las placas

amiloideas. La microglia activada y los astrocitos reactivos secretan citocinas inflamatorias y sustancias tóxicas que pueden contribuir a la neurodegeneración. Estas sustancias incluyen especies de oxígeno y nitrógeno reactivas que provocan estrés oxidativo (McGeer et al., 2003).

### 1.1.3 Estrategias Terapéuticas

La hipótesis amiloide señala al incremento en la producción y a la acumulación del  $\beta$ A42 como las primeras causas de la patología de la EA. Con base en hipótesis se han diseñado varias estrategias terapéuticas que consideran al  $\beta$ A42 como un blanco terapéutico; de manera que las investigaciones están orientadas a la inhibición de las enzimas involucradas en la producción del  $\beta$ A y en la inhibición de la agregación de este péptido.

#### 1.1.3.1 Inhibición de la producción de $\beta$ A

Las estrategias que involucran la inhibición de la producción del  $\beta$ A se han enfocado principalmente en la inhibición de la  $\gamma$  y la  $\beta$  secretasas, así como en la estimulación de la  $\alpha$  secretasa. Se han utilizado varios compuestos para inhibir la actividad de la  $\gamma$  y la  $\beta$  secretasas. En estudios clínicos Fase II se ha demostrado que la inhibición de la  $\gamma$  secretasa provoca una disminución en la concentración de  $\beta$ A en el plasma pero no en líquido cefalorraquídeo. Se ha encontrado que la  $\gamma$  secretasa es un complejo formado por PS1, nicastrina, Aph1 y Pen2. El incremento en la producción de  $\beta$ A depende de varios factores que influyen en la estructura de este complejo. Entre estos factores se han encontrado la composición de lípidos en la membrana celular y la cantidad de inhibidores de esta enzima. Estos datos son de importancia para el desarrollo de agentes terapéuticos. Sin embargo también se sabe que las presenilinas tienen otras funciones en el sistema nervioso central como por ejemplo la eliminación de proteínas de desecho y la activación de vías de señalización que inhiben la fosforilación de tau. Todo esto indica que la  $\gamma$  secretasa puede ser un blanco terapéutico, pero es necesario un mayor conocimiento que se tiene acerca del

funcionamiento de este complejo y de sus componentes. Otros estudios se han enfocado en la inhibición de la  $\beta$ -secretasa, esta la proteasa transmembranal se encuentra en todas las células pero en mayor cantidad en neuronas. Estudios en ratones knockout de la  $\beta$ -secretasa han mostrado que la falta de la  $\beta$ -secretasa provoca alteraciones morfológicas; además, se le ha atribuido un papel en la liberación de neurotransmisores (Citron, 2004).

#### 1.1.3.2 Inmunoterapia

Se ha observado en ratones transgénicos que la inmunización activa y pasiva pudieran ser unas de las formas de prevenir o tratar la EA. Las estrategias se basan principalmente en la utilización de anticuerpos anti-  $\beta$ A (Dodart et al., 2003). En la inmunización activa se han evaluado dos tipos de inmunógenos: el péptido entero o fragmentos de este. Después de la inmunización de ratones con estos antígenos las células presentadoras de antígenos los procesan y los presentan a las células T. Posteriormente, se generan anticuerpos anti-  $\beta$ A. Por otro lado, la inmunización pasiva consiste en administrar anticuerpos anti-  $\beta$ A directamente. Esta estrategia no requiere de algún tipo de respuesta inmunológica del paciente. La inmunización pasiva podría ser de utilidad en personas de edad avanzada, cuyo sistema inmune al igual que otros se ve deteriorado por la edad (Schenk, 2002).

##### 1.1.3.2.1 Inmunización Activa

Schenk y colaboradores (1999) reportaron el primer estudio de inmunización activa con el  $\beta$ A42, la forma predominante en las placas amiloideas. La primera administración fue por vía parenteral con adyuvante completo de Freund y los refuerzos se hicieron con adyuvante incompleto de Freund. La inmunización se hizo en ratones transgénicos PDAPP. Este modelo presenta varias características como: la expresión de APP humano con una mutación relacionada con la EAF y la agregación de  $\beta$ A en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo calloso. Los ratones transgénicos PDAPP no presentan marañas neurofibrilares pero tienen algunas características de la EA, como la alteración en procesos cognitivos. En este estudio se observó que en los ratones inmunizados con  $\beta$ A42 presentaron una

reducción en el número de pacas amiloideas, neuritas distróficas y gliosis. Con esta inmunización la formación de agregados amiloideos en ratones jóvenes se previno y en ratones viejos se redujo. Esta terapia estimula la respuesta inmune mediada por microglia, células T y B.

Sigurdsson y colaboradores (2004) también demostraron que la inmunización activa de ratones transgénicos, Tg2576, provoca reducción de las placas amiloideas y del daño cognitivo. Los anticuerpos que fueron generados predominantemente por estos ratones fueron IgM anti-  $\beta$ A. Dado que los anticuerpos IgM son demasiado grandes para atravesar la barrera hematoencefálica, se considera que estos anticuerpos pudieron interactuar con el  $\beta$ A en la periferia y de esta manera desagregar y/o reducir la formación de placas amilodeas en el cerebro de estos ratones.

En otro estudio Frenkel y Solomon (2001) utilizaron el epitopo EFRH el cual se encuentra localizado en la posición 3-6 del  $\beta$ A y es considerado como un sitio de regulación para la formación de placas amiloideas. En este estudio se inmunizó a ratones, conejos y cobayos con fagos filamentosos que desplegaban en su superficie al péptido EFRH para generar anticuerpos que reconocen al epitopo EFRH, la alta inmunogenicidad del fago permitió la obtención de títulos elevados de IgG sin necesidad de adyuvante además la inmunización con el péptido EFRH permite la producción de anticuerpos anti-agregantes.

La inmunización con el  $\beta$ A se ha llevado acabo por diferentes vías y en distintos modelos. Por ejemplo la administración subcutánea en ratones TgAPP695, que expresan mutaciones en la APP y desarrollan placas amiloideas de manera temprana, se observó una reducción de placas amiloideas (Janus et al., 2000). En el doble transgénico APP/PS1 (APP humana con mutaciones K670/M671 y PS1 con mutación M146L) se observó una reducción modesta de placas pero una mejoría en procesos de memoria. Acentuando que la mejoría en este tipo de procesos no esta totalmente asociada a la deposición de placas (Morgan et al., 2000). Resultados similares se ha obtenido con la inmunización nasal (Weiner et al., 2000) e intraperitonealmente (Frenkel et al., 2003).

Los resultados anteriores fueron alentadores y se iniciaron pruebas clínicas en donde se administró el  $\beta$ A42 con el adyuvante QS-21 bajo el nombre de AN1792 (Elan Pharmaceuticals Inc.). El adyuvante QS-21 es inductor de respuesta celular Th-1. AN1792 fue previamente probado en ratones, conejos, cobayos y monos. Se iniciaron pruebas clínicas fase I primero con 24 y después con 70 pacientes, los cuales mostraron buena tolerabilidad. Subsecuentemente se iniciaron estudios clínicos fase II incrementando el número de pacientes con la EA a 375, de estos, 75 pacientes recibieron placebo y los 300 restantes AN1792. La administración fue intramuscular en el día 0 y a los meses 1,3,6,9 y 12. Desafortunadamente estos estudios se suspendieron en el 2002, debido a que 18 de los pacientes que recibieron AN1792 presentaron síntomas clínicos de meningoencefalitis. El análisis postmortem de dos pacientes que habían recibido AN1792 reveló disminución en el número de placas y carencia de neuritas distróficas (Gelinas et al., 2004). En el 2003 se analizó el cerebro de una paciente que y se encontraron pocas placas, persistencia de las marañas neurofibrilares, angiopatía cerebral amiloide y respuesta asociada a microglia. Toda esta información ha sido de gran utilidad porque en ella se resalta la importancia de los anticuerpos anti- $\beta$ A y finalmente estos estudios apoyan fuertemente la hipótesis del amiloide (Weiner et al., 2006).

#### 1.1.3.2.2 Inmunización Pasiva

Esta estrategia involucra la administración de anticuerpos anti-  $\beta$ A o fragmentos de estos (Fab`s, scFvs y VH). Bard y colaboradores (2000) administraron periféricamente anticuerpos anti-  $\beta$ A a ratones transgénicos PDAPP y notaron que estos anticuerpos fueron capaces de reducir los depósitos amiloideos. Estos anticuerpos al sistema nervioso central se unieron a las placas amiloideas e indujeron la eliminación del  $\beta$ A ya existente. Cuando examinaron *ex vivo* los cerebros de estos ratones encontraron que estos anticuerpos activaron la microglia para eliminar por fagocitosis a las placas a través de los receptores Fc. Para determinar la importancia de la región Fc utilizaron la región F(ab)'2 de anticuerpos anti-  $\beta$ A. Se encontró que los anticuerpos completos y los anticuerpos carentes de la región Fc pueden unirse al péptido  $\beta$ A. Además, los anticuerpos

carentes de la región Fc no activaron a la microglia. Estos estudios demostraron que en ausencia de proliferación de células T, los anticuerpos son suficientes para disminuir la deposición del  $\beta$ A en ratones PDAPP (Bard et al., 2000). DeMattos y colaboradores (2002) inmunizaron periféricamente a ratones PDAPP utilizando el anticuerpo m266 dirigido a la región central del  $\beta$ A. En este estudio se observó una disminución en la deposición de las placas, pero sin que el anticuerpo m266 se uniera a los depósitos amiloideos directamente. Los autores postularon que la presencia de m266, en la periferia altera el transporte y la dinámica de equilibrio del  $\beta$ A entre el cerebro y el plasma. Este equilibrio alterado favorece la eliminación periférica y el catabolismo de depósitos del  $\beta$ A en el cerebro. El anticuerpo m266 fue comparado con dos de los anticuerpos monoclonales (m3D6 y m10D5) usados por Bard y colaboradores (2000). Estos también fueron capaces de actuar como secuestradores del  $\beta$ A en la periferia, aunque no fueron tan efectivos como m266. Este mismo anticuerpo fue utilizado para establecer una correlación entre los niveles basales del  $\beta$ A en el plasma y en el cerebro de ratones transgénicos PDAPP viejos (12-13 meses). La administración periférica de m266 provocó un incremento en las concentraciones de  $\beta$ A40,  $\beta$ A42 y de la proporción  $\beta$ A40/42 en el plasma, este incremento correlacionó con la cantidad de  $\beta$ A acumulado en el cerebro. Sin embargo, esto no ha sido determinado en humanos para poder ser utilizado como una prueba de diagnóstico de la EA (DeMattos et al., 2002).

Dodart y colaboradores (2002) administraron periféricamente el anticuerpo m266 a ratones transgénicos PDAPP. El objetivo de este estudio fue observar el efecto del anticuerpo monoclonal m266 en la elaboración de tareas relacionadas con el aprendizaje, memoria y reconocimiento de objetos. Se encontró que la mejoría al hacer estas tareas no estaba correlacionada con la desagregación de las placas, de esta manera estos resultados contradecían a otros estudios que proponen que el daño cognitivo está relacionado con la formación de placas amiloideas. Los resultados del grupo de Dodart apoyan las propuestas que señalan a los agregados de  $\beta$ A solubles como responsables de la neurodegeneración y daños relacionados asociados con la EA. En otro estudio también se inmunizó periféricamente con un anticuerpo monoclonal que reconoce los aminoácidos de

las posiciones 3-6 del  $\beta$ A humano. Este anticuerpo fue nombrado  $\beta$ 1. Se observó que la administración de  $\beta$ 1 provoca una reducción significativa de placas difusas principalmente, sin embargo, también induce un incremento de las microhemorragias cerebrales en vasos que contienen amiloide. Esto sugiere un posible nexo con las complicaciones neuroinflamatorias observadas en las pruebas clínicas en humanos (Pfeifer et al., 2002). Basados en el estudio anterior otro grupo propuso la inmunización intracerebroventricular con un anticuerpo anti- $\beta$ A, encontrando una disminución de las placas amiloideas, sin actividad de astrocitos y disminución de la inflamación, esto último provocado por la reducción de microglia (Chauhan et al., 2003).

Utilizando ratones transgénicos PDAPP inmunizados directamente en la superficie cortical con los anticuerpos anti- $\beta$ A, 3D6 y 10D5 (anteriormente fueron utilizados por el grupo de Bard), Lombardo y colaboradores (2003) reportaron que las neuritas anormales están directamente relacionadas con la deposición del  $\beta$ A. Las neuritas parecen tener un mecanismo de auto corrección por el cual estas son capaces de restaurar su morfología después de la eliminación de las placas, es decir, hasta cierto intervalo de tiempo este proceso es reversible.

Con los anticuerpos 3D6 y 10D5 (dirigidos a la región amino terminal del  $\beta$ A) y con m266 (dirigido a la región central del  $\beta$ A) Racke y colaboradores (2005) determinaron que, los anticuerpos dirigidos a la región amino terminal producen microhemorragias.

1.1.3.2.3 Mecanismos de eliminación del  $\beta$ A por anticuerpos anti-  $\beta$ A específicos  
Actualmente se han postulado tres mecanismos diferentes para la eliminación del  $\beta$ A del cerebro, que a continuación se describen:

- i. Activación de microglia y fagocitosis del  $\beta$ A. En este mecanismo se requiere de la región Fc del anticuerpo. Se ha observado que los anticuerpos se unen directamente a los depósitos amiloideos. Además la región Fc activa a la microglia para que fagocite al complejo anticuerpo -  $\beta$ A (Bard et al., 2000; Pritman et al., 2006 y Schenk et al., 1999).

