



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE
MUTACIÓN FLEMISH (ALA-692-GLY) CON BIBLIOTECAS DE
PEPTIDOS EXPRESADAS EN FAGO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :
CARLOS SANDOVAL BORJA**

ASESORES:

**DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSYAN
BIOL. GONZALO ACERO GALINDO**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

EN MEMORIA DE MI ABUELA:

GUADALUPE ZAMORA CAMACHO

Y DE UN GRAN AMIGO:

ANIBAL ALVAREZ GATICA "ROMAN"

A DIOS Y A MIS PADRES CARLOS SANDOVAL GARCIA Y GLORIA BORJA ZAMORA, POR DARMER LA VIDA, APOYARME EN TODO Y REPRENDERME POR TODO LO ILÓGICO QUE HAGO.

A KARINA POR ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, POR QUERERME COMO SOY Y POR SER LA MEJOR PERSONA QUE HE CONOCIDO EN EL UNIVERSO.

A MIS HERMANAS Y HERMANO: ELIZABETH, PAULINA Y ALBERT, QUE AUNQUE NO ME AYUDARON EN NADA SE QUE ESTAN AHI PARA CUANDO LOS NECESITE.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser una mejor persona proporcionándome las herramientas y conocimientos necesarios.

A la Dra. Gohar Gevorgyan y al Dr. Karen Manucharyan por permitirme participa en este proyecto tan interesante.

A Gonzalo Acero por estar siempre atento de mi progreso y desempeño en el laboratorio además de todos lo conocimientos transmitidos y principalmente por ser una gran persona.

A la M en C. Maria Elena Munguía por todo el tiempo dedicado a enseñarme técnicas de laboratorio, en especial la técnica de secuenciación.

A todos mis profesores de la FES Cuautitlan en especial a mis sinodales por tomarse el tiempo necesario para revisar este trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biomédicas: Alejandra, Carmen, Mayra, Claudia, Gilda, Marcia, Jessica, Mactzil, Erika, Rodrigo, Jorge, Cesar, Carlos, David, Jorge V., por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar y pasar el tiempo.

A mis compañeros y amigos del depto: Lety, Araceli, Edgar, Luis (judicial), Silver, Cesáreo, Luis Macias, Álvaro, Iván, Erick (hidro), Mario y a dos colados que siempre se la vivían ahí: Erick Ricardo y Adolfo, sin olvidar al piporro. A todos gracias por todo el apoyo incondicional, por todas esas noches de estudio, y por tantos records superados.

A mis compañeros y amigos de la Fac: Elia, Angélica, Miriam, Dulce, Itzel, Blanca, Juanita, Marmota, Beto, Fredy, Vaquero, Gabriel, Güera, Alma, Compagny, Nancy, Primo, y a todos los que en algún momento formaron parte de la poderosa U de B.

Finalmente a todos mis amigos del rancho MF por enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista.

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCION	1
1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.2. SINTOMAS Y PATOGENIA	3
1.3. PEPTIDO BETA AMILOIDE (A β)	5
1.4. PROCESAMIENTO DE LA PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE (APP)	6
1.5. MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO DE LA APP	8
1.6. MUTACION FLEMISH	9
1.7. TRATAMIENTO	10
1.8. MIMÓTOPOS Y MAPEO DE EPÍTOPOS	13
1.9. TECNOLOGIA DE DESPLIEGUE EN FAGO (PHAGE DISPLAY)	14
1.10. CICLO DE INFECCIÓN DEL BACTERIOFAGO M13	16
1.11. BIOSELECCIÓN	18
2. JUSTIFICACIÓN	20

3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL	21
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	22
4.1. MATERIALES	22
4.2. ESQUEMA METODOLÓGICO	23
4.3. METODOLOGÍA	24
4.3.1. OBTENCION DE SUERO α -BETA AMILOIDE	
MUTACIÓN FLEMISH (α -FM)	24
4.3.2. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-A β	24
4.3.3. BIOSELECCIÓN (BIOPANNING)	25
4.3.4. ELUCIÓN DE FAGOS	25
4.3.5. TITULACIÓN DE FAGOS	25
4.3.6. AMPLIFICACIÓN	26
4.3.7. SELECCIÓN DE CLONAS AL AZAR	27
4.3.8. PURIFICACIÓN DE CLONAS	27
4.3.9. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES	28
4.3.10. SECUENCIACION DE CLONAS	29
4.3.11 . ANALISIS DE HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS	30
4.3.12 . REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES CON SUEROS	
CONTRA DIFERENTES FORMAS DEL PEPTIDO A β	30

5.	RESULTADOS	32
5.1.	TITULACION DE SUEROS EXPERIMENTALES	32
5.2.	BIOSELECCIÓN	33
5.3.	TITULO DE CLONAS ANTI-FM	34
5.4.	REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES	34
5.5.	SECUENCIACIÓN	36
5.6.	EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES CON SUEROS CONTRA DIFERENTES FORMAS DEL PEPTIDO A β .	38
5.7.	ALINEACIÓN DE CLONAS ANTI-FM CON EL PEPTIDO A β -FM	40
6.	DISCUSIÓN	41
7.	CONCLUSIONES	44
8.	PERSPECTIVAS	45
	APENDICES	46
	BIBLIOGRAFIA	50

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación de los NFT y de las SP	4
FIGURA 2. Hipótesis de Cascada Amiloide	5
FIGURA 3. Estructura de la APP	7
FIGURA 4. Secuencia del péptido A β dentro de la APP	8
FIGURA 5. Mutaciones presentes en la APP	9
FIGURA 6. Esquema del fago filamentoso M13	15
FIGURA 7. Ciclo de vida del fago M13	17
FIGURA 8. Proceso de Bioselección	19
FIGURA 9. Titulación de Sueros Anti-A β Flemish	32
FIGURA 10. Reactividad de clonas anti-FM (clonas 1-10)	35
FIGURA 11. Reactividad de clonas anti-FM (clonas 11-21)	35
FIGURA 12. ADN de clonas anti-FM	36
FIGURA 13. Evaluación de clonas con diferentes sueros contra A β	39
FIGURA 14. Evaluación de clonas con diferentes sueros contra A β	39

