



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-  
PEPTIDO BETA-AMILOIDE 1-42 CON EL FIN DE  
DESARROLLAR INMUNOTERAPEUTICOS PARA LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIOLOGO**

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

**GUILLERMO CORONAS SAMANO**



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

**2010**



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1.- Datos del alumno

Coronas  
Sámano  
Guillermo  
55 34 97 55  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
405053319

### 2.- Datos del tutor

Dra.  
Gohar  
Gevorgyan  
Markosian

### 3.- Datos del sinodal 1

Dr.  
Edmundo De Ibis  
Lamoyi  
Velázquez

### 4.- Datos del sinodal 2

Dra.  
María Celina  
Anaya  
Huertas

### 5.- Datos del sinodal 3

Dra.  
Rocío  
Salceda  
Sacanelles

### 6.- Datos del sinodal 4

Dra.  
Gabriela  
González  
Agüero

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSITUTUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional Autónoma de México por el glorioso espíritu de superación que me ha inculcado, por la grandeza de su enseñanza académica y por los valores que me ha dado como ser un mejor estudiante y un mejor ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian por su total apoyo académico, por confiar en mí para la realización de este proyecto, gracias a usted he aprendido a ser un mejor estudiante y mejor investigador.

Al Biol. Exp. Asariel Gonzalo Acero Galindo por su excelente enseñanza en el trabajo de laboratorio, por su apoyo incondicional y su entrega académica en todo momento.

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por su plena disposición en la corrección de este trabajo y por su apoyo en el transcurso de mi carrera académica.

A la Dra. María Celina Anaya Huertas por sus comentarios en el trabajo escrito, por mi formación académica y por su apoyo incondicional.

Al Dr. Edmundo De Ibis Lamoyi Velázquez por sus excelentes observaciones y comentarios en la corrección del trabajo escrito.

Al Dr. Karen Manoutcharian por confiar en mí desde el primer día que llegué a entrevistarme y por brindarme la oportunidad de elegir una línea de investigación.

A la M. en C. María Elena Munguía por su enseñanza en la secuenciación de este trabajo y su total disposición académica.

Al Dr. Vitally Vasilevko por colaboración a mi proyecto de investigación y a la Universidad de Irvine en California por la donación del suero para este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio por su excelente trabajo en equipo y por su enseñanza adquirida día con día: Dra. Angélica Pablo, Biol. Roxana Pérez, Q.B.C. Vanesa Ibarra Bracamontes Biol. Luis Fernando Hernández Zimbrón, Sr. Martín Estrada Mancilla.

## DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo a mis padres que son el pilar de mi vida, sin ustedes no podría realizar mis sueños, y este es sólo la consolidación de un reto más de los muchos que me he propuesto gracias a su apoyo incondicional. A mi mamá Choclis por estar conmigo en todo momento, gracias a ti soy un mejor ser humano y buen estudiante. A mi papá el Vikingo Mayor por tu apoyo incondicional y por tu ejemplo de astucia y perseverancia. A Benji por alegrarnos la vida en todo momento. A ustedes los amo mucho.

A mi Familia Sámano-Jiménez: tíos: Lala y Javier, primas: Auri, Lili y Carmita.

A mi familia Coronas-Moreno: tíos: Tere y Junior, primos: Cinthya, Suzel, Michelle y mi brother Memo.

A mi familia Coronas-Kababie: tíos: Reyna y Marcos, primos: Alicia, Sharon, y mi brother Moy.

A mi Familia Zozaya: tías: Eva y Lili, primas: Stephanie y Evita.

A mis futuros sobrinos.

A mi abuela Bitá y a mi tía Eva.

Y como mención especial a los que hoy día no están conmigo pero que siempre están dentro de mi corazón, les dedico mi trabajo: Mi abuela Profa. Aurea María Velázquez Flores †, mi abuelo Dr. Guillermo Coronas Gutiérrez †, mi tía Biol. Ernestina Coronas Gutiérrez †, y a mi abuela Angelita †.

Finalmente dedico este trabajo a todos aquellos que tienen sed de conocimiento y de interés en este hermoso, magnífico, misterioso y controvertido mundo de la ciencia.

## PENSAMIENTOS

*“Viața este un drum întortocheat spre moarte”*

Guillermo Coronas Sámano

En el transcurso de mi carrera no sólo adquirí un vasto bagaje científico, sino también aprendí a valorar la vida y aprender de ella día a día. La Biología ha estado presente en mí desde la infancia, la investigación científica ha sido parte cotidiana de mi existir, por ello estoy muy orgulloso de haberla estudiado, porque estoy convencido que nuestro país necesita del trabajo cotidiano de personas comprometidas con la investigación, para buscar soluciones a los acontecimientos que nos aquejan a diario como las enfermedades, la contaminación y la pobreza.

Lo que aprendí en el estudio de la Enfermedad de Alzheimer, es que un paciente con esta patología muere en vida, porque terriblemente se olvida de los acontecimientos más importantes de su existencia, aquellas personas que fueron su fortaleza y de los recuerdos que dejaron, se esfumarán cruelmente con el paso del inevitable tiempo. El miedo de su entorno y de las personas a las que no volverá a reconocer, es un sentimiento inquietante que siente en cada momento, olvidar el motivo de su existencia, es sin duda un acontecimiento muy triste que además afecta a los familiares del enfermo.

Por esto, pienso que es importante la participación de cada uno de nosotros, no importando el área profesional en que nos desempeñemos, a cuidar nuestra salud, a mejorar y preservar nuestro medio ambiente, y también a valorar cada uno de nuestros días, porque la vida es única y es extremadamente maravillosa.

Por mi raza hablará el espíritu.

## ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	i
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFOQUE HISTÓRICO	1
1.2. GENERALIDADES	1
1.3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	4
1.3.1. ALTERACIONES MACROSCÓPICAS	7
1.3.2. ALTERACIONES MICROSCÓPICAS	8
1.4. HIPÓTESIS DE CASCADA AMILOIDE	9
1.5. PROCESAMIENTO DE APP Y GENERACIÓN DE A $\beta$	11
1.5.1. VÍA NO AMILOIDOGÉNICA	11
1.5.2. VÍA AMILOIDOGÉNICA	12
1.6. MUTACIONES DE LA APP	12
1.7. AGREGADOS AMILOIDES	13
1.8. ESTADOS DE ENSAMBLAJES DE A $\beta$	14
1.9. TRATAMIENTOS	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GENERAL	20

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. MATERIALES	25
4.2. ESQUEMA METODOLÓGICO	26
4.3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
4.3.1. OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-A $\beta_{1-42}$	23
4.3.2. REACTIVIDAD DEL SUERO DE CONEJO ANTI-A $\beta_{1-42}$ CONTRA DIFERENTES FRAGMENTOS DE A $\beta$	23
4.3.3. BIOSELECCIÓN ( <i>BIOPANNING</i> ) Y EVALUACIÓN DE LOS FAGOS	24
4.3.4. AMPLIFICACIÓN	24
4.3.5. TITULACIÓN DEL ELUÍDO Y AMPLIFICADO	25
4.3.6. PURIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES	26
4.3.7. PURIFICACIÓN DE FAGOS POR DOBLE PRECIPITACIÓN CON PEG/NaCl	27
4.3.8. OBTENCIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA	27
4.3.9. SECUENCIA DE LAS CLONAS INDIVIDUALES	28
4.3.10. EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA	32
5. RESULTADOS	31

5.1. EVALUACIÓN DEL SUERO CONTRA DIFERENTES FRAGMENTOS DE A $\beta$	31
5.2. BIOSELECCIÓN	32
5.3. TÍTULO DE CLONAS ANTI-A $\beta_{1-42}$	33
5.4. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES	33
5.5. SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS ANTI-A $\beta_{1-42}$	35
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIONES	40
8. PERSPECTIVAS	41

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Tipos de demencias y sus características	2
TABLA 2.	Criterios para la identificación de EA NINCDS-ADRDA	6
TABLA 3.	Alteraciones celulares y sus características	9
TABLA 4.	Títulos de los eluidos en cada ronda de bioselección	32
TABLA 5.	Título de las 21 clonas individuales	33
TABLA 6.	Secuencia de las 15 clonas seleccionadas	35
TABLA 7.	Secuencia, frecuencia y reactividad de las 15 clonas seleccionadas	36

### ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Alteraciones macroscópicas en la EA	7
FIGURA 2.	Hipótesis de la cascada amiloide	10
FIGURA 3.	Procesamiento de APP y generación de A $\beta$	12
FIGURA 4.	Placas seniles	14
FIGURA 5.	Diferentes conformaciones de A $\beta$	15
FIGURA 6.	Evaluación del suero de conejo anti-A $\beta$ 1-42	31
FIGURA 7.	Reactividad de clonas anti-A $\beta$	37
FIGURA 8.	Reactividad de clonas anti-A $\beta$	37
FIGURA 9.	Reactividad y secuencia de clonas	37
FIGURA 10.	Esquema del bacteriófago M13	48

## ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	2, 2-azino-di-(3-etilbenziazolano-6-ácido sulfónico)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APP/Tg</b>	APP transgénico
<b><math>\alpha^{35}\text{S}</math></b>	Azufre radioactivo
<b>A<math>\beta</math></b>	Beta Amiloide
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumine)
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assy)
<b>HRP</b>	Enzima peroxidasa de rábano (Horse Radish Peroxidase)
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina Tipo G
<b>IPTG</b>	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>NFT's</b>	Marañas Neurofibrilares (Neuro Fibrilar Tangles)
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline)
<b>PEG</b>	Polietilenglicol

<b>pfu</b>	Unidades formadoras de placas (Plaque Forming Units)
<b>APP</b>	Proteína Precursora Amiloide (Amyloid Precursor Protein)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SP</b>	Placas Seniles (Senile Plaques)
<b>TBE</b>	Tris Borato EDTA
<b>TBS</b>	Tris Buffer Salino
<b>TRIS</b>	Tris [hidroximetil] aminometano
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-2-D-Galactopiranosido

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central que se caracteriza por deficiencias progresivas en la memoria y conducta, siendo la edad el principal factor para su desarrollo, por lo que la padecen en mayor frecuencia, los adultos mayores de 65 años.

Respecto a las características histopatológicas de la EA se encuentran los agregados neuronales del péptido Beta Amiloide ( $A\beta$ ), rodeado por neuritas distróficas y células de la microglía que en conjunto forman las placas seniles y también la presencia de estructuras intraneuronales conocidas como marañas neurofibrilares (NFT's) que se originan por la fosforilación anormal de la proteína TAU, la cual se encuentra asociada a los microtúbulos.

La formación del péptido  $A\beta$  proviene del procesamiento de una glicoproteína de membrana tipo I, llamada Proteína Precursora Amiloide por la activación enzimática de  $\beta$  y  $\lambda$ -secretasas.

Debido a que el péptido  $A\beta$  tiene un papel central en la patogénesis de la EA, se ha propuesto la hipótesis de cascada amiloide que describe los eventos que involucran el mal plegamiento del péptido  $A\beta$ , y que culmina con el establecimiento de esta patología.

Por lo anterior se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad, siendo la inmunoterapia, la más estudiada en la última década y que pretende inhibir o reducir la producción del péptido de  $A\beta$ , así como promover su remoción y disminuir así su toxicidad.

La transferencia pasiva de anticuerpos de alta especificidad, dirigidos al fragmento amino terminal del péptido  $A\beta$ , tiene la capacidad de desagregar al péptido  $A\beta$ , sin embargo, se encontraron efectos secundarios en los pacientes administrados provocando inflamación y hemorragias cerebrales.

Un aspecto poco explorado es la búsqueda de anticuerpos dirigidos al fragmento  $A\beta_{1-42}$  utilizando al conejo como modelo animal experimental y su evaluación en la capacidad desagregante.

La ventaja de experimentar con conejo es que produce el péptido A $\beta$  con la misma secuencia que la del humano, a diferencia del modelo murino que presenta en su secuencia diferencias de tres aminoácidos en la región amino terminal con respecto al A $\beta$  humano.

En este trabajo se llevó a cabo la identificación de epítomos del péptido A $\beta$  mediante la técnica de despliegue en fago (Phage Display) utilizando bibliotecas comerciales de péptidos de siete aminoácidos en la proteína pIII del fago filamentoso M13.

Después de tres rondas de bioselección se seleccionaron 21 clonas, las cuales fueron evaluadas por ELISA y posteriormente fueron secuenciadas para comparar su similitud con la secuencia del péptido A $\beta$ . Se demostró que las clonas positivas con el suero A $\beta$ <sub>1-42</sub> tienen la secuencia consenso DAE, indicando que éste es un posible sitio de alta inmunogenicidad en este modelo.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ENFOQUE HISTÓRICO

El primer caso reportado de la Enfermedad de Alzheimer (EA) es de Auguste D., una mujer de 51 años que fue internada en el Hospital de Frankfurt, Alemania en Noviembre de 1901, presentando un cuadro clínico caracterizado por exagerados celos a su marido, un progresivo impedimento cognitivo, alucinaciones, delirios, y un deterioro en el comportamiento social y agresividad que padeció durante 5 años. Después del fallecimiento de Auguste el 8 de Abril de 1906, a la edad de 56 años, el Dr. Alzheimer describió las dos características distintivas en el cerebro, las cuales fueron consideradas como un diagnóstico definitivo de la enfermedad: presencia de placas amiloideas y marañas neurofibrilares (Wolfe 2002), además de ciertos cambios arterioescleróticos (Ferri *et. al.* 2005).