- ii. Resolución directa. Se refiere al efecto directo de los anticuerpos sobre el  $\beta$ A que se encuentra en los agregados, provocando la disolución de los agregados. Este mecanismo se basa en estudios *in vitro* en donde los anticuerpos dirigidos a la región EFRH del  $\beta$ A pueden desagregar los depósitos amiloideos (Solomon et al., 1997; Frenkel et al., 1999).
- iii. Captura del  $\beta$ A amiloide soluble. Este mecanismo fue propuesto por DeMattos y colaboradores (2001) cuando observaron una disminución en la deposición de las placas sin que el anticuerpo atravesara la barrera hematoencefálica. Este mecanismo se basa en el secuestro del  $\beta$ A circulante, causando una migración del  $\beta$ A del cerebro al plasma. (DeMattos et al., 2001; Sigurdsson et al., 2004).

## 1.2 Técnica de Despliegue en Fagos, Phage Display

La técnica de despliegue en fagos o “phage display” (PD) es una tecnología molecular que permite la expresión de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos. La secuencia de interés es insertada dentro del genoma del bacteriofago filamentosos. Esta técnica puede ser utilizada para seleccionar y purificar moléculas específicas para ciertos ligandos (Smith et al., 1985).

### 1.2.1 Fagos filamentosos

Los bacteriofagos son virus que infectan una gran cantidad de bacterias Gram-negativas mediante el pili. Entre los bacteriofagos filamentosos más conocidos y que infectan específicamente a la *Escherichia coli* destacan: M13, F1 y Fd. El bacteriofago M13 es uno de los más estudiados. Es un fago de 6.5 nm de diámetro y aproximadamente 930nm de largo. Sin embargo la longitud del fago depende del tamaño del genoma. El fago M13 contiene como genoma una sola hebra de ADN circular de cadena sencilla y esta formado por 11 genes. Un fago viable expresa 2700 copias del gen g8 que codifica para la proteína principal de la cápside del fago, p8. El gen 3 (g3) codifica para la proteína de reconocimiento, p3 que es una de las cuatro proteínas menores que forman al



fago. Otros tres genes que codifican a las tres proteínas menores del fago son g6, g7 y g9. Las proteínas menores del fago se encuentran en los extremos del fago, p3 y p6 se encuentran en un extremo y p7 y p9 en el otro (Marvin, 1998). Los fagos filamentosos producen una infección no lítica, es decir no matan ni lisan a los hospederos. Para iniciar la infección, la proteína p3 reconoce el pili F de la bacteria como receptor. Después de la infección la cadena de ADN circular es convertida a una forma replicante de ADN de doble cadena (FR). Esta FR se replica por el mecanismo de círculo rodante, generando cadenas sencillas de ADN que sirven como templado que posteriormente se convierten en FR. Varias copias de la cadena sencilla de ADN son sintetizadas, empaquetadas y finalmente la progenie viral es liberada de la bacteria en forma infectiva (Azzazy et al., 2002).

#### 1.2.2 Bibliotecas de anticuerpos desplegadas en fago

Las bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser de dos tipos: inmunes y no inmunes o nativas. La biblioteca nativa es generada a partir de rearrreglos de genes que provienen de un organismo como el humano, el ratón, etc. no inmunizado con el antígeno en cuestión. Las bibliotecas inmunes son creadas de rearrreglos de genes V, que provienen de un organismo inmunizado con el antígeno particular.

Las bibliotecas de anticuerpos son enriquecidas en clonas específicas para un antígeno mediante un procedimiento conocido como bioselección. En este procedimiento los fagos que tienen desplegados a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se ponen en contacto con el antígeno de interés. Los fagos que despliegan en su superficie anticuerpos que no se unen a dicho antígeno son eliminados a través de lavados. Los fagos que despliegan en su superficie anticuerpos que reconocen al antígeno son eluidos mediante condiciones que desfavorecen la interacción del antígeno con el fragmento de anticuerpo desplegado en el fago. La condición más utilizada es el cambio de

pH. Esta selección se repite de 2 a 4 rondas generalmente (Bradbury et al., 2004).

### 1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos son inmunoglobulinas, que se encuentran en la membrana de las células B. Cuando son secretados en la circulación sanguínea sirven como efectores de la inmunidad humoral, en donde neutralizan antígenos o bien los marcan para su eliminación. Todos los anticuerpos tienen una estructura básica que consiste de un par idéntico de cadenas pesadas polipeptídicas (VH) y un par de cadenas ligeras polipeptídicas (VL), unidas unas a otras por enlaces disulfuros y con enlaces no covalentes. Cada una de las cadenas pesadas es codificada por segmentos genéticos. La familia de la cadena pesada posee segmentos genéticos  $V_H$ , D,  $J_H$ , y  $C_H$ . Los segmentos genéticos  $V_H$ , D y  $J_H$  reordenados codifican la región variable de la cadena pesada. Los segmentos genéticos correspondientes a las cadenas ligeras kappa y lambda son  $V_L$ ,  $J_L$  y  $C_L$ . Los segmentos  $V_L$  y  $J_L$  codifican la dominio variable de la cadena ligera. Para cada familia el fragmento C codifica para la región constante. Cada región V consiste de regiones alternadas llamadas regiones armazón (FW, framework), los cuales están que son más conservadas que las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) Los CDRs tienen una secuencia muy variada, estos dominios interaccionan en mayor proporción con el antígeno. Los primeros dos CDRs son codificados por los segmentos genéticos V. El tercer CDR es el producto de la unión de los segmentos  $V_H$ , D y  $J_H$ , para la cadena pesada y  $V_L$  y  $J_L$ , para la cadena ligera (Goldsby et al., 2003). Como se puede apreciar los anticuerpos contienen dominios discretos que se pueden separar por la digestión enzimática o producirlos por tecnología recombinante (Azzazy et al., 2002).Tabla 1.1

### 1.1 Fragmentos de anticuerpos característicos.

Fragmento de anticuerpo	Estructura
VH	Dominio VH
ScFv	Dominios VH y VL, unidos por 15 aa
Fv	Dominio VH y VL, no unidos entre sí
Minicuerpo	Dos cadenas de ScFv –CH3 unidas
Fab	Formado por dos cadenas: VH-CH1 y VL-CL
F(ab') <sub>2</sub>	Dos moléculas Fab

## 2 Objetivos

### 2.1 General

Identificar y caracterizar fragmentos de inmunoglobulinas que se unan al péptido  $\beta$ A, componente principal de las placas seniles en cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, a partir de una biblioteca inmune anti- $\beta$ A desplegada en la proteína p8 del fago M13, con el fin de desarrollar moléculas inmunoterapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

### 2.2 Específicos

Construir una biblioteca de VH inmune anti- $\beta$ A desplegada en la proteína p8 del fago M13 a partir de células de bazo de ratón inmunizado previamente con el  $\beta$ A42.

Selección de fragmentos de inmunoglobulinas que se unan al péptido  $\beta$ A, realizando biopanning de la biblioteca de VH expresada en el fago M13.

Caracterizar en ensayos de ELISA y de neurotoxicidad, las clonas que expresan los VH específicos al  $\beta$ A.

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Construcción de la Biblioteca de VH

##### 3.1.1 Generación de Animales Hiperinmunes al Péptido $\beta$ -Amiloide

Se empleó un protocolo estándar de inmunización (Gevorkian et al., 2004). Se inmunizaron grupos de 3 ratones macho Balb/C de 4-6 semanas de edad. La inmunización de los ratones consistió en la inyección subcutánea de 30  $\mu$ g del  $\beta$ A 42 humano (AnaSpec Inc., San José, CA). El fue resuspendido en PBS e incubado toda la noche a 37°C. Esta suspensión inmunogénica (50 $\mu$ l) fue emulsificada en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma chemical, USA). Se realizó una inmunización inicial y tres refuerzos a intervalos de 15 días. Los ratones control fueron inmunizados con PBS y adyuvante de Freund. Después de la tercera y cuarta inmunización, los ratones fueron anestesiados en una cámara con Sevorane y sangrados por plexo retroocular (100-200  $\mu$ l / animal). La fracción de suero se obtuvo mediante la coagulación de la sangre la cual fue mantenida a temperatura ambiente por 1 hora y a 37°C durante 2 horas, finalmente se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. Los sueros fueron almacenados a -20 °C.

##### 3.1.2 Identificación Inmunológica de Animales Hiperinmunes contra el Péptido $\beta$ -Amiloide

Para determinar el título de anticuerpos anti-  $\beta$ A42 en el suero de los ratones se utilizó un protocolo estándar de ELISA. En este ensayo se emplearon placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) de 96 pozos. Se inmovilizaron 2  $\mu$ g/ml del  $\beta$ A42 (diluido en buffer de carbonatos pH 9.6) en cada pozo incubando durante toda la noche a 4°C. Después de la adsorción del antígeno peptídico, los pozos se lavaron cuatro veces con un sistema para microplacas automatizado (Denley, Well Wash 4). Los lavados se realizaron con una solución de PBS pH 7.4/Tween-20 al 0,2% (Sigma). Posteriormente, se llevó a

cabo un procedimiento de bloqueo con 200  $\mu$ l de la solución PBS / BSA (2%) (Sigma chemical, USA) seguida de otro procedimiento de lavado. A continuación los pozos se incubaron con 100  $\mu$ l de antisuero policlonal en diluciones desde 1:400 a 1:15600 en PBS/BSA (1%) (Sigma chemical, USA)/Tween-20 (0.1%). Como control negativo se utilizó el suero de los ratones inmunizados con PBS y adyuvante de Freund. Después de 1 hora de incubación a 37°C , los pozos se lavaron nuevamente. En seguida se agregó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Zymed, San Francisco, CA) conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1:5000 en la solución PBS/BSA (1%) /Tween-20 (0.1%). Después se incubó por un período de 1 hora a 37°C. Finalmente a cada pozo se le agregó 100 $\mu$ l de solución cromogénica (ABTS single solution, Zymed). Y se midió la absorbancia a 405 nm con referencia a 450 nm en un lector de microplacas automatizado (Opsys Mr, Dynex Tech., Chantilly, VA).

### 3.1.3 Extracción de Esplenocitos

Dos animales con títulos séricos de anticuerpos anti-  $\beta$ A altos fueron seleccionados como candidatos para la obtención de sus esplenocitos, empleando el protocolo experimental descrito por Gevorkian y colaboradores (2004). Los animales hiperinmunes seleccionados para estos fines recibieron una última inmunización subcutánea con 30  $\mu$ g del inmunógeno quince días antes de ser sacrificados para la obtención de sus esplenocitos activados. Los animales inmunizados fueron anestesiados, sangrados a blanco y sacrificados por dislocación cervical. Los esplenocitos fueron obtenidos rápidamente por perfusión de bazo en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar de seguridad biológica Nivel 1 (VECO, Jiutepec, Mor.). Los esplenocitos colectados a partir de este tejido fueron lavados con PBS y tratados con un buffer de lisis de eritrocitos por 10 minutos con agitación ocasional.

#### 3.1.4 Extracción y Purificación de mRNA Total de los Esplenocitos

Se extrajo el mRNA total de  $5 \times 10^7$  esplenocitos, de dos ratones inmunizados, mediante el kit de purificación Quick prep. mRNA (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.1.5 Síntesis de DNA complementario

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) a partir del mRNA de ratón inmunizado con el péptido  $\beta$ A42 se utilizó el kit First strand cDNA (Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se utilizó en una reacción de PCR empleado Taq platinum (Invitrogene) y primers específicos para las cadenas pesadas de inmunoglobulinas 1 y 2 (Amersham). Se realizaron 30 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: 94°C durante 1 min, 55°C durante 2min y 72°C durante 2 min. Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad), de acuerdo a las indicaciones del kit Recombinant Phage Antibody System Mouse ScFv Module (Amershan Bioscience). Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de Tris-EDTA (TAE) agarosa 1.5% con amortiguadorTAE 1X a 60 V.

#### 3.1.6 Amplificación de VH

Se amplificó el fragmento VH por PCR en un termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad). Para 25 $\mu$ l de reacción se utilizó: 2,5 $\mu$ l de solución amortiguadora para Taq ADN polimerasa recombinante 10X (Altaenzymes), 0,75 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM, Altaenzymes), 0,5  $\mu$ l dNTP; (1 $\mu$ l de primer 3' LINK, 1 $\mu$ l de primer 5'PCANT, 0.5 $\mu$ l de enzima Taq polimerasa (5u/ $\mu$ l); (Alta enzima) y 50ng del fragmento de VH. Se realizaron 25 ciclos de amplificación: 94°C durante 1min, 70 °C durante 30 s y 72°C durante 30 s.

### 3.1.7 Purificación de VH

La purificación del VH amplificado se realizó con un kit de purificación para PCR (Concert Rapid PCR purification System; Marligen Bioscience, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.1.8 Digestión de VH

El fragmento VH se digirió con las enzimas Hind III y con NcoI (New England Bio labs). Para la digestión con Hind III, en un volumen de 60µl se utilizó: 40µl del fragmento VH (5ng/µl), 2µl de enzima Hind III (25u/ µl), 6µl de solución amortiguadora 10X num. 2 (New England Bio labs) y 12µl de H<sub>2</sub>O. La reacción se mantuvo durante 1h a 37°C. La digestión con la enzima NcoI, se realizó en un volumen de 11µl: 7µl de BSA, 1µl de amortiguador K, 1µl de KCl<sub>2</sub> (3 M) y 2µl de la enzima NcoI (New England Bio labs). La reacción se incubó durante 1h a 37°C.