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Titulo de rondas de Bioselección Anti-FM	33
TABLA 2. Titulo de clonas Anti-FM	34
TABLA 3. Secuencia de nucleótidos de las 21 clonas seleccionadas	37
TABLA 4. Secuencia de aminoácidos de clonas Anti-FM	38
TABLA 5. Alineación de clonas Anti-FM con el péptido A β -FM	40

ABREVIATURAS

ABTS	Sustrato revelador de la enzima HRP
ACAT	Acetilcolinesterasa y Colesterolacetiltransferasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Anti-Inflamatorios No Esteroideos
Ala	Alanina
APP	Proteína Precursora del Amiloide
APP/Tg	APP Transgénicos
Aβ	Beta Amiloide
BSA	Albúmina Serica Bovina (Bovine Serum Albumine).
CAA	Angiopatía Amiloide Congofílica
dNTPs	Desoxinucleótidos
ddNTPs	Didesoxinucleótidos
DM	Mutación Dutch (Dutch Mutation).
DO	Densidad Óptica
DTT	Dithiothreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EFRH	Secuencia de aminoácidos altamente inmunogénica
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FM	Mutación Flemish
Gly	Glicina
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Inmunoglobulina Tipo G
IPTG	(isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida)
kDa	Kilo Daltones
NFT	Ovillos Neurofibrilares (Neuro Fibrillar Tangles).
PBS	Buffer salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline).
PBST	Buffer salino de fosfatos con Tween 20.
PEG	Polietilenglicol.

PHF	Filamentos Helicoidales Pareados
rpm	Revoluciones por minuto
S³⁵	Azufre radioactivo
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Placas Seniles
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBS	Tris Buffer Salino
TRIS	(Tris [hidroximetil] aminometano)
WT	Tipo Silvestre (Wild Type)
X-Gal	(5-Bromo-4-Cloro-3-Idoly- ² -D-Galactopyranoside)
A	Alanina
V	Valina
L	Leucina
I	Isoleucina
P	Prolina
M	Metionina
F	Fenilalanina
W	Triptofano
G	Glicina
S	Serina
T	Treonina
C	Cisteína
N	Asparagina
Q	Glutamina
Y	Tirosina
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutámico
K	Lisina
R	Arginina
H	Histidina

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central que se manifiesta por deficiencias en la memoria y conducta, demencia progresiva y finalmente la muerte. Esta enfermedad es la causa más común de muerte entre personas adultas de entre 80 a 85 años. Se caracteriza por la presencia de placas seniles en la corteza cerebral constituidas por un centro de agregación de péptido Beta Amiloide ($A\beta$), rodeado por neuritas distróficas y células de la microglía, otro marcador es la presencia de ovillos neurofibrilares, constituidos por una proteína anormalmente fosforilada llamada proteína TAU.

El péptido Beta Amiloide proviene del procesamiento de una glicoproteína de membrana tipo I, llamada Proteína Precursora del Amiloide, por dos diferentes actividades enzimáticas: β y γ -secretasas.

Diferentes mutaciones en el gen de la Proteína Precursora del Amiloide (APP) se asocian a fenotipos variables de la enfermedad. La mutación Flemish, la cual ocurre por un intercambio en la secuencia de aminoácidos de la APP Ala-692-Gly dentro de la secuencia del péptido $A\beta$, provoca en personas menores de 60 años la patología de Alzheimer y además hemorragia cerebral.

Debido al papel central del péptido β -amiloide en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer se ha propuesto la hipótesis de cascada amiloide la cual describe una serie de eventos no completamente comprendidos, que involucran el mal plegamiento del péptido $A\beta$, culminando con el establecimiento de esta patología. Se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad, algunas solo se enfocan en los síntomas de ésta sin involucrarse en la modificación de la enfermedad.

Otras estrategias en el contexto de la hipótesis de cascada amiloide incluyen la inhibición de secretasas, para la reducción de la producción del péptido $A\beta$, o la inhibición de su agregación y la promoción de su remoción, estas dos últimas mediante inmunoterapia en el modelo murino.

La transferencia pasiva de anticuerpos de alta especificidad, dirigidos al fragmento amino terminal del péptido A β , tiene la capacidad de desagregar los núcleos del péptido A β y reducir la patología, lamentablemente se encontró que este tratamiento provoca inflamación y hemorragias cerebrales severas.

Un aspecto poco explorado es la búsqueda de anticuerpos dirigidos a la región media o carboxilo terminal del péptido A β y su evaluación en la capacidad desagregante. Debido a la tendencia del péptido A β mutación Flemish a provocar amiloidosis vascular por la sustitución de un residuo de Alanina por Glicina es de gran interés identificar el epítipo, ya sea lineal o conformacional involucrado en la patología, con el fin de desarrollar anticuerpos que neutralicen su efecto patológico.

La búsqueda de estos epítipos se realizó mediante la tecnología de Despliegue en Fago (Phage Display), una estrategia que permite la expresión de uno o una biblioteca de péptidos o proteínas al azar como fusión con las proteínas de la cubierta de un bacteriófago.

Utilizando una biblioteca comercial de siete aminoácidos al azar, expresada en fago M13, se llevaron a cabo tres rondas de bioselección, se seleccionaron 21 clonas al azar, se identificaron las clonas positivas por ELISA y posteriormente fueron secuenciadas. De las 21 clonas elegidas al azar únicamente el 15% de ellas resultaron negativas mientras que el 85%, es decir 18 clonas, resultaron positivas. Al analizar la secuencia de las 21 clonas se encontró que dentro de las 18 clonas positivas diez de ellas contenían el motivo EFRH amino terminal, es decir el 50% de las clonas analizadas contenían este motivo, lo cual explica la reactividad de estas clonas. Es importante resaltar que las clonas restantes que también resultaron positivas no presentaron en su secuencia el motivo EFRH, pero cada una de ellas presentó una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia de la región central (17-24) del péptido A β mutación Flemish, indicando que éste es un posible sitio de alta inmunogenicidad, a diferencia del péptido A β silvestre.

