



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE EPÍTOPOS/MIMÓTOPOS  
DE LOS PÉPTIDOS AMILOIDES  
AMINOTRUNCADOS PARA EL TRATAMIENTO DE  
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**MELISSA ELIZARRARÁS BERMÚDEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GOHAR GEVORGYAN  
2014**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *HOJA DE DATOS DEL JURADO*

1. Datos del alumno  
Elizarrarás  
Bermúdez  
Melissa  
55660383  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307626550
2. Datos del tutor  
Doctor  
Gohar  
Gevorgyan  
Markosian
3. Datos del sinodal 1  
Doctor  
Luisa Alvarina  
Alba  
Lois
4. Datos del sinodal 2  
Doctor  
Enrique  
Ortega  
Soto
5. Datos del sinodal 3  
M. en C.  
Alfonso José  
Vilchis  
Peluyera
6. Datos del sinodal 4  
Doctor  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe
7. Datos del trabajo escrito  
Caracterización de epítomos/mimótopos de los péptidos amiloides  
aminotruncados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer  
65p  
2014

## *DEDICATORIA*

A Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida profesional.

A mi mamá por ser la persona más importante en mi vida, que ha hecho todo lo posible para que yo logre mis metas y por demostrarme que todo se puede hacer en esta vida si en verdad se quiere; y por ser la más interesada en que terminara esta tesis.

A mis abuelitos que aunque ya no están conmigo fueron muy importantes para convertirme en la persona que soy hoy.

A mis padrinos que siempre me han apoyado, gracias por todo lo que me han dado.

A mi familia que la quiero mucho y que a pesar de que nos separe una distancia física sigamos unidos como siempre.

A mis amigos con los cuales he crecido como persona y con los cuales me he divertido mucho durante los años que llevo de conocerlos. En especial a: José Luis que has estado conmigo en todos los momentos buenos y malos, a Gabo que aunque no puedes ser mi psicólogo estrictamente, siempre has sido un gran apoyo y escuchas todas las tonterías que puedo decir, y a mis amigas Martha y Valeria por ser las amigas a las cuales siempre puedo recurrir para contarles todas mis cosas.

## *AGRADECIMIENTOS*

A la Dra. Gohar Gevorgyan por su apoyo y enseñanza durante mi taller y por permitirme realizar esta tesis en su laboratorio.

Al Biól. Exp. Gonzalo Acero por su gran ayuda e instrucción en el trabajo experimental y en la asesoría y revisión del trabajo escrito.

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

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

A mi jurado que con sus correcciones y preguntas me ayudaron a tener otras perspectivas.

A Gonzalo pingüico por tu gran ayuda, que si no fuera por ti esta tesis hubiera sido mucho más complicada. Por esas pláticas intensas en la cuales arreglábamos al mundo o por lo menos a México jaja. Pero sobretodo por tu inmensa paciencia y habilidad para enseñar.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Elizabeth, Emilia, Fernando, Mariana, Monserrat, Myriam, Paulina, Roxana, Susana y Yessica. Por su ayuda, consejos y los buenos momentos que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis profesores que tuve durante mi carrera que de una y otra manera contribuyeron para que ahora realice este trabajo.

A mis amigos de la carrera que me enseñaron muchas cosas y de los cuales me llevo muy bonitos recuerdos.

*El experimentador que no sabe lo que está buscando  
no comprenderá lo que encuentra.*

*Claude Bernard*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>DEMENCIA</b> .....	<b>6</b>
<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>6</b>
<b>IMPACTO SOCIAL Y ECONÓMICO</b> .....	<b>7</b>
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b> .....	<b>9</b>
<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b> .....	<b>9</b>
<b>DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>11</b>
<b>ETIOLOGÍA</b> .....	<b>13</b>
<b>FACTORES DE RIESGO (genéticos)</b> .....	<b>13</b>
<b>OTROS FACTORES DE RIESGO</b> .....	<b>14</b>
<b>TRATAMIENTO</b> .....	<b>15</b>
<b>NEUROPATOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
<b>PROCESAMIENTO DE APP/FORMACIÓN DE <math>\beta</math>-AMILOIDE</b> .....	<b>20</b>
<b>VARIANTES AMINO TRUNCADAS Y MODIFICADAS: <math>\beta</math>A<sub>11-42</sub> y el <math>\beta</math>A p(E)<sub>11-42</sub></b> .....	<b>22</b>
<b>INMUNOTERAPIA</b> .....	<b>23</b>
<b>MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA EN LA REDUCCIÓN DE <math>\beta</math>A<sub>25</sub></b> <b>DESPLIEGUE EN FAGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>27</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>28</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>30</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>31</b>
<b>EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA MEDIANTE ELISA</b> .....	<b>31</b>
<b>EVALUACIÓN DE LOS SUEROS ANTI-<math>\beta</math>Ap(E)<sub>11-42</sub> Y ANTI-<math>\beta</math>A<sub>11-42</sub> MEDIANTE</b> <b>WESTERN BLOT</b> .....	<b>32</b>
<b>MAPEO DE EPÍTOPOS</b> .....	<b>32</b>
<b>BIOSELECCIÓN (Esquema: Apéndice 1)</b> .....	<b>32</b>
<b>AMPLIFICACIÓN DE LOS FAGOS ELUIDOS</b> .....	<b>33</b>
<b>PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO</b> .....	<b>33</b>
<b>TITULACIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>SELECCIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES</b> .....	<b>34</b>
<b>TITULACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES</b> .....	<b>35</b>
<b>EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA</b> .....	<b>35</b>
<b>SECUENCIACIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA MEDIANTE ELISA</b> .....	<b>37</b>
<b>EVALUACIÓN DE SUEROS MEDIANTE WESTERN BLOT</b> .....	<b>38</b>
<b>MAPEO DE EPÍTOPOS</b> .....	<b>40</b>
<b>BIOSELECCIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>SELECCIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES</b> .....	<b>40</b>
<b>EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES MEDIANTE ELISA</b> .....	<b>40</b>
<b>SECUENCIACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES</b> .....	<b>42</b>

ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	43
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>APÉNDICES.....</b>	<b>50</b>
<b>APÉNDICE 1. ESQUEMA DE BIOSELECCIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>APÉNDICE 2. BACTERIÓFAGO M13.....</b>	<b>50</b>
<b>APÉNDICE 3. PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS.....</b>	<b>51</b>
<b>PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>54</b>

## *INDICE DE FIGURAS Y TABLAS*

### FIGURAS

Figura 1. Número de personas con demencia en el año 2050.

Figura 2. Comparación de cerebro sano y enfermo.

Figura 3. Caracterización inmunohistoquímica de los principales marcadores neuropatológicos de la EA.

Figura 4. A) Esquema del procesamiento de APP. B) Secuencia del péptido  $\beta$ A.

Figura 5. Mecanismos de acción de la inmunoterapia en la reducción de  $\beta$ A.

Figura 6. Reactividad cruzada del suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>. Evaluación mediante ELISA.

Figura 7. Reactividad cruzada del suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>. Evaluación mediante ELISA.

Figura 8. Evaluación del suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> mediante Western blot.

Figura 9. Evaluación del suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> mediante Western blot.

Figura 10. Evaluación de clonas bioseleccionadas por anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> mediante ELISA.

Figura 11. Evaluación de clonas bioseleccionadas por anticuerpos anti  $\beta$ A<sub>11-42</sub> mediante ELISA.

Figura 12. Secuencia completa del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>.

### TABLAS

Tabla 1. Criterios para definir el diagnóstico de la EA.

Tabla 2. Medicamentos más usados en el tratamiento de la EA.

Tabla 3. Ensayos clínicos en humanos.

Tabla 4. Título de fagos por ronda de bioselección.

Tabla 5. Secuenciación de las clonas reconocidas por los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>.

Tabla 6. Secuenciación de las clonas reconocidas por los anticuerpos anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>.

Tabla 7. Epítomos y mimótopos del péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>.

Tabla 8. Epítomos y mimótopos del péptido  $\beta$ A<sub>11-42</sub>.



## ABREVIATURAS

ABREV.	SIGNIFICADO
ADI	Alzheimer's Disease International
APH-1	Anterior Pharynx-defective
Apo E	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Amiloide
$\beta$ A	Beta-amiloide
CAA	Angiopatía Amiloide Cerebral
COX	Ciclooxigenasa
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
IRM	Imagen por Resonancia Magnética
MNFs	Marañas Neurofibrilares
NIA	National Institute of Aging
NIH	National Institutes of Health
NMDA	N-metil-D-Aspartato
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
p(E)	Piroglutamato
PBS	Buffer de fosfatos salino
PEG	Polietilenglicol
PEN-2	Presenilina enhancer-2
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
Pfu/ml	Unidades formadoras de placa por mililitro
PIB	Producto Interno Bruto
PNR	Péptido no relacionado
PS	Presenilina
QC	Glutaminil ciclasa
TAC	Tomografía Computarizada
TBS	Tris buffer salina

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, que causa el deterioro progresivo de las funciones cognitivas incluyendo una severa pérdida de la memoria, trastornos conductuales, pérdida de habilidades intelectuales y eventualmente produce la muerte. Es la causa más común de demencia en los adultos mayores, representando del 60% al 70% de los casos. En el año 2010 se estimó que habían 36 millones de personas con demencia en el mundo y se prevé que esta cifra se duplique cada 20 años por lo que aumentaría a 66 millones en 2030 y a 115 millones en 2050.

Existe información contradictoria sobre las causas de la enfermedad, y el diagnóstico confirmatorio se basa en exámenes post-mortem que muestran dos marcadores neuropatológicos: depósitos y agregados extracelulares del péptido  $\beta$ A, a los que se le conoce como placas amiloides, y las marañas neurofibrilares intracelulares, conformadas por agregados de la proteína Tau anormalmente hiperfosforilada.

El péptido  $\beta$ A es un fragmento de longitud variable que proviene de un precursor proteico conocido como Proteína Precursora Amiloide. Las principales variantes del péptido  $\beta$ A son el  $\beta$ A<sub>1-40</sub> y el  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, aunque recientemente se ha reportado que los péptidos aminotruncados ( $\beta$ A<sub>8-42</sub>,  $\beta$ A<sub>11-42</sub>,  $\beta$ A<sub>17-42</sub>, etc.), son más amiloidogénicos que las variantes de longitud completa.

Existen variantes que presentan una modificación post-traducciona l en la cual se lleva a cabo la ciclación del glutamato del extremo N-terminal, a estas variantes se les conoce como modificadas o piroglutamadas. Estudios enzimáticos señalan que esta modificación le otorga al péptido resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares. En los últimos años el estudio de estas variantes se ha vuelto muy importante para desarrollar estrategias inmunoterapéuticas contra la EA.

En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación y caracterización de epítomos/mimótopos de las variantes  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y  $\beta$ A<sub>11-42</sub> mediante la técnica de despliegue en fagos utilizando sueros policlonales de ratón: anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> y anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, respectivamente. Se identificaron epítomos lineales con secuencias similares a la región central del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, lo que explica el reconocimiento de las cuatro variantes por los anticuerpos presentes en los sueros, y una serie de mimótopos de epítomos conformacionales. Estos resultados son de gran importancia para poder desarrollar mejores estrategias inmunoterapéuticas, como vacunas basadas en los epítomos que reconozcan a más variantes y tengan una mayor eficacia.

## **INTRODUCCIÓN**

### **DEMENCIA**

La demencia es un síndrome, causado generalmente por enfermedades progresivas, que afecta la memoria, el pensamiento, el comportamiento, el lenguaje, el juicio y la habilidad de realizar las actividades de la vida diaria [Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012]. Los síntomas de la demencia son percibidos de diferentes maneras en distintas partes del mundo; esto incluye considerar a la demencia como parte normal del envejecimiento, una enfermedad mental o una enfermedad irreversible en el cerebro y sin tratamiento.

La OMS (2012) revela que aunque la demencia afecta principalmente a personas mayores de 65, ésta no constituye una consecuencia normal del envejecimiento y cada vez hay más casos que se presentan antes de los 65 años. Este síndrome es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en el mundo entero; tiene un impacto físico, psicológico, social y económico en los cuidadores, en las familias y en la sociedad.

Existen varios tipos de demencia que incluyen: la demencia vascular, la demencia frontotemporal, la demencia por cuerpos de Lewy; sin embargo, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las demencias representando del 60% al 70% de los casos. Los límites entre los distintos tipos son difusos y frecuentemente coexisten formas mixtas (OMS, 2012). Cualquier tipo de demencia es devastadora para el enfermo y sus familiares. Aunque no se puede alterar el curso progresivo de la enfermedad, existen tratamientos contra los síntomas que pueden ayudar a los enfermos, familiares y cuidadores a sobrellevar la enfermedad por un tiempo limitado.

### **EPIDEMIOLOGIA**

En el año 2010 se estimó que habían 36 millones de personas con la EA en el mundo (0.5% de la población mundial), de las cuales un poco más de la mitad (58%) vivían en países de ingresos bajos y medios. Esta cifra de personas con demencia, se prevé que se duplique cada 20 años por lo que aumentaría a 66 millones en 2030 y a 115 millones en 2050 (Figura 1) (Batsch, Mittelman y Alzheimer's Disease International [ADI], 2012). La mayor parte del aumento es atribuible al incremento de la cantidad de personas con demencia en los países de ingresos bajos y medios (Figura 1). En 2010 las personas con demencia en países de ingresos bajos y medios era el

57.7%, proporción que se espera incremente a 63.4% en 2030 y a 70.5% en 2050 (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2013).

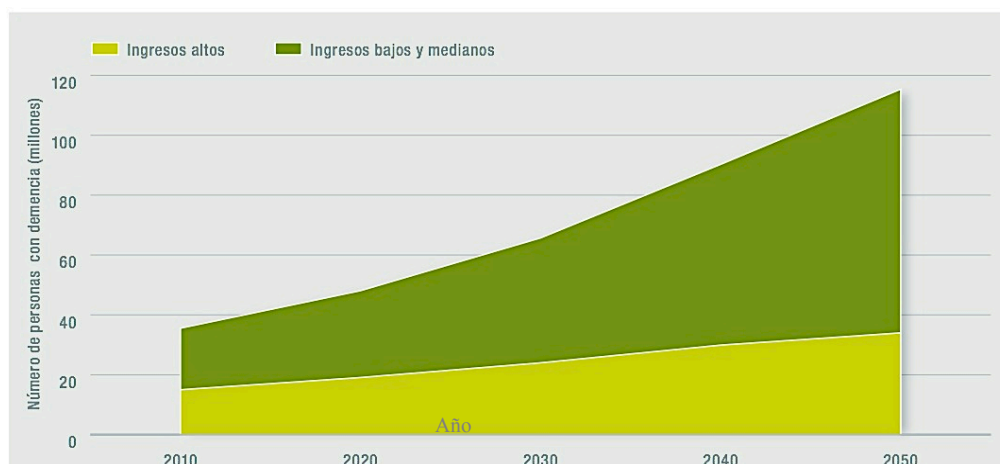


Figura 1. Crecimiento del número de personas con la EA en países con diferentes ingresos. Tomada de OPS, 2013.

### IMPACTO SOCIAL Y ECONÓMICO

Cualquier tipo de demencia acorta la vida de los que padecen este síndrome. Uno de los mejores estudios en la materia, estimó que la supervivencia media en la EA es 7.1 años (Fitzpatrick, et al., 2005); aunque existe mucha variabilidad individual en torno a estas estimaciones promedio. Es difícil evaluar la contribución independiente de la demencia a la mortalidad debido a que las actas de defunción son poco fiables, ya que raramente se considera a la demencia como la causa principal de muerte. Por consiguiente, existen diferentes cifras de mortalidad de acuerdo a la fuente consultada. Según estimaciones de la OMS, las demencias, incluida la EA, causan cada año en el mundo 276.000 fallecimientos de los cuales 93.000 son hombres y 183.000 son mujeres. Estas patologías representan el 0.5% del total de las causas de mortalidad (Ramos et al, 2007). Según estimaciones del informe de Carga Mundial de Morbilidad en países de ingresos altos las muertes equivalen al 4.0% (275.000) esto ocurre en personas de 60 años o más, en países de ingresos medianos altos equivale al 0.6% de las muertes (19.000), en países con ingresos medianos bajos equivale al 0.6% (72.000), y en países de ingresos bajos el 1.3% (111.000); llegando a un total de 477.000 muertes anuales a nivel mundial (Global Burden of Disease, 2004).

Debido a que alrededor del 0.5% de la población mundial vive con algún tipo de demencia, este síndrome tiene importantes repercusiones sociales y económicas. Todas las personas que padecen este síndrome necesitan cuidados que van desde supervisar el comportamiento y las acciones realizadas en la vida diaria, hasta cuidado de tiempo completo. Por lo tanto, la economía de esas personas y sus familiares se ve seriamente

afectada. Para saber qué tanto afecta socialmente este padecimiento ADI realizó varios estudios y en el año 2010 Wimo y Prince reportaron que el costo total de la demencia para la sociedad a nivel mundial se estimó en US\$ 604,000 millones. Esto equivale al 1% del producto interno bruto (PIB) mundial, o al 0,6% si sólo se tienen en cuenta los costos directos (atención médica y social); esto sin tomar en cuenta los costos indirectos (cuidados no remunerados por familiares y amigos) que en países de ingresos medianos supone un mayor costo. Con estos valores se pone en manifiesto el enorme impacto que tiene la demencia en las condiciones socioeconómicas mundiales.