### 3.1.9 Digestión del Vector PG8SAET

El vector PG8SAET se digirió con las enzimas Hind III (New England Bio labs) y NcoI (New England Bio labs). La digestión con Hind III se realizó en un volumen de 20µl: 4µl de vector (50ng/µl), 2µl de enzima Hind III (25u/µl), 2µl de amortiguador num. 2 y 12µl de H<sub>2</sub>O y se incubó durante 1h a 37°C. Para la digestión con la enzima NcoI en un volumen de 30µl se empleó lo siguiente: 3µl de BSA, 1µl de amortiguador, 0,7µl de KCl<sub>2</sub> (3 M) 2µl de la enzima NcoI y 3,3 µl de H<sub>2</sub>O. Se incubó durante 1h a 37°C.

### 3.1.10 Desfosforilación de Vector PG8SAET

Para un volumen final de 50µl se utilizó: 30µl del vector, 2µl de buffer 10X, 1µl de fosfatasa alcalina CIAP (Amersham) y 17µl de H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó durante 1h a 37°C.



### 3.1.11 Purificación del vector PG8SAET

El vector se purificó por electroforesis. Se aplicaron 20µl de vector PG8SAET digerido y desfosforilado, en un gel de agarosa (Invitrogen) al 1% en amortiguador de TBE1X, a un voltaje de 100V durante 1h. Posteriormente, el ADN del vector fue purificado con un kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Concert Rapid PCR purification System; Marligen Bioscience, Inc.).

### 3.1.12 Cuantificación del Vector PG8SAET

Para determinar la concentración del DNA purificado se utilizó un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X. Se cargaron 5 µl del vector PG8SAET más 1 µl de amortiguador de carga (Invitrogen). La concentración fue determinada por comparación con el marcador low DNA mass leader (Invitrogen).

### 3.1.13 Ligación del Fragmento VH en el Vector PG8SAET

Se realizaron ligaciones empleando tres diferentes proporciones del vector (PG8SAET:VH): 1:6, 1:4 y 1:2. En las reacciones de ligación se utilizó amortiguador 10X, T4 DNA ligasa (New England Bio Labs) y 1µl de ligasa T4 (New England Bio Labs). La clonación se realizó según la tabla 3.1

Tabla 3.1: Cantidades de los reactivos empleados para la ligación PG8SAET:VH de acuerdo a las tres ligaciones.

Ligación (relación)	Inserto VH(8ng/ $\mu$ l) ( $\mu$ l)	Vector PG8SAET (8ng/ $\mu$ )	T4 DNA ligasa ( $\mu$ l)	Amortiguador 10X ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Volumen final ( $\mu$ l)	t/T
1:2	2,5	1	0,5	1	5	10	14 hrs/16°C
1:4	5	1	0,5	1	3	10	14 hrs/16°C
1:6	7	1	0,5	1	0,5	10	14 hrs/16°C
C <sub>neg</sub>	--	1	0,5	1	7.5	10	14 hrs/16°C

Finalmente se repitió la ligación de VH con el vector PG8SAET relación 1:2, de la siguiente manera.

Ligación (relación)	Inserto VH(8ng/ $\mu$ l) ( $\mu$ l)	Vector PG8SAET (8ng/ $\mu$ )	T4 DNA ligasa ( $\mu$ l)	Amortiguador 10X ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Volumen final ( $\mu$ l)	t/T
1:2	9,2	40	2,5	6	2,3	60	14 hrs/16°C

### 3.1.14 Preparación de Células TG1 Electrocompetentes

Se inocularon 500 ml de medio 2XYT con una colonia de *E. coli* TG1. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación (250 rpm). El cultivo se dejó crecer hasta obtener una DO (600nm) de 0,6 - 0,7 (aproximadamente 4 hrs). El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de células fue resuspendida con 500 ml de glicerol al 10% (4°C). Se centrifugo nuevamente el glicerol y se decantó, las células fueron resuspendidas en 250 ml de glicerol. Esto se realizó 3 veces. Finalmente, se resuspendieron en 4 ml y se hicieron alícuotas de 90 y 180  $\mu$ l. Las alícuotas fueron congeladas a -80°C, hasta su uso.

### 3.1.15 Transformación de la Biblioteca

Las *E. coli*, TG1 electrocompetentes (90 y 180  $\mu$ l) fueron transformadas por electroporación las reacciones de ligación PG8SAET-VH, usando 0,5 y 1  $\mu$ l respectivamente. La transformación se realizó con Gene Pulser II System (Bio-Rad Laboratorios Inc., USA) con pulsos de 5 s a 2.5 Kvolts y 2.5  $\mu$ F.

### 3.1.16 Amplificación, Rescate y Titulación de la Biblioteca

Para calcular el título de la biblioteca, las células transformadas se recuperaron en medio 2XYT a una relación de 1:10 y se incubaron por 1 hora a 37 °C con agitación (250 rpm). Se utilizaron 3 y 30  $\mu$ l de la muestra para plaquear en cajas con medio LB más carbenicilina 50  $\mu$ l/ml. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Al resto de las células transformadas se le agregó 10  $\mu$ l de ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y 10  $\mu$ l de fago helper M13KO7 (Invitrogen). Se dejaron crecer 1h sin agitación y 1h con agitación. Con este cultivo se inocularon 40 ml de medio 2XYT con 50  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml) y 50  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml). El cultivo se incubó a 37°C con agitación (250rpm) durante toda la noche. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6000 rpm 20 min a 4°C. El sobrenadante se colectó, se le agregó 1/6 parte de PEG/NaCl (PEG-8000, 20% w/v; NaCl, 2.5 M) y se incubó a 4°C durante 4 hrs. En seguida se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y el precipitado se resuspendió con 1 ml de TBS estéril. Se repitió la precipitación con 1/6 parte de PEG/NaCl durante 2 hrs a 4°C. Para lavar los fagos se centrifugó durante 10 min y 14000 rpm a 4°C y se resuspendió con 200  $\mu$ l de TBS. Nuevamente fue centrifugado con las mismas condiciones pero esta vez se desechó el precipitado. Con el sobrenadante se hicieron 3 diluciones 1:1000 se infectó *E. coli* TG1 con 200  $\mu$ l de fagos purificados, durante 45 min a 37 °C. Después se sembraron por extensión con varilla en placas que contenían 15 ml de medio LB-agar y 15  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Finalmente se contaron las colonias.

### 3.1.17 Producción del DNA de la Biblioteca

Las células transformadas (3ml) se les adicionó el de fago helper M13KO7 (50 µl) (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante toda la noche. El plásmido se purificó con un kit (Roche). El plásmido purificado fue cuantificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 volts durante 40min.

### 3.1.18 Evaluación de fagos que tienen el fragmento VH

Para determinar que porcentaje de fagos expresan el inserto (VH) se picaron colonias de las placas usadas para titular la biblioteca. Para extraer el ADN se tomó una asada de cada colonia que fue colocada en 20 µl de agua mili Q estéril. En seguida fueron calentadas a 95 °C durante 10 min y centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante (que contiene el DNA de fago recombinante) se tomaron 5 µl para ser amplificados por PCR. La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: 2,5 µl de buffer 10X (Alta enzima), 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl de Taq polimerasa (Alta enzima), 25 pmoles de oligos F8 (primer 3'), 25 pmoles de oligos PYSAET (primer 5') y 13,75 de H<sub>2</sub>O mili Q. Se realizaron 20 ciclos de PCR: 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s 70 °C durante 30s. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa 1% durante 50 min a 100 volts.

## 3.2 Selección de los Fragmentos VH anti β-Amiloide

La bioselección se llevó a cado utilizando placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Rochester, NY), Se sensibilizó 4 pozos con 100 µl de una solución de 5 µg/ml del péptido β amiloide 1-42 disuelto en buffer de carbonatos pH 9,6 a 4°C toda la noche. Cada pozo se sensibilizó con 100 µl de la dilución. Se realizaron 5 lavados con 200 µl de una solución de PBS/Tween 0,2%. Posteriormente se bloquearon los pozos con 200 µl de una solución de PBS/BSA 2% durante 1 h a 37°C. Los pozos fueron lavados de la misma manera. Se agregó 1X10<sup>11</sup>fagos/pozo de la biblioteca de VH en PBS/BSA1% Tween 0,1% durante 4 hrs a 4°C y 30 min a temperatura ambiente. La placa fue lavada de la forma anteriormente descrita. Los fagos que quedaron en la

placa interactuando con el péptido  $\beta$  amiloide fueron eluidos con trietilamina 0,1M durante 30 min a temperatura ambiente. El eluido de los cuatro pozos fue transferido a un tubo ependorf de 1,5 ml y neutralizado con 200  $\mu$ l Tris-HCl 1M pH 7,5. Se hicieron dos rondas de bioselección.

### 3.2.1 Titulación de los Fagos Seleccionados

Para evaluar el rendimiento de la bioselección se infectaron 200  $\mu$ l de células de *E. coli* TG1 con 5  $\mu$ l y 50  $\mu$ l de una dilución 1:100 de eluido de cada ronda de bioselección. La cepa TG1 fue previamente cultivada en medio líquido 2YT durante 6 horas a 37° C y 250 rpm. Después de 30min en incubación las células se sembraron por extensión con varilla en cajas petri con 15ml de medio LB-agar y 15  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml). El cultivo se incubó toda la noche a 37 grados. Finalmente se contaron las colonias.

### 3.2.2 Rescate y Amplificación de Fagos Seleccionados

Los fagos recombinantes eluidos en cada ronda de bioselección debieron amplificarse para ser usados en la siguiente ronda, antes de ser amplificados deben someterse a un procedimiento de rescate del fagémido por un fago ayudador (helper) como se describe a continuación. Se infectaron 3 ml de bacterias *E. coli* TG1 con el eluido de la ronda de bioselección. Se incubó durante 1 h a 37° C. 1 ml se conservó en glicerol y a los 2 ml restantes se les agregó 7 ml de medio 2XYT, 10  $\mu$ l de ampicilina (100mg/ml) y 10  $\mu$ l de fago helper M13KO7 (Invitrogen). Posteriormente se incubó durante 30 min a 37 °C sin agitación y durante 30min a 37°C con agitación (250 rpm). Posteriormente el cultivo fue transferido a 40 ml de medio 2XYT con 50  $\mu$ l de ampicilina (100mg/ml) y 50 $\mu$ l de kanamicina (50mg/ml). Para su amplificación este cultivo se dejó incubando durante toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm). La titulación se realizó como se mencionó anteriormente.

### 3.3 Selección de las Clonas que tienen VH del Tamaño Esperado

De las dos rondas de bioselección se picaron colonias individuales, de la primera ronda se analizaron 20 colonias y de la segunda ronda se analizaron

40. Para extraer el ADN de los clones y para determinar que clones tuvieran el VH del tamaño adecuado se procedió como se indicó en 4.1.18. Los productos de la PCR fueron corridos con buffer de carga (Invitogen) en un gel de agarosa (0.8%).

### 3.3.1 Titulación de los Fagos que Expresan el Fragmento VH del Tamaño Esperado

Los fagos que expresaron los fragmentos VH del tamaño esperado fueron titulados para posteriormente evaluarse en ensayos de ELISA. Se hicieron 3 diluciones seriadas 1:1000 de la última dilución se tomaron 5  $\mu$ l y se infectó 200  $\mu$ l de bacterias *E coli* TG1. Se hizo otra dilución 1:100. Tomaron 5  $\mu$ l de la última dilución. Se infectaron bacterias *E coli* TG1 con 200  $\mu$ l.

### 3.4 Evaluación del Reconocimiento del $\beta$ A42 por los Fragmentos VH de las Clonas

Las clones que tuvieron el inserto del tamaño esperado fueron evaluadas por ensayos de ELISA de la siguiente manera: se sensibilizó una placa de 96 pozos de poliestireno Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) con 100 $\mu$ l del péptido  $\beta$ A42 (2  $\mu$ g/ml) resuspendido en buffer de carbonatos, pH 9.6. Se dejó incubando toda la noche a 4°C. Para el control negativo se utilizó 5  $\mu$ g/ml de un péptido no relacionado. La placa fue lavada 4 veces con una solución de PBS/Tween 0,2%. Posteriormente se bloquearon los pozos con 200  $\mu$ l de una solución de PBS/BSA 2% durante 1 h a 37°C. Los pozos fueron lavados de la misma manera. Se agregaron  $1 \times 10^{11}$  fagos/pozo de cada clona que tuviera el tamaño del inserto esperado. La dilución de los fagos se hizo en una solución de PBS/BSA 0,1% Tween 0,1% durante 4 hrs a 4°C y 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la placa fue lavada de la forma anteriormente señalada. La interacción de los fagos con el péptido  $\beta$  amiloide se reveló con 100  $\mu$ l de un anticuerpo monoclonal anti-M13 acoplado a la enzima HRP (Amersham, Pharmacia, Biotech, EUA), durante 1h a 37 °C. El anticuerpo conjugado fue diluido 1:5000 en PBS/BSA 1% /Tween 0.1%. Posteriormente se lavó de la forma anteriormente indicada. Se desarrollo la reacción del sustrato con 100  $\mu$ l/pozo de una solución de ABTS (Zymed, EUA)

a 37 °C. Como control negativo se utilizó fago M13. Como control positivo se utilizó una dilución fago (b4.4) que expresa scFvs previamente reportado que reconoce al péptido  $\beta$ A (Dra Gevorkian et al; 2004). Las DO fueron leídas en lector Opsys Mr, Dynex Tech. (Chantilly, VA) a una DO de 405nm. Las clonas consideradas como positivas fueron aquellas que presentaron una DO igual o mayor que el control positivo b4.4 y mayor a la DO del control negativo, fago M13.