Fue el 03 de Noviembre de 1906, en la trigésima séptima Conferencia de la Sociedad de Psiquiatras del Sudoeste de Alemania en Tübingen, donde el Dr. Alois Alzheimer dio a conocer, a la comunidad científica, las características clínicas y neuropatológicas de la enfermedad, que posteriormente adoptaría su nombre cuando Emil Kraepelin mencionó por primera vez “Enfermedad de Alzheimer” para referirse a esta patología de tipo senil (Goedert y Spillantini 2006).

### 1.2. GENERALIDADES

La EA está considerada como la principal causa de demencia (ver Tabla 1), y se define como un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores, cuyo origen aún se desconoce. El término demencia deriva del latín “*demens, dementatus*” que significa sin mente. La demencia es definida por la Organización Mundial de la Salud como: un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que hay déficits de múltiples funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo ([www.fundacionalzheimeresp.org](http://www.fundacionalzheimeresp.org)).

Tipos de demencias	Características
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	Tipo más común de demencia, suma el 60% al 80% de los casos. Dificultad para recordar nombres y eventos recientes en la etapa temprana; después se incluyen síntomas que incluyen incapacidad de razonar, desorientación, confusión, cambios conductuales, problemas para hablar, tragar y caminar.
<b>Demencia Vascular</b>	Considerado el segundo más común del tipo de demencias. Comprende un grupo de alteraciones cognoscitivas demenciales a diversos tipos de alteraciones originadas por hemorragias, trombos, infartos, etc., en el cerebro. Se distingue de la EA por el modo de comienzo, características clínicas y la evolución.
<b>Enfermedad de Pick</b>	Es una demencia progresiva de comienzo en la edad media de vida (entre 50-60 años) caracterizada por cambios precoces y lentamente progresivos de carácter y alteraciones de comportamiento, que evolucionan hacia un deterioro de la inteligencia, memoria y lenguaje, acompañado de apatía o de euforia.
<b>Enfermedad de Huntington</b>	Forma parte de una degeneración selectiva de tejido cerebral a nivel de los ganglios basales. Los síntomas pueden surgir en la tercera o cuarta década de vida. Los primeros síntomas suelen ser depresión, ansiedad, paranoias, acompañados con cambios en la personalidad.
<b>Enfermedad de Parkinson</b>	Se caracteriza por una degeneración del sistema dopaminérgico sobre todo por la afectación de la substancia nigra y el locus coeruleus. El inicio puede ser entre los 40 y 70 años. Aparecen dificultades en la concentración y tendencia a la distracción, enlentecimiento del pensamiento.
<b>Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob</b>	Demencia progresiva con una serie de síntomas y signos neurológicos por alteraciones neuropatológicas específicas (encefalopatías espongiiforme subaguda). El inicio tiene lugar en la etapa media o final de la vida. Se presenta una parálisis espástica progresiva de los miembros, acompañada de síntomas extrapiramidales como temblor, rigidez y movimientos coreo-atetoides.
<b>Infección por VIH</b>	Déficits cognoscitivos cuya incidencia se estima en un 7.3% de los casos de Sida en los pacientes entre 20 y 59 años, aumentando hasta el 19% en los mayores de 75 años. Los pacientes se quejan de fallas en la memoria, tiempos de reacción lentos, disforia, desconexión social y apatía, déficits de concentración, entre otras.

**Tabla 1.** Tipos comunes de demencias sus características (www.fundacionalzheimeresp.org; 2008).

Una conciencia notable del impacto social en la EA, ha dado como resultado grandes esfuerzos en la investigación con el fin de determinar su nosología, sin embargo, la causa de esta enfermedad aún falta por ser esclarecida. La EA, por su alta incidencia poblacional, adquiere una importancia relevante, debido a las implicaciones que pueden repercutir en el ámbito social, político y económico, y lo anterior acompañado del fuerte impacto psicológico en los familiares de quien la padece (Girones *et. al.* 2002).

El número de personas que actualmente sufren la EA son aproximadamente 24 millones en todo el mundo, lo cual podría duplicarse a 42 millones en el 2020, y hasta triplicarse a 81

millones en el 2040, asumiendo que no haya cambios en la mortalidad, y de no contar con una estrategia efectiva de prevención o tratamiento curativo. Los siete países que presentaron el número más grande de personas con EA en el 2001 fueron: China (5 millones), Unión Europea (5 millones), USA (2.9 millones), India (1.5 millones), Japón (1.1 millones), Rusia (1.1 millones) e India (1 millón) (Ferri *et. al.* 2005).

En lo que respecta a México, son más de 350,000 personas que son afectadas por la EA, y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes ([www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)). Es preocupante que el 60.1% del total de los enfermos con demencia habitan en países en vías de desarrollo, y podrían aumentar a 64.5% en 2020 y a 71.2% en 2040 (Ferri *et. al.* 2005) Por ello, es muy importante contar con diferentes líneas de investigación que se interesen en determinar la etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

La mayoría de los casos de EA son esporádicos y afecta en gran parte a personas mayores de 65 años, sin embargo, aproximadamente 5% del total de pacientes, presenta un patrón de herencia dominante (Enfermedad de Alzheimer Familiar). Esta última también llamada presenil o temprana comienza antes de los 65 años de edad y se han identificado diferentes genes cuyas mutaciones ocasionan la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) cuya agregación en el cerebro juega un papel importante en esta enfermedad. Los genes que hoy día se sabe que son alterados y que se asocian a formas familiares de inicio precoz son: el gen de la proteína precursora amiloide (APP) localizado en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PS1) localizado en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (PS2) localizado en el cromosoma 1 (Girones *et. al.* 2002; Walsh y Selkoe 2007).

Se ha descrito la susceptibilidad genética ligada a la apolipoproteína E, la cual tiene tres alelos que codifican para tres isoformas diferentes de apolipoproteína E (E2, E3 y E4). Los individuos que producen la isoforma E4 tienen mayor riesgo de padecer la EA (Palop *et. al.* 2006).

Hay reportes, que indican que los factores de riesgo para padecer la EA pueden estar ligados al comportamiento, dieta y otras características de tipo ambiental. Estudios epidemiológicos sugieren que personas con bajos niveles de educación, con un historial de

trauma cerebral, con un consumo alto de calorías, o un estilo de vida sedentaria, tienen el mayor riesgo de presentar la EA (Mattson 2004; Mayeux 2003).

Sin importar cual factor sea el responsable del desarrollo de la enfermedad, sea hereditario o espontáneo, los síntomas que presenta el paciente son los mismos, y por ello se han generado diversos diagnósticos que se basan en distintos criterios.

### **1.3. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD**

Uno de los principales objetivos de los investigadores de la EA durante el último cuarto de siglo ha sido el identificar su etiología y los mecanismos moleculares para ser capaces de diseñar fármacos que inhiban temprana y satisfactoriamente su mecanismo fisiopatológico.

El diagnóstico *in vivo* se caracteriza por una serie de exámenes de laboratorio y de imágenes por resonancia que permiten descartar causas reversibles de demencia, así como tests neuropsicológicos que demuestren la presencia de algún deterioro cognitivo no debido a una depresión. Ejemplos de estos pueden ser el NINCDS-ADRDA por su nombre en inglés *United States National Institute for Communicative Disorders and Stroke* y *The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ver Tabla 2). Existen otro tipo de criterios que son evaluados por el CERAD por su nombre en inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* el cual realiza evaluaciones clínicas, neuropsicológicas, neuropatológicas, de comportamiento y de historia familiar en la EA, y que se diferencia bien entre las personas normales y los pacientes con demencia leve a moderada (Fillenbaum *et. al.* 2008).

Hasta el momento no existen exámenes específicos de laboratorio ni de imágenes que permitan confirmar la EA en vida. Lo que parece más prometedor entre las diversas investigaciones en imágenes, son los estudios de visualización de amiloide *in vivo*. Recientemente se reportó los resultados de visualización de amiloide en pacientes con EA, usando un compuesto llamado compuesto PIB (Pittsburg Compound B), el cual interactúa con el A $\beta$  y, al ser radioactivo, es visible por tomografía de emisión de positrones (PET) (Klunk *et. al.* 2004); en experimentos con ratas se puede visualizar por resonancia

magnética (Higuchi *et. al.* 2005). El uso combinado de mediciones en el líquido cefalorraquídeo de tau y de  $A\beta_{1-42}$ , acompañado de la detección de amiloide con PIB, puede llegar a ser un efectivo examen de diagnóstico para la EA (Behrens y Vergara 2007).

Debido a que otro tipo de enfermedades pueden causar pérdida de memoria, un diagnóstico que es definitivo para determinar la EA, consiste en la examinación postmortem de cerebro, detectando la presencia microscópica de un número dado de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares en cortes de microscopía para establecer definitivamente que la demencia es de tipo Alzheimer. (Mattson 2004).

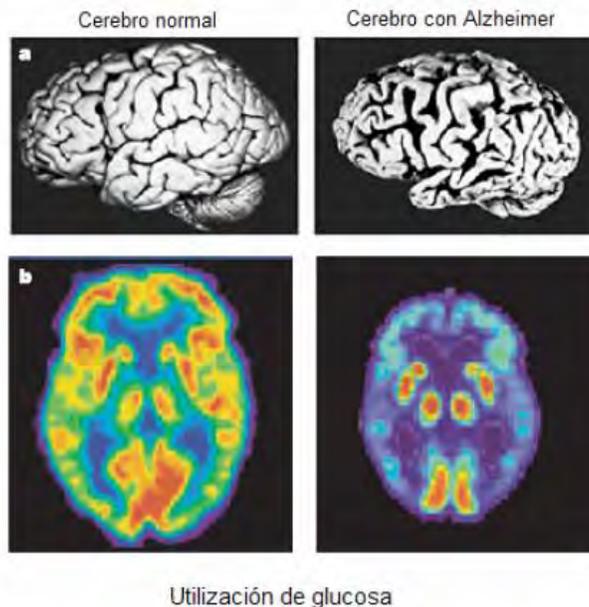
Por lo anterior, se necesitan mejorar las definiciones clínicas de la demencia y sus subtipos, así como esclarecer la utilidad de los diversos métodos de neuroimagen, biomarcadores y tests genéticos para aumentar la seguridad y fiabilidad del diagnóstico.

Diagnóstico	Características
<b>Probable EA:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+La demencia se establece bajo examen clínico y debe estar documentado mediante un test y ser confirmada por pruebas neuropsicológicas.</li> <li>+Debe presentar déficits en dos o más áreas cognitivas</li> <li>+Falla o pérdida de memoria y otras funciones cognitivas</li> <li>+Ausencia de alteraciones de conciencia</li> <li>+Inicio entre 40 y 90 años</li> <li>+Ausencia de otras enfermedades que expliquen el deterioro cognitivo</li> </ul> <p>Este tipo de diagnóstico se sustenta por:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+Deterioro progresivo de funciones cognitivas y actividades cotidianas</li> <li>+Historia familiar</li> <li>+Resultados de laboratorio</li> <li>+Síntomas múltiples ligados a EA</li> <li>+Inicio repentino</li> <li>+Signos neurológicos como hemiparesia o pérdida sensorial</li> <li>+Ataques epilépticos</li> </ul>
<b>Posible EA:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+A partir de un síndrome de demencia en ausencia de otras alteraciones neurológicas, psiquiátricas o sistémicas suficientes para causarlo.</li> <li>+En presencia de otra alteración cerebral o sistémica suficiente para causar demencia pero que no es considerada causa.</li> <li>+Déficit cognitivo severo progresivo en ausencia de otra causa identificable.</li> </ul>
<b>Definitiva EA:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+Criterios clínicos para la EA</li> <li>+Evidencia histopatológica obtenida por biopsia o autopsia</li> </ul>

**Tabla 2.** Criterios para la identificación de EA NINCDS-ADRDA (Alberca y López, 1998; [www.fundacionalzheimeresp.org](http://www.fundacionalzheimeresp.org)).

### 1.3.1. ALTERACIONES MACROSCÓPICAS

Las alteraciones macroscópicas de la enfermedad se caracterizan por atrofia, que generalmente es simétrica y difusa, de los giros cerebrales, que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral (Girones *et. al.* 2002). Los lóbulos temporal y frontal, que están relacionados con los procesos de memoria y aprendizaje, se encuentran reducidos en tamaño en un paciente con EA como resultado de sinapsis degeneradas y muerte neuronal (ver Figura 1) (Mattson 2004), sin embargo, también se han descrito lesiones en menor medida en los lóbulos parietales y occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas, y en menor proporción puede haber una relación de daño parieto-occipital. Cortes en los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular (hidrocéfalo *exvacuo*). Los ganglios basales, diencefalo, mesencefalo y el tronco cerebral no muestran anomalías notables (Girones *et. al.* 2002).



**Figura 1.** Alteraciones macroscópicas en la EA. En esta imagen se hace una comparación de un cerebro sano (izquierda) y un cerebro que padeció la enfermedad de Alzheimer (derecha). a. Se observa una disminución de masa cerebral sobretodo en lóbulo frontal y lóbulo temporal. b. Tomografía por emisión de positrones (TEP) con utilización de glucosa (las áreas de color rojo y amarillo indican las áreas del cerebro con altos niveles de utilización de glucosa; el paciente con la EA muestra un decremento en el metabolismo energético (Reproducido de Mattson 2004).

### 1.3.2. ALTERACIONES MICROSCÓPICAS

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se puede definir como un desorden neurodegenerativo caracterizado patológicamente por una progresiva degeneración y depositación de agregados del péptido beta amiloide (A $\beta$ ) conocidos como placas seniles (Mattson 2004; Plant *et. al.* 2003).

Se ha observado que la acumulación de A $\beta$  forma agregados que desencadenan cascadas patogénicas, caracterizadas por estrés oxidativo, inflamación y neurotoxicidad, que culminan en deterioro del sistema de neurotransmisores, apoptosis, pérdida neuronal y demencia (Bar-Am *et. al.* 2005; Naslund *et. al.* 2000).