En México, según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) en el año 2010 en México más de 350,000 personas están afectadas por la EA y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes. Se estima que uno de cada tres enfrentará esta enfermedad en algún ser querido o en un familiar.

## ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, dependiente de la edad, que causa el deterioro progresivo de las funciones cognitivas incluyendo una severa pérdida de la memoria, trastornos conductuales, pérdida de habilidades intelectuales y eventualmente produce la muerte. Es la segunda enfermedad causante de dependencia en adultos mayores, sólo después de la ceguera (ADI, 2009).

La EA progresa lentamente y se caracteriza por la dificultad para aprender y retener información nueva pero con una atención normal. Conforme avanza la enfermedad, los pacientes tienen dificultad para recordar hechos recientes, la orientación visoespacial se ve afectada al igual que el lenguaje y pierden la capacidad para realizar actos voluntarios ya aprendidos (Ramos et al., 2007).

De acuerdo con la edad de aparición, la EA se puede clasificar en familiar (de aparición temprana si aparece antes de los 60-65 años) y esporádica (de inicio tardío si aparece después de esa edad (ADI, 2009).

A pesar de que la mayoría de los casos de la EA son esporádicos (95%), resultado de múltiples factores ambientales y tal vez predisposiciones genéticas, existen casos familiares causados por diferentes mutaciones genéticas con un patrón de herencia autosómico dominante (Rosenberg, 2000).

Los casos familiares o de inicio temprano de la EA se relacionan generalmente con la mutación de tres genes: el precursor de la proteína amiloide (APP) en el cromosoma 21q, el gen presenilina (PS) 1 en el cromosoma 14q y el gen PS2 en el cromosoma 1q (Pérez-Tur, 2000).

Los casos esporádicos o de inicio tardío de la EA se relacionan principalmente con el gen de la apolipoproteína E (apo E) en el cromosoma 19, el cual tiene tres alelos apoE2, apoE3 y apoE4 (Rosenberg, 2000). La frecuencia de la variante apoE-ε4 está aumentada en la EA esporádica o de inicio tardío (Saunders, 1993). A su vez, la frecuencia de la variante apoE-ε2 está disminuida (Schachter, 1994).

Los casos familiares relacionados con mutaciones en genes específicos podrían arrojar información sobre la etiología de la forma esporádica abundante; aunque actualmente se considera que no es exactamente la misma enfermedad, pruebas relacionadas con esos genes podrían ser útiles en la predicción y diagnóstico de la EA.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas característicos de la EA son: pérdida de memoria y de las habilidades de lenguaje (dificultad para encontrar los nombres de las palabras),

alteraciones del pensamiento abstracto, juicio pobre, desorientación en lugar, tiempo y persona, cambios en el estado de ánimo, trastornos de personalidad y de conducta. El resultado general es un notorio decaimiento en las actividades personales y el desempeño en el trabajo (INNN, 2010). Los trastornos afectivos y de conducta pueden ser muy variados: depresión (algunos estudios muestran que hasta un 30-50% de los pacientes presenta depresión en el inicio de la enfermedad), agitación, agresividad, y comportamiento y lenguaje sexual inapropiado. Cuando la enfermedad está avanzada los pacientes pueden padecer mioclonías, convulsiones y mutismo. La muerte suele ser a consecuencia de infecciones sistémicas relacionadas con la grave incapacidad (Ramos et al., 2007).

Los síntomas clínicos que presenta la EA son los llamados “cuatro A” (Ramos et al. 2007):

1. Amnesia: pérdida de memoria; al comienzo hechos recientes y luego más lejanos o remotos.
2. Agnosia: pérdida total o parcial de la capacidad de reconocimiento de objetos; aunque exista el recuerdo en alguna modalidad sensorial o conceptual aislada.
3. Apraxia: incapacidad de realizar una función motora ya aprendida incluso cuando aún no existe una debilidad motora.
4. Afasia: incapacidad de llamar por su nombre los objetos familiares tales como ropa, llaves, etc..

Los síntomas antes mencionados se pueden observar en tres etapas (Alz.org, 2014; OMS, 2012):

1. **Etap a leve o temprana:** a menudo pasa desapercibida o es catalogada de forma incorrecta, al considerar los síntomas como algo normal de la vejez. Los cambios pueden empezar 20 años antes del diagnóstico ya que el inicio es paulatino. Los problemas que se presentan incluyen: pérdida de la memoria continua, pérdida de la noción del tiempo, desubicación espacial (incluso en lugares conocidos), entre otros.
2. **Etap a moderada o intermedia:** a medida que la EA progresa hacia la etapa intermedia, los signos y síntomas se vuelven más evidentes y más limitadores. Esta etapa dura de 2 a 10 años y es cuando se diagnostica la enfermedad. Las áreas del cerebro afectadas en esta fase controlan el lenguaje, el razonamiento, el pensamiento consciente y el procesamiento sensorial.

3. **Etapa severa o tardía:** es la última etapa de la enfermedad. La dependencia y la inactividad son casi totales. Las alteraciones de la memoria son graves y los síntomas y signos físicos se hacen más evidentes. Esta etapa puede durar 1 a 5 años. Hay muerte de gran número de neuronas (figura 2), lo que causa la pérdida de habilidades de la comunicación, hay poco o nulo reconocimiento de familiares y no pueden cuidarse a sí mismos.



Figura 2. Comparación de cerebro sano (izquierda) y cerebro en etapa avanzada de la EA (derecha). Tomada y modificada de [www.alz.org/](http://www.alz.org/).

La rapidez con la que progresa la EA varía considerablemente entre cada paciente. Las personas que padecen la enfermedad viven un promedio de ocho años, aunque algunas personas pueden vivir hasta 20. Por lo tanto, la afectación depende en parte de la edad de la persona al momento del diagnóstico y de la existencia de otras condiciones médicas como su condición física o su estilo de vida.

## DIAGNÓSTICO

Existen tres niveles de certeza diagnóstica: posible, probable y definitiva (Ramos et al., 2007).

El diagnóstico definitivo de la EA ocurre únicamente después de la muerte del paciente. Se hace relacionando la historia clínica del enfermo con un examen de los tejidos cerebrales durante la autopsia (Ramos et al., 2007; National Institutes of Health [NIH], 2010).

Actualmente existen varios métodos y herramientas que ayudan a los médicos a determinar con bastante precisión si una persona que está teniendo problemas de la memoria “posiblemente tiene Alzheimer” (la demencia puede ser debida a otra causa) o “probablemente tiene Alzheimer” (no se encuentra otra causa que explique la demencia) (NIH, 2010). Los criterios para ambos diagnósticos se detallan en la tabla 1.



**Tabla 1. Criterios para definir el diagnóstico de la EA. Tomada y modificada de Ramos et al., 2007.**

<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER POSIBLE</b>
1. Síndrome de demencia en ausencia de otras enfermedades neurológicas, psiquiátricas o sistémicas que puedan causar una demencia, con variaciones en el inicio, la presentación o el curso.
2. En presencia de otra enfermedad sistémica o neurológica potencialmente causante de demencia, la cual no sea considerada como la causa de la misma.
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PROBABLE</b>
1. Demencia establecida por el examen clínico, confirmado por test neuropsicológicos.
2. Déficits en dos o más áreas cognitivas.
3. Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas.
4. Sin trastorno de la conciencia.
5. Inicio entre los 45 y 90 años, más frecuente después de los 65 años.
6. Ausencia de otras enfermedades sistémicas o neurológicas que pudieran explicar el deterioro.
<b>El diagnóstico es apoyado por:</b>
1. Deterioro de funciones cognitivas específicas: afasia, apraxia, agnosia.
2. Incapacidad para desarrollar las tareas cotidianas y alteraciones conductuales.
3. Historia familiar, particularmente, si está confirmada neurológicamente.
4. Resultados de laboratorio: punción lumbar normal, electroencefalografía normal o con cambios inespecíficos, tomografía computarizada con evidencia de atrofia.

Para diagnosticar la EA, los médicos le preguntan al paciente y familiares sobre la salud general, los problemas médicos previos y la capacidad para realizar actividades diarias, y sobre cambios en el comportamiento y en la personalidad. Realizan pruebas relacionadas a la memoria, a la capacidad de resolver problemas, a prestar atención y a las habilidades de lenguaje. Llevan a cabo pruebas médicas, tales como pruebas de sangre, orina y fluido espinal.

La neuroimagen es uno de los pilares del futuro diagnóstico de la EA, especialmente en la fase temprana, pues proporcionan información sobre el progreso de la enfermedad desde la fase del deterioro cognitivo ligero (Ramos et al. 2007). Por esta razón, los médicos efectúan gammagrafías del cerebro, tales como la tomografía computarizada (TAC), las imágenes por resonancia magnética (IRM) o la tomografía

por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés). Como ya se mencionó anteriormente, estas pruebas pueden ser repetidas para darles a los médicos información sobre cómo el cerebro de la persona está cambiando a través del tiempo.

Un factor que complica el diagnóstico de la EA es que muchos pacientes no muestran signos de demencia en las etapas tempranas; existen pacientes que incluso presentan síntomas después de 20 o 30 años que se comenzaron a desarrollar los cambios neuropatológicos.

Debido a todos los cambios que padece el paciente durante las primeras etapas de la EA, el diagnóstico temprano sería valioso por varias razones: el iniciar el tratamiento sintomático en etapas tempranas puede mejorar la calidad de vida de los pacientes desde meses hasta años, a pesar de que la muerte de células cerebrales no pueda ser detenido, se podrían diseñar y aplicar tratamientos preventivos; además de que brinda la oportunidad a las familias de planear el futuro, investigar sobre la enfermedad y prepararse emocionalmente para sobrellevar la enfermedad.

Es por esto que la búsqueda de marcadores biológicos potenciales para el diagnóstico temprano es fundamental.

## ETIOLOGÍA

Comprender la etiología de la EA sería sumamente importante para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Aunque existen varias hipótesis, la causa exacta es desconocida.

### FACTORES DE RIESGO (genéticos)

El factor de riesgo más importante en la EA de tipo esporádica es la edad. La mayoría de las personas afectadas tienen más de 65 años de edad. La probabilidad de desarrollar la EA casi se duplica cada cinco años después de cumplir 65 años y el riesgo aumenta a casi un 50% para las personas mayores de 85 años de edad (ADI, 2009).

Aunque se han identificado numerosos factores de riesgo, ningún gen causante se ha relacionado con la EA esporádica. Sin embargo, como ya se mencionó antes se ha encontrado que el gen apo E se relaciona con varios de los casos esporádicos. Esta proteína tiene tres alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  (Rosenberg, 2000). El alelo  $\epsilon 4$  es el alelo de riesgo y es el factor genético más significativo en la EA esporádica. Este alelo fue identificado como factor de riesgo en 1993 por Corder et al. y se considera que el riesgo aumenta dosis dependiente de acuerdo con la presencia de uno o dos alelos de  $\epsilon 4$ . En contraste, el poseer el alelo  $\epsilon 2$  disminuye el riesgo de padecer la EA. Así, los posibles genotipos en

orden de menor a mayor riesgo son:  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$  o  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  (Corder et al., 1994). No obstante, aunque el poseer uno o dos alelos de  $\epsilon 4$  aumenta el riesgo de tener EA en la mayoría de los casos, existen individuos homocigotos para  $\epsilon 4$  que nunca desarrollaron EA (Corder et al., 1993). Esto nos indica que existen otros factores de riesgo relacionados con los casos esporádicos de la EA.

El factor de riesgo más importante en la EA de tipo familiar es el historial genético familiar. Como ya se había mencionado antes, más de la mitad de los casos de inicio temprano se relacionan con la mutación de tres genes.

El gen APP fue uno de los primeros genes relacionados e identificados con la EA. Al menos 25 mutaciones patogénicas han sido identificadas; además de que duplicaciones del gen (incluyendo a los pacientes del síndrome de Down) son suficientes en muchos casos para generar la EA. Las mutaciones de APP son responsables del 13-16% de los casos de la EA tipo familiar (Janssen, 2003).

La PS1 es un componente de la  $\gamma$ -secretasa responsable de la escisión de APP, por lo que una mutación en la PS1 modifica la actividad de la  $\gamma$ -secretasa e incrementa la proporción de péptido beta-amiloide ( $\beta A$ )<sub>42</sub> (Citron et al., 1997). Las mutaciones en el gen de la PS1 son las responsables de la mayoría de los casos de la EA (hasta del 50%) (Cruts et al., 1998). Además, son causantes de los casos más severos, con una mayor tasa de progresión e inicio a temprana edad, en promedio a los 45 años (Jayadev et al., 2010).

El gen de la PS2 se cree que tiene una función similar al gen de la PS1 y que causa la patología de la EA al incrementar los valores de  $\beta A$ <sub>42</sub> (Steiner et al., 2002). A diferencia de la PS1 las mutaciones en PS2 son raras y tienen una edad de inicio más tardía, en promedio a los 53.7 años; además viven más tiempo después del diagnóstico (Jayadev et al., 2010).

#### OTROS FACTORES DE RIESGO

De acuerdo con varios estudios existen al menos seis factores para los que existe una fuerte evidencia de efectos independientes sobre la incidencia de la EA: diabetes, hipertensión a mediana edad, obesidad, depresión, inactividad física y fumar; de forma controversial algunos autores también consideran un bajo nivel educativo como otro factor de riesgo (Barnes y Yaffe, 2011). Además, hay un vínculo fuerte entre el futuro riesgo de desarrollar EA y las lesiones serias a la cabeza o el cerebro debido a la inflamación que se genera a consecuencia de un traumatismo.

Varias investigaciones sugieren que las enfermedades vasculares son un gran factor de riesgo que predispone a la EA (Hofman et al., 1997). En estudios de incidencia de corta y larga latencia, fumar aumenta el riesgo para padecer la enfermedad. La diabetes también es un factor de riesgo (Ott et al., 1999) y en estudios a más largo plazo, la hipertensión a mediana edad (Skoog et al., 1996; Kivipelto et al., 2001) y el colesterol elevado (Kivipelto et al., 2001) están asociados con el comienzo de la EA en la vejez.

Debido a la controversia, para determinar el impacto de un mejor nivel educativo y de una mejor salud cardiovascular, se deben observar poblaciones en las que estas tendencias sean prominentes y ver si se asocian en el tiempo con una disminución en la incidencia de la EA esporádica. Por otra parte, la detección y el tratamiento de la diabetes y la hipertensión, la reducción de los niveles de obesidad, el dejar de fumar, el aumento de la actividad física y una mejor educación, ya son prioridades de la salud pública en gran parte de los países en todo el mundo.

## TRATAMIENTO

Hoy en día no hay una cura para la EA y ninguna manera 100% efectiva para detener la muerte neuronal. Pero existen tratamientos que pueden ayudar, por un tiempo limitado, con los síntomas cognitivos y los trastornos conductuales que presentan los pacientes con EA.

Existen dos tipos de medicamentos aprobados actualmente por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) para tratar los síntomas cognitivos de la EA (Ramos et al., 2007): el primer tipo, inhibidores de acetilcolinesterasa, previene la hidrólisis de la acetilcolina, un mensajero químico de importancia para la memoria y el aprendizaje. Al mantener los niveles de acetilcolina, estos medicamentos apoyan la comunicación entre neuronas. El deterioro de los síntomas es retrasado por seis a 12 meses en alrededor del 50% de las personas que toma estos medicamentos. El otro tipo de medicamento regula la actividad del glutamato, uno de los neurotransmisores excitatorios del sistema nervioso central que en abundancia puede originar una actividad excesiva de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) que resulta en un flujo excesivo de calcio intracelular, causando la muerte neuronal.

Dentro de los medicamentos inhibidores de la acetilcolinesterasa se tienen cinco fármacos con resultados positivos: la tacrina, donepezilo, rivastigmina, galantamina y

metrifonato; de los cuales los tres más utilizados se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Medicamentos más usados en el tratamiento de la EA. \*Desde el 2006 fue aprobada para la etapa severa.**

<b>NOMBRE</b>	<b>APROBADO</b>	<b>ETAPA RECOMENDADA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
Donepezil (Aricept)	1996 y *2006	Moderada a *severa	Inhibidor selectivo y reversible
Rivastigmine (Exelon)	2000	Leve a moderada	Inhibidor relativamente selectivo y pseudoirreversible.
Galantamine (Razadyne)	2001	Leve a moderada	Inhibidor selectivo y competitivo.