#### 3.4.1 Amplificación y Purificación de las Clonas Positivas en ELISA

Cuando se hizo el rescate de las clonas seleccionadas en la primera y segunda ronda de la bioselección se guardó 1 ml de cada clona en glicerol al 30% a -80°C. De cada clona conservada en glicerol se tomaron 50  $\mu$ l. Con la alícuota anterior se inocularon 3 ml de 2XYT durante 8 hrs a 37°C y con agitación de 250rpm. El rescate, la amplificación y la titulación se realizaron como se mencionó anteriormente. Después de cada amplificación se verificó que las clonas tuvieran el tamaño de fragmento VH utilizando el procedimiento anteriormente descrito en 4.1.18.

#### 3.5 Mapeo de las clonas positivas usando péptidos truncados del $\beta$ A

Para determinar que región del  $\beta$ A42 es reconocida por las clonas seleccionadas se empleo un protocolo estándar de ELISA descrito por Gevorkian (2004). En este ensayo se emplearon placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) de 96 pozos. Se adsorbieron individualmente 100  $\mu$ l por pozo de una solución de  $\beta$ A42 (2  $\mu$ g/ml) diluido en buffer de carbonatos (pH 9.6). Se empleó una concentración de 5  $\mu$ g/ml para los péptidos  $\beta$ A8-42,  $\beta$ A1-46,  $\beta$ A12-28,  $\beta$ A17-42 y para el péptido no amiloide. Para todos los péptidos la incubación fue durante toda la noche a 4°C. Después de la adsorción del antígeno peptídico, los pozos se lavaron cuatro veces con un sistema para microplacas automatizado (Denley, Well Wash 4). Para los lavados se empleó una solución de PBS-0,2% Tween-20 (Sigma chemical, USA) a pH 7,4. Posteriormente, se llevó a cabo un procedimiento de bloqueo con 200  $\mu$ l de la solución PBS / 2% BSA (Sigma chemical, USA), durante 1 h a 37°C. La placa se sometió a otro procedimiento de lavado como

se mencionó anteriormente. Se agregó  $1 \times 10^{11}$  fagos/pozo de cada clona que tuviera el tamaño del inserto esperado y que reconociera al  $\beta$ A42. Se empleó la misma cantidad de M13, para usarlo como control negativo. La dilución de los fagos se hizo en una solución de PBS/BSA 0,1% Tween 0,1% durante 4 hrs a  $4^{\circ}\text{C}$  y 30 min a temperatura ambiente. Transcurridos los 30 min la placa fue lavada de la forma anteriormente señalada. Los fagos que quedaron en la placa interactuando con el péptido  $\beta$  amiloide fueron revelados con 100  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo monoclonal anti-M13 acoplado a la enzima HRP (Amersham, Pharmacia, Biotech, EUA), durante 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ . El anticuerpo conjugado fue diluido 1:5000 en PBS/BSA 1% /Tween 0.1%. Posteriormente se lavó de la forma anteriormente indicada. La reacción se desarrolló con 100  $\mu\text{l}$ /pozo del sustrato ABTS (Zymed, EUA) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6 Secuenciación de las Clonas Positivas

Para secuenciar las clonas se purificó DNA de doble cadena de las clonas que tuvieran el inserto del tamaño esperado y que en ensayos de ELISA reconocieron al  $\beta$ A42. Para purificar ADN de doble cadena se utilizó un kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se precipitó el ADN agregando 1 parte de NaCl 5M por cada 25 partes del volumen obtenido de la solución y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Para el volumen de 100  $\mu\text{l}$  se utilizó 4  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M y 250  $\mu\text{l}$  de etanol. Se mezcló perfectamente. Se incubó 1 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Posteriormente se hizo un lavado con 250  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% (frío). Se centrifugó durante 1 min a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet formado se resuspendió con 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  mili Q estéril. Para cuantificar el ADN extraído y purificado se digirió con la enzima HindIII. Para 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción se utilizó 2  $\mu\text{l}$  de la solución que contiene el ADN purificado, 1  $\mu\text{l}$  del buffer 2 (New England), 1  $\mu\text{l}$  de la enzima Hind III y 6  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se incubó durante 1 hr a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se corrió un gel de agarosa para cuantificar el ADN por comparación con el marcador ADN low mass leader (Invitrogen).



### 3.7 Ensayos de Neuroprotección *In Vitro*

A las clonas que se les determinó la secuencia de nucleótidos de su ADN, también se les evaluó su capacidad protectora en ensayos *in vitro*. Estos ensayos de neurotoxicidad consistieron en sembrar en placas de cultivo de 96 pozos con  $1 \times 10^4$  células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con 200  $\mu$ l de medio de cultivo MEM/F12/SFB 10% y 10  $\mu$ M de ácido retinóico para su diferenciación. Después de 8 días, se agregan los ADDLs en medio OPTI-MEM (en ausencia de SFB y rojo de fenol). Las clonas seleccionadas son preincubadas por 24 horas con los ADDLs a 4°C y después esta mezcla se adiciona a las células SH-SY5Y. Al término de una incubación de 24 horas, se mide la viabilidad celular mediante la cuantificación de la actividad redox con XTT. Los ADDLs se generaron disolviendo 1 mg de A $\beta$  en 1 ml de hexafluoroisopropanol. Posteriormente se evaporó el solvente y el polvo se disolvió en DMSO y medio OPTI-MEM, este preparado se incubó toda la noche a 4°C.

### 4.8 Análisis de datos

Todos los resultados fueron expresados  $\pm$  desviación estándar. La selección de las clonas positivas se realizó de acuerdo a umbrales estadísticos, establecidos como: el promedio de los tratamientos más dos veces el promedio de la desviación estándar de los controles de M13 y PNR. Para el análisis de datos del mapeo de las clonas se utilizó ANOVA de una vía y la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey. Para los ensayos de neuroprotección se compararon los tratamientos contra el control de ADDLs utilizando ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 11.0.

## 4 Resultados

### 4.1 Ligación del Fragmento VH con el Vector PG8SAET

Para obtener una mejor eficiencia de clonación se evaluaron 3 relaciones del vector PG8SAET con el fragmento VH. La relación de ligación más favorable fue 1:2 (Vector:Inserto). Lo anterior se hizo tomando en cuenta que la concentración del vector es 8ng/ $\mu$ l y la del fragmento VH es de 4ng/ $\mu$ l. Las relaciones de ligación se establecieron en picomolas (pm) es decir, pm del vector:pm del VH. En la tabla 4.1 se muestra la evaluación de las relaciones de ligación pm PG8SAET:pm VH. La eficiencia representa la cantidad de fagos ensamblados e infectivos que se generaron mediante la electroporación del vector con el inserto en la cepa de *E. coli*, TG1.

Tabla 4.1 Evaluación de las relaciones de ligación pmPG8SAET:pm VH.

Ligación (pm Vector:pm Inserto).	Eficiencia (pfc/ $\mu$ g)
1:6	$1.5 \times 10^5$
1:4	$1.16 \times 10^5$
<b>1:2</b>	<b><math>3 \times 10^5</math></b>

### 4.2 Título y Complejidad de la Biblioteca de VH

De acuerdo a la tabla 4.1 se decidió ligar a una relación 1:2. Para 40  $\mu$ l del vector se utilizaron 9.2  $\mu$ l de el fragmento VH. En la tabla 4.2 se muestra la complejidad y el titulo de la biblioteca. La complejidad representa la diversidad de la biblioteca es decir, la cantidad de fagos que tienen genoma diferente en la biblioteca. El título indica la cantidad de fagos rescatados y amplificados.

Tabla 4.2 Características cuantitativas de la biblioteca murina e inmune de VH.

Complejidad (pfc/ml)	$8 \times 10^4$
Título (pfc/ml)	$8 \times 10^{12}$

#### 4.3 Evaluación de fagos que expresan VH de 340pb en al biblioteca

Se determinó el porcentaje de fagos que expresan los VH de 340pb, tamaño correspondiente al del VH clonado en el genoma del fago. El ADN fue obtenido de 6 colonias, de la cepa TG1 infectadas con la biblioteca de VH. El ADN se amplificó por PCR y utilizando F8 y PYSAET, que mapean 350 nucleótidos fuera del fragmento VH. En el gel de agarosa se esperaba observar un fragmento aproximadamente 690 pb, aunque el tamaño del fragmento de VH es de 340 pb. De las 6 colonias evaluadas solamente una tuvo el inserto del tamaño esperado (figura 4.1)

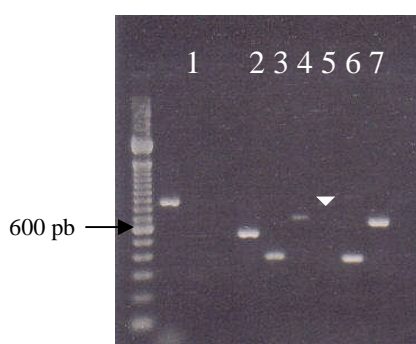


Figura 4.1: Electroforesis en gel de agarosa de seis colonias infectadas con la biblioteca de VH. En donde el carril 1 representa el control de PCR. Los carriles 2-7 representan el ADN de fagos de la biblioteca de VH. La cabeza de flecha (▼) del carril 4 corresponde a la clona con el inserto VH del tamaño esperado.

#### 4.4 Selección de los Fragmentos VH anti $\beta$ -amiloide por Bioselección

La biblioteca de VH fue utilizada para seleccionar clonas específicas para el  $\beta$ A42 inmovilizado en una fase sólida. En la tabla 4.3 se muestra los títulos de los eluidos obtenidos en 2 rondas de bioselección. Los datos de entrada corresponden a la cantidad de fagos adicionados a cada pozo de la placa. Los datos de salida representan a los fagos que reaccionaron con el  $\beta$ A42 en la placa y que fueron eluidos.

Tabla 4.3: Títulos de entradas y salidas de las dos rondas de bioselección.

Ronda	Entrada (ufc/ml)	Salida (ufc/ml)
1a	$1 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^5$
2a	$4 \times 10^{12}$	$6 \times 10^6$

#### 4.5 Selección de las Clonas que Tienen VH del Tamaño Esperado

Para cada ronda de bioselección se evaluó la cantidad de fagos que expresaron el fragmento VH del tamaño esperado. Para ello se infectaron bacterias TG1 con el eluido de cada ronda y se pusieron a crecer en placas con agar. De las colonias que se obtuvieron se extrajo el ADN y se amplificó por PCR. Para la primera ronda se analizaron 40 colonias, de las cuales 12 tenían el tamaño del fragmento de DNA esperado, es decir el 30 % (figura 4.2)

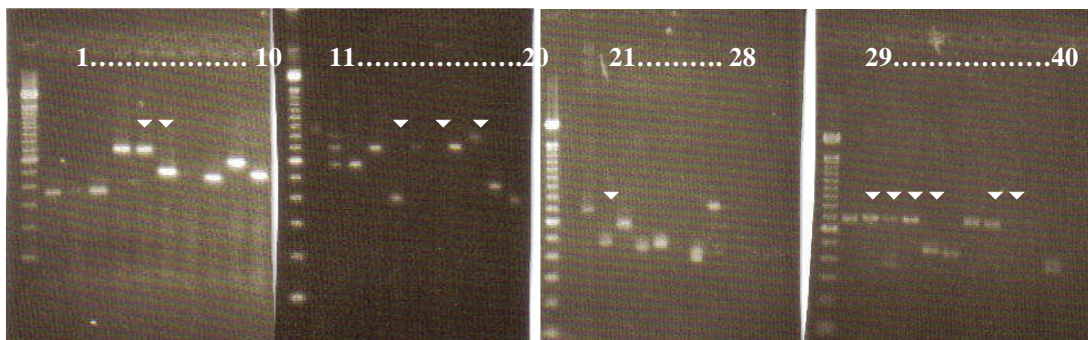


Figura 4.2. Productos de PCR amplificados de las clonas obtenidas de la primera ronda del biopanning. Los carriles del 1-40 representan a los productos de PCR amplificados del ADN de clonas de la primera ronda de bioselección. La cabeza de flecha (▼) indica las clonas que tienen el tamaño del inserto esperado. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para la segunda ronda se analizaron 20 colonias, de las cuales 15 tuvieron el tamaño de fragmento de DNA esperado, es decir el 75 % (figura 4.3).