1. INTRODUCCION

1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo y la causa más común de demencia senil. Se manifiesta inicialmente por afectar levemente las funciones cognitivas como pérdida de la memoria episódica de corto plazo y la orientación en tiempo y espacio. Posteriormente hay pérdida creciente de la función motora, equilibrio y caminata. Después de una década o más tiempo, se presenta demencia marcada, desorientación e inmovilidad total hasta la muerte (Hendriks *et al.*, 1996; Van Gassen *et al.*, 2003).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el mundo hay alrededor de 20 millones de enfermos de la EA. Actualmente en México hay cerca de 500 mil personas afectadas, cifra que en menos de 10 años podría triplicarse si se considera que la población mayor tiende a crecer vertiginosamente. Para el año 2040 se calcula que sólo en Estados Unidos habrá 14 millones de enfermos, a no ser que se encuentre una forma eficaz de prevención. China, India y Latinoamérica experimentarán el mayor crecimiento de enfermos de Alzheimer; en estos países se encontrará el 70% de los afectados de todo el mundo (www.who.int/es/).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer, con el caso de una paciente de 51 años de edad, Auguste D., que presentaba fuertes sensaciones de celos hacia su marido, deficiencia en la memoria, desorientación, alucinaciones y un comportamiento agresivo. Después de cuatro años y medio, en los cuales sufrió un rápido deterioro mental, Auguste D. murió en completo estado de demencia. Análisis histológicos posmortem de su cerebro revelaron densos conglomerados de una inusual fibrilla dentro de las células nerviosas a los que posteriormente se denominó ovillos neurofibrilares (NFT) y numerosas lesiones focales dentro de la corteza cerebral, subsecuentemente llamadas “placas seniles” (Allsop, 2000).

Esta combinación de demencia senil progresiva con placas seniles y ovillos neurofibrilares comenzó a ser conocida como la enfermedad de Alzheimer (EA), un término que fue posteriormente ampliado para incluir formas seniles de demencia con características neuropatológicas similares (Allsop, 2000).

Genéticamente la Enfermedad de Alzheimer es considerada como dicotómica, puede ser de desarrollo temprano cuando hay mutaciones persistentes que se transmiten de manera autosomal, o de desarrollo tardío debido a polimorfismos comunes (Tanzi *et al.*, 2001). Existen también evidencias que indican que la variabilidad génica en el catabolismo del péptido A β y su remoción pueden contribuir al riesgo de desarrollo temprano de la Enfermedad de Alzheimer (Montero, 2004).

Estudios genéticos han permitido demostrar la implicación de varios cromosomas en el desarrollo de la enfermedad. Los cromosomas 1, 14 y 21 se asocian a formas familiares de inicio precoz. Mientras que las formas de inicio tardío aparecen ligadas a los cromosomas 12 y 19 (Menéndez *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de los casos de la EA no pueden ser explicados genéticamente; para estos casos se han planteado hipótesis entre las que cabe señalar las que inciden en los aspectos genéticos, que sugieren la existencia de posibles agentes infecciosos no claramente identificados como el caso de algunos virus, aunque todavía no se ha podido demostrar la relación causal entre virus específicos y la EA.

También se sugiere la acción de tóxicos desconocidos, bien sean ambientales o endógenos ya que algunos estudios de laboratorio muestran la formación de placas de beta-amiloide en presencia de niveles altos de iones metálicos como zinc, cobre, hierro y aluminio. Parece que esta acción se incrementa en un medio ligeramente ácido. Por otro lado, se ha observado que precisamente estas condiciones de elevado nivel de zinc o cobre en un medio acidificado, se dan como parte de la respuesta inflamatoria local frente a la lesión. La influencia de todos estos factores incrementara el riesgo de padecer la enfermedad a lo largo de la vida (Menéndez *et al.*, 2000; Tschampa *et al.*, 2001; Flaten, 2001).

1.2. SINTOMAS Y PATOGENIA.

Al inicio de la Enfermedad de Alzheimer, las personas pueden tener problemas para recordar nombres y caras familiares, actividades recientes, la fecha del día, o lo que comieron para el desayuno. A menudo familiares y amigos no reconocen los síntomas tempranos de la enfermedad de Alzheimer porque comienzan con cambios imperceptibles en la conducta y personalidad, y progresan lentamente. Otras veces, estos síntomas son considerados como parte del proceso normal de envejecimiento. Sin embargo, los síntomas de la enfermedad de Alzheimer no son parte natural del envejecimiento. Afecta al cerebro, borrando la experiencia adquirida a través de los años; se olvidan nombres, fechas, lugares. Las tareas más simples, como decir la hora, su propio nombre, utilizar los cubiertos, ir al baño, sujetar las tijeras para cortar un pedazo de papel, se convierten en algo imposible. Una persona en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer puede continuar con sus actividades regulares. Esto hace aún más difícil reconocer la enfermedad. Más tarde, los síntomas se profundizan y comienzan a interferir con la vida diaria del paciente (www.alzheimer.org.mx). Los síntomas para identificar una persona afectada por la Enfermedad de Alzheimer son:

- Pérdida de memoria
- Desorientación en tiempo, lugar y persona
- Repeticiones continuas
- Perder cosas o colocarlas en lugares equivocados
- No reconocer a familiares o lugares
- Cambios de comportamiento y personalidad (se vuelven agresivos o pasivos)
- Incapacidad para realizar actividades de la vida diaria (aseo personal, habilidad para comer, pérdida del control de sus necesidades fisiológicas)
- Angustia, depresión, insomnio y agitación.
- Dificultades en el habla y los movimientos
- Alucinaciones ocasionales

Lamentablemente estos síntomas marcados son perceptibles cuando la enfermedad ya se encuentra en una etapa avanzada.