La memantina es la única medicina disponible actualmente dentro del segundo tipo de medicamentos. Fue aprobada en el año 2003 para tratar la EA en sus etapas moderada a severa. Es un antagonista específico, con moderada afinidad y no competitivo de los receptores glutamato tipo NMDA. Esta medicina protege a las células de la excitotoxicidad del glutamato.

Algunas alternativas terapéuticas farmacológicas que necesitan un análisis más profundo son: los antioxidantes como la vitamina E o *Gingko biloba*, los antiinflamatorios como los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX), los inhibidores de la  $\beta$  y  $\gamma$  -Secretasas, los antipsicóticos, los ansiolíticos y los antidepresivos. Otra alternativa terapéutica es la inmunoterapia de la cual se ahondará más adelante en otro apartado.

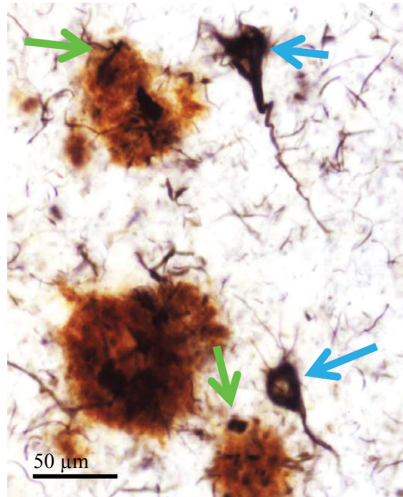
## NEUROPATOLOGIA

### *CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS*

Aunque el examen visual del cerebro de pacientes con EA no es diagnóstico, por lo general, en los cerebros se reconoce un patrón típico de atrofia cortical que afecta el lóbulo temporal medial -incluyendo la región hipocampal, la corteza entorrinal y parahipocampal-, el lóbulo frontal y el occipital. Como resultado de este patrón de adelgazamiento cortical, los ventrículos laterales pueden observarse alargados. Este patrón es estereotipado y puede ser reconocido tempranamente en el curso clínico de la EA por imagen de resonancia magnética (Dickerson et al., 2009, 2011). Es relativamente común encontrar microinfartos corticales y la desmielinización de la materia blanca periventricular. La presencia de microhemorragias, sobre todo en los lóbulos parietal y occipital posterior, nos refiere a una angiopatía amiloide cerebral (CAA por sus siglas en inglés) severa (Braak y Del Tredici, 2011).

### *CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS*

Los dos marcadores neuropatológicos principales de la EA son: la presencia de depósitos y agregados extracelulares del péptido  $\beta$ A (placas amiloides) y las marañas neurofibrilares (MNFs) intracelulares conformadas por agregados de la proteína Tau anormalmente hiperfosforilada (National Institute of Aging [NIA], 1997; Selkoe y Schenk, 2003) Estas características se pueden observar en la Figura 3. Existen cambios adicionales que pueden observarse en cerebros de pacientes con EA como: CAA, cambios en la materia blanca, disfunción sináptica, pérdida neuronal y neuroinflamación (Butterfield, Perluigi y Sultana, 2006; Scheff y Price, 2006) y que contribuyen al deterioro cognitivo. Sin embargo, estos últimos no son considerados características patognomónicas de la EA (Montine et al., 2012).



**Figura 3.** Caracterización inmunohistoquímica de los principales marcadores neuropatológicos de la EA. Las flechas verdes indican placas amiloides en color rojizo y las flechas azules indican MNFs de proteína Tau asociada a microtúbulos en negro. Imagen tomada de Nelson et al., 2012.

#### *MARAÑAS NEUROFIBRILARES*

Las MNFs son agregados intracelulares de la proteína asociada a microtúbulos Tau que se encuentra anormalmente hiperfosforilada y mal plegada. En las neuronas sanas, Tau estabiliza los microtúbulos que forman el citoesqueleto de la célula por un proceso de fosforilación y desfosforilación de la proteína (Combs, Voss y Gamblin, 2011). Tau hiperfosforilada es incapaz de unirse a los microtúbulos y en su lugar se agrega con otras moléculas de Tau, formando filamentos rectos y posteriormente filamentos helicoidales apareados. A la larga, esto puede provocar un fallo en el transporte neuronal que conduce a la muerte celular (Mi y Johnson, 2006). Las MNF's tienen una progresión estereotípica y espaciotemporal (surgen en el sistema límbico y progresan hacia corteza) que correlaciona con la severidad del deterioro cognitivo. De hecho, su número y distribución es utilizada como un marcador para la progresión de la EA (Braak y Braak, 1991; Selkoe y Schenk, 2003).

Cabe mencionar que, a diferencia de las placas amiloides, las MNFs no son específicas para la EA, también se encuentran en pacientes con otras taupatías. Aunque Tomlinson en 1970 reportó que las MNFs, si bien, se encuentran en el hipocampo de pacientes control y con EA, sólo en los cerebros de pacientes enfermos se encontraron de manera severa y generalizada en la corteza, indicando que únicamente los pacientes enfermos las presentan en esa zona.

## PLACAS AMILOIDES

Las placas descritas por Alois Alzheimer en su reporte original resultaron ser la acumulación anormal extracelular del péptido  $\beta$ A de 40 o 42 aminoácidos, dos productos normales del corte de APP por las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -Secretasas. Debido a su mayor capacidad de formar fibrillas y su insolubilidad,  $\beta$ A<sub>42</sub> es más abundante en las placas (Serrano-Pozo, 2011).

Se distinguen dos tipos de placas amiloides: placas difusas y placas neuríticas. Las primeras son depósitos amorfos de  $\beta$ A, mientras que las placas neuríticas son depósitos fibrilares compactos y están rodeados de neuritas distróficas así como de astrocitos y microglía activados (Duyckaerts et al., 2009)

De acuerdo con el estado de agregación de  $\beta$ A en las placas, las técnicas de tinción permiten diferenciar a las placas difusas de las placas neuríticas más compactas. En placas neuríticas predomina la forma fibrilar del péptido que adopta una conformación de  $\beta$ -plegada, lo cual le permite interactuar y ser detectada por reactivos como rojo de congo y Thioflavina S (ThioS) (Castellani *et al.*, 2010). Las placas difusas no adoptan esta conformación y por lo tanto no se tiñen con estos reactivos.

A diferencia de las MNFs, la progresión espacio temporal de placas amiloides no es tan predecible; en general las principales regiones afectadas por estas placas son la corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y cerebelo (Braak y Braak, 1991; Musiek y Holtzman, 2012).

## ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL

El péptido  $\beta$ A no sólo se deposita en el parénquima cerebral en la forma de placas amiloides, también lo hace afectando los capilares corticales, pequeñas arteriolas, arterias medianas, así como las arterias leptomeníngicas. Por lo general, es el péptido más soluble ( $\beta$ A<sub>40</sub>) el mayor causante de la CAA, acumulándose entre las células del músculo liso y la túnica media (Serrano-Pozo, 2011).

En el contexto de la EA, por lo general, la CAA es asintomática y es diagnosticada en la autopsia. No obstante, hay estudios que revelan que la CAA puede ser un contribuyente sinérgico para el declive cognitivo en pacientes con EA (Pfeifer et al., 2002; Arvanitakis et al., 2011).



## PROCESAMIENTO DE APP/FORMACIÓN DE $\beta$ -AMILOIDE

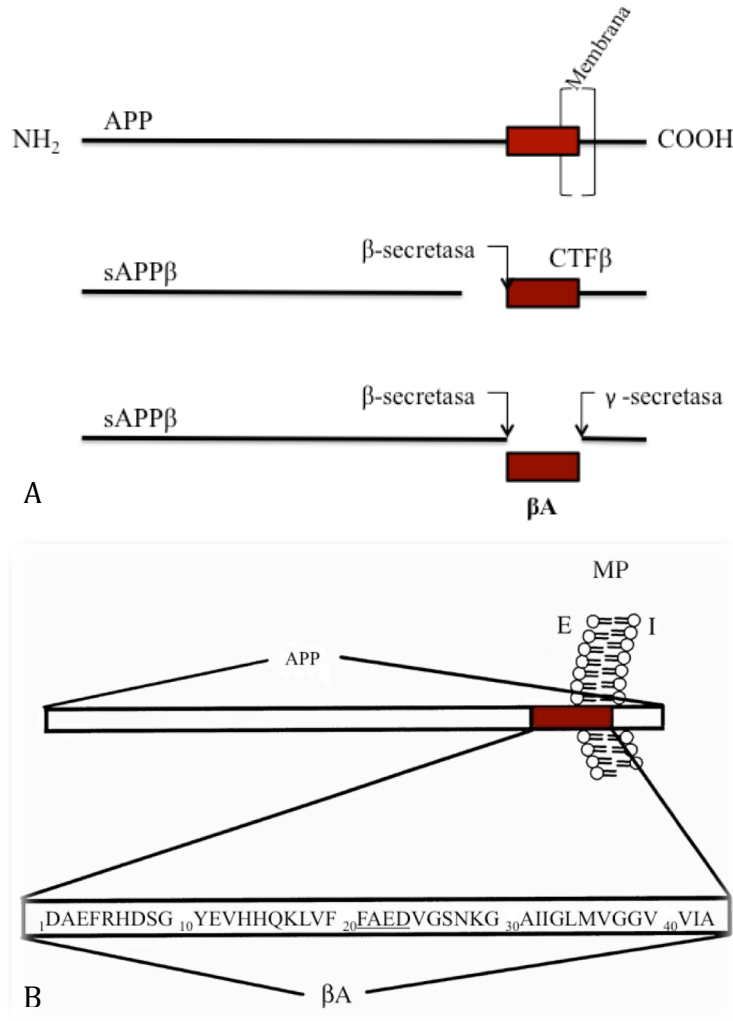
APP es una proteína integral de membrana que se expresa ampliamente en las células del organismo. De acuerdo con Zhang et al. (2011) su papel fisiológico sigue siendo desconocido. Se ha sugerido que juega un papel en el crecimiento de las neuritas, la sinaptogénesis, el tráfico de proteínas a lo largo del axón, la transducción de señales transmembrana, adhesión celular, entre otros, aunque todos requieren de más pruebas *in vivo*.

El procesamiento de APP puede seguir una ruta amiloidogénica por la acción secuencial de las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas, generando un fragmento de alrededor de 4 kDa y una longitud variable de 39 a 43aa, conocido como péptido  $\beta$ A (ver figura 4A).

La APP es cortada por la  $\beta$ -secretasa liberando a sAPP $\beta$ . Posteriormente, el CTF $\beta$  (fragmento de 99 aminoácidos que permanece unido a la membrana) es cortado por la  $\gamma$ -secretasa, formando así al péptido  $\beta$ A. El corte por la  $\gamma$ -secretasa es algo impreciso; por lo tanto, existen numerosas variantes de  $\beta$ A; sin embargo, los péptidos más abundantes en el cerebro son el  $\beta$ A<sub>40</sub> (~ 80 a 90%) seguido por el  $\beta$ A<sub>42</sub> (~ 5 a 10%) (Ver figura 4B) siendo este último el más amiloidogénico (Murphy y LeVine, 2010).

La  $\beta$ -secretasa es una aspartil-proteasa transmembranal. Existen dos formas de la enzima, BACE1 y BACE2. La primer forma de la enzima se encuentra abundantemente en el cerebro y es la responsable de la producción del péptido  $\beta$ A. Se considera que es la enzima limitante de la ruta amiloidogénica y procesa ~10% de la APP total (Murphy y LeVine, 2010).

La  $\gamma$ -secretasa es un complejo de cuatro subunidades: presinilina (PS1 o PS2), nicastrina, APH-1 (Anterior Pharynx-defective) y PEN-2 (Preseniline enhancer-2) (Kimberly et al., 2003). Para el funcionamiento correcto de la  $\gamma$ -secretasa son necesarias las cuatro subunidades; no obstante, el funcionamiento de cada componente no está completamente esclarecido. Se cree que la presinilina forma el sitio activo de la aspartil-proteasa (Murphy y LeVine, 2010).



**Figura 4. A) Esquema del procesamiento de APP por la acción secuencial de las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas generando al péptido  $\beta$ A (color rojo). Tomada y modificada de Selkoe y Kopan (2003) B) Secuencia del péptido  $\beta$ A (color rojo). APP: Proteína Precursora Amiloide; MP: membrana plasmática; E: medio extracelular; I: medio intracelular. Imagen tomada y modificada de Opazo (2005).**

Como se mencionó anteriormente, la mayor producción y acumulación del péptido  $\beta$ A produce una cascada neurodegenerativa que conduce a una disfunción sináptica, formación de MNFs y eventualmente la muerte neuronal.

Existen diferentes estados de agregación del péptido  $\beta$ A desde dímeros, trímeros, tetrámeros hasta oligómeros solubles, protofibrillas y fibrillas (Koffie et al., 2011). Las primeras investigaciones que se hicieron sobre la EA se enfocaron en los depósitos amorfos y fibrilares del péptido; sin embargo, el enfoque actual se orienta a los primeros estados de agregación, los oligómeros solubles del péptido  $\beta$ A. Estas estructuras son mucho más tóxicas para las células (Deshpande et al., 2006).

$\beta$ A soluble (que incluye oligómeros y protofibrillas) se encuentra en fluido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Kuo et al., 1996), puede ser neurotóxico a bajas concentraciones e induce la inhibición de potenciales de larga duración -involucrados en procesos de memoria- y el deterioro cognitivo (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002). Además de que los niveles de  $\beta$ A soluble correlacionan mejor la densidad de placas con la severidad del deterioro cognitivo (Deshpande et al., 2006).

$\beta$ A fibrilar desencadena un variedad de cambios patológicos que incluyen la hiperfosforilación de la proteína Tau que conlleva a la disfunción y degeneración neuronal (Pike et al., 1992). En modelos de ratones transgénicos causa distrofia neurítica que produce alteraciones en respuestas sinápticas (Spires et al., 2005).

#### VARIANTES AMINO TRUNCADAS Y MODIFICADAS: $\beta$ A<sub>11-42</sub> y el $\beta$ A p(E)<sub>11-42</sub>

Además de las variantes del péptido  $\beta$ A que comienzan con el aspartato como primer aminoácido ( $\beta$ A<sub>1-x</sub>), se han descrito un gran número de variantes N-truncadas y modificadas del péptido (Saido et al., 1995). Las variantes que no contienen en su secuencia los residuos iniciales  $_3$ EFRH<sub>6</sub>, son más amiloidogénicas. Se ha demostrado que las modificaciones en la región N-terminal favorecen la agregación del péptido  $\beta$ A<sub>x-42</sub> en comparación con el péptido completo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Pike et al., 1995) al ser más hidrofóbicos debido a la ausencia de la región hidrofílica N-terminal (Sohma et al., 2012). Asimismo, se sugiere que la ausencia de estos residuos favorece la exposición de residuos hidrofóbicos implicados en la formación de fibrillas con estructura  $\beta$ -plegada. Estas variantes N-truncadas podrían iniciar el depósito del péptido  $\beta$ A, formando un núcleo a partir del cual se promueve la generación de placas (Pike et al., 1995, El-Agnaf et al., 1998).

Por otro lado, existen variantes que presentan una modificación post-traducciona en la cual se lleva a cabo la ciclación de un glutamato del extremo N-terminal, a estas variantes se les conoce como modificadas o piroglutamadas.

Las variantes piroglutamadas son prominentes en cerebros de pacientes con EA y se han postulado como las semillas para la formación de agregados amiloides (Saido et al., 1995). Otros estudios sugieren que las variantes N-truncadas y piroglutamadas influyen en la tendencia de agregación de otras variantes no modificadas, actúan como centros de nucleación e influyen en la toxicidad del péptido  $\beta$ A (Pike et al., 1995; He y

Barrow, 1999; Russo et al., 2002). Estudios enzimáticos señalan que la modificación en el extremo N-terminal, le otorga a las variantes resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares e intracelulares (Russo et al., 2002).

Dos de las variantes amino truncadas son el péptido  $\beta A_{11-42}$  y el  $\beta A_{p(E)_{11-42}}$ , este último presenta la ciclación del glutamato del extremo N-terminal. La ausencia de los primeros aminoácidos ocurre por el corte alternativo de BACE1 de APP en la red *trans*-Golgi (Huse et al., 2002). Debido al corte en la posición 11 del péptido, el glutamato de esa posición queda expuesto y la enzima glutaminil ciclasa (QC) realiza la ciclación mediante la deshidratación del glutamato, liberando amonio o agua (Jawhar et al., 2011)

## INMUNOTERAPIA

Como ya se había mencionado anteriormente, en la actualidad no hay una cura para la EA; sin embargo, se están probando alternativas terapéuticas para poder prevenir y tratar la EA. Una de ellas es la inmunoterapia.

La inmunoterapia se refiere a un tipo de tratamiento que utiliza al propio sistema inmune para tratar una enfermedad. Existe la inmunoterapia activa, en la cual se administra un inmunógeno que estimule la respuesta inmune específica y genere memoria inmunológica, y la inmunoterapia pasiva, la cual consiste en administrar anticuerpos generados en otro organismo que sean capaces de neutralizar blancos moleculares de alguna enfermedad.