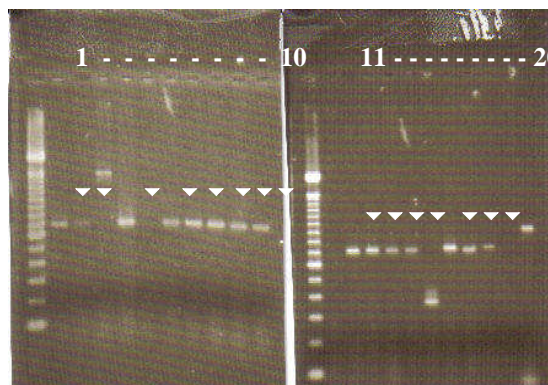
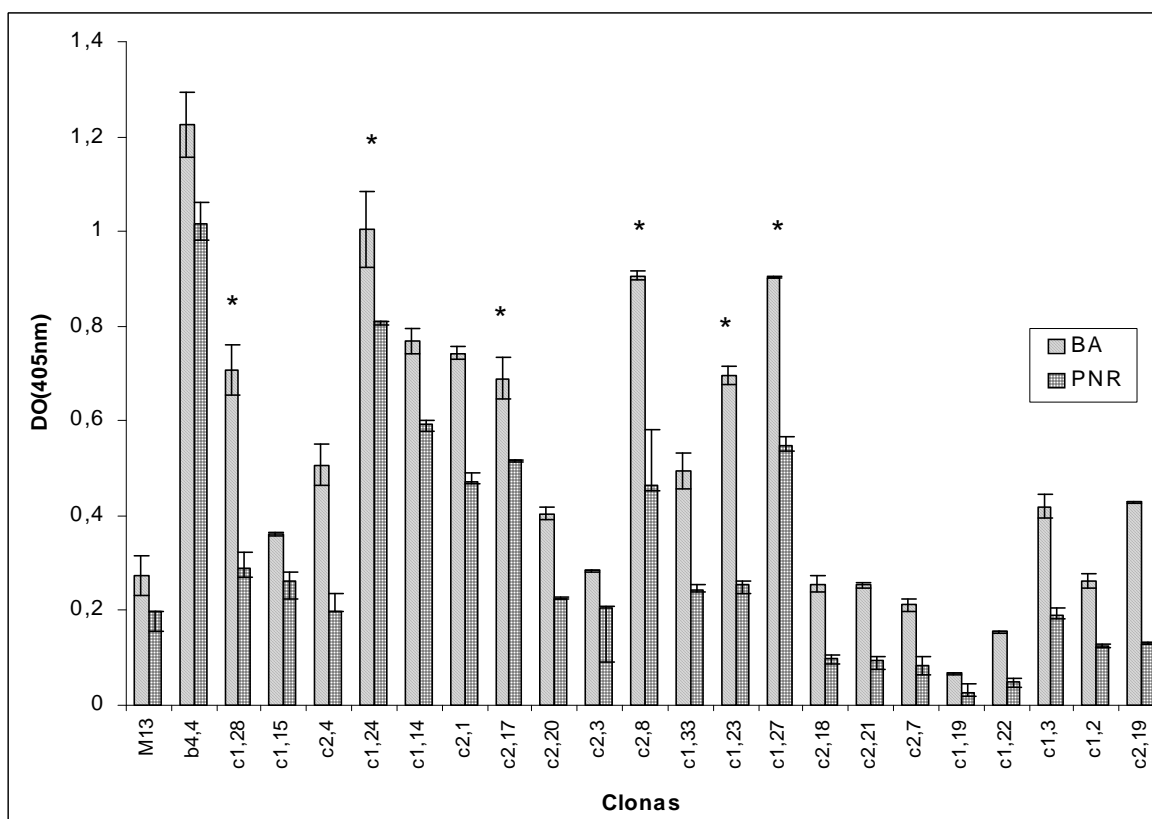


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa. Los carriles del 1-20 representan los productos de PCR al ADN de las clonas del de la segunda ronda de bioselección. La cabeza de flecha (▼) indica las clonas que tienen el tamaño del inserto esperado.

#### 4.6 Evaluación de las clonas que contienen el VH del tamaño esperado

Las clonas que tuvieron el tamaño esperado fueron evaluadas por ELISA. Las clonas consideradas como positivas fueron aquellas que presentaron una DO mayor a la DO del control negativo M13, siguiendo este criterio las clonas positivas en el ensayo de ELISA fueron: c1.28, c2.4, c2.1, c2.8, c1.33, c1.23, c1.27, c1.3 y c2.9 (gráficas 4.1 y 4.2).

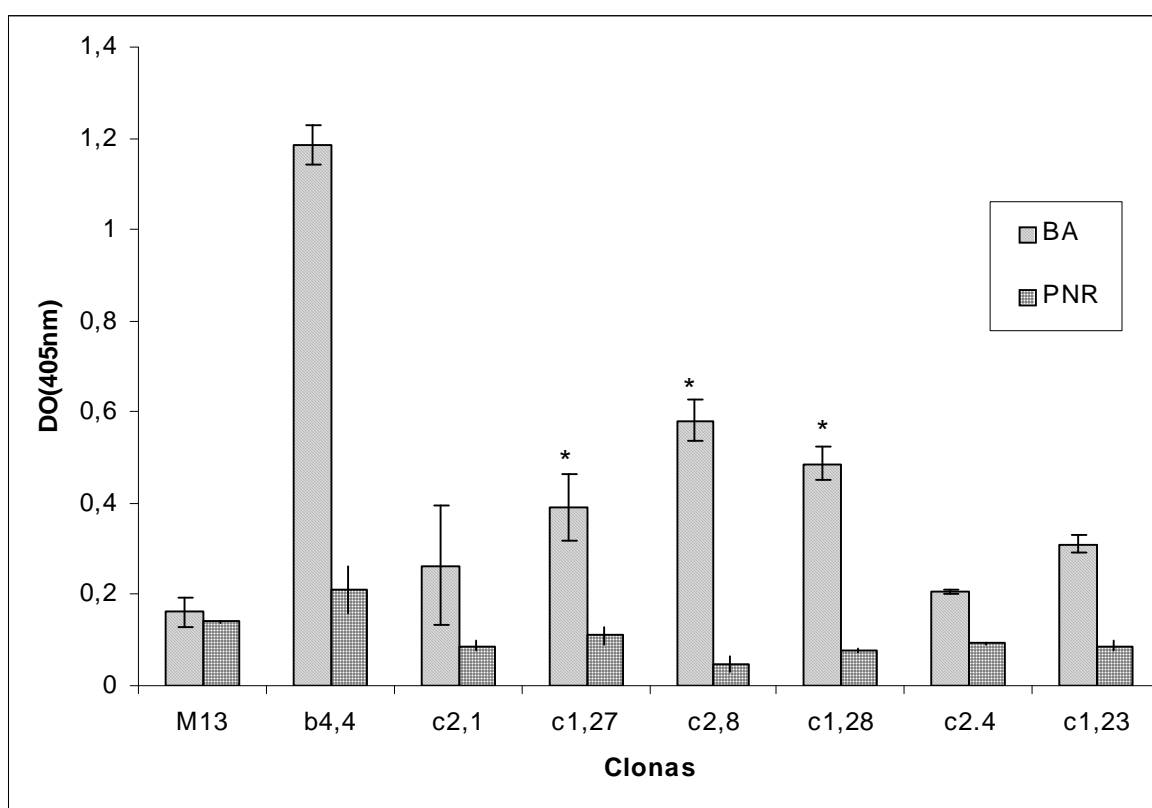


Gráfica 4.1. Análisis mediante ELISA del reconocimiento del  $\beta$ A42 por las clonas. El  $\beta$ A fue fijado a una placa y posteriormente se incubó con las clonas que tuvieron el tamaño del inserto esperado. Como control negativo se utilizó el fago M13 y como control positivo b4.4. Las barras con diagonales representan a los pozos sensibilizados con el  $\beta$ A. Las barras con cuadros representan a los pozos sensibilizados con un péptido no relacionado (PNR). El análisis fue hecho por duplicado con experimentos independientes y con amplificadores diferentes. Las diferencias de M13 y b4.4 entre las 6 clonas: c1.28, c1.24, c2.1, c2.8, c1.23 y c1.27 fueron significativas. Para discernir entre las clonas fue necesario establecer dos umbrales estadísticos y que involucran al PNR y a M13.

#### 4.6.1 Confirmación de las clonas positivas en ELISA

Se confirmó que las clonas fueran específicas al  $\beta$ A después de haber sido amplificadas en varias ocasiones. Se evaluaron por ELISA como se describió anteriormente. En este caso se utilizaron amplificados nuevos.

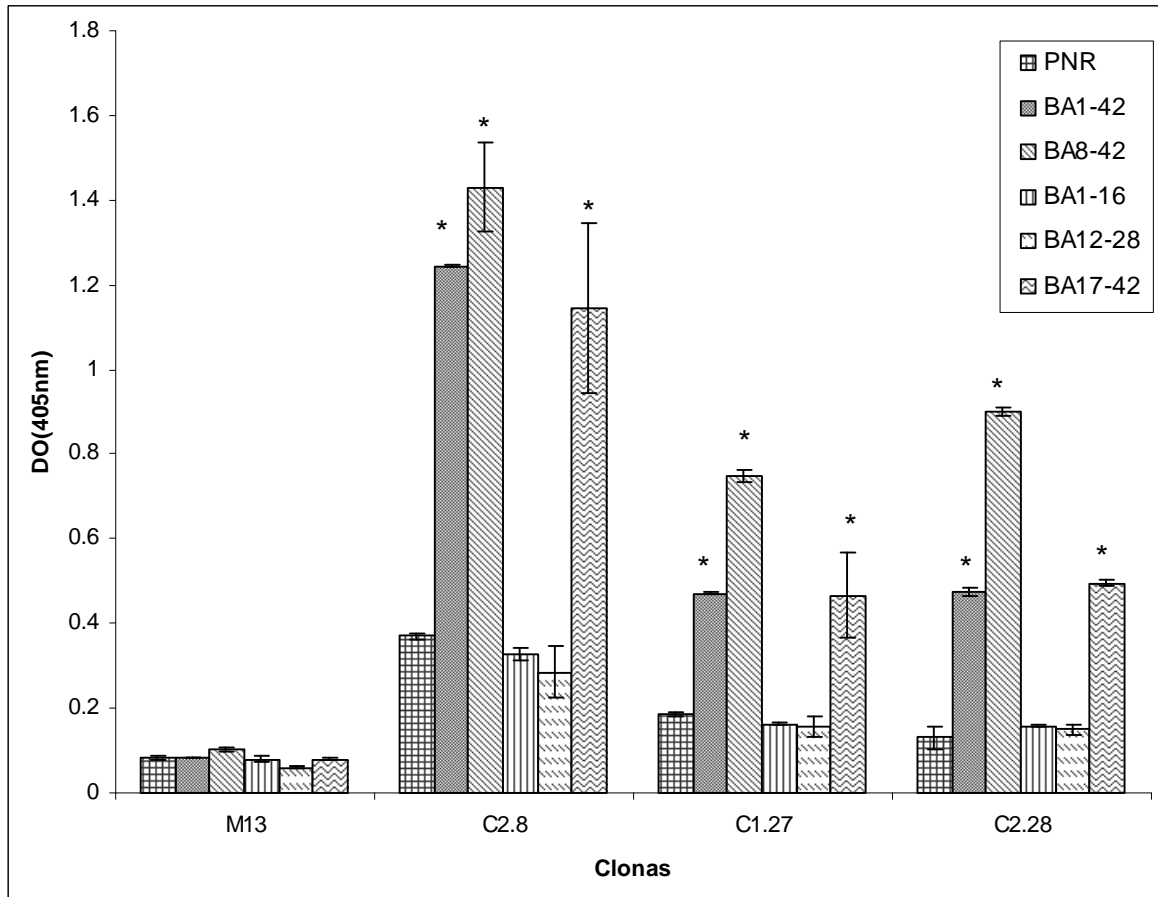
De acuerdo con la grafica 4.2 las clonas que se mantuvieron positivas y que conservaron el inserto con posteriores amplificaciones fueron las clonas c2.8, c1.28 y c1.27.



Gráfica 4.2. Evaluación de las clonas positivas mediante ELISA. Control negativo M13. Control positivo b4.4. Las barras diagonales representan a los pozos sensibilizados con el  $\beta$ A. Las barras con cuadros representan a los pozos sensibilizados con un péptido no relacionado (PNR). El análisis fue hecho por duplicado con experimentos independientes y con amplificados diferentes. Las diferencias de M13 y b4.4 entre las 3 clonas: c1.28, c2.8 y c1.27 fueron significativas. Para discernir entre clonas fue necesario establecer dos umbrales estadísticos que involucran al PNR y al fago M13. Las clonas consideradas como positivas fueron aquellas cuya diferencia de reconocimiento entre el PNR y BA y entre M13 y  $\beta$ A fueron mayores a los umbrales establecidos.

#### 4.7 Mapeo de las clonas positivas usando fragmentos del péptido $\beta$ A1-42

Para determinar que región del  $\beta$ A es reconocida por las clonas seleccionadas, se fijaron a una placa  $\beta$ A de diferentes tamaños. Los péptidos utilizados fueron:  $\beta$ A1-42,  $\beta$ A8-42,  $\beta$ A17-42,  $\beta$ A1-6 y  $\beta$ A12-28. Se encontró que las clonas están dirigidas al extremo carboxilo, grafica 4.3.



Gráfica 4.3. Mapeo de las clonas positivas usando péptidos truncados del  $\beta$ A. Control negativo M13. El análisis fue hecho por duplicado con experimentos independientes y con amplificadores diferentes. \*Diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) comparadas con los fragmentos 1-16, 12-28 del  $\beta$ A y con el PNR; de las clonas c1.27 ( $F=32,728$ ), c1.28 ( $F(35,772)$ ) y c2.8 ( $25,280$ ). ANOVA de una vía y la prueba post hoc Tukey.

#### 4.8 Secuenciación de las clonas positivas

La secuencia de nucleótidos de los VH de las clonas positivas fueron analizadas con los programas IMGT/V-Quest y ClustalX. En la tabla 4.4 se muestran las secuencias de los HCDR3 y las líneas germinales de las regiones V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> de las clonas secuenciadas.