Clínicamente, la enfermedad puede ser diagnosticada con base en exámenes neurológicos, pruebas neuropsicológicas e imágenes cerebrales usando técnicas tales como tomografía por computadora y resonancia magnética. Sin embargo, un diagnóstico definitivo de la enfermedad solo puede ser obtenido por examen histológico pos-mortem del cerebro. La patología se caracteriza por una extensa pérdida de células neuronales y por lesiones características que se distribuyen en el neo-cortex, hipocampo y amígdala, formadas por ovillos neurofibrilares (NFT) y Placas Seniles (SP) (Hendriks *et al.*, 1996).

Los ovillos neurofibrilares (NFT) son inclusiones intraneuronales de Filamentos Helicoidales Pareados (PHF) constituidos principalmente de una proteína asociada a microtúbulos llamada proteína TAU, la cual, en este caso, se encuentra anormalmente fosforilada (Hendriks *et al.*, 1996)(Fig1).

Las Placas Seniles (SP) son depósitos extracelulares constituidos por un centro amiloide formado por la acumulación de un péptido denominado péptido Beta Amiloide ($A\beta$), rodeado por neuritas distróficas, microglia y astrocitos reactivos (Hendriks *et al.*, 1996; Van Gassen *et al.*, 2003)(Figura.1).

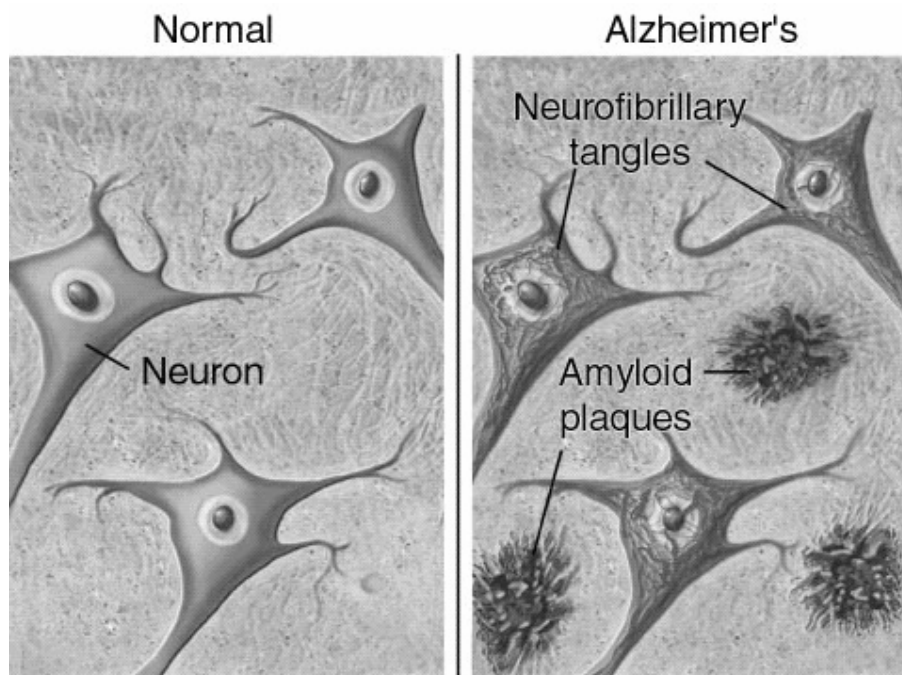


Figura1. Representación de los Obillos Neurofibrilares y Placas Seniles. (www.life enhancement.com)

1.3. PEPTIDO BETA AMILOIDE (A β)

El péptido beta amiloide (A β) tiene un peso molecular de alrededor de 4-kDa. Existen diferentes formas del péptido que van de 40-43 aminoácidos de longitud. Este péptido se deriva del procesamiento de una proteína precursora membranal llamada Proteína Precursora del Amiloide (PPA) (Van Gassen *et al.*, 2003). El péptido en solución adopta predominantemente una configuración β -plegada antiparalela y tiende a formar fibrillas que al agregarse forman depósitos de tipo amiloide por lo cual se le denominó péptido β -Amiloide (A β) (Allsop, 2000). Se ha encontrado que las dos formas predominantes de A β en la enfermedad de Alzheimer son el fragmento A β_{40} más abundante en circulación y con mayor solubilidad, y el fragmento A β_{42} menos soluble que se encuentra en mayor cantidad en las placas seniles (Kumar-singh *et al.*, 2002). El péptido A β juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad y desde mediados de los años ochenta se planteó la hipótesis de cascada amiloide, la cual explica el proceso de la enfermedad de la siguiente manera: (Figura. 2)

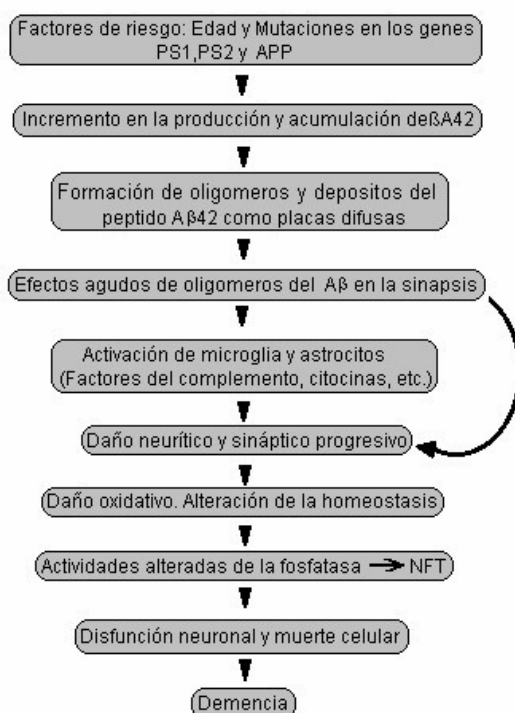


Figura 2. Hipótesis de cascada amiloide: secuencia de eventos patogénicos que conducen a la EA. La curvilínea indica que los oligómeros del A β pueden dañar directamente la sinapsis, neuritas y neuronas cerebrales, aunado a la activación microglial y astrocitos (Hardy *et al.*, 2002).