El principal blanco de la EA es el péptido  $\beta A$ , por lo que se han desarrollado estrategias inmunoterapéuticas con el fin de reducir la acumulación y depósito de este péptido.

Tanto la inmunoterapia activa (inmunización con péptido  $\beta A$ ) como la pasiva (anticuerpos anti- $\beta A$ ), han demostrado disminuir los depósitos de  $\beta A$  y revertir el déficit cognitivo que presentan los ratones transgénicos (APP/Tg) al igual que en modelos de la EA en primates y caninos (Morgan, 2011).

Al observar que la inmunoterapia, tanto activa como pasiva, tenía éxito en modelos animales, se comenzaron ensayos clínicos en humanos. Algunos de los más relevantes, ya finalizados, se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Resumen de ensayos clínicos en humanos. Tomada y modificada de Morgan, 2011.**

Tratamiento	Compañía	Epítipo de $\beta$ A	Inmunización	Fase
Bapineuzumab	Janssen/ Wyeth/ Elan	N-terminal	Pasiva	Fase III
Solanezumab	Eli Lilly	Región central	Pasiva	Fase III
Gammaguard	Baxter	Pool IVIg humanos	Pasiva	Fase III
Ponezumab	Pfizer	C-terminal	Pasiva	Fase II
Gantenerumab R1450	Roche	N-terminal y región central	Pasiva	Fase I
GSK933776A	GlaxoSmithKline	Anti- $\beta$ A	Pasiva	Fase I
Bapineuzumab s.c.	Janssen/Wyeth/Elan	N-terminal	Pasiva	Fase I
BAN2401	Eisai/BioArctic	Protofibrillas	Pasiva	Fase I
AAB-002	Wyeth/Elan	Conformacional	Pasiva	Preclinical
-----	Boehringer/Ablynx	Anti- $\beta$ A	Nano-anticuerpos	Preclinical
-----	Abbott	Conformacional	Pasiva	Preclinical
ACC-001	Janssen/Wyeth/Elan	N-terminal	Activa	Fase II
CAD106	Novartis	N-terminal	Activa	Fase II
Affitope AD1 and AD2	Affiris/ GlaxoSmithKline	Mimotopo N-terminal	Activa	Fase II
V950	Merck	Conformacional	Activa	Fase I
UB311	United Biochemical	N-terminal	Activa	Fase I

Debido al éxito de la terapia con el péptido  $\beta$ A en ratones, el primer ensayo clínico en humano lo realizó Elan Pharmaceuticals Inc, en el cual se iniciaron pruebas con el péptido sintético  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (designado AN 1792) más el adyuvante QS-21 (Lemere y Masliah, 2010). Se buscaron 300 pacientes con EA leve a moderada, a los cuales se les evaluó la función cognitiva, volumen cerebral, entre otros parámetros para medir la eficacia del tratamiento. Desafortunadamente 6% de los pacientes reportaron signos y síntomas de meningoencefalitis después de recibir entre 1 y 3 dosis. La evidencia disponible indica que la vacuna AN 1792 genera títulos de anticuerpos anti- $\beta$ A con gran variabilidad individual. Se reportaron mejoras sólo en un grupo de 30 pacientes, los cuales perdieron menos volumen cerebral, además de que su declive cognitivo se estabilizó. Los casos de meningoencefalitis fueron atribuidos a una infiltración de células T reactivas ya que el adyuvante QS21 es un inductor de la respuesta Th1. Por lo anterior, todo el estudio fue suspendido.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA EN LA REDUCCIÓN DE $\beta$ A

Se proponen varios mecanismos para la reducción del péptido  $\beta$ A asociada al uso de anticuerpos anti- $\beta$ A (figura 5):

- Por fagocitosis.- Se basa en la función de los anticuerpos de opsonizar al antígeno, que conduce a la fagocitosis del péptido por la microglía. Los anticuerpos anti- $\beta$ A se unen al péptido y estimulan la fagocitosis mediante el receptor Fc de la microglía (figura 5A).
- Salida a la periferia.- La presencia de anticuerpos anti- $\beta$ A circulando en sangre altera el equilibrio de  $\beta$ A a través de la barrera hematoencefálica y favorece un flujo de salida debido a la menor concentración de  $\beta$ A libre en la sangre o un bloqueo en la entrada de nuevo al cerebro (DeMattos et al., 2001) (figura 5B).
- Modificación de la conformación.- Los anticuerpos modifican la estructura secundaria del péptido  $\beta$ A a una conformación que es menos propensa a generar agregados fibrilares asociados con la patología (Alcantar, Jimenez y Morgan, 2010) (figura 5C).

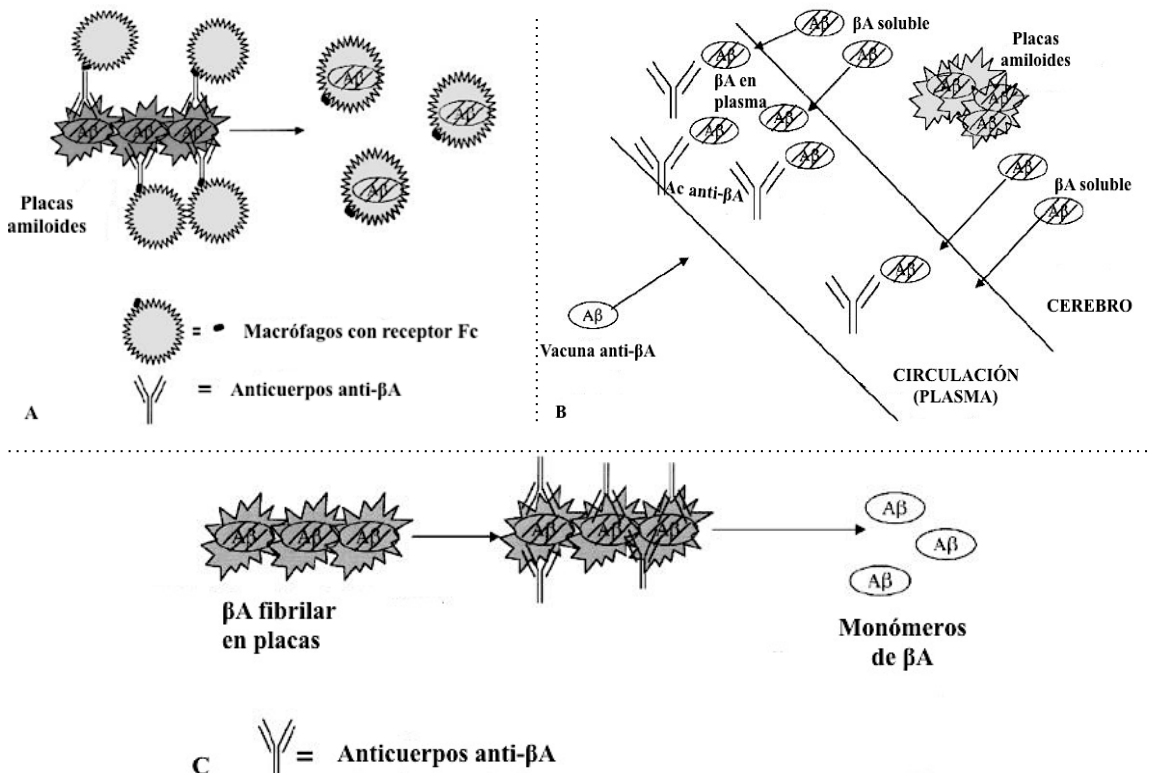


Figura 5. A) Opsonización y fagocitosis. Anticuerpos anti- $\beta$ A estimulan la fagocitosis de  $\beta$ A por macrófagos con receptor Fc. B) Salida a la periferia. Anticuerpos anti- $\beta$ A alteran el equilibrio de  $\beta$ A en circulación y en el cerebro, generando una salida del péptido. C) Cambio de conformación. Los anticuerpos anti- $\beta$ A modifican la estructura secundaria del péptido  $\beta$ A minimizando la formación de agregados. Tomada y modificada de Ugen y Morgan (2001).

Lo más importante, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes. Diferentes anticuerpos pueden utilizar diferentes mecanismos; el grado en que los diferentes anticuerpos usen uno u otro mecanismo les conferirá diferentes efectos ya sea positivos como negativos (Morgan, 2011).

## MAPEO DE EPÍTOPOS

Parte de la respuesta inmune se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, ésta se da a través del reconocimiento de un **epítopo** o determinante antigénico, que se define como una región o secuencia (lineal o conformacional) de un antígeno, que entra en contacto con el parátopo (sitio de reconocimiento del anticuerpo) (Meola et al., 1995).

Existen péptidos llamados **mimótopos** que pueden imitar o mimetizar, desde un punto de vista funcional o estructural, a diferentes epítomos; estos mimótopos no poseen necesariamente una similitud con la secuencia original del epítopo. Un mimótopo será inmunogénico siempre y cuando genere una respuesta inmunológica contra el epítopo original (Meola et al., 1995).

De acuerdo con De Groot (2004), el vacunar sólo con epítomos inmunogénicos, puede ser tan eficaz e incluso podría ser más seguro que vacunar con todo el antígeno, por lo que el mapeo de epítomos tiene varias aplicaciones adicionales en el campo de la inmunoterapia.

El mapeo de epítomos es la metodología mediante la cual pueden ser identificados epítomos específicos basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Para realizar el mapeo de epítomos una de las tecnologías más empleadas es el despliegue en fagos.

## DESPLIEGUE EN FAGOS FILAMENTOSOS

El despliegue en fagos es una tecnología molecular que permite la expresión de un gran número ( $>10^9$ ) de péptidos aleatorios en la superficie de fagos filamentosos. Esta tecnología se utiliza para seleccionar a partir de un amplio conjunto de péptidos a los que tengan una alta afinidad de unión a un anticuerpo de interés (Barbas, Burton y Scott, 2001). Durante este proceso ocurre una selección, denominada bioselección, en la cual los péptidos seleccionados imitan al epítopo en términos de propiedades físico-químicas y organización espacial (Mayrose et al., 2007).

Por lo anterior, es posible identificar y caracterizar a los epítomos de las variantes aminotruncadas del péptido  $\beta A$  que son reconocidos por los anticuerpos anti- $\beta A_{(E)11-42}$  y anti- $\beta A_{11-42}$ .



## ANTECEDENTES

De acuerdo con estudios realizados por He y Barrow (1999), las variantes aminotruncadas y modificadas constituyen cerca de la mitad del total del péptido  $\beta$ A presente en cerebros de pacientes con EA.

Se propone que las variantes aminotruncadas, juegan un papel importante en el proceso de formación de los agregados tóxicos del péptido  $\beta$ A (Schlenzig, 2009).

Se identificaron dos epítomos del péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> que son reconocidos por anticuerpos presentes en un suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> producido en conejo. Estos anticuerpos son capaces de reconocer a las tres variantes más importantes del péptido ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>), ya que uno de los epítomos se encuentra en la región central del péptido completo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Pérez-Garmendia et al., 2010).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio se observó que los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> presentes en el suero producido en ratones Balb/c son capaces de reconocer a las tres variantes más importantes del péptido (Nava-Catorce, 2012).

En otro estudio de nuestro laboratorio, se está investigando la diferencia en cuanto a la antigenicidad e inmunogenicidad causada por la modificación post-traduccional presente en algunas variantes del péptido  $\beta$ A: la ciclación del glutamato en N-terminal.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La EA tiene un impacto físico, psicológico, social y económico en nuestra sociedad. Actualmente es considerada un grave problema económico y de salud pública. A pesar de que existen tratamientos contra los síntomas que pueden ayudar a los enfermos a sobrellevar la enfermedad unos meses, éstos no logran, a largo plazo, una mejoría clínica y no alteran el curso progresivo de la enfermedad.

Las estrategias inmunoterapéuticas se han enfocado en el péptido  $\beta$ A completo de 42 aminoácidos, específicamente dirigidas a la región  ${}_3\text{EFRH}_6$  localizada en el extremo N-terminal. Estas estrategias buscan disminuir los niveles del péptido, ya sea favoreciendo su eliminación o disminución de su producción. No obstante, el enfoque utilizado hasta este momento ha tenido importantes efectos secundarios como las microhemorragias y meningoencefalitis en humanos; además de que las variantes aminotruncadas carecen de esa región N-terminal. Esto no debe ser desalentador, al contrario debe provocar el interés de identificar el o los epítomos que puedan generar inmunogenicidad sin efectos secundarios. Por consiguiente, la caracterización de nuevos epítomos y mimótopos del péptido  $\beta$ A se vuelve de suma importancia y podría servir para el desarrollo de terapias efectivas que eviten la agregación del péptido sin provocar los efectos secundarios asociados al epítomo  ${}_3\text{EFRH}_6$  de la región N-terminal.

Se ha postulado que la inmunización en humanos con péptidos cortos que mimeticen regiones del péptido  $\beta$ A diferentes a  ${}_3\text{EFRH}_6$  podrían generar anticuerpos protectores sin efectos tóxicos (Gevorkian et al., 2004). Así, surge la importancia de la variante aminotruncada  $\beta\text{A}_{11-42}$  y su variante modificada  $\beta\text{Ap(E)}_{11-42}$ ; las cuales carecen de los residuos iniciales en el extremo N-terminal, por ende, del epítomo  ${}_3\text{EFRH}_6$  y que se ha demostrado que tienen una mayor agregación y una mayor resistencia a las aminopeptidasas, por lo que se propone que juegan un papel importante en el proceso de formación de agregados tóxicos del péptido  $\beta$ A.

Debido a lo antes mencionado, las variantes aminotruncadas modificadas se posicionan como eficientes blancos terapéuticos y es importante conocer los epítomos que presentan para poder desarrollar mejores estrategias inmunoterapéuticas, como vacunas basadas en los epítomos.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Identificar y caracterizar epítomos/mimótopos del péptido N-truncado  $\beta A_{11-42}$  y su variante piroglutamada  $\beta Ap(E)_{11-42}$  que son reconocidos por anticuerpos anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$  y anti- $\beta A_{11-42}$  inducidos en ratones.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la reactividad cruzada, mediante ELISA, de los sueros anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$  y anti- $\beta A_{11-42}$  contra los péptidos  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$  y  $\beta A_{11-42}$ .
- Evaluar los sueros anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$  y anti- $\beta A_{11-42}$  mediante Western Blot.
- Identificar los epítomos/mimótopos de los péptidos amino truncados  $\beta Ap(E)_{11-42}$  y  $\beta A_{11-42}$  mediante un proceso de bioselección utilizando una biblioteca de heptapéptidos expresados en fagos y los respectivos sueros.
- Evaluar mediante ELISA la reactividad de las clonas obtenidas con su respectivo suero.
- Secuenciar los insertos de las clonas reactivas.

## **METODOLOGÍA**

### **EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA MEDIANTE ELISA**

Con el objetivo de evaluar la reactividad cruzada de los sueros policlonales anti- $\beta A_{11-42}$  y anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$  (hechos en ratones Balb/c) contra otras variantes del péptido  $\beta A$ , en ensayos por separado, en una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Dinamarca) se inmovilizaron los péptidos:  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$  y  $*\beta A_{11-42}$  (AnaSpec, California, USA) y como control negativo un péptido no relacionado con la secuencia de  $\beta A$ . \*El péptido N-truncado no modificado  $\beta A_{11-42}$  se empleó sólo para los ensayos de reactividad del suero anti- $\beta A_{11-42}$ , después de tomar la decisión de realizar el mapeo de ésta variante.

Se utilizó una concentración de péptido de  $2\mu g/ml$  en buffer de carbonatos a pH 9.5, en un volumen de  $100\mu l$ / pozo. La placa se incubó toda la noche a  $4^{\circ}C$ . Al día siguiente, la placa se lavó en un lavador automático (WellWash, Thermo Scientific, EUA) con un ciclo de cuatro lavados con  $300\mu L$  de  $PBS_{(1x)}$ -Tween 20 $_{(0.2\%)}$  y se bloqueó con  $200\mu l$ /pozo de  $PBS_{(1x)}$ -leche descremada $_{(2\%)}$  durante una hora a  $37^{\circ}C$ . Transcurrido el tiempo la placa se lavó nuevamente.

Los anticuerpos primarios se prepararon de la siguiente manera: los sueros policlonales anti- $\beta A_{11-42}$  y anti  $\beta Ap(E)_{11-42}$ , por separado, se diluyeron en  $PBS_{(1x)}$ -leche $_{(2\%)}$ -TritónX-100 $_{(0.2\%)}$  1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600; como control negativo se usó el suero obtenido de un ratón Balb/c inyectando sólo adyuvante de Freund y  $PBS$ -estéril en una dilución 1:200 y como controles positivos se usaron los sueros de conejo anti- $\beta A_{11-42}$ , anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$ , anti- $\beta A_{1-42}$  y anti- $\beta Ap(E)_{3-42}$  en una dilución 1:200. Los sueros fueron agregados en las pozas correspondientes ( $100\mu l$ /pozo). La placa se incubó durante una hora a  $37^{\circ}C$ .