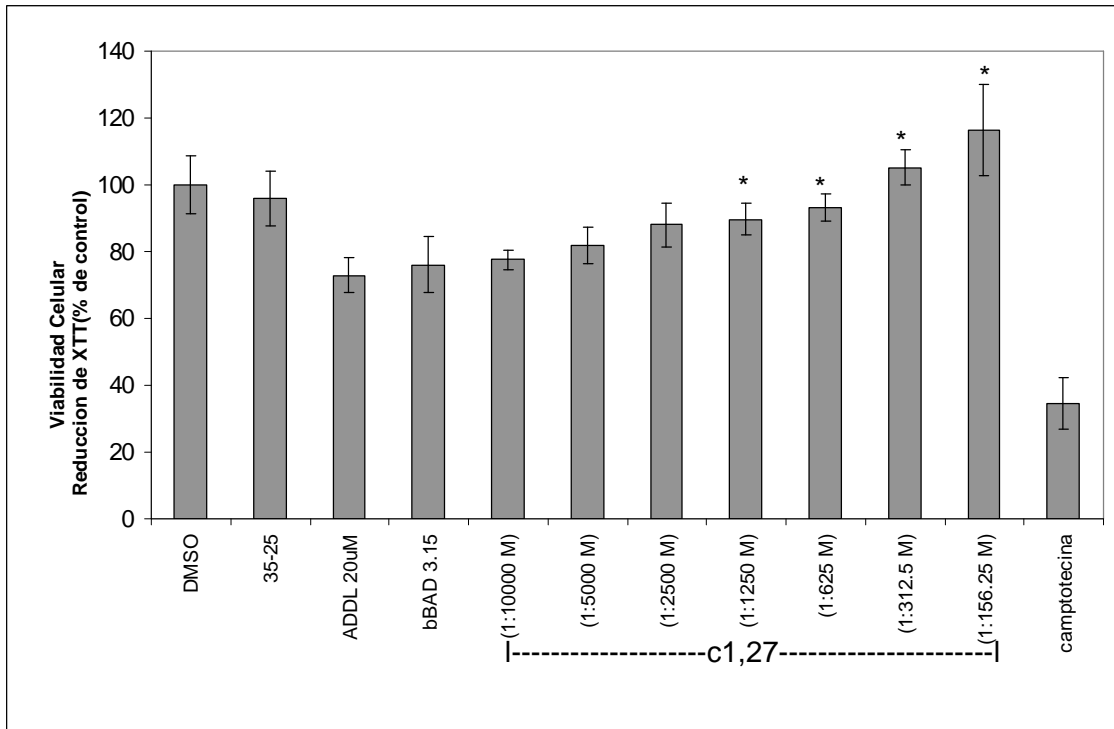
Tabla 4.4 Secuencias de los HCDR3 y las líneas germinales de las regiones V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> de los VH provenientes de una biblioteca de VH, inmune (βA1-42) y murina.

Clona	Línea germinal V <sub>H</sub>	Línea germinal D <sub>H</sub>	Línea germinal J <sub>H</sub>	HCDR3
c2.8	IGHV3-1 02	IGHD2-14 01	IGHJ1 02	GGGGACGGGGCT
c1.27	IGHV3-6 02	IGHD3-1 01	IGHJ4*01	GATTATAGGTACGACGGGATGGACTAC
c1.28	IGHV3-2 02	IGHD3-2 01	IGHJ2 01	CGGGGTAACCTTGACTAC

#### 4.9 Neuroprotección de las clonas c2.8, c1.27y c1.28

A continuación se presentan los resultados de tres experimentos independientes, en los cuales las células SH-SY5Y fueron incubadas con ADDLs (20μM) y con las 3 clonas: c 1.27, c1.28 y c2.8 de forma independiente. Esto se llevó a cabo a diferentes concentraciones de fagos (a una relación molar de fago:ADDLs 1:10 000, 1:5000 M, 1:2500 M, 1:1250 M, 1:625 M, 1:312.5 M y 1:156.25 M). Las tres clonas presentaron un efecto neuroprotector dosis dependiente observándose que para neutralizar ADDLs (20μM), que corresponden a 10000 moléculas se necesitan como mínimo 8 fagos correspondiente a c1.27 y c2.8 (1:1250) (gráficas 4.4. y 4.5) y 16 fagos de c1.28 (1:625) (gráfica 4.6).





Gráfica 4.4. Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y determinado por la reducción del XTT con respecto a las células control (DMSO). El DMSO es el solvente presente en todos los tratamientos (células control). El control negativo es el péptido A $\beta_{35-25}$  y como control positivo es la camptotecina. Los experimentos se hicieron por duplicado\* Diferencias entre el tratamiento con ADDLs (20µM) y con las diferentes relaciones de (c1.27:ADDLs) (P<0,05;F=13,633). ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnet.

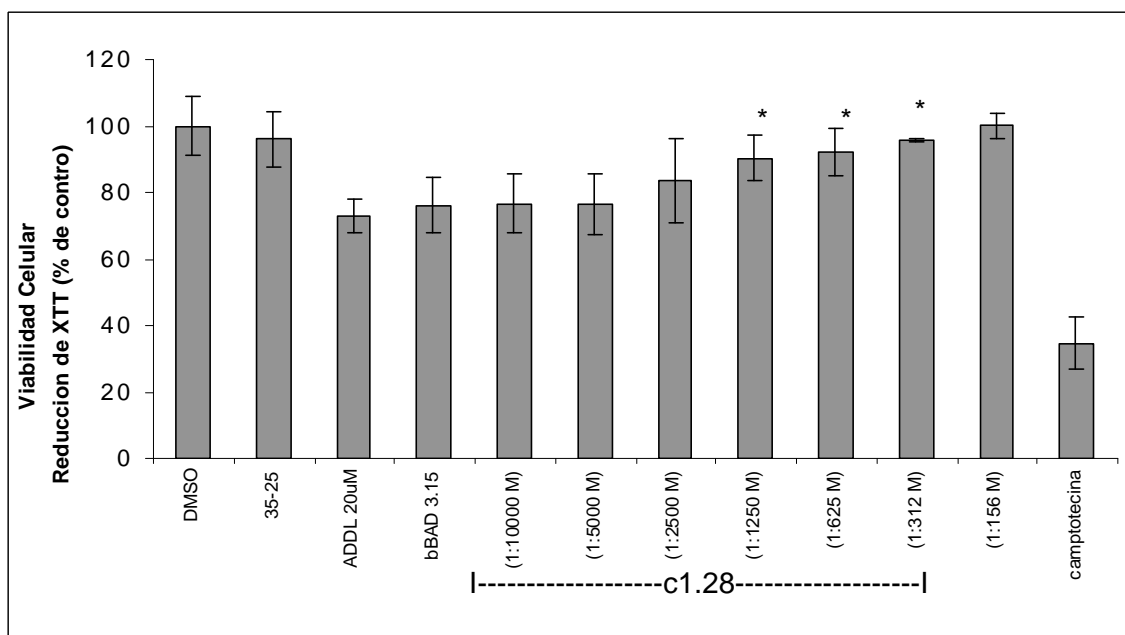
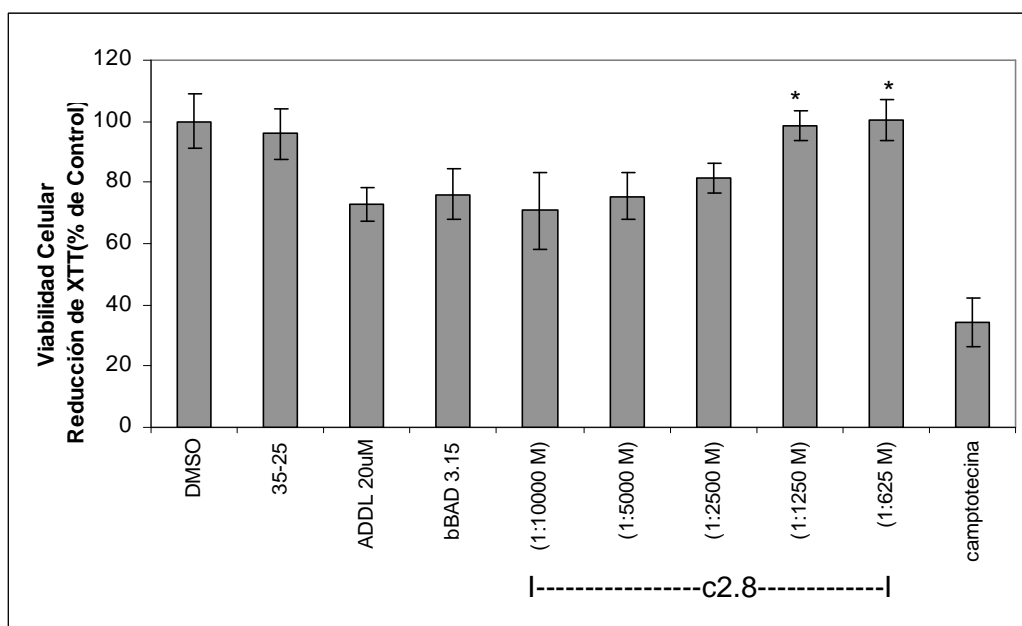


Figura 4.5. Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y con respecto a las células control (DMSO), determinado por la reducción del XTT. El DMSO es el solvente presente en todos los tratamientos (células control). El control negativo es el péptido  $A\beta_{35-25}$  y como control positivo es la camptotecina. Los experimentos se hicieron por duplicado\*. Diferencias entre el tratamiento con ADDLs ( $20\mu\text{M}$ ) y con las diferentes relaciones de (c1.28:ADDLs) ( $P < 0,05$ ;  $F = 5,348$ ). ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett.



Gráfica 4.6. Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y con respecto a las células control (DMSO), determinado por la reducción del XTT. El DMSO es el solvente presente en todos los tratamientos (células control). El control negativo es el péptido  $A\beta_{35-25}$  y como control positivo es la camptotecina. Los experimentos se hicieron por duplicado\* Diferencias entre el tratamiento con ADDLs ( $20\mu\text{M}$ ) y con las diferentes relaciones de (c2.8:ADDLs) ( $P < 0,05$ ;  $F = 8,983$ ). ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnet.

## 5 Discusión

Los dominios VH han sido empleados para el estudio de la etiología de varias enfermedades y estos estudios sustentan las propiedades de reconocimiento al antígeno que tienen estos dominios (Cai et al., 1995, 1996, 1997; Fang et al., 1995; Reitner et al., 1999; Bond et al., 2003; Saerns 2005). Cain y colaboradores (1997) compararon las propiedades de bibliotecas de VH y de ScFv como una fuente de clonas específicas de melanomas y no observaron variación en las propiedades de reconocimiento de antígeno. Por otra parte se sabe que los camélidos producen anticuerpos funcionales, carentes de la región VL (Genst et al., 2006). El uso de estos dominios tiene varias ventajas y aplicaciones médicas y biotecnológicas entre las que destacan su tamaño, su alta afinidad y especificidad hacia el antígeno debido a que presentan los tres CDR. Los dominios VH tienen mejor estabilidad química y térmica que otros fragmentos de anticuerpos (Brekke al., 2003).

La biblioteca que se construyó en este proyecto tiene 2 características que son: es una biblioteca inmune ( $\beta$ A) y los fagos despliegan los VH en la proteína p8 de la superficie del fago. Es la primera biblioteca de VH utilizada para la identificación y caracterización de moléculas inmunoterapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Con la biblioteca construida en este trabajo se encontraron tres clonas: c 2.8, c1.27 y c 1.28, estas clonas van dirigidas a la región carboxilo del  $\beta$ A. Finalmente se encontró que estas clonas protegen de la neurotoxicidad provocada por los ADDL's a células de neuroblastoma humanas, SH-SY5Y. Estos resultados son importantes para el diseño de vacunas para la enfermedad de Alzheimer debido a que abarcan aplicaciones potenciales que se han estudiado en los últimos años. Una de estas aplicaciones es la inmunización pasiva con anticuerpos o fragmentos de estos.

La inmunización pasiva podría ser de utilidad en personas de edad avanzada, cuyo sistema inmune al igual que otros se ve deteriorado por la edad. (Schenk, 2002). Bard y colaboradores administraron periféricamente anticuerpos anti-  $\beta$ A a ratones transgénicos PDAPP y notaron que estos anticuerpos fueron capaces de reducir los depósitos amiloideos. Estos anticuerpos pudieron entrar al sistema nervioso central, unirse a las placas e inducir la eliminación del  $\beta$ A ya

existente (Bard et al., 2000). Sin embargo se ha demostrado que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-  $\beta$ A puede provocar microhemorragias o meningoencefalitis autoinmune aséptica en ratones (Pfeifer et al., 2002; Lee et al., 2005). Cuando se observaron cerebros de ratones previamente inmunizados con anticuerpos anti-  $\beta$ A encontraron que, estos anticuerpos activaron la microglia para eliminar las placas a través de los receptores Fc, por fagocitosis. En este estudio se observó también que los anticuerpos carentes de la región Fc no activan a la microglia y que en ausencia de proliferación de células T los anticuerpos son suficientes para disminuir la deposición del  $\beta$ A en ratones PDAPP (Bard et al., 2000). De esta manera en la EA el uso de fragmentos de anticuerpos para inmunoterapia presenta otra ventaja adicional, que es la carencia del dominio Fc del anticuerpo. La función del dominio Fc es la activación de microglia y células fagocíticas que pueden producir reacciones adversas al administrarse o dirigirse al sistema nervioso central. En la EA los scFv han sido evaluados encontrando que presentan las mismas propiedades anti-agregantes y/o desagregantes que los anticuerpos completos (Shernk et al., 1999; Brazill et al., 1999; Pritman et al., 2003).