La hipótesis plantea la existencia de dos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad: la edad y alteraciones genéticas en los genes PS1, PS2 y APP (Hardy *et al.*, 2002; LeVine, 2004). Es claro que la acumulación de A β en cerebro es un evento relacionado con la edad avanzada y existe evidencia de que la formación de placas, en cierto grado, es inevitable con la edad. Debido a esto la edad es considerada como factor principal aunado a que de un 90-95% de los casos se presentan por envejecimiento mientras que sólo de 5-10% de los casos se presentan por alteraciones genéticas (Rocchi *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó, según la hipótesis de la cascada del amiloide la agregación de A β es uno de los eventos primarios en la patogénesis de la enfermedad. La agregación del péptido provoca la formación de NFT y posteriormente la neurodegeneración, además de que el A β tiene propiedades neurotóxicas por sí mismo (Allsop, 2000; Hardy *et al.*, 1991). También se ha encontrado que las fibrillas del péptido A β no son las únicas formas neurotóxicas, sino además se ensambla en formas solubles oligoméricas: las protofibrillas que forman estructuras curvilíneas *in vitro* y causan estrés oxidativo que desacopla los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, y desestabiliza la homeostasis celular del calcio, alterándose también la actividad de la fosfatasa que desencadena la muerte celular y eventualmente la demencia (Hardy *et al.*, 2002).

1.4. PROCESAMIENTO DE LA PROTEINA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP)

El péptido A β se deriva del procesamiento proteolítico de una glicoproteína de tipo I transmembranal, la Proteína Precursora del Amiloide (APP). La APP posee un dominio intramembranal, un largo dominio amino terminal extracelular y una pequeña sección citoplasmática del lado carboxiterminal. Es una proteína multifuncional que es expresada por diferentes tipos celulares y para la cual se ha descrito su intervención en interacciones proteínicas, desarrollo de neuritas, movilidad celular, adhesión celular y una posible regulación de la transcripción génica (Figura 3) (Van Gassen *et al.*, 2003).

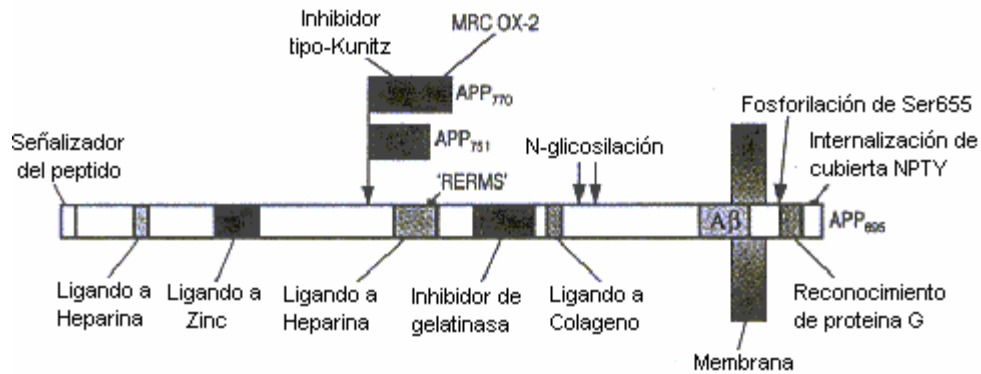


Figura 3. Estructura de la Proteína Precursora del Amiloide APP, en la cual se muestran algunos de los dominios de mayor funcionalidad (Allsop, 2000).

El gen para esta proteína está localizado sobre el cromosoma 21 en la región 21q21.2 y es codificada por 18 exones de los cuales, los exones 16 y 17 codifican en parte para el fragmento A β (Hendriks *et al.*, 1996; Van Gassen *et al.*, 2003).

Debido a diferencias en el corte y empalme (splicing) alternativo del transcrito de este gen, existen diferentes isoformas de la APP que van de 695 a 770 aminoácidos de longitud, tales como APP695, APP751, APP770, de las cuales APP695 es la más encontrada en cerebro.

La liberación del fragmento A β de la APP requiere de las actividades enzimáticas denominadas secretasas localizadas en la membrana plasmática. Se han descrito tres secretasas: α , β y γ , y dependiendo de la secuencia y el sitio de procesamiento, se liberará o no el fragmento A β (Figura 4).

En células no neuronales la APP es cortada regularmente en un dominio extracelular por la actividad de α -secretasa, produciendo un fragmento soluble (sAPPa) y un fragmento membranal de 10 k-Da (APP-C83). La actividad de una segunda secretasa, γ -secretasa, libera este último fragmento pero debido a que α -secretasa actúa dentro de la secuencia del fragmento A β , este proceso no produce al péptido A β (ruta no-amilodogénica) (Van Gassen *et al.*, 2003).

Un camino alternativo el cual se produce principalmente en células neuronales, es el procesamiento en el extremo aminoterminal de la secuencia del fragmento A β . Esta actividad se ha llamado β -secretasa. Después de que β -secretasa realiza su acción se genera un fragmento anclado a la membrana del lado carboxiterminal (APP-C99) el cual es un sustrato ideal para la actividad de γ -secretasa. En este caso la actividad de γ -secretasa es única ya que ocurre dentro de la región transmembranal de la APP, liberando no solo al fragmento β -amiloide sino también al pequeño fragmento citoplasmático de la APP (Figura 4), el cual esta implicado en la regulación génica. Ambos procesos ocurren también en individuos sanos, indicando que la generación del péptido A β es parte de la fisiología normal y no únicamente está asociado con la EA (Van Gassen *et al.*, 2003).