Se realizó el ciclo de lavados y posteriormente se agregó el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a la enzima peroxidasa (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, USA) ( $100\mu l$ /pozo) en una dilución 1:2500 en  $PBS_{(1x)}$ -leche $_{(2\%)}$ -TritónX-100 $_{(0.2\%)}$ . Se incubó la placa durante una hora a  $37^{\circ}C$ . Después de lavar la placa, se agregaron  $100\mu l$ /pozo del sustrato de la peroxidasa (ABTS single solution, Invitrogen, USA) y se incubó a  $37^{\circ}C$ . Finalmente se tomaron lecturas a diferentes tiempos con un lector de placas automático (Microplate Reader, Dynex, USA) a  $405nm$ .

## EVALUACIÓN DE LOS SUEROS ANTI- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> Y ANTI- $\beta$ A<sub>11-42</sub> MEDIANTE WESTERN BLOT

Con el objetivo de evaluar a los sueros mediante Western blot, se corrió un gel comercial de gradiente 4-12% NuPage (Invitrogen, California, USA) con cuatro péptidos oligomerizados:  $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ A<sub>11-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>. Por cada carril se cargó 5 $\mu$ g de péptido (1 $\mu$ g/1 $\mu$ l), además de un marcador de peso molecular de 3.5-260 kDa (Novex, Invitrogen, California, USA). El gel se corrió a voltaje constante de 200V por 45 minutos. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 25V por 50 minutos. La membrana se bloqueó con PBS<sub>(1x)</sub>-leche descremada<sub>(2%)</sub> toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, después de realizar tres lavados por 5 minutos con PBS<sub>(1x)</sub>-Tween 20<sub>(0.2%)</sub> la membrana se incubó con el suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> o el suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, ambos anticuerpos diluidos 1:400 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub>. Las membranas se dejaron incubando toda la noche a 4°C en agitación.

Al día siguiente, tras realizar tres lavados por 5 minutos con PBS<sub>(1x)</sub>-Tween 20<sub>(0.2%)</sub>, se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:2500 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub>. Se incubó en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizaron los lavados de la misma forma y finalmente se realizó la inmunodetección por quimioluminiscencia usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, EUA).

## MAPEO DE EPÍTOPOS

### BIOSELECCIÓN (Esquema: Apéndice 1)

Con el objetivo de identificar los epítopos y/o mimótopos de los péptidos  $\beta$ A<sub>11-42</sub> y  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, por separado, se realizó una bioselección en la cual se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados al azar sobre la proteína III de la cubierta del fago M13 (ver apéndice 2). (New England Biolabs, Herfordshire, Inglaterra) y el suero correspondiente.

El proceso de bioselección fue realizado en un formato de fase sólida en cuatro pozos de una placa de microtitulación (Maxisorp, Nunc Thermo Sci.) sobre la cual se inmovilizaron anticuerpos policlonales anti-IgG de ratón hechos en cabra (Thermo

Scientific, Rockford, USA) (2mg/ml), que reconocen la región Fc de los anticuerpos IgG presentes en los sueros, a una concentración de 5µg/ml de buffer de carbonatos a pH 9.5 (100µl / pozo). La placa se incubó una hora a 37° C.

Se realizó un ciclo de lavados (5x) con 300µL de PBS<sub>(1x)</sub>-Tween 20<sub>(0.2%)</sub>. Posteriormente, se bloqueó con 200µl/pozo de PBS<sub>(1x)</sub>-leche descremada<sub>(2%)</sub> durante una hora a 37°C y se lavó nuevamente (5x).

La placa se incubó con 100µl/pozo del suero anti-βA<sub>11-42</sub> o anti-βAp(E)<sub>11-42</sub>, que se diluyó 1:200 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub>, durante una hora a 37°C.

Después de lavar nuevamente los pozos, se añadieron 100µl/pozo de la biblioteca comercial de fagos diluida 1:100 (10<sup>11</sup>pfu/mL) en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.1%)</sub> y se incubó toda la noche a 4°C. En la segunda y tercera ronda, se sustituyó la biblioteca de fagos y se agregó el amplificado (10<sup>9</sup>, 10<sup>13</sup> Pfu/ml) obtenido de los eluidos de la primera y segunda ronda en el mismo diluyente. Al día siguiente, se realizó un ciclo de lavados manual (10x).

Se añadieron 100µl/pozo de Glicina-HCl<sub>(0.2M; pH2.2)</sub>, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 37°C. El eluido de los cuatro pozos se colectó en un solo tubo y se neutralizó con 60µl de Tris-HCl<sub>(1M; pH 9.1)</sub>. El tubo se almacenó a 4°C.

#### AMPLIFICACIÓN DE LOS FAGOS ELUIDOS

Se inocularon 10ml de medio 2YT con bacterias *Escherichia coli* TG1 y se dejaron en agitación a 200rpm a 37°C toda la noche. Al día siguiente se inocularon 500µl de bacterias en un matraz de 250ml que contenía 50ml de medio 2YT estéril. El matraz se incubó una hora a 37°C a 250rpm de agitación. Transcurrido el tiempo, al matraz se inoculó con el eluido de fagos (se reservan 20µl para su titulación) para incubarlo a 37°C por 20 minutos sin agitación, y posteriormente en agitación a 250rpm por 4.5 horas.

#### PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO

Se separaron los 50ml del amplificado en dos tubos de centrifuga de 50ml estériles (25ml por tubo) y se centrifugaron a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubos estériles nuevos y se agregó una quinta parte del volumen total (5ml por tubo) de Polietilenglicol/NaCl (PEG/NaCl) para precipitar a los fagos. Los tubos se mantuvieron a 4°C toda la noche.

Al día siguiente, los tubos se centrifugaron nuevamente a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de TBS-estéril. La suspensión se volvió a centrifugar a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril, se le añadieron 200µl (1/5 parte) de PEG/NaCl y se incubó 30 minutos en hielo; posteriormente se centrifugó a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 200µl de TBS-estéril y de nuevo se centrifugó a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo estéril.

## TITULACIÓN

Se sembró una colonia de *E. coli* TG1 en 10ml de medio 2YT y se incubó en agitación a 250rpm a 37°C, aproximadamente una hora o hasta llegar a una O.D.<sub>600</sub>=0.5.

En tubos de 1.5ml con 1mL de medio 2YT se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración de fago de 10<sup>4</sup>/ml, suponiendo una concentración inicial de 10<sup>11</sup>/ml a 10<sup>13</sup>/ml. De la última dilución de fagos, se infectaron 200µl de la suspensión de bacterias; esto se realizó por duplicado. Las bacterias infectadas se incubaron a 37°C por 10 minutos. A cada tubo se le añadieron 15µl de Xgal/IPTG; el volumen completo se mezcló con 4 ml de top agar mantenido a 45°C, la mezcla se agitó en el vórtex y se vació en cajas Petri con 10ml de LB Agar. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C.

El título se obtuvo a partir de multiplicar el número total de placas azules (unidades formadoras de placas por mililitro [pfu/ml]) presentes en las cajas por el factor de dilución utilizado. Cada placa corresponde a una clona individual, es decir, a un fago que expresa una secuencia particular de aminoácidos.

## SELECCIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES

De la placa de titulación del eluido de la tercera ronda, se colectaron 22 clonas al azar para ser amplificadas en 5ml de medio 2YT durante una hora a 37°C a 250 rpm de agitación y posteriormente ser incubadas durante 4.5 horas en las mismas condiciones, en su respectivo tubo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos y el sobrenadante obtenido se dividió en dos alícuotas: 4 ml para la purificación de fagos y 1ml para la obtención del ADN de cadena sencilla de los fagos.

Para purificar fagos, se añadieron 800µl de PEG/NaCl a cada tubo y se conservaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron 10,000 rpm

a 4°C por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 1ml de TBS estéril, se añadieron 200µl de PEG/NaCl, se incubó por una hora a 4°C y se centrifugaron a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos; se resuspendió el pellet en 200µl de TBS-estéril y se centrifugó nuevamente 10,000rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos estériles y se guardaron a 4°C para su titulación.

Para la obtención de ADN, se añadieron 400µl de PEG/NaCl y se conservaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron a 10,000rpm a 4°C por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200µl de buffer de yoduro de sodio<sub>[4M]</sub>/EDTA<sub>[1mM]</sub> adicionando de inmediato 500µl de alcohol absoluto, los tubos se agitaron en el vórtex, se dejaron por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 14,000rpm por 10 minutos. El sobrenadante se retiró por vacío y el pellet se lavó con 200µl de etanol al 70%. Nuevamente, se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante por vacío. Todos los tubos se dejaron bajo la campana extractora durante 15 minutos, se resuspendieron con 15µl de agua milliQ y se guardaron a -20°C hasta su secuenciación.

#### TITULACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES

Para la titulación de cada clona se siguió el protocolo antes descrito.

Si el título de las clonas resultó ser menor a 10<sup>11</sup>pfu/ml se amplificaron de la manera antes descrita con la variante de agregar 20µl de fago purificado en vez del eluido.

#### EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA

Con el objetivo de evaluar la reactividad de las 22 clonas individuales resultantes de cada bioselección, se llevó a cabo un análisis mediante ELISA para determinar si estas clonas eran reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en el suero correspondiente: anti-βA<sub>11-42</sub> o anti-βAp(E)<sub>11-42</sub>.

Se inmovilizaron, en los 96 pozos de una placa de microtitulación, anticuerpos anti-IgG de ratón hechos en cabra (2mg/ml) que reconocen la región Fc de los anticuerpos presentes en los sueros, a una concentración de 5µg/ml de buffer de carbonatos a pH 9.5 (100µl / pozo). La placa se incubó una hora a 37° C. Transcurrido el tiempo, la placa se lavó en un lavador automático con un ciclo de cuatro lavados con PBS<sub>(1x)</sub>-Tween 20<sub>(0.2%)</sub> y se bloqueó con 200µl/pozo de PBS<sub>(1x)</sub>-leche descremada<sub>(2%)</sub> durante una hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente.



A 48 pozos de la placa se les adicionó 100µl por pozo del suero control, en este caso suero de ratón Balb/c obtenido al inyectar adyuvante de Freund y PBS-estéril, y a los otros 48 pozos se les adicionó 100µl por pozo del suero anti-βA<sub>11-42</sub> o anti-βAp(E)<sub>11-42</sub> correspondiente; ambos diluidos 1:200 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub>. La placa se dejó incubando por una hora a 37°C.

Después de lavar se adicionaron, por duplicado, tanto en el suero control como el problema, los fagos diluidos 1:10 [ $10^{13}$  Pfu/ml] en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub> y se incubó la placa toda la noche a 4°C. Después de lavar la placa, se adicionaron 100µl/pozo del anti-M13 hecho en conejo diluido 1:500 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub> y se dejó incubando una hora a 37°C.

Se realizó el ciclo de lavados y posteriormente se adicionaron 100µl/pozo de anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa, diluido 1:2000 en PBS<sub>(1x)</sub>-leche<sub>(2%)</sub>-TritónX-100<sub>(0.2%)</sub> y se dejó incubando 1 hora a 37°C.

Nuevamente se lavó la placa y se adicionaron 100µl/pozo del sustrato de la peroxidasa (ABTS) y se incubó a 37°C. Finalmente se tomaron lecturas a diferentes tiempos con un lector de placas automático a 405nm.

## SECUENCIACIÓN

A) La secuenciación de ADN de cadena sencilla de los fagos obtenidos de la bioselección con el suero anti-βAp(E)<sub>11-42</sub> se realizó usando el primer -28 gIII, incluido en el kit Ph.D. de New England Biolabs, con la secuencia 5'-<sup>HO</sup> GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C -3', 100pmol, 1pmol/µl. Las secuencias se enviaron al secuenciador Genetic Analyser 3500 XL y se llevó a cabo con el kit Big Dye Terminator V3 (Applied Biosystems) en el Instituto de Biología de la UNAM.

B) La secuenciación de ADN de cadena sencilla de los fagos obtenidos de la bioselección con el suero anti-βA<sub>11-42</sub> se realizó usando el primer -96 gIII, incluido en el kit Ph.D. de New England Biolabs, con la secuencia -5'-<sup>HO</sup> CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3', 100pmol, 1pmol/µl. Las secuencias se enviaron al secuenciador Genetic Analyser 3500 XL y se llevó a cabo de la misma manera que las secuencias del suero anti-βAp(E)<sub>11-42</sub>.

Se emplearon diferentes primers en cada secuenciación, debido a que en la primera secuenciación se advirtió que sería mejor tener un margen más amplio de nucleótidos antes de que apareciera la secuencia de interés.

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA MEDIANTE ELISA

Con el objetivo de evaluar si el suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> (hecho en ratones Balb/c) era capaz de reconocer a las tres variantes más importantes de péptido  $\beta$ A ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>) se realizaron ensayos ELISA. En la figura 6 se muestran los resultados de un ensayo representativo con su desviación estándar. El suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> se utilizó a diluciones 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600.

Se puede observar que el suero fue capaz de reconocer a los tres péptidos; aunque la reactividad con el péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub> fue muy baja, como se describió previamente en el trabajo de tesis de licenciatura de una compañera de laboratorio (Nava-Catorce, 2012). Como controles se utilizaron: un péptido no relacionado el cual no presentó reactividad en ninguno de los ensayos (valores de 0) y suero de ratones inmunizados sólo con adyuvante, el cual tampoco presentó reactividad en ninguno de los ensayos.

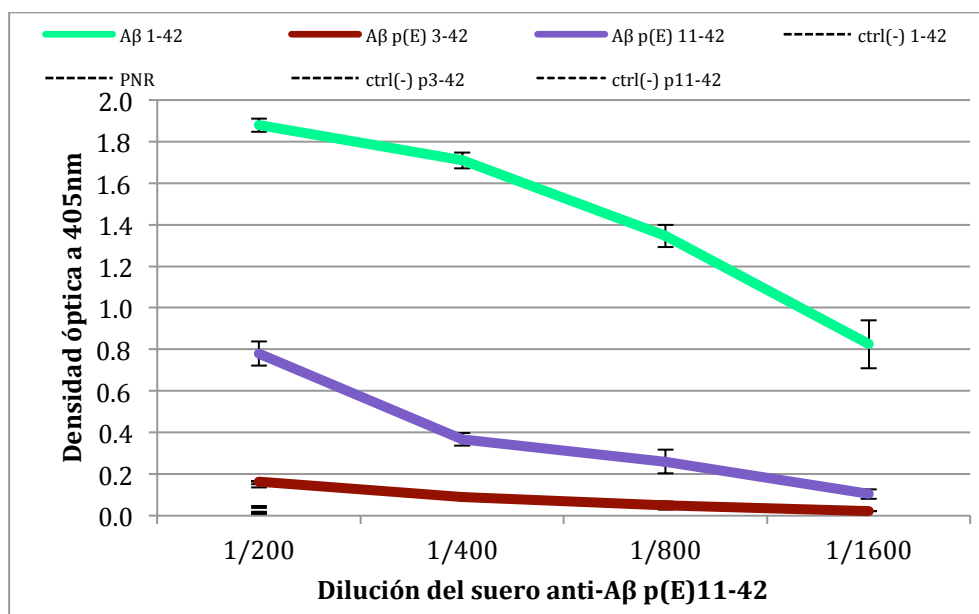


Figura 6. Reactividad cruzada, evaluada mediante ELISA, del suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> con los péptidos  $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> a diluciones seriadas 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600. Reactividad de sueros de ratones controles (a los que se les administró sólo el adyuvante (ctrl -) que se probaron contra cada uno de los péptidos, se evaluó a la menor dilución 1:200). Datos de un ELISA representativo  $\pm$  desviación estándar.

De igual manera, se realizó un ELISA con el suero anti- $\beta A_{11-42}$  (hecho en ratones Balb/c). Se utilizaron las tres variantes más importantes de péptido  $\beta A$  ( $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$ ) y además la variante aminotruncada no modificada  $\beta A_{11-42}$ . Se utilizaron los mismos controles con el mismo resultado (valores de 0). Como se muestra en la figura 7, se encontró que este suero también reconoce a las cuatro variantes del péptido antes mencionadas. Cabe recordar que la variante aminotruncada no modificada  $\beta A_{11-42}$  se empleó en estos ensayos después de tomar la decisión de realizar el mapeo de ésta variante.