Se ha encontrado en exámenes postmortem de personas seniles, la presencia de cantidades sustanciales de amiloide en corteza límbica y de asociación. Los depósitos de A $\beta$  fibrilares han sido asociados con anormalidades sinápticas e incluso con la desintegración de redes neuronales (Haass y Selkoe 2007; Palop *et. al.* 2006).

Otra característica de tipo anatomopatológico de la EA es la presencia de las marañas neurofibrilares (NFT), las cuales son filamentos helicoidales pareados intraneuronales que resultan de la hiperfosforilación de proteínas tau. Estas formaciones están asociados a ubiquitina y son reflejo de la destrucción de microtúbulos y neurofilamentos, manifestando el daño y posterior muerte neuronal (Mattson, 2004; Pérez, 2007).

Las placas de A $\beta$  y NFT están presentes principalmente en regiones del cerebro como corteza entorrinal, hipocampo, cerebro anterior basal y amígdala, las cuales están relacionadas con los procesos de aprendizaje, memoria, y conductas emocionales (Mattson 2004). También se han descrito otros cambios importantes dentro de la EA como se mencionan en la Tabla 3.

<b>Alteraciones microscópicas</b>	<b>Características</b>
<b>Placas seniles</b>	Son lesiones del neurópilo de estructura esferoide que miden aprox. 20-100 $\mu\text{m}$ de diámetro. Además de la proteína $A\beta$ , se han detectado otras sustancias, factores de crecimiento, proteoglicanos, apolipoproteína $\epsilon_4$ , citoquinas y una proteína que no ha sido caracterizada llamada NAC (componente no amiloide) que se deriva de la sinucleína. Se han descrito varios subtipos de placa: difusas, primitivas, clásicas (neuríticas) y quemadas.
<b>Degeneración neurofibrilar</b>	Está constituido por NFTs, los cuales están compuestos por proteína tau y neurofilamentos anormalmente fosforilados que corresponden a proteínas que forman parte del citoesqueleto neuronal normal.
<b>Cambios del neurópilo</b>	Son estructuras filamentosas dispersas en el neurópilo independientes de las placas seniles y NFTs, aunque tienden a ser numerosas cuando hay presencia de marañas.
<b>Angiopatía amiloide</b>	Son depósitos de amiloide en los vasos sanguíneos. Fragmentos de APP se depositan en la base de las membranas astrocíticas, miocíticas y pericíticas.
<b>Degeneración gránulo-vacuolar</b>	Tiene presencia en las células piramidales del hipocampo, principalmente en el sector CA1 del hipocampo y en el subiculum, aunque también se pueden hallar en CA2 y en la corteza entorrinal.
<b>Pérdida neuronal</b>	Afecta a las capas superficiales de la corteza. Las neuronas que sobreviven exhiben un nucléolo pequeño anormal y una reducción del RNA citoplasmático.
<b>Neurotransmisores</b>	Descenso en la actividad colinérgica. Afectación de las neuronas de proyección que producen transmisores monoamina y neuronas corticales que producen glutamato, GABA, somatostatina, neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, Substancia P y otros neuromoduladores.
<b>Cuerpos de Hirano</b>	Se encuentran fundamentalmente en el sector CA del hipocampo normalmente, en la EA son desplazados desde el estrato lacunar hacia el estrato piramidal.

**Tabla 3.** Alteraciones celulares y sus características (Girones *et. al.* 2002).

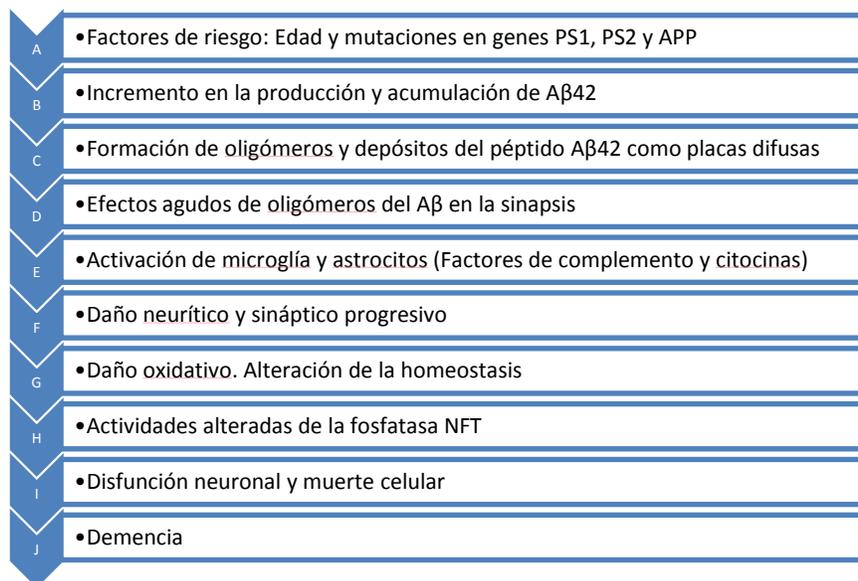
#### **1.4. HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE**

Se han encontrado diferentes variantes del péptido  $A\beta$  que van de 38 a 43 aminoácidos de longitud. Este péptido se deriva del procesamiento de una proteína conocida como Proteína Precursora Amiloide (APP).

Existen evidencias de que las dos formas de A $\beta$  que predominan en la EA son el fragmento A $\beta$ <sub>1-40</sub> y el A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Este péptido que tiene un peso molecular de alrededor 4 kDa, adopta una configuración de  $\beta$ -plegada y tiende a formar fibrillas que al agregarse forman depósitos de tipo amiloide.

Esta hipótesis plantea que la acumulación y agregación del péptido A $\beta$  desencadena una lenta y potente cascada que produce alteraciones sinápticas, activación microglial y de astrocitos, la modificación de la proteína tau en neuronas, la formación de filamentos helicoidales, una progresiva pérdida neuronal asociada con múltiples deficiencias de neurotransmisores y déficit cognitivo (Haass y Selkoe 2007). Dado esto, se ha propuesto un modelo que pretende explicar el proceso de la enfermedad conocido como “hipótesis de la cascada amiloide” (Ver Figura 2).

En esta hipótesis se admite la existencia de dos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, ligados a la edad y a alteraciones en los genes PS1, PS2 y APP, siendo la edad el factor principal.



**Figura 2.** Hipótesis de la cascada amiloide. Se enumeran las alteraciones secuenciales que participan en el desarrollo de la enfermedad.

## 1.5. PROCESAMIENTO DE APP Y GENERACIÓN DE A $\beta$

Un evento central en la enfermedad es la alteración del proceso proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), la cual es una glicoproteína de tipo I transmembranal, que da como resultado la producción y agregación de las formas neurotóxicas de A $\beta$  (Nunan y Small 2000). Una vez que se determinó la secuencia de A $\beta$  fue posible purificar, secuenciar y clonar el gen que codifica a la APP, localizándolo en el cromosoma 21 (Haass y Selkoe 2007; Mattson 2004).

El A $\beta$  es un producto de la endoproteólisis de la APP, la cual se lleva a cabo por cortes secuenciales mediante grupos de enzimas o complejos enzimáticos conocidos como:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas. Son tres las enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasas que han sido identificadas, todas ellas pertenecientes a la familia ADAM (una familia de enzimas de desintegrinas y metaloproteinasas): ADAM9, ADAM10 y ADAM17 (LaFerla *et. al.* 2007).

La división y el procesamiento de APP puede ser diferenciado en una vía no amiloidogénica y en una vía amiloidogénica. Se ha demostrado que la sobreexpresión de APP incrementa la formación de péptidos amiloidogénicos en cultivos celulares y causa neurodegeneración y disfunción cognitiva en ratones transgénicos (Bar-Am *et. al.* 2005). La APP también se encontró en forma circulante en fluidos extracelulares, incluyendo el líquido cefalorraquídeo y el plasma (Haass y Selkoe 2007).

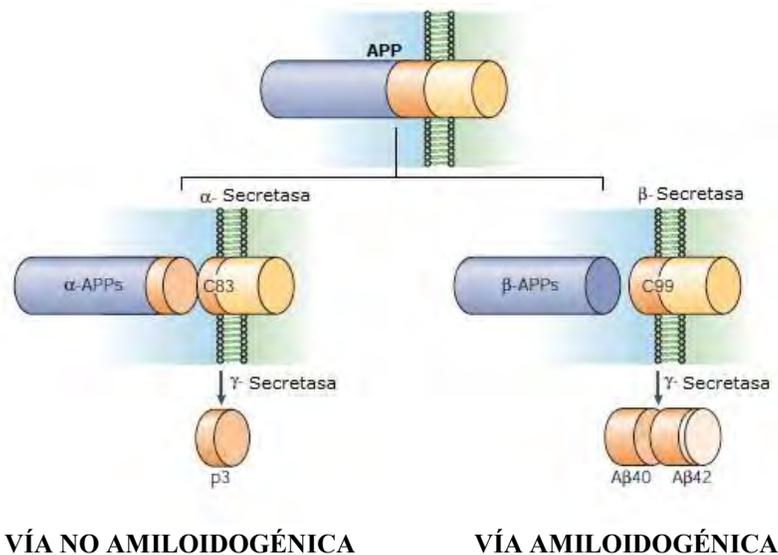
### 1.5.1. VÍA NO AMILOIDOGÉNICA

En esta vía, el procesamiento de APP inicia por la actividad de la  $\alpha$ -secretasa en la región C-terminal produciendo un péptido de 10 kDa con una longitud de 83 aminoácidos (C83) y liberando un ectodominio N-terminal soluble no amiloidogénico (sAPP $\alpha$ ), el cual es liberado al medio extracelular. El péptido resultante C83, se mantiene en la membrana y subsecuentemente es cortado por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo un péptido pequeño no amiloidogénico denominado p3 de 3 kDa. El procesamiento de la APP por la  $\alpha$ -secretasa ocurre dentro de la región de A $\beta$ , y por lo tanto excluye la formación de A $\beta$ <sub>1-40/42</sub> (Bar-Am *et. al.* 2005; LaFerla *et. al.* 2007).

### 1.5.2. VÍA AMILOIDOGÉNICA

Esta vía se caracteriza por la proteólisis inicial que se lleva a cabo por la actividad de la  $\beta$ -secretasa y da como resultado la liberación del fragmento sAPP $\beta$  al espacio extracelular y produce un fragmento transmembranal de 99 aminoácidos (C99). Subsecuentemente la proteólisis de este fragmento transmembranal (entre los residuos 38 y 43) por la  $\gamma$ -secretasa, libera el péptido A $\beta_{1-40/42}$  (LaFerla *et. al.* 2007).

El complejo PS- $\gamma$ -secretasa puede cortar la APP, la variante que más predomina es la de 40 aminoácidos (A $\beta_{1-40}$ ), y una pequeña porción (aproximadamente 10%) es de la variante de 42 aminoácidos (A $\beta_{1-42}$ ) la cual es más hidrofóbica y más propensa a la formación fibrilar, por lo que es predominante en las placas seniles (LaFerla *et. al.* 2007; Plant *et. al.* 2003; Younkin 1998).



**Figura 3.** Procesamiento de APP y generación de A $\beta$ . En esta figura se esquematiza la vía no amiloidogénica, y la vía amiloidogénica que culmina con la síntesis del péptido A $\beta$  (Adaptado de Citron 2004).

### 1.6. MUTACIONES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE A $\beta$

Mutaciones en los genes de la APP, PS1 y PS2 son la causa de EA autosomal dominante y tiende a manifestarse como una patogénesis de inicio temprano, afectando el metabolismo y

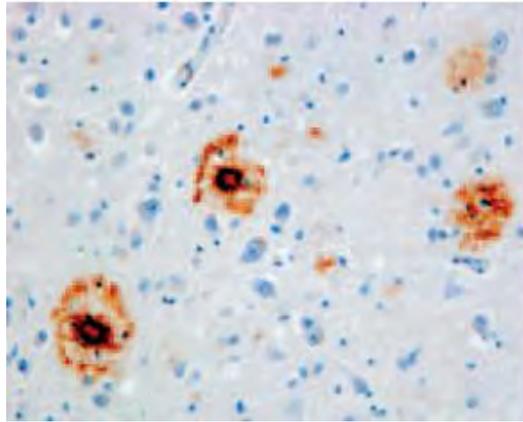
estabilidad de A $\beta$  (St George-Hyslop y Petit 2005). Estas mutaciones han sido utilizadas para generar ratones transgénicos para el estudio de la EA. Una mutación común en APP es conocida como Swedish (APP<sub>Swe</sub>) la cual es un cambio de doble aminoácido que conduce a un incremento de la proteólisis de esta proteína por la  $\beta$ -secretasa. Otras mutaciones, como la mutación Arctic (APP<sub>Arc</sub>) tiene un efecto de incrementar la agregación de A $\beta$ . Mutaciones en las presenilinas, como la mutación PS1M146V, incrementa los niveles de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Jankowsky *et. al.* 2004).

Un aumento en la carga genética de APP también da como resultado la EA, como en el caso de el síndrome de Down, en el cual la trisomía en el cromosoma 21 da como resultado la acumulación de A $\beta$  en edad temprana (Haass y Selkoe 2007; LaFerla *et. al.* 2007).

## **1.7. AGREGADOS AMILOIDES**

Los agregados amiloides son depósitos de fibrillas y agregados amorfos del péptido A $\beta$  extracelular (Mattson 2004) e intracelular, encontrado recientemente en neuronas del cerebelo y médula espinal de personas entre 38 a 83 años (LaFerla *et. al.* 2007), lo que sugiere que la síntesis de A $\beta$  intracelular es un evento que no es dependiente de la edad. También se ha propuesto que la formación de A $\beta$  intracelular sea un evento temprano que precede a formación extracelular de los depósitos de A $\beta$  en la patogénesis de la EA y síndrome de Down (Gyure *et. al.* 2001), además ha sido demostrado que los niveles de A $\beta$  intraneuronal disminuyen conforme se acumulan los agregados amiloides.