Las clonas encontradas en este trabajo reconocen la región carboxilo terminal del  $\beta$ A. Este resultado es importante porque se ha encontrado que los anticuerpos dirigidos al extremo amino terminal del  $\beta$ A ocasionan microhemorragias (Pfeifer et al., 2002 y Racke et al., 2005). Se ha sugerido que los anticuerpos que no son dirigidos a la región amino terminal no interactúan directamente con las placas amiloideas. La interacción de estos anticuerpos podría ser a través de la captura de  $\beta$ A amiloide soluble (DeMattos et al., 2001; Bard et al., 2000). Esta característica es importante porque impiden la formación de placas eliminando al  $\beta$ A soluble que se encuentra en forma de oligómeros. Se ha comprobado recientemente que los oligómeros ocasionan la patología asociada a la EA (Cleary et al., 2005; Kokubo et al., 2005).

La importancia de encontrar agentes terapéuticos que tengan como blanco la región carboxilo terminal del  $\beta$ A presenta varias ventajas. Se sabe que las placas difusas contienen  $\beta$ A truncado y que el procesamiento C-terminal puede ser crítico para el desarrollo de la EA (Teplow et al., 1999). Lo anterior se ha observado con el  $\beta$ A 17-42 (Growing et al., 1994). Pike y col encontraron

una gran tendencia de las especies  $\beta$ A n-42 y  $\beta$ A n-40 a agregarse, también observaron en cultivo de neuronas que las especies n-truncadas especialmente  $\beta$ A 8-42 y  $\beta$ A 17-42 son más citotóxicas que el péptido completo (Pike et al., 1995). Se sabe que el fragmento “no amiloidogénico” o p3 ( $\beta$ A 17-42) es el péptido predominante en las formaciones preamiloideas en pacientes con síndrome de Down (Lalowski et al., 1996).

La capacidad neuroprotectora de las clonas c2.8, c1.27 y c1.28 contra los ADDLs en las células SH-SY5Y tiene relevancia en la inmunoterapia de la EA debido a que actualmente se sabe que el daño cognitivo y la disfunción sináptica es provocada principalmente por ADDLs (Cleary., 2005; Kokubo et al., 2005). Se ha demostrado que los oligómeros causan daño a la memoria tempranamente en modelos murinos de la EA, de esta manera anticuerpos dirigidos a estas especies pueden ayudar a recuperar la funciones sinápticas y revertir las primeras manifestaciones de la EA (Klyubin et al., 2005; Lesne et al., 2006; Oddo et al., 2006). Los anticuerpos que reconocen ADDLs han sido también empleados para localizar ultraestructuralmente a estas especies (Lambert et al., 2001). Estas clonas también podrían tener aplicación en el diagnóstico de la EA debido a que se ha encontrado que los oligómeros presentes en el líquido cefalorraquídeo pueden ser evaluados como biomarcadores para el diagnóstico de la EA (Klein, 2006).

Los fragmentos VH desplegados en la superficie del fago M13 podrían ser administrados y evaluados en ratones transgénicos de la EA. Se ha demostrado que los scFvs desplegados en fagos filamentosos se une a los depósitos amiloideos en el cerebro de ratones transgénicos vivos después de la administración intranasal (Frenkel y Solomon, 2002). Como estudios posteriores a este trabajo podemos señalar la síntesis de péptido basados en la secuencias de los CDR3 de las clonas y la evaluación de los fragmentos VH solubles, es decir no desplegados en fagos.

## 6 Conclusiones

En este trabajo se construyó la primera biblioteca de VH, murina, inmune ( $\beta$ A) y expresada en la proteína p8 del fago M13 con el objetivo de identificar y caracterizar VH's que se unan al  $\beta$ A. Posteriormente estos fragmentos podrán ser evaluados como moléculas inmunoterapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la EA. Con esta biblioteca se encontraron tres clonas nuevas anti-  $\beta$ A: c2.8, c1.27 y c1.28. Mediante el mapeo de las tres clonas usando fragmentos del péptido  $\beta$ A 1-42 se encontró que están dirigidas al extremo carboxilo del  $\beta$ A. Con la secuencia de ADN de cada clona se encontró que son diferentes entre sí y tienen el inserto VH completo en su genoma. Finalmente en ensayos de neuroprotección se observó que estas clonas protegen a células de neuroblastoma, SH-SY5Y, de los efectos tóxicos de los ADDLs. Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos señalar que:

1. Los fragmentos VH pueden ser utilizados como moléculas inmunoterapéuticas. Este trabajo sustenta las propiedades de reconocimiento al antígeno ( $\beta$ A) que tienen estos dominios.
2. Las tres clonas: c2.8, c1.27 y c1.28 son de gran importancia debido a que reconocen la región C-terminal de  $\beta$ A. La región 17-42 del péptido es considerada la más citotóxica y es una de las formas más predominante de los depósitos difusos.
3. Este trabajo apoya la hipótesis de que los fragmentos de anticuerpos pueden ser utilizados como agentes terapéuticos en la EA mediante la neutralización de los ADDLs

## 7 Bibliografía

Azzazy H. y Highsmith E. 2002. Phage Display Technology: Clinical Applications and Recent Innovations. *Clinical Biochemistry* 35:425-445.

Bard F., Cannon C., Baobour R., Burke R., Games D., Grajeda H., Gido T., Hu K., Huang J., Johnson 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. y Yednock T. 2000. Pheripherally Administtered Antibodies Against Amyloid  $\beta$ -peptide enter the Central Nervous System and Reduce Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Nature Medicine* 6:8;916-919.

Bond C., Marsters J y Sidhu S., 2003. Contributions of CDR3 to VHH Domain Stability and the Design of Monobody Scaffolds for Native Antibody Libraries 332: 643-655.

Bradbury A. y Marks J. 2004. Antibodies from Phage Antibody Libraries. *Journal of Immunological Methods* 290:29-49

Brekke O. y Løset G. 2003. New technologies in therapeutic antibody development. *Current Opinion in Pharmacology* 3:544–550

Butterfield D. 2003. Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-42)-Associated Free Radical-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain: Mechanism and Consequences. *Current Medical Chemistry* 10:817-827

Chauhan N. y Siegel G. 2003. Intracerebroventricular Passive Immunization UIT Anti- A $\beta$  Antibody in Tg2579. *Journal of Neuroscience Research* 74:142-147.

Cai X y Garen A. 1997. Comparison of Fusion Phage Libraries Displaying VH or Single-Chain Fv Antibody Fragments Derived from the Antibody Repertoire of a Vaccinated Melanoma Patient as a Source of Melanoma. Specific Targeting Molecules. *Processes Natural Academic Science* 94:9261-9266.



Citron Martin. 2004. Strategies for Disease Modification in Alzheimer's Disease. Nature Neuroscience 5:677-685.

Cleary J., Walsh D., Hofmeister J., Shankar G., Kuskowski M., Selkoe D. y Ashe K. (2005) Natural Oligomers of the Amyloid- $\beta$  Protein Specifically Disrupt Cognitive Function. Nature Neuroscience 8:1, 79-84.

DeMattos R., Bales K., Cummins D., Dodat J., Paul S. y Holtzman D. Peripheral. 2001. 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. PNAS 98:15; 8850-8855.

DeMattos R., Bales K., Cummins D., Paul S y Holtzman D. 2002. Brain to Plasma Amyloid- $\beta$  Efflux: a Measure of Brain Amyloid Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Science 295:264-267.

Dodart J., Bales K., Gannon K., K., Greene S., DeMattos R., Mathis C., DeLong C., Wu S., Wu X., Holtzman D. y Paul S. 2002. Immunization Reverses Memory Deficits without Reducing Brain A $\beta$  Burden in Alzheimer's Disease Model. Nature Neuroscience 5: 5;452-457.

Dodart J., Bales K. y Paul S. 2003. Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Will Vaccination Work?. TRENDS in Molecular Medicine 9:3; 85-87

Frenkel D., Balass M., Katchalski K., y Solomon B. 1999. High Affinity Binding of Monoclonal Antibodies to the Sequential Epitope EFRH of  $\beta$  Amyloid peptide is Essential for Modulation of Fibrillar Aggregation. Journal of Neuroimmunology 95:136-142.

Frenkel D. y Solomon B. 2001. Towards Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Vaccination. Biologicals 29:243-247.

Frenkel D., Dewachter I., Van Leuven F., y Solomon B. 2003. Reduction of  $\beta$  Amyloid Plaques in Brain of Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine* 21:1060-1065.

Fang Q., Kannapeli C., Man Fu S., Xu S. y Gaskin F. 1995. VH and VL Gene Usage by Anti-  $\beta$ - Amyloid Autoantobodies in Alzheimer's Disease: Detection of Highly Mutated V Regions in both Heavy and Light Chains. *Clinical Immunology and Immunopathology* 79:2;159-157.

Gartner L. y Hiatt J. 2001. *Textbook of Histology*. Segunda edición. Editorial: WB Saunders Company. USA. 183-184.

Gelinas D., DaSilva K., Fenili D., George P. y McLaurin J. Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *PNAS* 101:14657-14662.

Genst E., Saerens D., Muyldermans S. y Conrath K. 2006. Antibody Repertoire Development in Camelids. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 187-198.

Gevorkian G., Manoutcharian K., Almagro J., Govezensky T. y Dominguez V. 1998. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. *Clinical Immunology Immunopathology* 86:30309.

Gevorkian G., Manoutcharian K., Govezensky T., Cano J., Dominguez V., Santamaría H. y Sarralde C. 2000. Identification of Mimotopes of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Journal of Autoimmunity* 15:33-40.

Goldsby R., Kindt T., Osborne B. y Kuby J. 2003. *Immunology*. Quinta edición. Editorial Freeman and Company, USA. 81-141.

Growing E., Roher A., Woods A., Cotter R., Chaney M., Little S. y Ball M. Chemical Characterization of A $\beta$  12-42 Peptide, a Component of Diffuse

Amyloid Deposits of Alzheimer Disease. 1994. The Journal of Biological Chemistry 269, 15:10987-10990.

Hardy J. y Selkoe D. 2002. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. Science 297:353-356.

Hendriks L. y Van C. 1996. The A $\beta$ 40 Amyloid Precursor Gene and Alzheimer's Disease. European Journal of Biochemistry 237:6-15.

Hooper M. 2000. Alzheimer's Disease, Methods and Protocols. Editorial Human Press.

Irie K., Murakami K., Masuda Y., Morimoto A., Ohigashi H., Ohashi R., Takegoshi K., Nagao M., Shimizu T. y Shirasawa T. 2005. Structure of  $\beta$ -Amyloid Fibrils and Its Relevance to Their Neurotoxicity: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99:5, 437-447.

Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P., Jiang Y., Schimidt S., Chishti M., Horne P., Heslin D., French J., Mount H., Nixon R., Mercken M., Bergeron C., Fraser P., George P. y Westaway D. A $\beta$ . 2000. Peptide Immunization Reduces Behavioural Impairment and Plaque in a Model of Alzheimer's Disease. Nature 2000 408:979-982.

Joosten V., Lokman C., Van den Hondel C. y Punt P. 2003. The Production of Antibody Fragments and Antibody Fusion Proteins by Yeast and Filamentous Fungi. Microbial Cell Factories 2:1-15.

Kang C., Jayasinha V. y Martin P. 2003. Identification of Peptides that Specifically bind A beta (1-40) amyloid *in vitro* and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brain Using Phage Display. Neurobiology Disease 14:146-156.

Kangj., Lemaire H., Unterbeck A., Salbaum J., Masters C., Grzeschik H., Multhaup G., Beyreuther K. y Muller B. The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell –Surface Receptor. *Nature* 325:733-736.

Klein William. 2006. Synaptic Targeting by A $\beta$  Oligomeros (ADDLS) as a Basis for Memory Loss in Early Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia* 2: 43-55.

Hass C., Koo E., Mellon A., Hung A. y Selkoe D. 1992. Targetin of B-Cell Surface  $\beta$ -amyloid Precursor Protein to Lysosomes: Alternative Processing into Amyloid – Bearins Fragments. *Nature* 357: 500-503.

Kirschner D., Abraham C. y Selkoe D. 1986. X- Ray Diffraction from Intraneuronal Paired Helical Filaments and Extraneuronal Amyloid Fibers in Alzheimer's Disease Indicates Cross–  $\beta$  Conformation. *Processes. Natl. Academic Science. USA* 83:503-507.

Kokubo H., Kaye R., Glabe C. y Yamaguchi H. 2005. Soluble  $\beta$ A Oligomers ultrastructurally Localize to Cell Processes and Might be Related to Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Research* 1031:222-228.

Lalowski M., Golabek A., Lemeres C., Selkoe D., Wisniewski H., Beavis R., Frangione B y Wisniewski T. 1996. The "Nonamyloidogenic" p3 Fragment (Amyloid  $\beta$ 17-42) Is a Major Constituent of Down's Syndrome Cerebellar Preamyloid. *The Journal Of Biological Chemistry* 271; 52:33623-33631.

Lambert M., Viola K., Chromy B., Chang L., Morgan T., Yu J., Venton D., Krafft G., Finch C., y Klein W. 2001. Vaccination with Soluble  $\beta$ A Oligomeros Generates Toxicity-Neutralizing Antibodies. *Journal of Neurochemistry* 79:595-605.