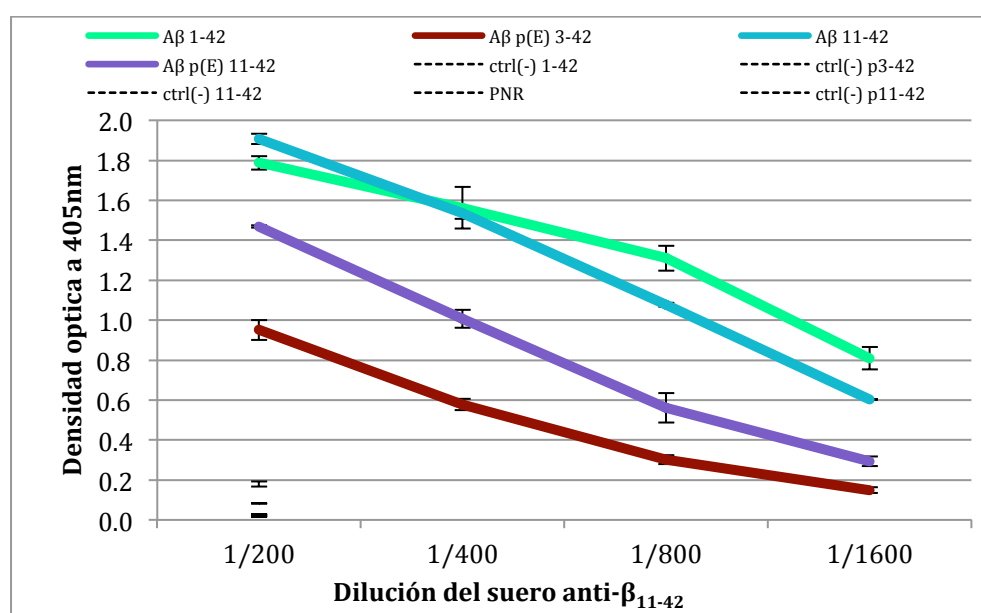
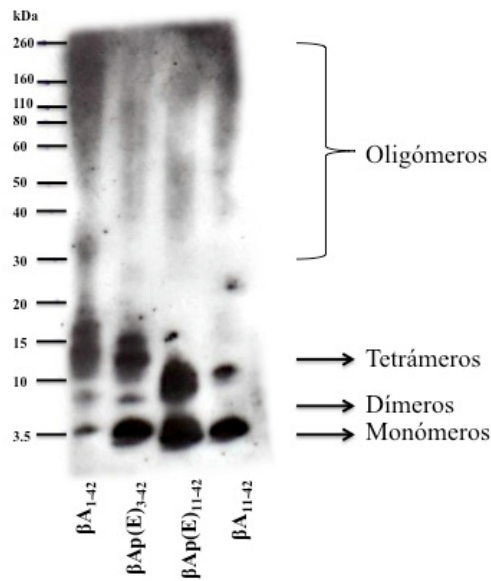


Figura 7. Reactividad cruzada, evaluada mediante ELISA, del suero anti- $\beta A_{11-42}$  con los péptidos  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$  y  $\beta A_{11-42}$  a diluciones seriadas 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600. Reactividad de sueros de ratones controles (al que se les administró sólo el adyuvante (ctrl -) que se probaron contra cada uno de los péptidos, se evaluó a la menor dilución 1:200). Datos de un ELISA representativo  $\pm$  desviación estándar.

## EVALUACIÓN DE SUEROS MEDIANTE WESTERN BLOT

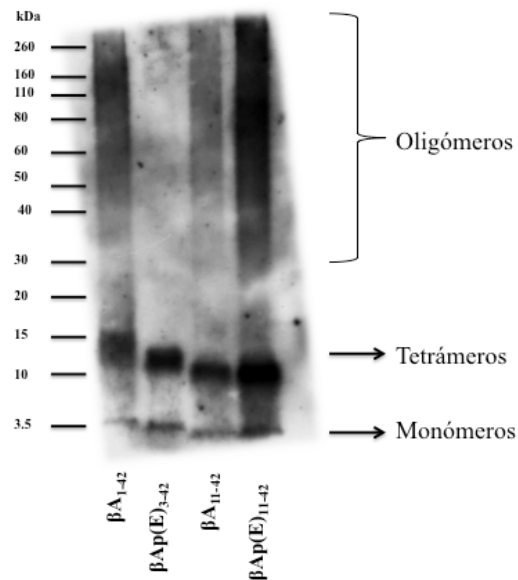
Con el objetivo de evaluar la capacidad de los sueros anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$  y anti- $\beta A_{11-42}$  de reconocer a determinados agregados de los péptidos  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$  y  $\beta A_{11-42}$  se realizó un Western blot con monómeros y oligómeros de los cuatro péptidos.

En la figura 8 se muestran los resultados del Western blot de los cuatro péptidos revelados con el suero anti- $\beta Ap(E)_{11-42}$ . Se observa que el suero es capaz de reconocer todas las formas de agregación de los cuatro péptidos; sin embargo, reconoce los monómeros del péptido  $\beta A_{1-42}$  con menor intensidad.



**Figura 8.** Evaluación del suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> mediante Western blot. Los péptidos  $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y  $\beta$ A<sub>11-42</sub>, fueron revelados con el suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>. Los anticuerpos presentes en el suero reconocen de monómeros a oligómeros de los cuatro péptidos.

En la figura 9 se muestran los resultados del Western blot de los cuatro péptidos revelados con el suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>. Se observa que el suero es capaz de reconocer a monómeros, tetrámeros y oligómeros de los cuatro péptidos; aunque con menor reactividad con los oligómeros del péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>.



**Figura 9.** Evaluación del suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> mediante Western blot. Los péptidos  $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub>,  $\beta$ A<sub>11-42</sub> y  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, fueron revelados con el suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>. Los anticuerpos presentes en el suero reconocen de monómeros a oligómeros de los cuatro péptidos.

## MAPEO DE EPÍTOPOS

### BIOSELECCIÓN

Con el objetivo de identificar los epítomos y/o mimótopos de los péptidos  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y  $\beta$ A<sub>11-42</sub>, se realizaron tres rondas de bioselección con una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados al azar sobre la cubierta del fago filamentoso M13, utilizando los anticuerpos presentes en los sueros anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>, respectivamente.

En la tabla 4 se indica la eficiencia de cada una de las rondas reflejada en el título de fagos, representado por pfu/ml, del eluido de cada ronda y la amplificación de la misma. Con cada ronda aumenta el número de clonas específicas reconocidas por los anticuerpos de cada suero.

**Tabla 4. Título de fagos por ronda de bioselección. A) suero anti- $\beta$  p(E)11-42 , B) suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>.**

A)Ronda	$\beta$ Ap(E) <sub>11-42</sub>	Título (pfu/ml)	B)Ronda	$\beta$ A <sub>11-42</sub>	Título (pfu/ml)
1	Amplificación	$1.4 \times 10^{11}$	1	Amplificación	$1.60 \times 10^{13}$
	Eluido	$4.2 \times 10^5$		Eluido	$5 \times 10^5$
2	Amplificación	$10^{13}$	2	Amplificación	$3.12 \times 10^{13}$
	Eluido	$1.7 \times 10^7$		Eluido	$10^7$
3	Eluido	$2.04 \times 10^9$	3	Eluido	$6.6 \times 10^9$

### SELECCIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES

Para ambos sueros (anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>), del eluido de la tercera ronda de bioselección se tomaron 22 clonas al azar, las cuales se amplificaron y titularon. El amplificado se dividió en dos alícuotas: 1) para la purificación de fagos y su posterior evaluación mediante ELISA y 2) para la obtención del ADN de cadena sencilla de los fagos para su posterior secuenciación.

### EVALUACION DE CLONAS INDIVIDUALES MEDIANTE ELISA

Con el objetivo de determinar si las 22 clonas individuales resultantes de cada bioselección eran reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en el suero correspondiente: anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> o anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> se realizaron tres ensayos ELISA.

En la figura 10 observamos los valores de un ELISA representativo de la reactividad de las 22 clonas. Trece clonas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> y nueve clonas resultaron negativas. Las clonas

que se consideraron positivas siempre que tuvieran un valor mayor a 0.20 a 405nm de OD –este es un valor de corte de acuerdo con el control del fago silvestre M13- aunado a que las clonas negativas siempre tuvieron un valor de 0.

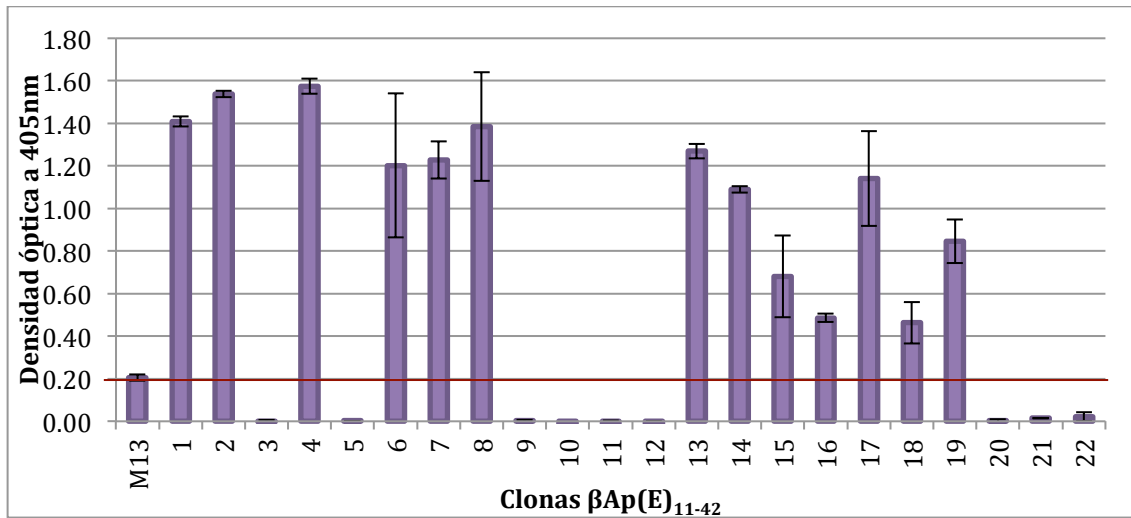


Figura 10. Evaluación de clonas bioseleccionadas por anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> mediante ELISA. Datos de un ELISA representativo  $\pm$  desviación estándar.

De forma análoga se evaluó la reactividad de las 22 clonas seleccionadas con los anticuerpos presentes en el suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub>. En la figura 11 observamos 20 clonas positivas y dos clonas negativas, bajo el mismo criterio de determinación antes mencionado.

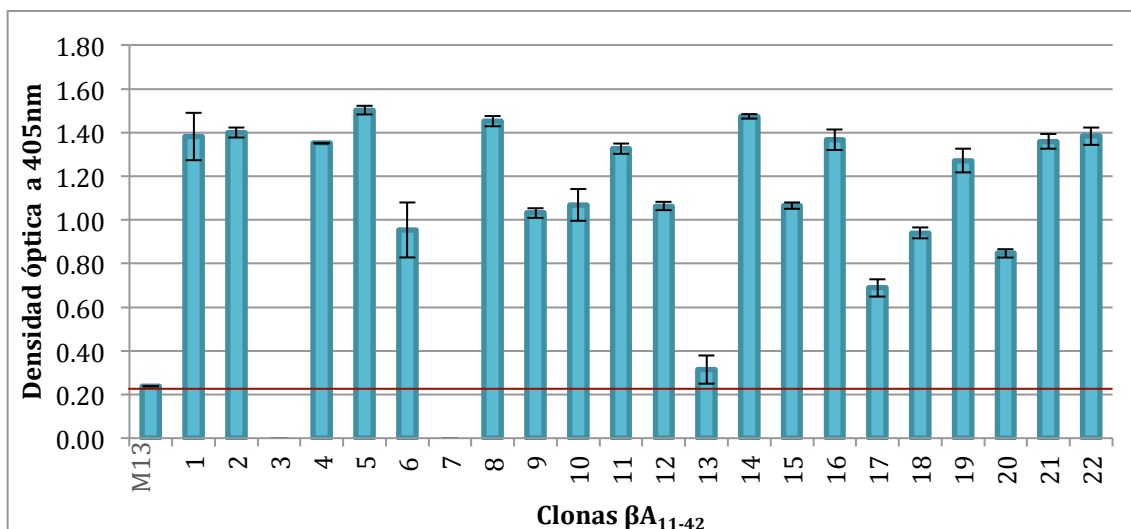


Figura 11. Evaluación de clonas bioseleccionadas por los anticuerpos anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> mediante ELISA. Datos de un ELISA representativo  $\pm$  desviación estándar.

## SECUENCIACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES

Una vez determinadas las clonas reconocidas por el suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, se secuenciaron 13 clonas positivas (1, 2, 4, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) para determinar la región inmunodominante del péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, y dos clonas negativas (10 y 20).

Para ello se aisló el ADN de cadena sencilla de los fagos (descrito previamente) y posteriormente se realizó la secuenciación.

En la tabla 5 se observan los resultados de la secuenciación. En base a los datos, las clonas pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

1. El primer grupo lo integran las clonas 2, 7, 8, 13, 17, 18, 19 y las clonas 1 y 14 que tienen la misma secuencias; estas clonas comparten los aminoácidos W-F en la posición 2 y un motivo FFA(E,S,D) (E,D) que presenta similitud con la región central de los péptidos  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>,  $\beta$ A p(E)<sub>3-42</sub> y  $\beta$ A<sub>1-42</sub>.

2. El segundo grupo lo integran las clonas 4 y 15 las cuales presentan un motivo Y (G,L) F (S,L) CLM.

3. El tercer grupo lo integran las clonas 6 y 16 las cuales no presentan similitud entre ellas, con los otros grupos o con el péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>.

Las clonas mostradas en rojo son las clonas negativas.

**Tabla 5. Secuenciación de las clonas reconocidas por los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>. Se observan la secuencia y densidad óptica (OD)  $\pm$  desviación estándar de cada clona obtenida en ELISA.**

CLONA	SECUENCIA	OD	DS	CLONA	SECUENCIA	OD	DS
1-14	GWFAEDY	1.249	$\pm$ 0.0198	15	YLFLCLM	0.681	$\pm$ 0.1916
2	AFFFDET	1.538	$\pm$ 0.0148	16	SRVLMRM	0.486	$\pm$ 0.0198
4	YGFSCLM	1.574	$\pm$ 0.0354	17	SWFAEDA	1.140	$\pm$ 0.2227
6	WITPMPA	1.202	$\pm$ 0.3380	18	AFFASED	0.463	$\pm$ 0.0969
7	GFFADER	1.227	$\pm$ 0.0877	19	TFWAEEG	0.845	$\pm$ 0.1025
8	GWFLRRR	1.384	$\pm$ 0.2546	20	TNMSIHT	0.002	$\pm$ 0.0071
13	SFIEDLI	1.269	$\pm$ 0.0339	10	QLSRPTI	0.0	$\pm$ 0.0007

Asimismo, después de la bioselección con el suero anti- $\beta A_{11-42}$  se secuenciaron las clonas positivas (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) y las clonas negativas (3 y 7) para determinar la región inmunodominante del péptido  $\beta A_{11-42}$ . Dos clonas (1 y 19) fueron eliminadas del análisis por poseer un codón de término en la traducción de su secuencias.

En la tabla 6 se observan los resultados de la secuenciación. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos determinada, las clonas pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

1. El primer grupo lo integran las clonas (2, 4, 11, 14, 16, 22) con la misma secuencia y las clonas 21, 18, las cuales comparten el motivo V Y(F) H V P(I) S.
2. El segundo grupo lo integran las clonas 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15 que presentan el motivo FFFAED que se comparte con la región central del péptido completo  $\beta A_{1-42}$
3. El tercer grupo lo integran las clonas 20 y 17 que no presentan similitud con los dos grupos anteriores o el péptido  $\beta A_{1-42}$ .

Las clonas mostradas en rojo son las clonas negativas.

**Tabla 6. Secuenciación de las clonas reconocidas por los anticuerpos anti- $\beta_{11-42}$ . Se observan la secuencia y densidad óptica (OD)  $\pm$  desviación estándar de cada clona obtenida en ELISA.**

CLONA	SECUENCIA	OD	DS						
					13	SPPFWAF	0.314	$\pm$	0.0651
2,4,11,14,16,22	QVYHVPS	1.384	$\pm$	0.0145	15	SPSFFAT	1.066	$\pm$	0.0148
5	FFWKDRP	1.504	$\pm$	0.0205	17	LMMNPML	0.689	$\pm$	0.0403
6	GSFFAED	0.955	$\pm$	0.1266	18	SVFHTPR	0.940	$\pm$	0.0255
8	FFADDLY	1.452	$\pm$	0.0240	20	FMFDDKD	0.847	$\pm$	0.0198
9	IPGWFAE	1.032	$\pm$	0.0226	21	AVYHVIS	1.359	$\pm$	0.0339
10	AWFAEEH	1.068	$\pm$	0.0721	3	GYQGLPK	0.0	$\pm$	0.0
12	HFFAEDW	1.063	$\pm$	0.0191	7	SHHSQGT	0.0	$\pm$	0.0

#### ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para facilitar el análisis de las secuencias se elaboraron las tablas 7 y 8. En estas tablas, se observan: las clonas acomodadas de acuerdo a los grupos antes mencionados (de acuerdo a su secuencia), la densidad óptica que obtuvieron en el ensayo ELISA y la frecuencia de cada clona. En la figura 12 se muestra la secuencia del péptido de longitud completo  $\beta A_{1-42}$ , donde se marca la región que se comparte con los epítomos encontrados.