Existe un largo número de estudios post-mortem de EA, síndrome de Down y de ratones transgénicos los cuales aportan evidencia de la presencia de A $\beta$  intracelular entre las neuronas y aunado al uso de anticuerpos contra la región C-terminal del péptido A $\beta$ , se ha observado que el más abundante es A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Por microscopía electrónica se demostró que el A $\beta$ <sub>1-42</sub> se encuentra en cuerpos multivesiculares (MVBs) en las neuronas de cerebro humano (Takahashi *et. al.* 2002).



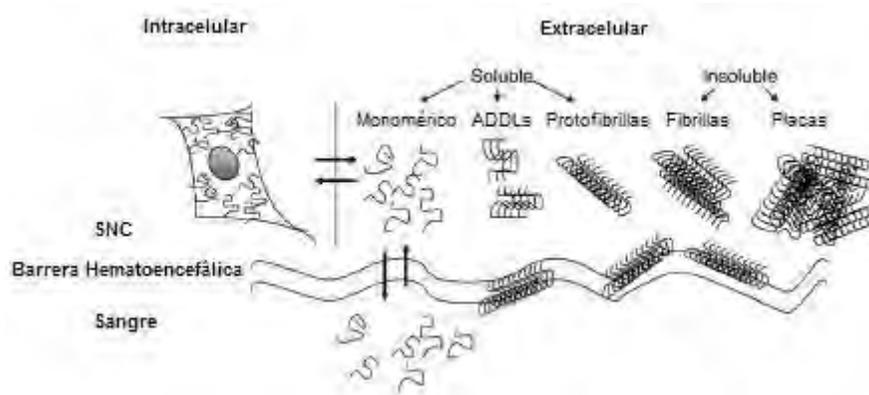
**Figura 4.** Placas seniles. Se muestra en esta imagen los conglomerados que se forman en la masa cerebral, productos de una sobreproducción del péptido fibrilar A $\beta$  (Adaptado de Haass y Selkoe 2007).

### **1.8. ESTADOS DE ENSAMBLAJE DE A $\beta$**

El péptido A $\beta$  es producido como monómero, rápidamente se agrega y forma complejos multiméricos. Estos complejos se presentan desde bajos pesos moleculares como dímeros y trímeros a altos pesos moleculares como protofibrillas y fibrillas. Las especies oligoméricas del péptido A $\beta$  son las más agresivas a partir de dímeros que afecta la memoria y aprendizaje, función sináptica y potenciación a largo plazo (LTP), hasta dodecámeros que afectan la memoria y cognición de modelos en ratones transgénicos. Se ha reportado que la oligomerización de A $\beta$  ocurre en los compartimientos endosomales, durante las interacciones de la bicapa lipídica, en microdominios ricos en colesterol y glicoesfingolípidos (balsas lipídicas) (Haass y Selkoe 2007; LaFerla *et. al.* 2007).

Recientemente se ha puesto especial interés en identificar la fracción tóxica responsable de la disfunción sináptica y pérdida en la viabilidad neuronal en la EA. La producción de estas aparentes especies tóxicas, oligómeros solubles de A $\beta$ , y su habilidad en causar daño neuronal, depende de la precisión de la ruptura proteolítica intramembranal. Algunas especies oligoméricas de A $\beta$  son pequeñas y suficientemente solubles para difundirse fácilmente por el parénquima cerebral y afectar la estructura sináptica, función y sobrevivencia neuronal (Caughey y Lansbury 2003; Haass y Selkoe 2007).

Después que se propuso la hipótesis amiloide para la EA, han surgido discrepancias entre la formación de las placas amiloideas en el cerebro y el impedimento cognitivo, por ello se han introducido nuevos conceptos como protofibrillas, ensamblajes anulares, ligandos difusibles derivados-A $\beta$  (ADDLs) y especies tóxicas oligoméricas. Estas especies son formas intermedias entre los monómeros de A $\beta$  y los agregados amiloides (Martins *et. al.* 2008) (Ver Figura 5).



**Figura 5.** Diferentes conformaciones de A $\beta$ . En esta imagen se esquematizan las variantes del péptido que se han descrito (Adaptado de Vasilevko y Cribbs 2006).

Se encuentran varios tipos de ensamblajes sintéticos de A $\beta$ , de acuerdo con sus formas, que incluyen protofibrillas (PFs), estructuras anulares, paranúcleos, ligandos difusibles derivados-A $\beta$  (ADDLs), globulómeros y fibrillas amiloideas. Los oligómeros solubles son definidos como ensamblajes de A $\beta$  que no precipitaron desde fluidos fisiológicos por alta velocidad de centrifugación, y no todos los mencionados ensamblajes sintéticos cumplen esta definición (Haass y Selkoe 2007).

Las protofibrillas son estructuras flexibles que se pueden polimerizar *in vitro* para formar fibrillas amiloideas o pueden despolimerizarse en especies de menor orden; PFs son angostas fibrillas amiloideas (aprox ~5 nm vs aprox ~10 nm), son curvos y rectos ensamblajes arriba de 150 nm de longitud. Los ensamblajes anulares de A $\beta$  sintético son en forma de rosquillas, con un diámetro exterior de 8-12 nm y un diámetro interior de 2.0-2.5 nm (Bitan *et. al.* 2003; Haass y Selkoe 2007; Walsh *et. al.* 1999).

Algunos laboratorios han identificado especies oligoméricas más pequeñas que los anillos, y se les han designado como ADDLs, que han sido aislados desde cerebros post-mortem EA y su presencia está relacionada a la pérdida de memoria, estimulando una excesiva estimulación de especies reactivas de oxígeno. La estabilización química de A $\beta$ <sub>42</sub> sintético, ha revelado ensamblajes intermediarios con una periodicidad hexámero, como hexámero, dodecámero y octadecámero (De Felice *et. al.* 2007; Haass y Selkoe 2007).

AB\*56, un aparente dodecámero natural de A $\beta$ , detectado en cerebros de ratones APP transgénicos (Martins *et. al.* 2008), puede representar in vivo de manera análoga a los ADDLs sintéticos, aunque comparaciones directas estructurales no han sido posibles; AB\*56 puede perturbar la función sináptica y por ello, afectar la memoria. (Haass y Selkoe 2007; Lesne *et. al.* 2006).

Oligómeros intracelulares y solubles, dímeros y trímeros han sido descritas en cultivos celulares resistentes al detergente SDS, resistente a la enzima degradadora de insulina (IDE), los cuales sólo digieren monómeros de A $\beta$  (Haass y Selkoe 2007).

Hallazgos recientes indican que los pequeños agregados solubles de A $\beta$  producen mayor daño en la disfunción sináptica daño neuronal que los polímeros de A $\beta$  (Dahlgren *et. al.* 2002), A $\beta$  soluble es detectable tempranamente en la corteza cerebral de personas con riesgo de presentar la patología de la EA, varios años antes de la formación y deposición de las fibrillas de A $\beta$ .

## **1.9. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

Desde 1984 se ha producido ininterrumpidamente un avance prodigioso en el conocimiento de la patología química de la EA, tal como la composición subunitaria de las placas seniles y las marañas neurofibrilares, y sobre todo de la genética molecular de la EA, que ha encontrado el grado de importancia de cada proteína que participa en los procesos fundamentales de esta patología.

Estos estudios han permitido realizar estrategias para desarrollar drogas para su posible uso en terapias que se centren en la reducción de la carga del péptido A $\beta$ . Una de esas

aproximaciones es identificar a  $\beta$ - y  $\gamma$ - secretasas como objetivos importantes para un posible tratamiento que interfiera en la producción de A $\beta$ , sin embargo, se han detectado efectos contraproducentes ya que se ha demostrado que la pérdida de A $\beta$  endógeno por inhibición farmacológica resulta en una severa reducción en la viabilidad de neuronas (Plant *et. al.* 2003).

Otros grupos han propuesto que el fármaco Rasagilina y sus derivados inducen, al igual que la droga anti-Alzheimer ladostigil (TV3326), el aumento de sAPP $\alpha$  no amiloidogénico (Bar-Am *et. al.* 2005), evitando así la neurotoxicidad por la sobreproducción de A $\beta$ .

La enzima degradadora de insulina (IDE) es una tiol-metallo-endopeptidasa de ~110kDa que degrada péptidos pequeños como la insulina y el péptido A $\beta$ , siendo identificada como la proteasa más importante en la degradación de agregados extracelulares. La sobreexpresión neuronal de IDE reduce los niveles de A $\beta$  y retarda la formación de placas. IDE degrada exclusivamente las especies monoméricas del péptido A $\beta$  (Caccamo *et. al.* 2005).

La presencia de neprililina en los sitios presinápticos tiene una importancia característica, porque es capaz de degradar las formas monoméricas y oligoméricas del péptido A $\beta$ . La sobreexpresión de neprililina repercute en la reducción de los niveles de A $\beta$ , además de que la administración de inhibidores de neprililina en ratones transgénicos eleva los niveles de A $\beta$  en el cerebro. En estudios con cerebros de humano *post mortem*, los niveles de RNAm de neprililina fueron bajos en regiones vulnerables en el desarrollo de placas seniles como el hipocampo y el giro mediotemporal (Hellstrom-Lindahl *et. al.* 2008; Yasojima *et. al.* 2001).

Nilsen ha sugerido que un modo de prevención resulta de la exposición de estrógenos, ya que puede prevenir la neurotoxicidad por A $\beta$  *in vitro* e *in vivo*. Muchos de los efectos inmediatos en el tratamiento de estrógenos convergen en la neuroprotección de la mitocondria, mediante la regulación homeostática del calcio (Nilsen *et. al.* 2006).

El uso de Anti Inflamatorios No Esteroideos (AINES), inhibidores de acetilcolinesterasa, y el uso de medicamentos antioxidantes han sido también tratamientos utilizados en la EA. Se

sabe que la administración de altas dosis de AINES reduce la agregación de amiloide en ratones APP transgénicos, ya que tiene un efecto modulador sobre la actividad de  $\lambda$ -secretasa impidiendo la formación de  $A\beta_{1-42}$  y con esto, disminuye el progreso de la enfermedad (Wolfe 2002; Citron 2004).

Lo más novedoso con relación a nuevas terapias para combatir la EA es el avance de la inmunoterapia. En el modelo de la EA en ratones transgénicos, la vacunación con  $A\beta$  produjo anticuerpos anti- $A\beta$  y una notable disminución del número de placas seniles en el cerebro (Schenk *et. al.* 1999; Vasilevko y Cribbs 2006). Los ratones transgénicos vacunados mostraron mejoría en pruebas de memoria (Morgan *et. al.* 2000). La vacunación pasiva, inyección directa de anticuerpos anti  $A\beta_{1-42}$ , también mostró resultados prometedores.

Posteriormente, en humanos, se inició la inmunización con el compuesto AN1792, que consistía en  $A\beta_{1-42}$  fibrilar como inmunógeno, y un fuerte adyuvante QS21, sin embargo, después de completar la fase I de seguridad y tolerabilidad en 2001, se tuvo que suspender en la fase II ya que los pacientes presentaron meningoencefalitis. Los estudios posteriores demostraron que es debida al desarrollo de inmunidad celular, y por lo tanto, evitando el desarrollo de este tipo de inmunidad se podrían lograr los efectos benéficos de la inmunoterapia para la EA. Hay un ensayo de vacunación activa con una fracción del péptido amiloide más corto, el  $A\beta_{1-16}$ , que estimula sólo la inmunidad humoral ya que contiene los epítomos que desarrollan inmunidad celular (Hock *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el péptido beta amiloide de 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-42}$ ) tiene un papel central en la formación de los agregados amiloides que inducen neurotoxicidad y que con el paso del tiempo ocasionan toda la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer. Es por eso que se pretende encontrar moléculas específicas que logren desagregar estos agregados y/o prevenir la formación de ellos y así eliminar su efecto tóxico.