Lesné S., Koh M., Kotilinek., Kaye R., Glabe C., Yang A y Gallagher M., Ashe K., 2006 A Specific Amyloid –  $\beta$  Protein Assembly in the Brain Impairs Memory. *Nature* 440:352-357.

Levites Yona, Das Pritman, Price Robert, RochetteMarjorie, Kostura Lisa, McGowan Eileen Murphy Michael y Golde Todd. (2006) Anti-  $\beta A_{1-42}$ - and anti-  $\beta A_{1-40}$ -Specific mAbs Attenuate Amyloid Deposition in an Alzheimer Disease Mouse Model.

Liu R., Yuan B., Emadi S., Zameer A., Schlz P., McAllister C., Lyubchenko Y., Gound G. y Sierks M. 2004. Single Chain Variable Fragments against  $\beta$ -Amyloid ( $\beta A$ ) Can Inhibit  $\beta A$  Aggregation and Prevent  $\beta A$ -Induced Neurotoxicity. *Biochemistry* 43:6959-6967.

Lombardo J., Stern E., Mclellan M., Kajdasz S., Hickey G., Bacskai B. Hymán B. 2003. Amyloid-  $\beta$  Antibody Treatment Leads to Rapad Normalization of Plaque-Induced Neuritis Alterations. *The Journal of Neuroscience* 23:34; 10879-10883.

Lue L., KuoY., Roher A.,Brachova L., Shen Y.,Sue L.,Beach T., Kurth J. RydelR. y Rogers J.(1999) Soluble Amiloid Beta Pepetide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology* 155:853-862.

Mandybur T. y Chuirazzi C. 1990. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's Disease. *Neurology* 25:120-126.

Manoutcharian K., Acero G., Munguia M., Becerril B., Massieu L. Govezensky T., Ortiz e., Marks J., Cao C., Ugen K. y Gevorkian G.2004. Human Single Chain Fv Antibodies and a Complementarity Determining Region-Derived Peptide Binding to Amyloid  $\beta$ -1-42.

Marvin D.1998. Filamentous Phage Structure, Infection and Assembly. *Current Opinion Structural Biology* 8:150-158.

Mattson M. 2004. Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature* 430:631-639.

McGeer E. y McGeer P. 2003. Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27: 741-749.

Morgan D., Diamond D., Gottschall PE Ugen K. Dickey C. Hardy J., Duff K., Jantzen P., Wilcock E., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M. y Arendash G. 2000. A $\beta$  Peptide Vaccination Prevents Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer' Disease. *Science* 408:982-985.

Morgan Carlos, Colombres Marcela, Nuñez T Marco y Inestrosa Nibaldo, 2004. Structure and Function of Amyloid in Alzheimer's Disease. *Progress in Neurobiology* 74: 323-349.

Mortimer J., Borenstein A., Gosche K. y Snowdon D. 2005. Very Early Detection of Alzheimer Neuropathology and the Role of Brain Reserve in Modifying Its Clinical Expression. *Journal of Geriatric Psychiatry Neurology* 18:4;218-223.

Oddo S., Caccamo A., Smith I., Green K. y LaFerla F. 2006. A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of A $\beta$ . *Molecular Pathogenesis of Genetic and Inherited Disease*. 168:1;184- 190

Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., Stalder A., Deller T., Staufenbiel M., Mathews P. y Jucker M. 2002. Cerebral Hemorrhage After Passive Anti- A $\beta$  Immunotherapy. *Science* 298:1379.

Pike c., Overman M. y Cotman C. 1995. Amino-Terminal Deletins Enhance Aggregation of  $\beta$ -Amyloid Peptides *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 270;41:23895-23898.

Pritam D., Howard V., Loosbrock N., Dickson D., Murphy P. y Golde T. 2003. Amyloid –  $\beta$  Immunization Effectively Reduces Amyloid Deposition in FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 23:24;832-838.

Racke M., Boone L., Hepburn D., Parsadainian M., Bryan M., Ness D., Pirooz K., Jordan W., Brown D., Hoffman W., Holtzman D., Bales K., Gitter B., May P., Paul S. y DeMattos R. 2005. Exacerbation of Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Microhemorrhage in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice by Immunotherapy Is Dependent on Antibody Recognition of Deposited Forms of Amyloid  $\beta$ . *The Journal of Neuroscience* 25:3;629-636.

Ramassamy c., Averill D., Befert U., Theroux L., Lussier S., Cohn J., Christen Y., Schoofs A., Davignon J., Poirier J. 2000. Oxidative Insults are Associated with Apolipoprotein E genotype in Alzheimer's Disease Brain. *Neurobiology disease* 7:23-37.

Reiter Y., Schuck P., Boyd L., y Plaksin D., 1999. An Antibody Single- Domain Phage Display Library of a Native Heavy Chain Variable Region: Isolation of Functional Single-Domain VH Molecules with a Unique Interface. *Journal of Molecular Biology* 290:685-698.

Saerens D., Pellis M., Loris R., Pardon E., Dumoulin M., Matagne A., Wyns L., Muyldermans S. y Conrath K. 2005. Identification of a Universal VHH Framework to Graft Non-canonical Antigen-binding Loops of Camel Single-domain Antibodies. *Journal of Molecular Biology* 352: 597–607

Schenk D., Baubour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson K. y Khan K. 1999. Immunization with amyloid –  $\beta$  attenuates Alzheimer- Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature* 400:173-177.

Schenk D. 2002. Amyloid-  $\beta$  Immunotherapy for Alzheimer's Disease: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 3: 824-828.

Selkoe Dennis J. 2001. Alzheimer's: Genes, Protein and Therapy. *Physiological Review*:81, 741- 765.

Sidhu S., Weiss G. y Wells J. 2000. High Copy Display of Large Proteins on Phage for Functional Selections. *Journal of Molecular Biology* 296: 2; 487-495.

Sigursson E., Knudsen E., Asuni A., Attas C., Sage D., Quartemain D., Goni F., Frangione B., y Wisniewski T. 2004. An Attenuated Immune Response is Sufficient to Enhance Cognition in an Alzheimer's Disease Mouse Model Immunized with Amyloid-  $\beta$  Derivates. *Neurobiology of disease* 24:28, 6277-6282.

Solomon B., Koppel R., Frenkel D. y Hanan E. 1997. Disaggregation of Alzheimer  $\beta$ - Amyloid by Site Directed mAb. Processes. *Natl. Academic Science USA* 94: 4109-4112.

Smith G. 1985. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* 228:1315-1317.

Spires T. y Hyman T. 2005. Transgenic Models of Alzheimer's disease: Learning from Animals. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2:423-437.

Takasugi., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niiuma M., TakahashiY., Thinakaran G. y Iwatsubo T. 2003. The Role of Presenilin Cofactors in  $\gamma$ -secretase complex . *Nature* 422: 438-441.

Teplow D. 1999.Truncating the Amyloid Cascade Hypothesis: the Role of C-Terminal A $\beta$  Peptides in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* 20: 71-73.

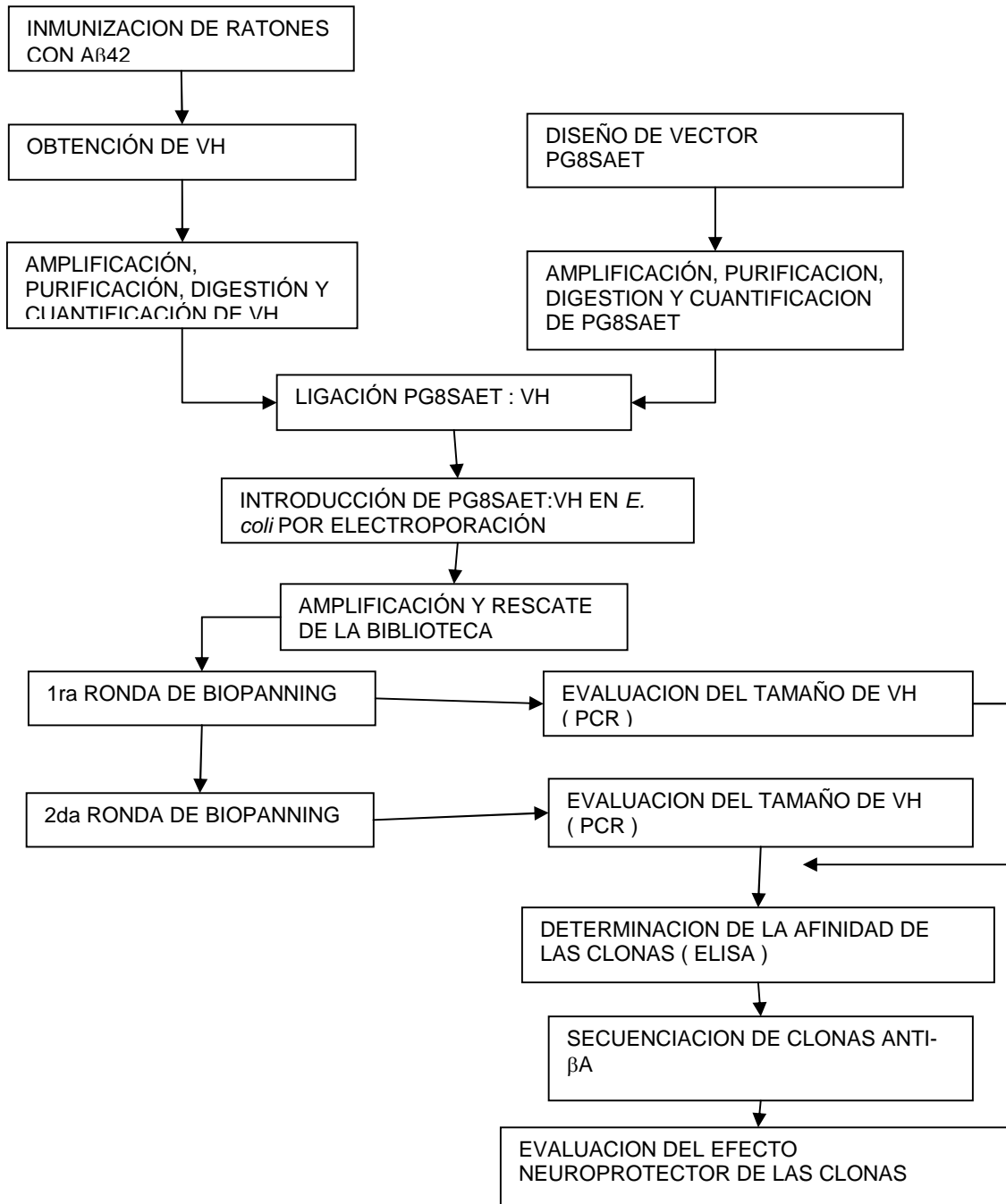
Weiner H., Lemere C., Maron R., Spooner e., Grenfell T., Mori C., Issazadeh S., Hancock W. y Selkoe D. 2000. Nasal Administration of Amyloid -  $\beta$  Peptide Decreases Cerebral Amyloid Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Annual Neurology* 48:567-569.

Weiner H. y Frenkel D. 2006. Immunology and Immunotherapy of Alzheimer's Disease. *Nature Reviews* 6:404-415.



## 8 Anexos

### 8.1 Esquema Experimental



## 8.2 Secuencias de ADN y Proteínas de las Clonas Positivas

### 8.2.1 Clona 2.8

#### DNA

- CAGGTCAAACCTGCAGGAGTAAGGACCTGGCCTGATGAAACCTTCTCAG  
TCACTTTCACCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGT**GGTT**  
**ATAGCTGGCAC**TGGATCCGGCAGTTTCCGGGAAACAAACTGGAATGG  
ATGGGG**TACATGCAGTACAGTGGTACCACTAACTACAACCCATCTCT**  
**CAAAGT**CGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTC  
CTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTG  
CAAGG**GGGGACGGGGCT**TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT  
CTCC

#### Proteína

- QVKLQE **Stop** GPGLMKPSQSLSLTCTVTGYSITS**GY S**  
**WH**WIRQFPGNKLEW**M**GY**MQYSGTTNYP****SLK**SRIS  
ITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAR**GDG**AYW  
GQGTTVTVS
- **CDR1**            **CDR2**            **CDR3**

## 8.2.2 Clona 1.27

### DNA

- GAAATGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGCCTCTG  
TCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGT**GGTTACTACT**  
**GGAAC**TGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGC  
**TACATAAGCTACGACGGTAGCAATAACTACAACCCATCTCTCAAAAAT**  
CGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCTGAAGT  
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGAG**GA**  
**TTATAGGTACGACGGGATGGACTAC**TGTGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCC

### Proteína

- E**M**QQSGPGLVKPSQPLSLTCSVTGYSIT**S****GYYWNW**  
IRQFPGNKLEW**M****G****YISYDGSNNYNPSLKN**RISITRD  
TSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAR**DYRYDGM**DYC  
GQGTTVTVS
- **CDR1**            **CDR2**            **CDR3**

### 8.2.3 Clona 1.28

#### DNA

- CAAGTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTG  
TCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGT**GATTATGCCT**  
**GGAAC**TGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGC  
**TACATAAGCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAGT**  
CGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT  
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAC**C**  
**GGGGTAACTACCTTGACTACT**TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC  
TCC

#### Proteína

- QVQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD**DYAWN**W  
IRQFPGNKLEW**M**GY**ISYSGSTSYNPSLKS**RISITRD  
TSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAR**RGNLYLDY**WGQ  
GTTVTVS
- **CDR1**            **CDR2**            **CDR3**