<sup>1</sup>DAEFRHDSG <sup>10</sup>YEVHHQKLVF <sup>20</sup>FAEDVGSNKG <sup>30</sup>AIIGLMVGGV <sup>40</sup>VIA

Figura 12. Secuencia completa del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

Tabla 7. Epítomos y mimótopos del péptido  $\beta A_{p(E)_{11-42}}$ .

CLONA	1	2	3	4	5	6	7	Frec	OD
8	G	W	F	L	R	R	R	1	1.384
1-14	G	W	F	A	E	D	Y	2	1.249
17	S	W	F	A	E	D	A	1	1.140
7	G	F	F	A	D	E	R	1	1.227
18	A	F	F	A	S	E	D	1	0.463
2	A	F	F	F	D	E	T	1	1.538
13	S	F	I	E	D	L	I	1	1.269
19	T	F	W	A	E	E	G	1	0.845
4	Y	G	F	S	C	L	M	1	1.574
15	Y	L	F	L	C	L	M	1	0.681
6	W	I	T	P	M	P	A	1	1.202
16	S	R	V	L	M	R	M	1	0.486
20	T	N	M	S	I	H	T	1	0.002
10	Q	L	S	R	P	T	I	1	0.00

Tabla 8. Epítomos y mimótopos del péptido  $\beta A_{11-42}$ .

CLONA	1	2	3	4	5	6	7	Frec	O.D
2,4,11,14,16,22	Q	V	Y	H	V	P	S	6	1,384
21	A	V	Y	H	V	I	S	1	1,359
18	S	V	F	H	T	P	R	1	0,940
15	S	P	S	F	F	A	T	1	1,066
6	G	S	F	F	A	E	D	1	0,955
12	H	F	F	A	E	D	W	1	1,063
10	A	W	F	A	E	E	H	1	1,068
8	F	F	A	D	D	L	Y	1	1,452
5	F	F	W	K	D	R	P	1	<b>1,504</b>
9	I	P	G	W	F	A	E	1	1,032
13	S	P	P	F	W	A	F	1	0,314
20	F	M	F	D	D	K	D	1	0,847
17	L	M	M	N	P	M	L	1	0,689
3	G	Y	Q	G	L	P	K	1	0,000
7	S	H	H	S	Q	G	T	1	0,000

## **DISCUSIÓN**

La EA es un tipo de demencia que afecta a millones de personas en el mundo. Es la segunda causa de dependencia en adultos mayores y genera un gasto económico que equivale al 1% del PIB mundial. Hasta el momento no existe una cura o forma 100% efectiva para tratar la EA. Se han propuesto múltiples estrategias para el tratamiento de la EA, que fueron anteriormente expuestas; sin embargo, en el presente trabajo nos enfocaremos a la inmunoterapia, la cual ha demostrado disminuir los depósitos de  $\beta A$  y revertir el déficit cognitivo que presentan los ratones transgénicos (APP/Tg) y otros modelos animales (Morgan, 2011).

La mayoría de las estrategias inmunoterapéuticas se han enfocado en el péptido  $\beta A$  completo de 42 aminoácidos y específicamente están dirigidas a la región  $_3EFRH_6$  localizada en el extremo N-terminal. No obstante, en 2003 Seargent reportó que el 60% de las variantes encontradas en cerebros de pacientes enfermos corresponde a variantes aminotruncadas que no presentan esa región, además de que el usar el péptido completo ha tenido importantes efectos secundarios como microhemorragias y meningoencefalitis en humanos.

Los péptidos  $\beta A_{11-42}$  y  $\beta Ap(E)_{11-42}$  son variantes amino truncadas y son importantes en el desarrollo de las placas amiloides al actuar como centro de nucleación, los cuales favorecen la formación de agregados tóxicos de  $\beta A$  característicos de los pacientes que presentan la EA. Como ya se mencionó, asimismo, las variantes piroglutamadas poseen resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares e intracelulares (Russo et al., 2002), lo que las hace especialmente tóxicas para el desarrollo de la enfermedad. Todas estas características, hacen a los péptidos  $\beta A_{11-42}$  y  $\beta Ap(E)_{11-42}$  blancos importantes para la inmunoterapia.

El objetivo de esta tesis fue el identificar los epítomos y/o mimótopos de los péptidos  $\beta A_{11-42}$  y  $\beta Ap(E)_{11-42}$  con la finalidad de desarrollar mejores estrategias inmunoterapéuticas, como vacunas basadas en los epítomos.

Para comenzar con el mapeo de epítomos, se caracterizaron los sueros anti- $\beta A_{p(E)_{11-42}}$  y anti- $\beta A_{11-42}$  mediante ELISA y Western Blot. Se encontró que ambos sueros reconocen mediante ELISA al péptido de longitud completa  $\beta A_{1-42}$  y a las variantes aminotruncadas y modificadas (ver figuras 6 y 7). De acuerdo con el Western blot, el

suero anti- $\beta$ A p(E)<sub>11-42</sub> reconoce todas las formas de agregación de los cuatro péptidos (ver figura 8); sin embargo, reconoce los monómeros del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> con menor intensidad. El suero anti- $\beta$ A<sub>11-42</sub> reconoce a monómeros, tetrámeros y oligómeros de los cuatro péptidos; sin embargo, con menor intensidad a los oligómeros del péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>3-42</sub> (ver figura 9), Aunque uno podría atribuir este último resultado a las diferencias en la cinética de agregación de los péptidos utilizados. En trabajos futuros en el laboratorio se van a estudiar esas diferencias. . En general, los resultados obtenidos en esa tesis coinciden con los datos ya reportados en nuestro laboratorio con los anticuerpos obtenidos en conejos y en ratones (Pérez-Garmendia et al., 2010; Navacatorce, 2012).

Una vez caracterizados los sueros, el mayor número de clonas obtenidas después de la bioselección con los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> comparten en sus secuencias los aminoácidos W-F en la posición 2 y un motivo FFA(E,S,D) (E,D) que presenta similitud con la región central del péptido completo  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. Estos resultados señalan que el péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> tiene un epítipo lineal inmunodominante en la región central, en los residuos de aminoácidos 19 a 23. Asimismo, se encontraron mimótopos que se unen a los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> a pesar de que las secuencias no coinciden con la secuencia de residuos de aminoácidos del péptido original.

Los resultados anteriores explican porqué los anticuerpos del suero anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub> presentan reactividad cruzada, i.e., son capaces de reconocer a las tres variantes más importantes del péptido, como ya se reportó en este trabajo y trabajos anteriores. La secuencia del epítipo que consideramos inmunodominante <sub>19</sub>FFAED<sub>23</sub> que presenta el péptido  $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, al encontrarse en la región central, coincide con los residuos de aminoácidos centrales presentes en la secuencia del péptido completo (ver figura 4B), así como en las especies aminotruncadas y modificadas.

Se ha reportado que los anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido reducen el riesgo de manifestar el efecto secundario de microhemorragias (Litchlen, 2008) lo que significa una ventaja terapéutica sobre los anticuerpos dirigidos a otros epítipos como el <sub>3</sub>EFRH<sub>6</sub> dirigido a la región aminoterminal. Considerando todo lo anterior, los inmunógenos capaces de inducir anticuerpos similares a los anticuerpos anti- $\beta$ Ap(E)<sub>11-42</sub>, son de interés para el desarrollo de inmunoterapéuticos para la EA.

Sería interesante evaluar los epítomos/mimótopos seleccionados en esta tesis en el futuro con el fin de observar si son capaces o no de inducir anticuerpos protectores.

En el mapeo de epítomos del péptido  $\beta A_{11-42}$  se encontró que existen dos epítomos inmunodominantes. El primero, basado en el primer grupo de clasificación (ver Tabla 8), que se podría considerar un mimótopo o epítomo conformacional con la secuencia consenso VYHVP; el hecho de que varias clonas presenten la misma secuencia nos marca una clara tendencia hacia un sitio o conformación de reconocimiento por los anticuerpos presentes en el suero anti- $\beta A_{11-42}$ . El segundo epítomo se encuentra en la región central del péptido en los residuos de aminoácidos  ${}_{19}\text{FFAED}_{23}$ , similar al péptido piroglutamado  $\beta\text{Ap(E)}_{11-42}$ . De nuevo, lo anterior explica la reactividad cruzada que presenta el suero anti- $\beta A_{11-42}$  con las otras variantes y que se observa en la figura 7.

El análisis de las secuencias presentadas en las tablas 7 y 8 nos indica que hay un grupo que comparte los aminoácidos F-W, E-D, A, S-T los cuales aunque se encuentran en diferentes posiciones, por lo general, se intercambian sólo por un aminoácido con propiedades similares. Podemos concluir de que hay una predisposición hacia ciertas características estructurales y/o funcionales de esos aminoácidos.

Regresando al epítomo en común  ${}_{19}\text{FFAED}_{23}$ , que también comparte aminoácidos con la secuencia original del péptido  $\beta A$ , se sugiere que es un epítomo lineal que se encuentra en la mayoría de variantes del péptido  $\beta A$ . Es importante mencionar que en el año 2010 Pérez-Garmendia et al. realizaron el mapeo de epítomos del péptido  $\beta\text{Ap(E)}_{11-42}$  utilizando anticuerpos obtenidos al inmunizar conejos con este péptido. Ellos identificaron dos epítomos de células B: el primero localizado en la región N-terminal y el segundo en la región central del péptido. Aunque el presente trabajo se realizó con ratones Balb/c se obtuvieron resultados semejantes confirmando una vez más que existe un epítomo lineal entre los aminoácidos 19-23.

El epítomo  ${}_{19}\text{FFAED}_{23}$  no se ve afectado por el posible cambio conformacional que le confiere la modificación post-traducciona a la variante  $\beta\text{Ap(E)}_{11-42}$  en la cual se lleva a cabo la ciclación del glutamato en la posición 11 del extremo N-terminal; sin embargo, las propiedades inmunogénicas de ambas variantes sí se ven afectadas por esta modificación de acuerdo con estudios hechos en nuestro laboratorio (datos no publicados). Se requiere más estudio para profundizar en el hecho de que aunque exista un epítomo inmunodominante en común, la variante modificada  $\beta\text{Ap(E)}_{11-42}$  es más inmunogénica.

En conclusión, la identificación del epítipo inmunodominante  ${}_{19}\text{FFAED}_{23}$  es de suma importancia para desarrollar una nueva estrategia inmunoterapéutica ya que la inmunización con este epítipo y otros mimótopos encontrados en este trabajo puede inducir una reactividad cruzada, con la cual se estarían atacando a las variantes más importantes del péptido  $\beta\text{A}$  ( $\beta\text{A}_{1-42}$ ,  $\beta\text{A p(E)}_{3-42}$ , y  $\beta\text{A p(E)}_{11-42}$ ), incluso las más tóxicas, con una sola vacuna de epítomos. Además se reducirá el riesgo de microhemorragias. De igual manera, la administración de anticuerpos dirigidos hacia la región mencionada (inmunización pasiva) puede ofrecer tener el mismo efecto.

Como ya se mencionó antes y como perspectiva para este trabajo, sería interesante saber si estos epítomos/mimótopos encontrados en el presente trabajo son capaces de inducir anticuerpos protectores en el modelo murino. Sí es así, comenzar el desarrollo de una vacuna de epítomos que pueda ser valorada en el mismo modelo y evaluar los efectos que ésta pueda tener en el avance del declive cognitivo, la acumulación y presencia de placas amiloides, microhemorragias y conducta general de los ratones. Y con esto contribuir con la búsqueda de una cura contra la EA.

## CONCLUSIONES

Los anticuerpos de los sueros anti- $\beta A_{11-42}$  y anti  $\beta Ap(E)_{11-42}$  reconocen a las cuatro variantes más importantes del péptido  $\beta A$ :  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{11-42}$ .

El péptido  $\beta Ap(E)_{11-42}$  presenta un epítipo inmunodominante en la región central:  ${}_{19}FFAED_{23}$ .

El péptido  $\beta A_{11-42}$  presenta dos epítipos: el primero, que no comparte aminoácidos con la secuencia completa (VYHVP) y el segundo que se encuentra en la región central ( ${}_{19}FFAED_{23}$ ).

El epítipo lineal  ${}_{19}FFAED_{23}$  no se ve afectado por la modificación post-traducciona (glutamato piroglutamato) de la variante  $\beta Ap(E)_{11-42}$ .

Se encontraron mimótipos que imitan epítipos conformacionales del péptido  $\beta A$ .

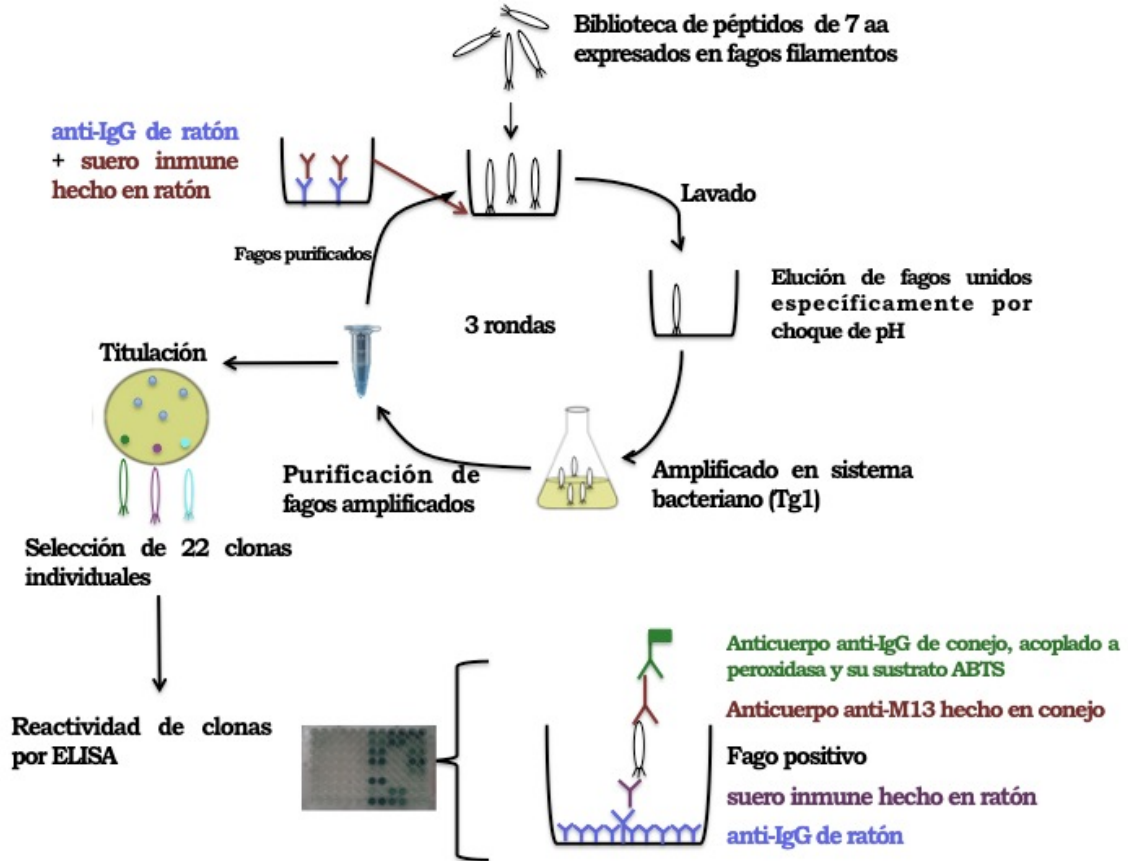
Los epítipos y mimótipos ya identificados en este trabajo se pueden emplear para desarrollar inmunógenos que induzcan anticuerpos protectores para el tratamiento de la EA, los cuales tendrían la ventaja de estar dirigidos a la región central, que a su vez les conferiría la ventaja de reconocer a las variantes más relevantes del péptido  $\beta A$  y reducir el riesgo de inducir microhemorragias.

Debido a las ventajas de las vacunas de epítipos, se podría aumentar la eficacia de la inmunoterapia en el tratamiento de la EA.

Se requieren más estudios para saber si los epítipos y mimótipos encontrados en el presente trabajo desencadenan una respuesta inmune general a los péptidos originales.

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1. ESQUEMA DE BIOSELECCIÓN



### APÉNDICE 2. BACTERIÓFAGO M13

Este virus pertenece al género *Inovirus* e infecta a bacterias gram negativas mediante el pili de la bacteria sin generar lisis. Este fago mide aproximadamente 6.5nm de diámetro y 930nm de largo, la longitud depende del tamaño del genoma. Su genoma comprende una sola hebra de ADN circular de cadena sencilla con 6.4kb, esta formado por 11 genes de los cuales 5 codifican a proteínas de la cápside: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. Un fago viable expresa 2,700 copias de la proteína pVIII (50aa) que es la principal de la cápside del fago. La proteína pIII (340aa), que se utiliza frecuentemente para el despliegue en fagos, es una de las cuatro proteínas menores que forman al fago y se encuentra expresada de 3 a 5 copias en uno de los extremos del fago.