Actualmente la inmunoterapia es una potente área de estudio, la cual puede ser una solución viable dentro de todas las terapias que existen.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Mapeo de epítomos del péptido beta amiloide que son reconocidos por anticuerpos policlonales anti-A $\beta$ 1-42 mediante el uso de una biblioteca de heptapéptidos expresados en fago filamentosos, con el fin de desarrollar inmunoterapéuticos para la Enfermedad de Alzheimer.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:**

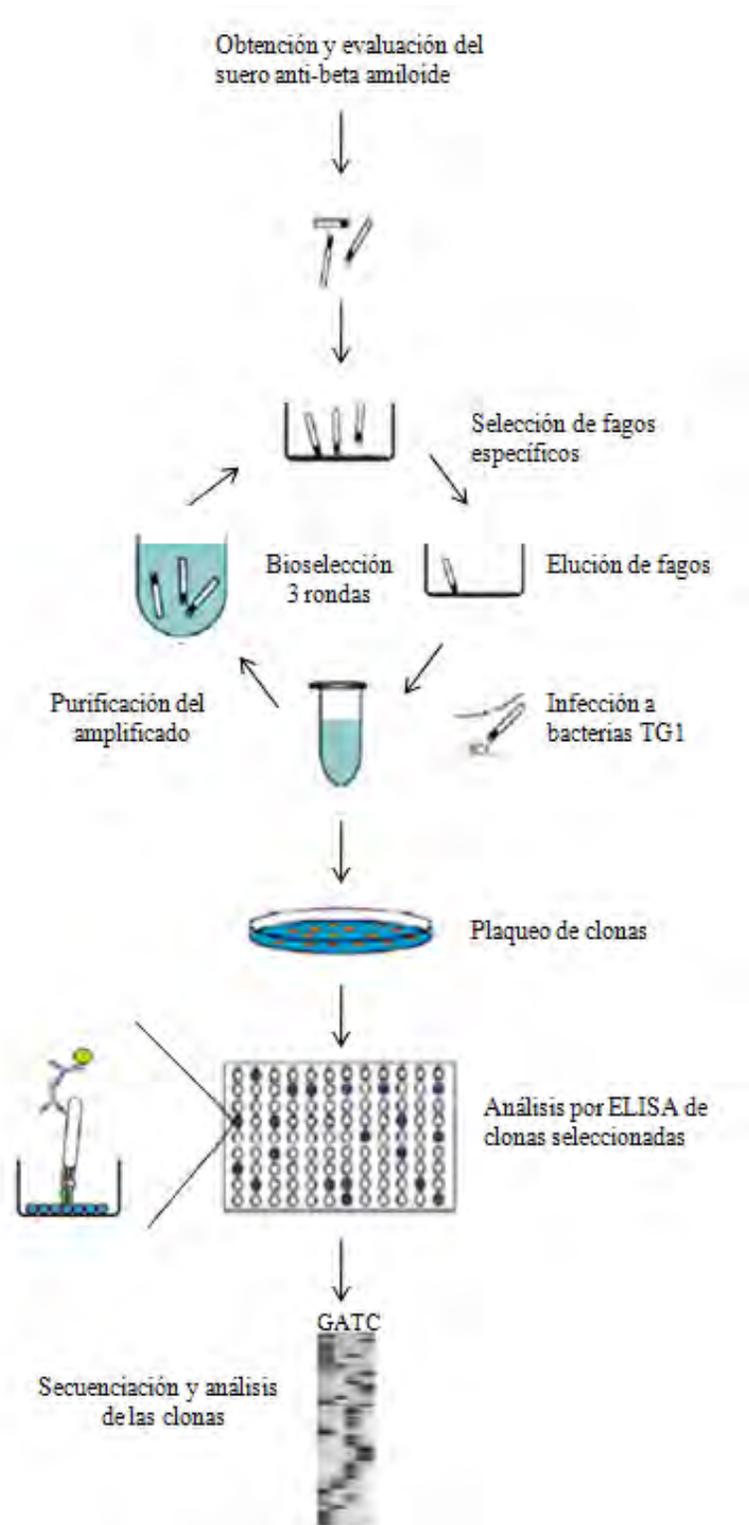
- Caracterización de un suero de conejo específico contra el péptido beta amiloide 1-42
- La búsqueda de epítomos/mimótopos del péptido A $\beta$  por bioselección.
- Secuenciación del ADN de las clonas seleccionadas.
- Análisis de las secuencias.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIALES

BIOLÓGICO/QUÍMICO	EQUIPOS Y OTROS
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Cepa de <i>E. coli</i> TG1.</li><li>➤ Conejos.</li><li>➤ Suero de cabra <math>\alpha</math>-IgG de conejo conjugado a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjúgate, Zymed, San Francisco, CA, USA).</li><li>➤ Biblioteca de péptidos comercial (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra).</li><li>➤ Anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo (Gamma).</li><li>➤ Suero de conejo <math>\alpha</math>-M13.</li><li>➤ Kit Sequenase Quick-Denature Plasmid Secuencing (Amershan Pharmacia Biotech, OH, USA).</li><li>➤ Leche descremada en polvo</li><li>➤ Péptidos <math>A\beta_{1-42}</math>, <math>A\beta_{1-16}</math>, <math>A\beta_{12-28}</math>, <math>A\beta_{17-42}</math>, <math>A\beta_{3-42}</math>, <math>A\beta_{11-42}</math>, <math>A\beta_{8-42}</math>, <math>A\beta_{25-35}</math>.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Centrífuga Hearus (Biofuge Stratos).</li><li>➤ Máquina de lavado automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA).</li><li>➤ Cámara electroforética para secuenciación.</li><li>➤ Secador de geles (Bio-Rad, USA).</li><li>➤ Campana de flujo laminar.</li><li>➤ Lector de placas automático (Dynex, Virginia, USA).</li><li>➤ Balanza analítica.</li><li>➤ Placas de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark).</li><li>➤ Tubos de policarbonato (Nalgene, New York, USA).</li><li>➤ Placas de rayos X (Kodak).</li><li>➤ Microtubos de 0.6 ml, 1.5 ml y 2 ml.</li><li>➤ Cajas de Petri.</li><li>➤ Tubos cónicos de 15 ml y 50 ml.</li></ul>

## 4.2. ESQUEMA METODOLÓGICO



## **4.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

### **4.3.1. OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-BETA AMILOIDE 1-42**

La Universidad de Irvine en California donó un suero anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> obtenido en conejos inmunizándolos vía subcutánea con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y adyuvante.

### **4.3.2. REACTIVIDAD DEL SUERO DE CONEJO ANTI-A $\beta$ <sub>1-42</sub> CONTRA DIFERENTES FRAGMENTOS DE A $\beta$ .**

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 0.2  $\mu$ g por pozo de diferentes fragmentos de A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>1-16</sub>, A $\beta$ <sub>12-28</sub>, A $\beta$ <sub>17-42</sub>, A $\beta$ <sub>3-42</sub>, A $\beta$ <sub>11-42</sub>, A $\beta$ <sub>8-42</sub>, A $\beta$ <sub>25-35</sub>) y un péptido no relacionado como control negativo en un volumen final de 100  $\mu$ l de buffer de carbonatos (pH 9.6) y se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la placa en un lavador automático de 4 ciclos (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS-Tween20 al 0.2%, posteriormente se bloqueó con 200  $\mu$ l de PBS-Leche 2%-TritónX-100 al 0.2% durante 1 hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa y se agregó 100  $\mu$ l por pozo del suero de conejo anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> a una dilución 1:800 en PBS-Leche 2%-TritónX-100 al 0.2%. Se incubó por 1 hora a 37° y después del lavado, se agregó el anticuerpo secundario de cabra  $\alpha$ -IgG de conejo conjugada a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjúnate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS-Leche 2%-Tritón al 0.2%. Se incubó durante 1 hora a 37°C. Se lavó y se adicionó 100  $\mu$ l por pozo de sustrato para peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco, CA, USA). Finalmente se tomó la lectura en un lector de placas automático (Dynex, Virginia, USA) a 405 nm.

### 4.3.3. BIOSELECCIÓN (BIOPANNING) Y ELUCIÓN DE LOS FAGOS

Para la identificación de epítomos del péptido Beta Amiloide se usó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos fusionados a la proteína pIII del fago filamentoso M13 (New England Biolabs, Herfordshire, Inglaterra) (Ver Apéndice D).

El proceso de bioselección se realizó en un formato de fase sólida, por lo cual, cuatro pozos de una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark), se sensibilizaron con 100  $\mu$ l de una solución de anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo (Zymed) a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml en buffer de carbonatos a pH 9.6 (ver apéndice B), durante 1 hora a 37°C. Después los pozos se lavaron manualmente 5 veces con 200  $\mu$ l de PBS-Tween<sub>20</sub> al 0.2% a temperatura ambiente. Posteriormente se bloqueó con 200  $\mu$ l/pozo de PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2% durante 1 hora a 37°C y se lavaron de la misma manera. Se agregó el suero de conejo anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> diluido 1:100 en PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2% y se incubó 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se volvió a lavar como anteriormente, y se agregó 10  $\mu$ l de solución de la biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresada en fagos ( $2.2 \times 10^{11}$  fagos/ml) en PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2%. La placa se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron los pozos cinco veces con PBS-Tween al 0.2% y dos veces con únicamente PBS (ver apéndice A y B).

Finalmente, a cada pozo se añadieron 100  $\mu$ l de Trietilamina 1M (ver apéndice B) incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colectó el volumen de las cuatro pozas (400  $\mu$ l en total) en un microtubo de 1.5 ml y se neutralizó a pH 7.4 con Tris-HCl.

### 4.3.4. AMPLIFICACIÓN

500  $\mu$ l *E. coli* TG1 de un cultivo de toda la noche (una colonia de *E. coli* TG1 en 10 ml de 2YT a 250 rpm toda la noche a 37°C) se diluyó en 50 ml de 2YT (1:100) en un matraz de 250 ml. Se incubó por 30 minutos en agitación a 37°C y posteriormente se infectó con el eluido obtenido de la ronda de bioselección, se incubó por 30 minutos sin agitación, para facilitar la infección y se incubó 4.5 horas a 37°C en agitación constante de 250 rpm.

Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo fresco y estéril para precipitar los fagos agregando 1/5 del volumen de PEG/NaCl. Para favorecer la precipitación de los fagos, se conservaron los tubos a 4°C toda la noche.

El precipitado de toda la noche se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, después se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1.5 ml de TBS (ver apéndice A y B) estéril pH 7.5. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C con el fin de eliminar restos de bacterias. Se recuperó el sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 1/5 de PEG/NaCl del volumen total de la suspensión y se incubó durante 1 hora en hielo. Sucesivamente se volvió a centrifugar 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 400 µl de TBS estéril y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo para posteriormente ser titulado.

#### **4.3.5. TITULACIÓN DE FAGOS Y AMPLIFICADO**

Se sembró una colonia de *E. coli* TG1 en 10 ml de 2YT, se dejó incubando con agitación constante 250 rpm a 37°C, verificando la turbidez que correspondía a la fase de la media logarítmica de crecimiento DO 600nm = 0.5 y una concentración aproximada a 10<sup>8</sup> células por mililitro.

En microtubos de 1.5 ml con 200 µl de la suspensión de bacterias, se infectaron con diluciones apropiadas del eluido y amplificado, incubándose por 30 minutos a 37°C con el fin de facilitar la infección.

A cada tubo de infección con los fagos del eluido y del amplificado, se añadieron 15 µl de Xgal/IPTG (ver apéndice A) y se mezcló el volumen completo de cada tubo con las bacterias infectadas a su correspondiente tubo con 4 ml de TOP AGAR a 45°C, agitando con el vortex, y posteriormente, vaciando en cajas Petri con 10 ml de LB (ver apéndice B). Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C.

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

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

Después de la tercera ronda se obtuvieron 21 clonas individuales provenientes de la bioselección con el suero anti A $\beta$ <sub>1-42</sub> que fueron amplificadas y tituladas para contar con la cantidad suficiente de fagos viables ( $10^{11}$  pfu/ml) para evaluar su reactividad y llevar a cabo el análisis de las secuencias.

#### **4.3.6. PURIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES**

Después de contar el número total de unidades formadoras de colonias, se seleccionaron aquellas cajas con suficiente número de placas y se recuperaron 21 placas al azar provenientes de la titulación del eluido de la tercera ronda de bioselección con el suero anti anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Cada clona se amplificó en 3 ml de medio líquido 2YT en tubos de 15 ml con una dilución 1:100 de bacterias *E. coli* TG1 crecidas toda la noche y se incubó en agitación constante durante 4 horas 30 minutos a 37°C.

Los tubos se centrifugaron a 4 000 rpm, 4°C por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 3 ml) y se dividió en dos alícuotas por clona de la siguiente manera: 1.2 ml para la evaluación de las clonas por ELISA, y 1 ml para la obtención de ADN de cadena sencilla de los fagos.

#### **4.3.7. PURIFICACIÓN DE FAGOS POR DOBLE PRECIPITACIÓN CON PEG/NaCl**

Se añadieron 200  $\mu$ l de PEG/NaCl a los tubos destinados para ELISA y se incubaron 1 hora en hielo para la precipitación de los fagos. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se desechó el sobrenadante.

Después se resuspendió cada pellet en 1 ml de TBS estéril y se añadieron 200  $\mu$ l de PEG/NaCl para una segunda precipitación. Los tubos del resuspendido se mezclaron y se incubaron durante una hora a 4°C. Nuevamente se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de TBS estéril y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y estériles y se guardaron a 4°C para posteriormente ser titulados y determinar la reactividad de las clonas mediante un ensayo de ELISA.

#### **4.3.8. OBTENCIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA**

Se añadieron 400  $\mu$ l de PEG/NaCl a los tubos con 1 ml de sobrenadante y se incubaron toda la noche a 4°C para facilitar la precipitación del fago. Al día siguiente se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se volvieron a centrifugar los tubos para retirar completamente los remanentes del sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer de Yoduro de sodio/EDTA adicionando 500  $\mu$ l de etanol, los tubos se agitaron y se dejaron incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron 12 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

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

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 12 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante mediante vacío. Todos los tubos se destaparon y se dejaron abiertos bajo la campana extractora para facilitar su secado.

El ADN se resuspendió en 15  $\mu$ l de agua miliQ estéril y cada tubo se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para después determinar la secuencias de las clonas seleccionadas.

#### **4.3.9. SECUENCIA DE LAS CLONAS INDIVIDUALES**

Antes de llevar a cabo la secuenciación de cada una de las clonas, se verificó la presencia de ADN de cadena sencilla en un gel de agarosa al 1% (ver apéndice B) en Buffer de TBE 1X se cargaron 2  $\mu$ l de ADN de cadena sencilla en una mezcla de 1  $\mu$ l de Azul de Bromofenol con 2  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se corrió a voltaje constante de 100 V durante 1.5 hrs. Se retiró el gel de la cámara y se sumergió en una solución de bromuro de etidio y finalmente se analizó iluminando con luz ultravioleta.

La secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos seleccionados se realizó utilizando el Kit utilizando el Kit de Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing (Amershan Pharmacia Biotech, OH, EAU) y dATP  $\alpha$ -S35.