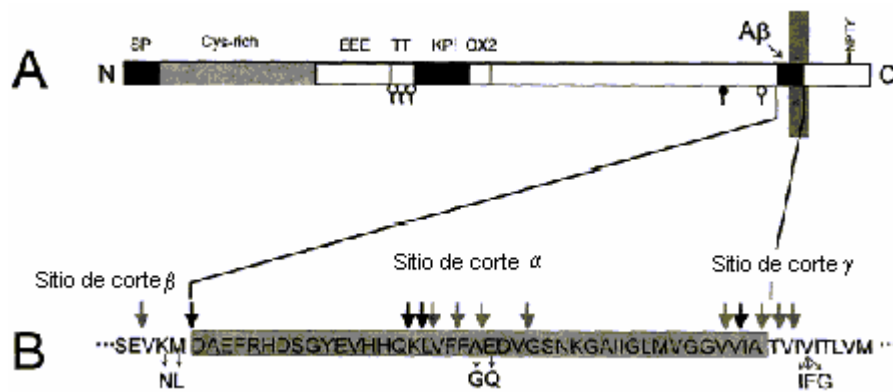


Figura 4. Región de la APP que corresponde a la secuencia del péptido A β . Indicándose los sitios en los cuales se lleva a cabo la actividad de cada una de las secretasas (Allsop, 2000).

1.5. MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO DE LA APP

Existen cambios en la secuencia de aminoácidos de la APP debido a mutaciones que sufre el gen que codifica para la proteína, originando así cambios en la presentación de la enfermedad, ya que estas mutaciones ocurren regularmente en la secuencia del péptido β -amiloide (Hendriks *et al.*, 1996).

Se han registrado diferentes mutaciones en los exones 16 y 17 de la APP. Las mutaciones en el gen de APP cambian el código para los aminoácidos de la proteína:

Val717-Ile, Val717-Phe, Val717-Gly, Lys670-Asn, Met671-Leu (Kumar-Singh *et al.*, 2002).
(Figura 5)

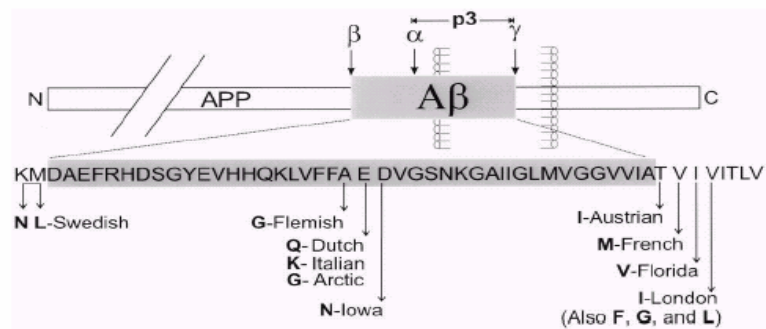


Figura 5. Diferentes mutaciones presentes en la APP dentro de la secuencia del péptido Aβ₄₂. (Kumar-Singh *et al.*, 2002).

1.6. MUTACIÓN FLEMISH

Una de las mutaciones detectada en el codón 692 en el gene de la APP (APP692) que origina el cambio de Alanina-692 por Glicina es la llamada mutación Flemish (Familia Flemish) que causa una forma autosomal temprana de la Enfermedad de Alzheimer caracterizada por la presencia de demencia presenil asociada a hemorragias cerebrales, formación de extensos depósitos de β-amiloide en vasos sanguíneos y en el parénquima cerebral. Provoca distrofia neurítica y se observan placas seniles y ovillos neurofibrilares clásicos (Van Duinen *et al.*, 1999).

Poco se sabe sobre la historia natural de la enfermedad en portadores de APP692, pero ésta familia comenzó a llamar la atención cuando un paciente de 51 años de edad presentaba demencia presenil, mientras que uno de sus hermanos presentaba hemorragia cerebral causada por Angiopatía Amiloide Congoílica (CAA). La historia familiar mostraba un desorden genético segregado en esta familia, manifestándose como demencia presenil o hemorragia cerebral. Diferentes casos de hemorragia cerebral o demencia presenil están ligados a la mutación APP692 (Roks *et al.*, 2000). Los mecanismos de esta variante de Alzheimer no son muy claros, pero se sabe que cambios conformacionales inducidos por el

intercambio de aminoácidos Ala21→Gly podrían facilitar la adherencia del péptido Aβ al endotelio vascular (Walsh *et al.*, 2001).

La región central del péptido Aβ juega un papel crucial en muchas de las propiedades de éste, incluyendo la agregación, neurotoxicidad, procesamiento proteolítico e interacciones con otras proteínas, tal como la apolipoproteína E (El-Agnaf *et al.*, 1998). Dos mutaciones en esta región Ala21→Gly y Glu22→Gln dan como resultado la forma temprana de la enfermedad. La mutación de Ala por Gly en la posición 21 incrementa el grado de agregación y altera la tendencia para adoptar una estructura secundaria pasando de α-hélice a β-plegada. Se sabe también que células que expresan la APP con la mutación Gly21 (en la posición 692 de la APP 770) incrementan la producción de Aβ y alteran las proporciones de especies menores, indicando que esta sustitución puede alterar los requerimientos estructurales necesarios para la actividad α-secretasa (El-Agnaf *et al.*, 1998). Estudios estructurales previos sobre el péptido Aβ sugieren que el cambio conformacional de un α-hélice a β-plegada es la clave para la formación de fibrillas y la inducción de efectos citotóxicos (Murakami *et al.*, 2002).

1.7. TRATAMIENTO.

Actualmente se han abordado diferentes estrategias para el tratamiento de ésta afección. Algunas estrategias se dirigen al tratamiento de los síntomas de esta enfermedad sin importar su etiología. El uso de Anti Inflamatorios No Esteroideos (AINES), inhibidores de acetilcolinesterasa, y el uso de medicamentos antioxidantes son algunos ejemplos (Citron, 2004; Wolfe, 2002).

La patología de la EA claramente tiene asociado un proceso inflamatorio y existe una gran evidencia epidemiológica que la reducción del riesgo de padecer la EA esta asociado al uso de fármacos AINES (Anti-inflamatorios No Esteroideos). Se sabe que administraciones constantes de altas dosis de AINES inician una reducción en la carga amiloide y la activación de la microglia en ratones APP transgénicos *in vivo*, lo que indica que los efectos terapéuticos de los AINES pueden ser mediados por sus efectos directos o indirectos sobre la producción de Aβ, además de que recientemente se mostró que los AINES tienen modulación sobre la actividad γ-secretasa, alterando su especificidad,

disminuyendo así la producción de $A\beta_{42}$ e incrementando la producción de formas de menor tamaño del péptido $A\beta$, disminuyendo así la progresión de la enfermedad (Weggen, *et al.*, 2001).