Para iniciar la infección, la cadena de ADN circular es convertida en una forma replicante (FR) de ADN de doble cadena. Esta forma se replica por el mecanismo de círculo rodante, generando cadenas sencillas de ADN que sirven como templado, que posteriormente se convierten en FRs. Varias copias de cadena sencilla son sintetizadas y empaquetadas, y finalmente la progenie viral es liberada en forma infectiva (Azzazy et al. 2002)

### APÉNDICE 3. PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS

#### Buffer de Fosfatos Salino (PBS) 10X

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (JT Baker, México)	5.4436g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56.784g
NaCl	320.2512g
KCl	8.0514g
H <sub>2</sub> OMQ	3.8ml

Ajustar pH a 7.0 y aforar a 4L. Guardar a temperatura ambiente (TA).

#### Para PBS 1X

Diluir y ajustar el pH a 7.2

#### Tris buffer salino (TBS) 10X

Tris Base (BioRad, USA)	656g
NaCl (JT Baker, México)	87.6g
H <sub>2</sub> OMQ	800 ml

Ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1L. Guardar a temperatura ambiente.

#### Para TBS 1X

Diluir y ajustar el pH a 7.2

#### Buffer de Carbonatos

NaHCO <sub>3</sub>	7.13g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59g
H <sub>2</sub> OMQ	1000ml

Ajustar pH a 9.6 con NaOH y guardar a 4°C.

#### Buffer de Yoduro

Tris-HCl	10mM
----------	------



EDTA	1mM
NaI	4M

Disolver y proteger de la luz. Guardar a temperatura ambiente.

#### **Medio 2XYT**

2-YT Broth (Invitrogen CA, USA)	31g
H <sub>2</sub> OMQ	1000ml

Disolver y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Guardar a TA.

#### **Medio LB agar**

LB agar (Invitrogen CA, USA)	32g
H <sub>2</sub> OMQ	1000 ml

Disolver y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Guardar a TA.

#### **Medio Top Agar**

LB Broth Base (Gibco BRL, Escocia)	20g
Bacto Agar (DIFCO, Becton Dickinson, Francia)	7g
H <sub>2</sub> OMQ	1000 ml

Disolver y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Guardar a TA.

#### **Glicina-HCl**

Glicina	0.2M
---------	------

Ajustar pH a 2.2 con HCl.

#### **Tris-HCL**

Tris	1M
------	----

Ajustar pH a 9.1 con HCl.

#### **Peg/NaCl**

NaCl	2.5M
Polietilenglicol	20%p/v

Mezclar y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Guardar a TA

### **X-gal/IPTG**

X-gal	1g
IPTG	1.25g
Dimetilformamida	25ml

Guardar a -20°C

### **PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS**

Para la preparación de los oligómeros de los péptidos  $\beta A_{1-42}$ ,  $\beta Ap(E)_{3-42}$ ,  $\beta A_{11-42}$  y  $\beta Ap(E)_{11-42}$ , primero se diluyeron los péptidos sintéticos (AnaSpec, California EUA) en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (Sigma-Aldrich, Francia) a 4°C a una concentración de 1 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora para obtener los monómeros. Los tubos se evaporaron toda la noche a temperatura ambiente en la campana de extracción y se liofilizaron por tres días.

Para obtener los oligómeros, los péptidos liofilizados se resuspendieron, en esterilizado, con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Francia) a una concentración de 5mM y se llevaron a 230  $\mu$ M con PBS 1X estéril. Para formar los oligómeros se dejaron los tubos a 37°C toda una noche. Posteriormente se almacenaron a 4°C.

## REFERENCIAS

- ADI, Alzheimer's Disease International. 2009. *World Alzheimer Report 2009*. Prince, M.J y Jackson, J. Editores. London, Alzheimer's Disease International.
- Alcantar N.A.; Jimenez J.; Morgan D. 2010. Direct observation of the kinetic mechanisms for A $\beta$  peptide aggregation: Towards elucidating Alzheimer plaque dissolution. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*; **6**:S247.
- Alzheimer's Association. 2014. El Alzheimer y el Cerebro. Consultado el 24 de febrero de 2014. <[http://www.alz.org/espanol/about/el\\_alzheimer\\_y\\_el\\_cerebro.asp](http://www.alz.org/espanol/about/el_alzheimer_y_el_cerebro.asp)>.
- Arvanitakis Z; Leurgans S.E.; Wang Z.; Wilson R.S.; Bennet D.A.; Schneider J.A. 2011. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol*. **69**: 320–327.
- Azzazy H. y Highsmith E. 2002. Phage Display Technology: Clinical Applications and Recent Innovations. *Clinical Biochemistry*; **35**:425-445.
- Barbas C.F.; Burton D.R.; Scott J.K. 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Barnes D.E. y Yaffe K. 2011. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurology*, **10 (9)**: 819–828.
- Batsch, L. N.; Mittelman, S. M. y Alzheimer's Disease International. 2012. *World Alzheimer Report 2012: Overcoming the stigma of dementia*. London, Alzheimer's Disease International.
- Braak H.; Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*; **82**: 239–259.
- Braak H.; Del Tredici K. 2011. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathology*. **121**: 171–181.
- Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol*; **545**:39–50.
- Castellani R.J.; Rolston R.K.; Smith M.A. 2010. Alzheimer Disease. *Dis. Mon*; **56 (9)**: 484-546.

- Citron, M.; Westaway, D.; Xia, W. et al. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine*. **3 (1)**: 67–72.
- Combs B, Voss K, Gamblin TC. 2011. Pseudohyperphosphorylation has differential effects on polymerization and function of Tau isoforms. *Biochemistry*; **50**: 9446–56.
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J. et al. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. **261 (5123)**: 921– 923.
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Risch, N. J. et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer Disease. *Nature Genetics*. **7 (2)**: 180–184.
- Cruts, M.; van Duijn, C. M.; Backhovens, H. et al. 1998. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer Disease. *Human Molecular Genetics*. **7 (1)**: 43–51.
- De Groot A.S. 2004. Immunome-derived vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther*; **4**:767–772.
- DeMattos R.B.; Bales K.R.; Cummins D.J.; Dodart J.C.; Paul S.M.; Holtzman D.M. 2001. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; **98**: 8850–5.
- Deshpande A; Mina E; Glabe C; Busciglio J. 2006 Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci*; **26**:6011–6018.
- Dickerson B.C.; Bakkour A.; Salat D.H.; Feczko E.; Pacheco J.; Greve D.N.; Grodstein F.; Wright C.I.; Blacker D.; Rosas H.D.; et al. 2009. The cortical signature of Alzheimer's disease: Regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex*. **19**: 497–510.
- Dickerson B.C.; Stoub T.R.; Shah R.C.; Sperling R.A.; Killiany R.J.; Albert M.S.; Hyman B.T.; Blacker D.; Detolledo-Morrell L. 2011. Alzheimer-signature MRI

- biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*. **76**: 1395–1402.
- Duyckaerts C.; Delatour B.; Potier M. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*; **118**: 5-36.
- El-Agnaf O.M.A., Guthrie D.J.S., Walsh D.M., Irvine G.B. 1998. The influence of the central region containing residues 19-25 on the aggregation properties and secondary structure of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide. *Eur. J. Biochem*; **256**: 560-569.
- Fitzpatrick A.L. et al. 2005. Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*. **229–230**: 43–49.
- Gevorkian. G.;Petrushina I.; Manoutcharian K.; Ghochikyan A.; Acero G.; Vasilevko V.; Cribbs D.H.; Agadjanyan M.G. 2004. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amiloid. *J. Neuroimmunol*. **156**: 10-20.
- Global Burden of Disease: 2004 (actualizado). 2008. Genova, World Health Organization.
- He, W. y Barrow, C. J. 1999. The A beta 3-pyroglutamyl and 11- pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*; **38**: 10871–10877.
- Hofman A. et al. 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*, **349**: 151–154.
- Huse J.T.; Liu K.; Pijak D.S.; Carlin D.; Lee V.M.; Doms R.W. 2002. Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*; **277(18)**:16278-84.
- INNN, Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugia . 2010. Enfermedad de Alzheimer. Consultado el 24 de febrero de 2014 en: <<http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html>>.
- Janssen, J. C.; Beck, J. A.; Campbell, T. A. et al. 2003. Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families. *Neurology*. **60 (2)**: 235–239.

- Jawhar S.; Wirths O. y Bayer T.A. 2011. Pyroglutamate Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ): A Hatchet Man in Alzheimer Disease. *J Biol Chem*; **286(45)**: 38825-38832.
- Jayadev, S.; Leverenz, J. B.; Steinbart, E. et al. 2010. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain*. **133 (4)**: 1143–1154.
- Kimberly W.T; LaVoie M.J; Ostaszewski B.L.; Ye W.; Wolfe M.S.; Selkoe D.J. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**: 6382–6387.
- Kivipelto M. et al. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *British Medical Journal*, **322 (7300)**: 1447–1451.
- Koffie R.; Hyman B.; Spires-Jones T. 2011. Alzheimer's Disease: synapses gone cold. *Molecular degeneration*; **6**: 63.
- Kuo Y.M.; Emmerling M.R.; Vigo-Pelfrey C.; Kasunic T.C.; Kirkpatrick J.B.; Murdoch G.H.; Ball M.J.; Roher A.E. 1996. Water-soluble A $\beta$ <sub>N-40, N-42</sub> oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem*; **271**:4077–4081.
- Lambert M.P.; Barlow A.K.; Chromy B.A.; Edwards C.; Freed R.; Liosatos M.; Morgan T.E.; Rozovsky I.; Trommer B.; Viola K.L.; Wals P.; Zhang C.; Finch C.E.; Krafft G.A.; Klein WL. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ <sub>1-42</sub> are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*; **95**:6448–6453.
- Lemere C.A. y Masliah E. 2010. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-B immunotherapy? *Nat. Rev. Neurol*; **6(2)**: 108-119.
- Lichtlen, P. y Mohajeri M. H. 2008. Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools, *J Neurochem*; **104**: 859-74.
- Mayrose I.; Shlomi T.; Rubinstein N.D.; Gershoni J.M.; Ruppin E.; Sharan R.; Pupko T. 2007. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res*; **15(1)**:69–78.
- Meola A.; Delmastro P.; Monaci P.; Luzzago A.; Nicosia A.; Felici F.; Cortese R.; Galfre G. 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic propertie

- of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. Of Immunol*; **154(7)**:3162-3172.
- Mi K, Johnson GV. 2006. The role of Tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*; **3**: 449–63.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, et al. 2012. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol*; **123**:1–11.
- Morgan, D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *J Intern Med*; **269(1)**:54-63.
- Murphy M.P. y LeVine H. 2010. Alzheimer's Disease and  $\beta$ -Amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* ; **19**: 311–23.
- Musiek E.S. y Holtzman D.M. 2012. Origins of Alzheimer's disease: reconciling cerebrospinal fluid biomarker and neuropathology data regarding the temporal sequence of amyloid-beta and Tau involvement. *Current Opinion in Neurology*; **25(6)**: 715-720.
- Nava-Catorce C.M. 2012. Evaluación de tres especies patogénicas del péptido Beta amiloide en ratones. Tesis profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Nelson P.T; Alafuzoff I.; Bigio E.H. et al. 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*; **2**: 362–381.
- NIA, National Institute on Aging y Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. 1997. *Neurobiol Aging*; **18**:S1–2.
- NIH, National Institutes of Health. 2010. La enfermedad de Alzheimer. Consultado el 24 de febrero de 2014 en: <<http://www.nia.nih.gov/espanol/publicaciones/la-enfermedad-de-alzheimer>>.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2012. *Demencia*. Consultado el 22 de febrero de 2014 en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>>.
- Opazo C. 2005. Metales de transición y enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Geriatr Gerontol*; **40(6)**: 365-70.

- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 2013. *Demencia: una prioridad de salud pública*. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud.
- Ott A. et al. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. *Neurology*, **53 (9)**: 1937–1942.
- Pérez-Tur J. 2000. La genética y la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurology* 2000; **30**: 161-169.
- Pérez-Garmendia R.; Ibarra-Bracamontes V.; Vasilevko V.; Luna-Muñoz J.; Mena R.; Govezensky T.; Acero G.; Manoutcharian K.; Cribbs D.H.; Gevorkian G. 2010. Anti-11[E]-pyroglutamate- modified amyloid  $\beta$  antibodies cross-react with other pathological A $\beta$  species: relevance for immunotherapy. *J Neuroimmunol*; **229 (1-2)**: 248-255.
- Pfeifer LA, White LR, Ross GW, Petrovich H, Launer LJ. 2002. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: The HAAS autopsy study. *Neurology*. **58**: 1629– 1634.
- Pike C.J.; Cummings B.J.; Cotman C.W. 1992  $\beta$ -Amyloid induces neuritic dystrophy *in vitro*: similarities with Alzheimer pathology. *NeuroReport*; **3**:769–772.
- Pike C.J.; Overman M.J.; Cotman C.W. 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides *in vitro*. *J Biol Chem*; **270(41)**:23895-8.
- Ramos, P.; Serrano, P.; Ribera, JM.; Bermejo, F.; Vega, S.; Gil, P.; et al. 2007. *La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Detección y cuidados en personas mayores*. Madrid, España: Comunidad de Madrid.
- Rosenberg R.N. 2000. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning. *The 2000 Wartenberg lecture. Neurology* 2000; **54**: 2045-2054.
- Russo, C.; Violani, E.; Salis, S.; Venezia, V.; Dolcini, V. y Damonte, G. 2002. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides – A $\beta$ N3(pE) – strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem* **82**: 1480–1489.
- Saido T.C.; Iwatsubo T.; Mann D.M.; Shimada H.; Ihara Y.; Kawashima S. 1995. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A $\beta$  N3(pE), in senile plaques. *Neuron*; **14(2)**:457-66.
- Saunders A.M.; Strittmatter W.J.; Schmechel D.; St George-Hyslop P.H.; Pericak-Vance M.A.; Joo S.H.; et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele E4



- with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; **43**: 1467-72.
- Schachter F.; Faure-Delane L.; Guenot F.; Rouger H.; Froguel P.; Lesueur- Ginot L.; et al. 1994. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* 1994; **6**: 29-32.
- Scheff SW, Price DA. 2006. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Di*; **9**:101-15.
- Schlenzig, D.; Manhart, S.; Cinar, Y.; Kleinschmidt, M.; Hause, G.; Willbold, D.; Funke, S. A.; Schilling, S.; Demuth, H.U. 2009. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides, *Biochemistry*; **48**: 7072-8.
- Selkoe D.J. y Kopan R. 2003. Notch and Presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual Review of Neuroscience*; **26**: 569-97.
- Selkoe D.J. y Schenk D. 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; **43**:545-84.
- Sergeant N.; Bombois S.; Ghestem A.; Drobecq H.; Kostanjevecki V.; Missiaen C.; Wattez A.; David J.P.; Vanmechelen E.; Sergheraert C. y Delacourte A. 2003. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach, *J Neurochem*; **85**: 1581-91.
- Serrano-Pozo A.; Frosch P.M.; Masliah E. y Hyman T.B. 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*; **1**:a006189
- Skoog I. et al. 1996. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet*, **347 (9009)**: 1141-1145.
- Sohma Y.; Yamasaki M.; Kawashima H.; Taniguchi A.; Yamashita M.; Akaji K.; Mukai H.; Kiso Y. 2012. Comparative properties of A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 11-42 and [Pyr<sup>11</sup>]A $\beta$ 11-42 generated from O-acyl isopeptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **23**: 1326-1329.
- Spires T.L.; Meyer-Luehmann M.; Stern E.A.; McLean P.J.; Skoch J.; Nguyen P.T.; Bacskai B.J.; Hyman B.T. 2005. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*; **25**:7278-7287.

- Steiner, H.; Winkler, E.; Edbauer, D. et al. 2002. PEN-2 is an integral component of the  $\gamma$ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *The Journal of Biological Chemistry*. **277 (42)**: 39062–39065.
- Tomlinson B.E.; Blessed G.; Roth M. 1970. Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci*; **11**: 205–42.
- Ugen K.E. y Morgan D. 2001. Alzheimer's Disease: Molecularly Based Immunotherapeutics. *DNA and Cell Biology*; **20(11)**: 677-678.
- Walsh D.M.; Klyubin I.; Fadeeva J.V.; Rowan M.J.; Selkoe D.J. 2002. Amyloid- $\beta$  oligomers: their production, toxicity, and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans*; **30**:552–557.
- Wimo A. y Prince M. 2010. *World Alzheimer Report 2010; The Global Economic Impact of Dementia*. London, Alzheimer's Disease International.
- Zhang Y.; Thompson R.; Zhang H.; Xu H. 2011. APP procesing in Alzheimer's Disease. *Mol Brain*, **4**: 3.