Por separado se incubó 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  una mezcla con 12.5  $\mu$ l de ADN purificado de cada una de las clonas con 1.5  $\mu$ l de primer -28 (Sequencing Primer -28) y 2  $\mu$ l de Buffer de reacción. Por otro lado se realizó otra mezcla LABELING MIX que consiste en tomar 1  $\mu$ l de dithiothreitol 0.1 M (DTT), 2  $\mu$ l, 2  $\mu$ l de la mezcla labeling mix diluído 1:10 en  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.3  $\mu$ l de marca dATP  $\alpha$ -S35, finalmente los 16  $\mu$ l totales de la reacción annealing y 1  $\mu$ l de enzima polimerasa (sequenase versión 2.0 DNA polymerase) incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente de la mezcla annealing-labeling se añadieron 4.5  $\mu$ l a cuatro tubos por reacción precalentados a  $37^{\circ}\text{C}$  que contenían 2.5  $\mu$ l de los nucleótidos de terminación G, A, T, C, (ddNTPs 80  $\mu$ M) incubándose 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se añadió a cada tubo 4  $\mu$ l de solución de paro guardando los tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

Al día siguiente los tubos se incubaron durante 2 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$  y se cargaron 7  $\mu$ l de cada una de las muestras en los carriles correspondientes de un gel de poliacrilamida al 8% (ver

apéndice B) corriéndose aproximadamente 2 horas a 1700 V. El gel se precorrió a 1500 V por 30 minutos.

Al finalizar el tiempo, el gel se retiró de la cámara y se secó en un filtro colocándolo a un secador de geles (Bio-Rad, USA) durante 1 hora a 80°C. Después que transcurrió el tiempo de secado, el gel se transfirió en un cassette de exposición con una placa de rayos X (Kodak) durante 72 horas a temperatura ambiente.

Finalmente se reveló la placa y se llevó a cabo la lectura manual de la placa para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los insertos de los fagos seleccionados.

#### **4.3.10. EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA**

Con el fin de evaluar la reactividad de las 21 clonas individuales obtenidas en el proceso de bioselección con el suero anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub>, se llevó a cabo un análisis por ELISA para determinar si estas clonas fueron reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en el suero de conejo inmunizado con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. M13 fue utilizado como control negativo.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark), con 100  $\mu$ l/pozo de una solución de un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo hecho en cabra a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en buffer de carbonatos y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de un ciclo de lavado (4X) con PBS 1X-Tween20 al 0.2% en el lavador automático de placas, se bloqueó con 200  $\mu$ l/pozo de solución PBS-Leche al 2% durante 1 hora a 37°C y después se lavó de la misma manera.

Se agregó a la mitad de los pozos 100  $\mu$ l/pozo del suero anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> y la otra mitad 100  $\mu$ l/pozo del suero del conejo control, inmunizado con adyuvante solo. Los sueros fueron diluidos 1:200 en PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2%. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, las placas se lavaron y se agregaron por duplicado, a cada suero, las 21 clonas seleccionadas a una concentración de 10<sup>10</sup> fagos/pozo en PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2%. La placa se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la placa y se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo de una solución de un anticuerpo monoclonal anti-M13 (Invitrogen) diluido 1:4000 en PBS-Leche 2%-Tritón x-100 al 0.2%. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, nuevamente se lavó y se agregaron 200  $\mu$ l/pozo de ABTS como sustrato para la peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco CA, USA).

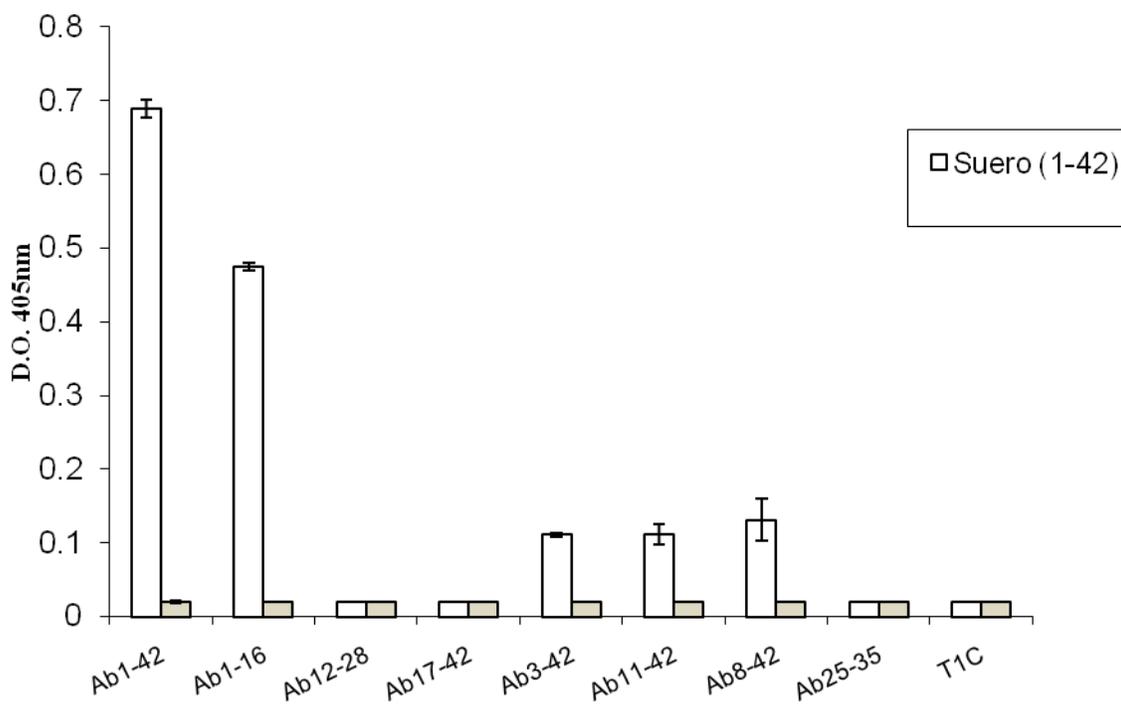
La placa se protegió de la luz directa y se incubó por 15 minutos a 37°C, después se leyó a una densidad óptica de 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EVALUACIÓN DEL SUERO CONTRA DIFERENTES FRAGMENTOS DE A $\beta$

Con el interés de identificar la región del péptido A $\beta$  que reconocía el suero anti-A $\beta$ , se realizaron ensayos inmunoenzimáticos con diferentes fragmentos sintéticos de A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>1-16</sub>, A $\beta$ <sub>12-28</sub>, A $\beta$ <sub>17-42</sub>, A $\beta$ <sub>3-42</sub>, A $\beta$ <sub>11-42</sub>, A $\beta$ <sub>8-42</sub>, A $\beta$ <sub>25-32</sub>), utilizando como control negativo un péptido no relacionado TIC.

Lo que se puede observar en la figura 6 es que el suero anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> generado en conejo reconoce a dos péptidos, A $\beta$ <sub>1-42</sub> y a A $\beta$ <sub>1-16</sub>, indicando que los anticuerpos están dirigidos contra la región amino-terminal del A $\beta$ <sub>1-42</sub>.



**Figura 6.** Evaluación del suero de conejo anti-A $\beta$  por ELISA contra ocho isoformas del péptido A $\beta$ , utilizando como control negativo a un péptido no relacionado TIC a 405 nm.

## 5.2. BIOSELECCIÓN

Con la finalidad de identificar los epítomos del péptido  $\beta A_{1-42}$  se llevaron a cabo tres rondas de bioselección utilizando una biblioteca de siete aminoácidos expresada en fago (PhD7 New England Biolabs) y anticuerpos de conejo anti- $\beta A_{1-42}$ . Al final de cada ronda de bioselección se cuantificaron los fagos eluidos y se obtuvieron los siguientes títulos (Tabla 4)

RONDA DE BIOSELECCIÓN	TÍTULO DE ENTRADA (*pfu/ml)	TÍTULO DE SALIDA (*pfu/ml)
1	$1 \times 10^{11}$	$2.6 \times 10^5$
2	$2 \times 10^{12}$	$2 \times 10^8$
3	$4.2 \times 10^{12}$	$7 \times 10^{10}$

**Tabla 4.** Títulos de los eluidos en cada ronda de bioselección. Los títulos de entrada corresponden a los usados para la bioselección y los de salida corresponden a los eluidos después de cada ronda de bioselección. El aumento de magnitud en los títulos de salida de cada una de las rondas de bioselección es ascendente. \*pfu Unidades formadoras de placas (*Plaque forming units*)

### 5.3. TÍTULO DE CLONAS ANTI-A $\beta_{1-42}$

Fueron seleccionadas aleatoriamente 21 clonas de la tercera ronda de bioselección las cuales se amplificaron y titularon (Tabla 5).

CLONA	TÍTULO	CLONA	TÍTULO
C3.1	7.6X10 <sup>10</sup>	C3.12	2.18X10 <sup>11</sup>
C3.2	1.92X10 <sup>11</sup>	C3.13	2.26X10 <sup>11</sup>
C3.3	1.58X10 <sup>11</sup>	C3.14	8.4X10 <sup>10</sup>
C3.4	1.58X10 <sup>11</sup>	C3.15	2X10 <sup>10</sup>
C3.5	1.82X10 <sup>11</sup>	C3.16	3.74X10 <sup>11</sup>
C3.6	6X10 <sup>10</sup>	C3.17	5.16X10 <sup>11</sup>
C3.7	1.74X10 <sup>11</sup>	C3.18	4.42X10 <sup>11</sup>
C3.8	1.44X10 <sup>11</sup>	C3.19	4.2X10 <sup>10</sup>
C3.9	1.68X10 <sup>11</sup>	C3.20	1.94X10 <sup>11</sup>
C3.10	2.38X10 <sup>11</sup>	C3.21	1.02X10 <sup>11</sup>
C3.11	2.08X10 <sup>11</sup>		

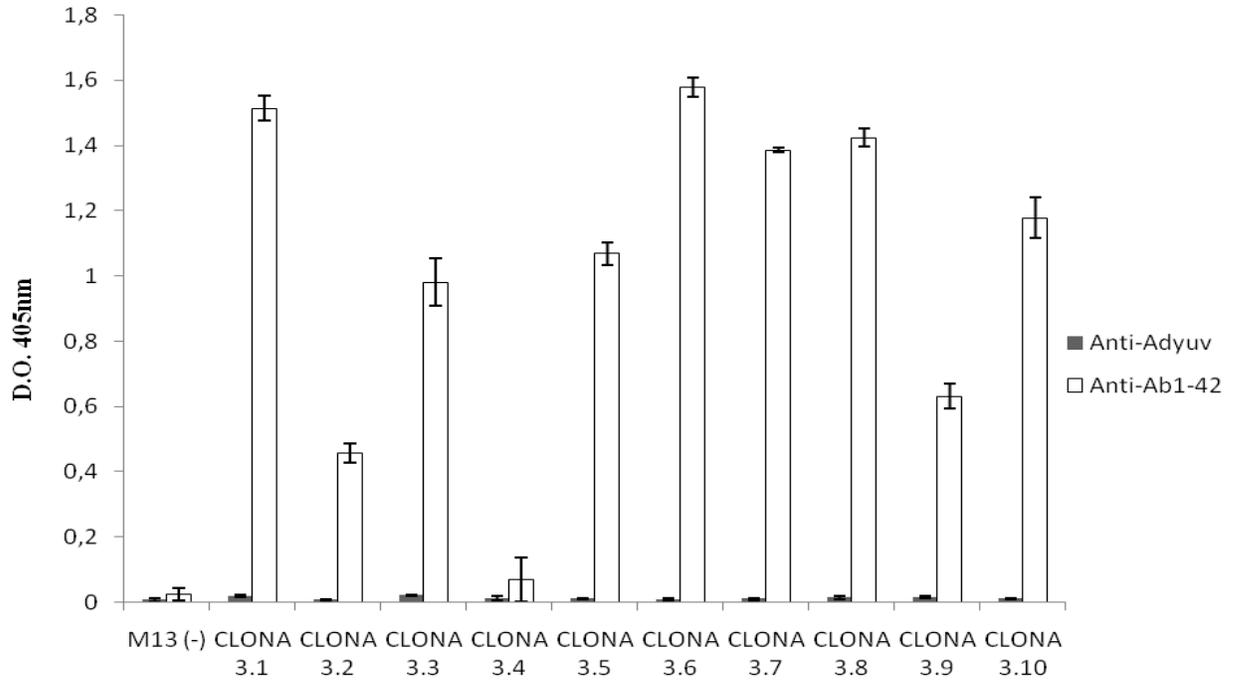
**Tabla 5.** Título de las 21 clonas individuales seleccionadas al azar de la tercera ronda de bioselección con el suero anti- $\beta_{1-42}$  después de ser amplificadas.

### 5.4. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES

Se llevó a cabo un ensayo inmunoenzimático ELISA con la finalidad de analizar la reactividad de las 21 clonas de la tercera ronda, seleccionadas al azar, hacia el péptido A $\beta_{1-42}$  (Figuras 8 y 9).