Otro aspecto estudiado señala que el incremento en la producción de colesterol en plasma presenta un riesgo para el padecimiento de la EA. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el procesamiento de la APP es dependiente del colesterol y que la disminución o agotamiento de éste reduce la producción de $A\beta$ a través de mecanismos no completamente comprendidos, pero se ha demostrado que inhibidores de la acetilcolinesterasa y colesterolacetiltransferasa (ACAT) las cuales catalizan la formación de ésteres de colesterol, reducen la producción de $A\beta$, sosteniendo la hipótesis que cambios fisiológicos en el metabolismo del colesterol disminuyen la carga amiloide (Simons, *et al.*, 1998). Sin embargo no se excluye la posibilidad de que estos beneficios se atribuyan solo a los ACAT o a los AINES, lo cual sugiere la necesidad de una terapia mezclada o alternada con este tipo de fármacos (Wolfe, 2002).

El uso de Antioxidantes para la inhibición de la agregación del péptido $A\beta$ involucra la disminución de los niveles de zinc; esto está basado en la observación de que el zinc y el cobre pueden formar complejos con el péptido $A\beta$ y que el zinc en particular puede inducir su agregación y es relevante a concentración fisiológica. Además el Cu^{2+} y Fe^{3+} son reducidos en presencia $A\beta$ generando especies oxidantes reactivas, tales como peróxido de hidrógeno, el cual es considerado como una causa de daño neuronal, debido a que los radicales oxidantes son muy reactivos (Wolfe, 2002; Atwood *et al.*, 2003). Se ha comprobado que una administración de fármacos quelantes de zinc y cobre durante nueve semanas en ratones transgénicos inician una sustancial reducción de depósitos de $A\beta$.

Otra estrategia se apoya en la hipótesis de cascada amiloide para la prevención y el tratamiento de la EA. La inhibición de secretasas, la inhibición de la agregación del péptido $A\beta$ así como la promoción de su remoción son puntos importantes en ésta estrategia, y particularmente el enfoque inmunológico ha sido utilizado en este sentido por medio de la inmunización activa y la transferencia pasiva de inmunidad en modelos murinos de esta patología (Citron, 2004).

La inmunoterapia dirigida al péptido beta amiloide ha recibido considerable atención como una importante estrategia para reducir niveles del péptido A β en cerebro (Monsenego *et al.*, 2003; Shenk, 2002; Weiner *et al.*, 2002). Se ha reportado que la inmunización activa de ratones de APP transgénicos (APP/Tg) con péptido A β fibrilar en combinación con un potente adyuvante inducen anticuerpos específicos promoviendo la desagregación del péptido en los cerebros de ratón (Gevorkian *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que la región amino terminal del péptido A β es altamente inmunogénica y diferentes grupos han demostrado que la inmunización activa induce anticuerpos que preferentemente reconocen un epítipo lineal en la región amino terminal del A β_{42} y que la mayoría de los anticuerpos generados por inmunización con A β silvestre reconocen predominantemente péptidos lineales con el motivo EFRH de la secuencia del A β_{42} (Cibbs *et al.*, 2003; Dickey *et al.*, 2001). Aunque existe la posibilidad de que estos anticuerpos no estén reconociendo solo epítipos lineales o conformacionales sino también mimótipos.

En seres humanos como en el modelo murino, los anticuerpos contra esta región disminuyen la carga de placas en cerebro y revierten la patología. Sin embargo, los epítipos identificados en el extremo amino terminal se han relacionado con respuestas inmunológicas asociadas a hemorragia e inflamación cerebral tanto en humanos como en ratones transgénicos. Recientes estudios sugieren que la inmunización pasiva con estos anticuerpos incrementa el riesgo de sufrir hemorragias cerebrales debido al debilitamiento de las paredes de vasos sanguíneos en ratones y humanos (Wolfe, 2002).

Como parte de una prueba en pacientes con EA en grado medio o moderado, se llevó a cabo una prueba de fase clínica II, en treinta pacientes por inmunización activa con péptido sintético A β_{42} pre-agregado (AN1792) mediante una inyección intramuscular y un refuerzo a las cuatro semanas. Además de los anticuerpos anti-A β generados en respuesta a la vacunación, se observó también la capacidad de estos para cruzar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, se encontró la estabilización cognitiva relevante en la vida diaria de los pacientes que presentaron anticuerpos contra placas del péptido A β (Hock, *et al.*, 2003).

Estos datos sugieren que los anticuerpos contra placas de péptido pueden detener o retrasar el deterioro clínico y cognitivo en pacientes con la EA. Sin embargo en enero del 2002 fue suspendida la prueba clínica AN1792 porque algunos pacientes presentaban inflamación en el SNC. El fármaco probado (Betablock) contenía una versión sintética del péptido A β y causaba que el sistema inmunológico atacara las placas neuríticas. Sin embargo se sugirió una posible respuesta autoinmune por que la APP se encuentra en muchas células germinales además de las neuronas (Washington, 2002).

En la prueba clínica AN1792 posiblemente los anticuerpos se unieron a las placas neuríticas y se dió una condición de inflamación crónica como una respuesta aguda para acelerar la remoción del péptido A β en el cerebro. En pacientes de edad avanzada la vacunación tiene el potencial de exacerbar la neuroinflamación a través de la invasión al cerebro de células T-citotóxicas que acelerarían la pérdida neuronal y la demencia (Montero, 2004).

Por lo anterior se ha generado mucho interés por encontrar epítomos de la parte central y carboxilo terminal para su evaluación como inhibidores de la toxicidad del péptido A β . Es de gran importancia entonces caracterizar los epítomos presentes en el péptido beta-amiloide con el fin de encontrar aquellos que sean relevantes en la agregación del mismo (Montero, 2004; Gevorkian *et al.*, 2004).