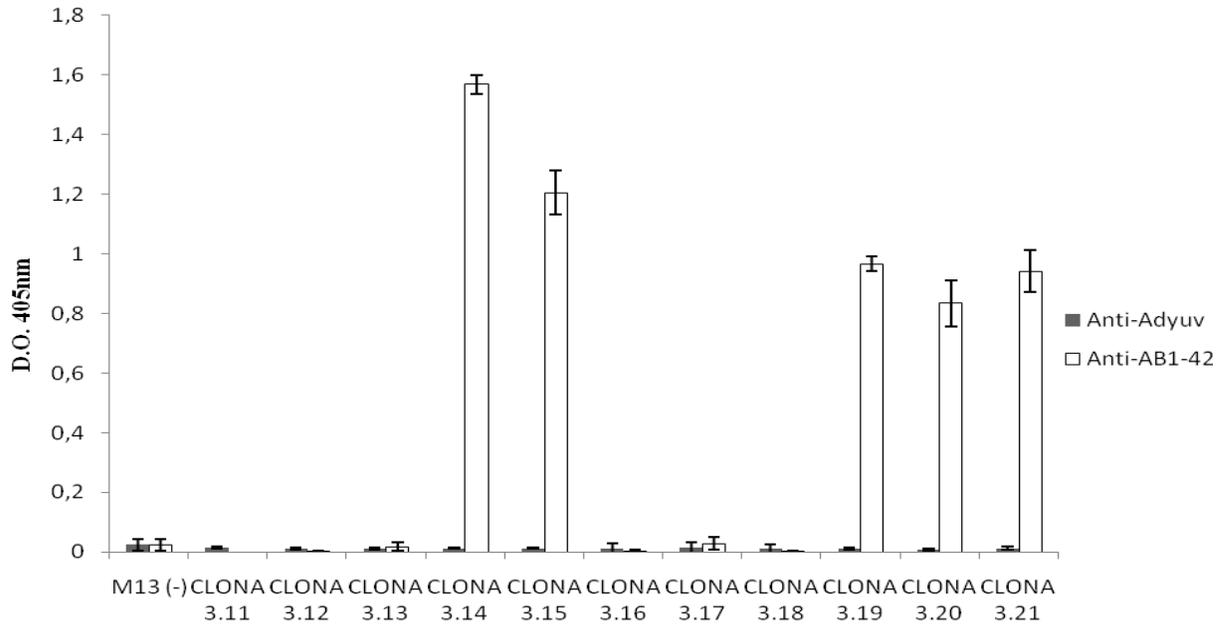
De las 21 clonas que fueron seleccionadas, 14 clonas resultaron positivas (C3.1, C3.2, C3.3, C3.5, C3.6, C3.7, C3.8, C3.9, C3.10, C3.14, C3.15, C3.19, C3.20, C3.21). Las 7 clonas restantes fueron negativas (C3.4, C3.11, C3.12, C3.13, C3.16, C3.17, C3.18).

### Reactividad de clonas seleccionadas con el suero anti- $A\beta_{1-42}$



**Figura 7.** Evaluación de la reactividad por ELISA de 10 de las 21 clonas de fagos individuales aisladas de la 3ª ronda de bioselección (Clonas 3.1-3.10). Se utilizó como control negativo el fago M13, y se leyó a 405nm.

### Reactividad de las clonas Anti- $A\beta_{1-42}$



**Figura 8.** Evaluación de la reactividad por ELISA de 10 de las 21 clonas de fagos individuales aisladas de la 3ª ronda de bioselección (Clonas 3.11-3.21). Se utilizó como control negativo el fago M13, y se leyó a 405nm.

## 5.5. SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS ANTI-A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Se llevó a cabo la purificación de ADN de cadena sencilla para después secuenciar cada una de las clonas aisladas. Se verificó la presencia de ADN de cadena sencilla de quince clonas individuales seleccionadas (catorce clonas positivas y una negativa como control) de las veintiuno, en un gel de agarosa al 0.8% en Buffer de TBE 1X con tinción de bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta.

Una vez que se verificó la presencia de ADN de cada una de las clonas, se secuenciaron por el método de Sanger en el gel de poliacrilamida utilizando un primer -28 y se obtuvo la secuencia de nucleótidos de cada una de las clonas (Tabla 6). Esta secuencia de nucleótidos fue leída en dirección de la cadena 5'→3' ya que fue esta la cadena que se sintetizó mediante el método de Sanger.

Clonas	Dirección	Secuencias						
Clona 1	(5'→3')	GAT	GCG	GAG	TTT	AGG	TGG	CCG
Clona 2	(5'→3')	GAT	GCG	TGG	TGG	CTT	CGG	TG*
Clona 3	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	ACT	CAT	GTT	GAT
Clona 5	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	TGG	GGG	TGG	TTG
Clona 6	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	TTT	AGT	CTT	TGG
Clona 7	(5'→3')	GAT	CTG	AGT	CGG	AAT	CCG	TGG
Clona 8	(5'→3')	GAT	GCG	GAG	TTT	AGG	TGG	CCG
Clona 9	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	AGT	TAT	TCT	CTG
Clona 10	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	TGG	GAT	GGT	TCT
Clona 11	(5'→3')	ATG	CCT	TTT	AAT	GTT	TCT	ATT
Clona 14	(5'→3')	GAT	GCG	GAG	TTT	AGG	CCG	CTT
Clona 15	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	TTT	CGT	ACT	GCT
Clona 19	(5'→3')	GAT	GCT	GAG	TGG	TAT	TCT	TAT
Clona 20	(5'→3')	GAT	GCT	GAT	GGG	GGT	TTT	TTT
Clona 21	(5'→3')	GAT	GCG	GAG	TTT	ACT	CAG	ATG

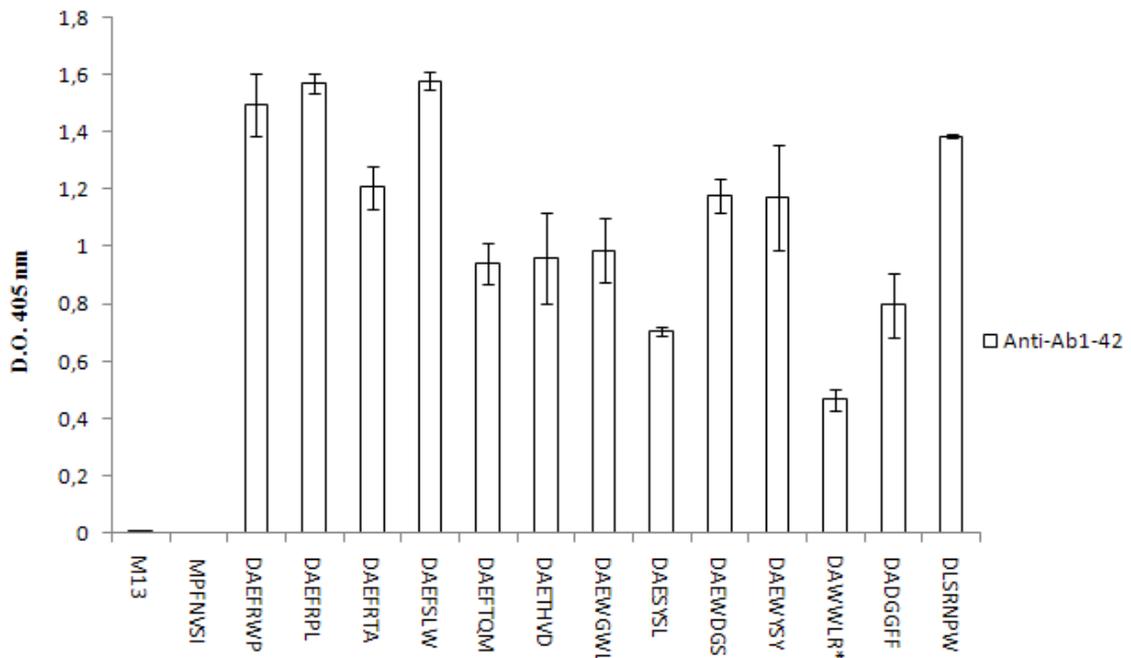
**Tabla 6.** Secuencia de nucleótidos de cada una de las 15 clonas seleccionadas. La lectura se realizó en dirección 5'→3'.

En la tabla 7 se indican las secuencias (ver apéndice C) de las clonas que se seleccionaron, así como sus frecuencias y los valores de densidad óptica a 405 nm resultado de la evaluación mediante ELISA con el suero anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

CLONA	SECUENCIA	FRECUENCIA	O.D. (405 nm)
M13			0.007 ± 0.006
1, 8	<b>DAEFRWP</b>	2	1.513 ± 0.038
14	<b>DAEFRPL</b>	1	1.569 ± 0.032
15	<b>DAEFRTA</b>	1	1.206 ± 0.073
6	<b>DAEFSLW</b>	1	1.579 ± 0.030
21	<b>DAEFTQM</b>	1	0.942 ± 0.070
3	<b>DAETHVD</b>	1	0.980 ± 0.073
5	<b>DAEWGWL</b>	1	1.068 ± 0.034
9	<b>DAESYSL</b>	1	0.631 ± 0.039
10	<b>DAEWDGS</b>	1	1.178 ± 0.062
19	<b>DAEWYSY</b>	1	0.967 ± 0.025
2	<b>DAWWLR*</b>	1	0.457 ± 0.029
20	<b>DADGGFF</b>	1	0.835 ± 0.077
7	<b>DLSRNPW</b>	1	1.386 ± 0.008
11	<b>MPFNVSI</b>	1	0.014 ± 0.004

**Tabla 7.** Secuencia de aminoácidos, frecuencia y reactividad en ELISA de las 15 clonas que fueron seleccionadas con el suero anti-A $\beta_{1-42}$ .

Se puede observar que en todas las clonas positivas el aminoácido ácido aspártico (D) se encuentra presente en el extremo amino. También es importante mencionar que la secuencia ac. aspártico (D), alanina (A) y ac. glutámico (E) se encuentran en diez de las catorce clonas positivas en el ensayo de ELISA contra el suero anti-A $\beta_{1-42}$ , por lo que se reafirma de que la región N-terminal del A $\beta$  es la región inmunodominante (ver figura 9). También se puede observar que la clona 3.11 con secuencia MPFNVSI que había dado negativa en el ensayo inmunoenzimático, no presenta similitud alguna respecto a la secuencia de aminoácidos del péptido A $\beta$ .



**Figura 9.** Reactividad por ELISA y secuencia de las clonas que se obtuvieron en la tercera ronda de bioselección con el suero anti- $A\beta_{1-42}$ . Se utilizó como control negativo al fago M13.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó un suero de conejo generado contra el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mediante la tecnología de despliegue en fago (Phage Display), con la finalidad de identificar los epítomos que pudieran ser de relevancia para la inmunoterapia de la EA.

Aplicando la tecnología de despliegue en fago (Phage Display) es posible identificar epítomos y/o mimótopos de nuestro interés, teniendo la ventaja de que una vez identificadas las clonas de fagos que expresan dichos epítomos y/o mimótopos se pueden amplificar en pocas horas mediante la infección de *E. coli*, facilitando su disponibilidad en grandes cantidades.

Mediante ensayos inmunoenzimáticos se conoció la reactividad de las clonas contra el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y se observó que el 66% (14 clonas) fueron positivas, mientras que el 33% (7 clonas) resultaron negativas.

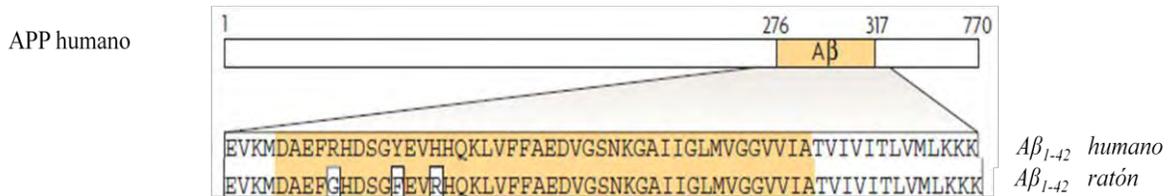
Se seleccionaron las quince clonas positivas y solo una negativa para ser secuenciadas y se observó que en las catorce clonas (100%) tienen aspartato (D) como aminoácido conservado y que en once clonas (78%) hay una región conservada DAE (aspartato (D), alanina (A) y glutamato (E)). En once clonas se observa el epítomo de DAE. Estos resultados demuestran que la región amino-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> es la región inmunodominante.

Los resultados obtenidos en ELISA con péptidos sintéticos también señalan la presencia de la región inmunodominante en la parte amino-terminal del péptido A $\beta$ , el suero reconoce A $\beta$ <sub>1-42</sub> y A $\beta$ <sub>1-16</sub>.

Los primeros inmunoterapéuticos que se desarrollaron para evitar el progreso de la EA en humanos fueron obtenidos de ratones inmunizados, utilizando como inmunógeno el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Vasilevko y Cribbs 2006). Los anticuerpos disminuyen la carga de placas en cerebro, evitando el desarrollo de la enfermedad, sin embargo dicho tratamiento se suspendió, debido a las respuestas inmunológicas asociadas a hemorragias e inflamación cerebral en los pacientes que recibieron la vacuna (Hock, *et al.*, 2003). Esto podría deberse

a que la secuencia del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> de humano difiere a la secuencia que tiene el modelo murino con el que se obtuvieron los anticuerpos específicos para beta-amiloide.

Se sabe que la mayoría de los anticuerpos con alta afinidad hacia el péptido A $\beta$  reconocen el motivo EFRH (Gevorkian *et al.*, 2004). En el modelo murino se presenta un cambio de aminoácido, arginina (R) por glicina (G) en la región amino terminal del péptido A $\beta$ , lo que podría disminuir la especificidad del anticuerpo (ver Figura 10).



**Figura 10.** Secuencias del péptido A $\beta$ . En esta imagen se compara la secuencia de aminoácidos entre el péptido A $\beta$  de humano y de ratón. Se observan tres cambios de aminoácidos en la región amino terminal del péptido. Modificado de Gotz e Ittner 2008.

La importancia de este trabajo radica en la caracterización de anticuerpos contra la región A $\beta$ <sub>1-42</sub> obtenido en conejo, en donde dicho modelo animal, expresa la misma secuencia de A $\beta$  que la de humano (Gotz e Ittner, 2008), por tal motivo es de gran importancia caracterizar los epítomos presentes en el péptido beta-amiloide con el fin de encontrar aquellos que sean relevantes en la agregación del mismo (Gevorkian *et al.*, 2004).

Dado lo anterior, es de gran interés estudiar si los anticuerpos dirigidos hacia la región de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, obtenidos en este trabajo, son capaces de ocasionar una respuesta inmunológica y analizar si tienen la capacidad de desagregar al péptido, sin ocasionar efectos secundarios en los pacientes con EA.

Las ventajas de utilizar como modelo animal el conejo, es que presentan una elevada concentración de A $\beta$  en cerebro, inmunoreactividad a la acumulación neuronal de A $\beta$ , presencia de placas extracelulares de A $\beta$ , elevada concentración de colesterol en el cerebro, inmunoreactividad de apolipoproteína E, daño en la barrera hematoencefálica, microgliosis y pérdida neuronal, siendo un modelo muy útil para el estudio de la EA (Gotz e Ittner, 2008)

## 7. CONCLUSIONES

Se caracterizó un suero policlonal de conejo contra el péptido A $\beta$ 1-42 mediante dos métodos.

Utilizando péptidos sintéticos, se demostró en ELISA que este suero reconoce la parte amino-terminal del péptido A $\beta$ 1-42.

Mediante el uso de bibliotecas de péptidos expresados en fago filamentoso, se seleccionaron 15 clonas positivas y se identificaron catorce secuencias homólogas a la región N-terminal del péptido A $\beta$ 1-42.

## 8. PERSPECTIVAS

Analizar *in vivo* e *in vitro* si los anticuerpos que se generaron contra estas secuencias son capaces de inhibir o desagregar el péptido A $\beta$  o neutralizar el efecto neurotóxico.

Estudiar o evaluar las propiedades inmunogénicas de epítomos identificados en ratones o conejos con el fin de desarrollar moléculas capaces de inducir respuesta inmune protectora en la EA.

## APÉNDICE A: REACTIVOS

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

**BSA.-** Bovine Serum Albumine (Albúmina Serica Bovina)

**IPTG.-** (isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida). Induce la actividad de beta-galactosidasa, una enzima que promueve la utilización de la lactosa, inhibiendo el represor de Lac. IPTG es utilizado para inducir la expresión del gene de lacZ en experimentos de reproducción.

**PBS.-** Phosphate Buffer Saline (Buffer salino de fosfatos)

**PEG.-** Polietilenglicol)

**TBS.-** Tris Buffer Saline

**X-Gal.-** (5-Bromo-4-Cloro-3-Idoly-2-D-Galactopyranoside). Es utilizado como sustrato para la detección de  $\beta$ -galactosidasa el cual produce un color azul claro. Se utiliza conjuntamente con IPTG para distinguir bacterias recombinantes con el genotipo de Lac<sup>+</sup>. También se utiliza para reportar la selección de la actividad del gene de  $\beta$ -galactosidasa en la transfección de células eucariotas.

## APÉNDICE B: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

### LB (Luria Bertani) 1L

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

### Top Agar 1L

Bacto Tryptone	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1g
Agarosa	7g

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

### Medio 2XYT 1L

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

### Buffer Salino de Fosfatos PBS 10X

NaCl	80g	1.37M
KCl	2g	0.027M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4g	1M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4g	0.01M

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a 1 litro

### **Buffer de carbonatos 0.05M, pH 9.6**

Solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> aforar a 200 ml	31.8 mg	0.05M
Solución de NaHCO <sub>3</sub>	21 mg	0.05M

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 9.6 aforando a 500ml

### **PEG/NaCl (8000)**

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

### **TBS (Tris Buffer Saline)**

Tris-HCl pH 7.5	50mM
NaCl	150mM

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente

### **Buffer de Yoduro**

Tris-HCl pH 8.0	10mM
EDTA	1mM
NaCl	1mM

Proteger de la luz a temperatura ambiente

### **X-Gal/IPTG**

X-Gal	1g
IPTG	1.25g
Dimetil formamida	25ml

Mantener a -20°C

### **TBE 1L**

Tris-HCl	54g
Ácido Bórico	27.5g
EDTA	20ml

### **Gel de Agarosa 0.8%**

TBE	100ml
Agarosa	0.8g

### **Gel de poliacrilamida al 8% (Gel de Secuencia)**

Urea	39.6g
H2O miliQ	18.4ml
Acrilamida/Bisacrilamida	16ml

## **APÉNDICE C: CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON BASE EN SUS GRUPOS R**

### **1.- ALIFÁTICOS NO POLARES:**

**G.-** Glicina (Gly)

**A.-** Alanina (Ala)

**P.-** Prolina (Pro)

**V.-** Valina (Val)

**L.-** Leucina (Leu)

**I.-** Isoleucina (Ile)

**M.-** Metionina (Met)

### **2.- AROMÁTICOS:**

**F.-** Fenilalanina (Phe)

**Y.-** Tirosina (Tyr)

**W.-** Triptófano (Trp)

### **3.- POLARES SIN CARGA**

**S.-** Serina (Ser)

**T.-** Treonina (Thr)

**C.-** Cisteína (Cys)

**N.-** Asparagina (Asn)

**Q.-** Glutamina (Gln)

### **4.- CON CARGA POSITIVA**

**K.-** Lisina (Lys)

**H.-** Histidina (His)

**R.-** Arginina (Arg)

### **5.- CON CARGA NEGATIVA:**

**D.-** Ácido Aspártico o aspartato (Asp)

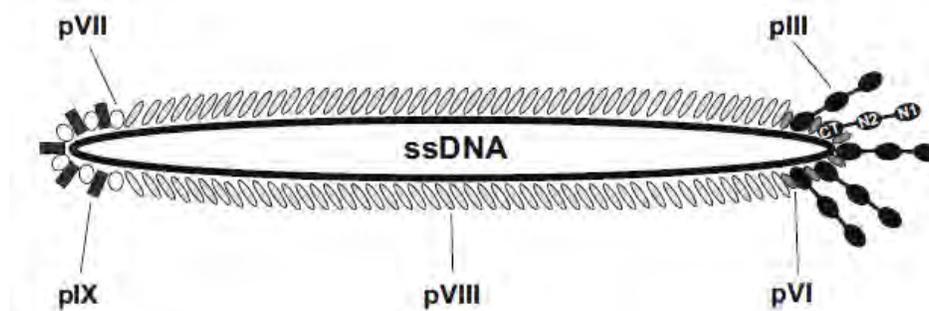
**E.-** Ácido glutámico o glutamato (Glu)

## APÉNDICE D: TECNOLOGÍA DE DESPLIEGUE EN FAGO (PHAGE DISPLAY)

El término phage display es una técnica útil de bioselección *in vitro* la cual nos permite la expresión de uno o un conjunto de péptidos o proteínas fusionadas genéticamente a una de las proteínas de superficie de un bacteriófago o fago filamentoso, el resultado de esta fusión es el despliegue del péptido o proteína en el exterior del fago mientras que el DNA que codifica para tal fusión se encuentra dentro del mismo fago que lo expresa. Esta fusión junto con la ventaja de manipularla *in vitro* e *in vivo*, permiten la generación rápida de moléculas ligando desplegados en los fagos con altas afinidades de unión. Los fagos filamentosos que se han estudiado principalmente son el fl, fd y M13, este último utilizado en este trabajo. La tecnología del phage display se ha convertido en una alternativa importante en el hallazgo y producción de agentes preventivos y terapéuticos (Webster, 2001).

El bacteriófago M13 perteneciente al género *Inovirus* es el comúnmente utilizado en los procesos del phage display es específico para *Escherichia coli*; generalmente los fagos filamentosos tiene un tamaño de ~6.5 nm de diámetro y ~930 nm de longitud. La masa total de la partícula del fago está constituida en 87% de proteína. El genoma está constituido por una molécula de DNA de cadena sencilla y covalentemente cerrada de cerca de 6,400 nucleótidos. El DNA del fago se encuentra empaquetado en un cilindro flexible de proteínas. Estas proteínas han sido denominadas: proteína pVIII que es la proteína principal de la cápside con 2,700 copias por partícula de fago, las proteínas pVII que cuenta con cinco copias en cada uno de los extremos del fago y las proteínas pIII y pVI con 4 o 5 copias cada una expresadas en el otro extremo del fago. El ADN se encuentra orientado dentro del virión por una región hairpin de 78 nucleótidos conocida como señal de empaquetamiento (PS) la cual siempre se localiza en el extremo del fago donde se encuentran las proteínas pVII y pIX (Paschke 2006) (Ver figura 6).

Los fagos filamentosos necesitan de algún tipo de bacterias que expresen pili para poder realizar el proceso de infección, estos bacteriófagos utilizan el pili de la bacteria como un receptor y la poderosa ventaja es que estos fagos como el M13, a diferencia de los fagos líticos, no matan ni lisan a sus hospederos.



**Figura 10.** Esquema que muestra la estructura del bacteriófago M13 en donde se muestran las estructuras proteínicas que lo conforman. La proteína o péptido se pega sobre la superficie del virus como fusión a la proteína pIII.

Se sabe que hay un brote de cerca de 1,000 partículas de fagos producidas en la primera generación después de la infección, y luego las bacterias producen cerca de 100 a 200 partículas por generación. Este proceso continúa durante varias generaciones, resultando en títulos de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  partículas por ml. Posterior a los pasos de infección, replicación, amplificación y purificación, las partículas de fagos son sometidas a un proceso clave dentro de la metodología del phage display: la bioselección o biopanning (Santamaría, 2003).

Durante la bioselección se prueba la afinidad de unión y reconocimiento de los fagos hacia moléculas blanco, este proceso clave se realiza generalmente de tres a cuatro veces (rondas) con la finalidad de asegurar y mejorar la especificidad de las clonas de los fagos seleccionados desde la primera ronda y por lo tanto, enriquecer la población de fagos específicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alberca R, López-Pousa S. 1998. Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias. Ed. Médica Panamericana, España.
- Bar-Am O, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. 2005. Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *FASEB J* 19(13):1899-901.
- Behrens PM, Vergara EF. 2007. [One hundred years of Alzheimer's disease: immunotherapy a hope?]. *Rev Med Chil* 135(1):103-10.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. 2003. Amyloid beta -protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):330-5.
- Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF and others. 2005. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci* 25(34):7709-17.
- Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. 2005. Age- and region-dependent alterations in A $\beta$ -degrading enzymes: implications for A $\beta$ -induced disorders. *Neurobiol Aging* 26(5):645-54.
- Caughey B, Lansbury PT. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267-98.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC and others. 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48(6):913-22.
- Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5(9):677-85.
- Clementi ME, Pezzotti M, Orsini F, Sampaolese B, Mezzogori D, Grassi C and others. 2006. Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) induces cell death in human neuroblastoma via bax/bcl-2 ratio increase: an intriguing role for methionine 35. *Biochem Biophys Res Commun* 342(1):206-13.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277(35):32046-53.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST and others. 2007. A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282(15):11590-601.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M and others. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503):2112-7.
- Fillenbaum GG, van Belle G, Morris JC, Mohs RC, Mirra SS, Davis PC and others. 2008. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): the first twenty years. *Alzheimers Dement* 4(2):96-109.
- Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez FF. 2002. [Alzheimer disease]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 59(1):13-38.
- Goedert M, Spillantini MG. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314(5800):777-81.
- Götz J, Ittner L. 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 532-544.
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC. 2001. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 125(4):489-92.

- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):101-12.
- Hellstrom-Lindahl E, Ravid R, Nordberg A. 2008. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels. *Neurobiol Aging* 29(2):210-21.
- Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC. 2005. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci* 8(4):527-33.
- Hock C, Maddalena A, Raschig A, Muller-Spahn F, Eschweiler G, Hager K and others. 2003. Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid* 10(1):1-6.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA and others. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13(2):159-70.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP and others. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55(3):306-19.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8(7):499-509.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A and others. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440(7082):352-7.
- Levitan D, Lee J, Song L, Manning R, Wong G, Parker E and others. 2001. PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21):12186-90.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W and others. 2008. Lipids revert inert A beta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* 27(1):224-33.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000):631-9.
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:81-104.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J and others. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408(6815):982-5.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P and others. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283(12):1571-7.
- Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. 2006. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 7:74.
- Nunan J, Small DH. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483(1):6-10.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L. 2006. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):768-73.
- Paschke M. 2006. Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 70(1):2-11.
- Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R and others. 2005. beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280(40):34186-92.
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. 2003. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23(13):5531-5.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A and others. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28(53):14537-45.
- Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lipka C, Lannfelt L and others. 2000. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 405(6786):531-2.

- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T and others. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400(6740):173-7.
- Schenk D, Hagen M, Seubert P. 2004. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16(5):599-606.
- Solorzano-Vargas RS, Vasilevko V, Acero G, Ugen KE, Martinez R, Govezensky T and others. 2008. Epitope mapping and neuroprotective properties of a human single chain FV antibody that binds an internal epitope of amyloid-beta 1-42. *Mol Immunol* 45(4):881-6.
- St George-Hyslop PH, Petit A. 2005. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol* 328(2):119-30.
- Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A and others. 2002. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 277(42):39062-5.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H and others. 2002. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 161(5):1869-79.
- Vasilevko V, Cribbs DH. 2006. Novel approaches for immunotherapeutic intervention in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 49(2):113-26.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P and others. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735-41.
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A and others. 1999. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274(36):25945-52.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101(5):1172-84.
- Wolfe MS. 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* 1(11):859-66.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919(1):115-21.
- Younkin SG. 1998. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92(3-4):289-92.
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A and others. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407(6800):48-54.