1.8. MIMÓTOPOS Y MAPEO DE EPÍTOPOS.

Un epítomo es cualquier secuencia, estructura (lineal o conformacional) o región de una proteína que es reconocida por un anticuerpo o por un linfocito T. Un mimótopo es un péptido que imita (mimetiza) estructural y/o funcionalmente a un epítomo sin tener la misma secuencia que éste. Los mimótopos pueden ser inmunogénicos (generan una respuesta inmunológica contra el epítomo original), o antigénicos (reaccionan con anticuerpos generados por el antígeno original pero no son capaces de montar una respuesta inmunológica específica contra el antígeno) (Meola *et al.*, 1995).

Actualmente, la identificación o mapeo de epítomos se apoya en tres estrategias básicas. Una emplea algoritmos predictivos computacionales para la identificación de posibles

epítomos, síntesis de dichos péptidos representativos y su evaluación. Por otro lado, la síntesis de un número de péptidos pequeños traslapados siguiendo la secuencia de la proteína de interés, nos permite la evaluación de estos fragmentos independientemente. Finalmente también puede utilizarse otra estrategia basada en la síntesis de enormes cantidades (bibliotecas) de péptidos aleatorios, cuya gran variabilidad (hasta 10^9 variantes) nos permite ampliar la probabilidad de tener en ella la secuencia de interés (o un mimótopo de ella). Dichas bibliotecas pueden generarse por síntesis química o por tecnología de ADN recombinante por medio del Despliegue en Fagos (Phage Display)(Santamaría *et al.*, 2001).

1.9. TECNOLOGIA DE DESPLIEGUE EN FAGO (PHAGE DISPLAY)

La tecnología de despliegue en fagos fue descrita por primera vez por Smith en 1985 y desde entonces ha sido usada en diversos estudios (Smith, 1985; Scott *et al.*, 1990). El despliegue en fagos (Phage display) es una tecnología que nos permite la expresión de uno o un conjunto de péptidos o proteínas como fusión con una proteína de la cubierta de un bacteriófago, dando como resultado un desplegado de la fusión proteica sobre la superficie del virión. Al mismo tiempo el ADN que codifica tal fusión se encuentra dentro del virión que lo expresa (Parmley *et al.*, 1988). Tal fusión permite la generación de moléculas ligando con altas afinidades de unión, desplegadas en los fagos (Pfiifer *et al.*, 2002). El bacteriófago más usado en esta aplicación es el fago M13, pero se han utilizado otros fagos, como el fago Fd, fago f1 y el fago λ .

El bacteriófago M13 es un fago filamentoso flexible específico de *Escherichia coli* con un diámetro aproximado de entre 6.5-10 nm y una longitud que va de 0.9-1.0 μ m. Su genoma es de ADN circular de cadena sencilla, mide aproximadamente 6.4 Kb, codifica para 11 diferentes proteínas las cuales están implicadas en la replicación, morfogénesis y formación de la cápside viral. Su cubierta es de 1.5 a 2 nm de grueso y tiene un peso aproximado de entre 1.2 y 1.4 $\times 10^7$ Da. La masa total de la partícula de fago se constituye en un 87% de proteína (Marvin, 1998).

Dos de las cinco proteínas que forman parte de la cápside del fago M13 son de gran importancia para el despliegue de péptidos. La proteína pVIII, de (50 aminoácidos) que se

encuentra en alrededor de 2700 copias y forma la estructura cilíndrica del fago, y la proteína pIII (de 340 aminoácidos) que se encuentra expresada en 3 a 5 copias en uno de los extremos del fago son las principales proteínas utilizadas para la expresión tanto de péptidos como proteínas, incluso fragmentos de la cadena variable de anticuerpos. Las otras tres proteínas también se encuentran en bajo número de copias en los extremos del fago. La proteína pVI en el mismo extremo que pIII, y las proteínas pVII y pIX en el otro extremo. (Figura 6).

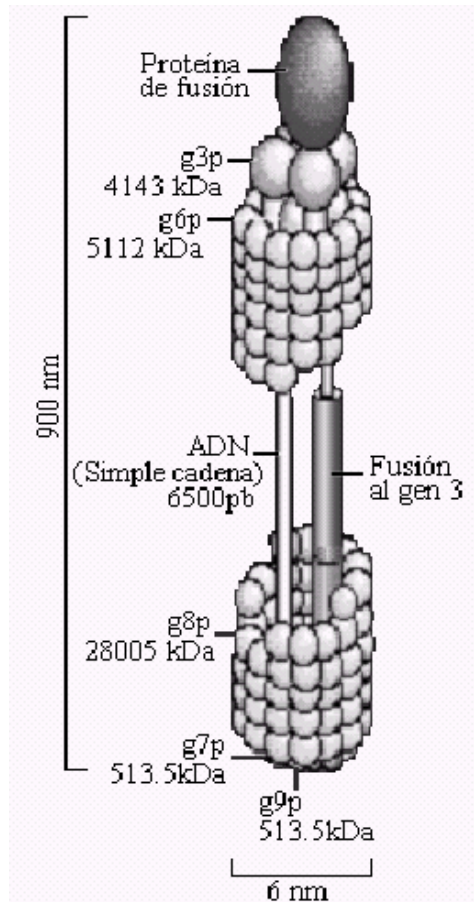


Figura 6. Esquema que muestra la estructura detallada del fago filamentososo M13. La proteína o péptido está representada sobre la superficie del virus como una fusión a la proteína pIII (Webster, 2001).

1.10. CICLO DE INFECCION DEL BACTERIOFAGO M13.

El ciclo replicativo del fago comienza cuando el virus infecta a las bacterias *E. coli*. La infección es un proceso que requiere la interacción de la proteína pIII viral con el pili conjugativo F y las proteínas bacterianas de la membrana citoplasmática TolQ, R y A. El

pilli F es un ensamblaje de proteínas tubulares en la membrana citoplasmática y se extiende desde la membrana hasta el exterior de la célula. Las proteínas requeridas para esta estructura, ensamble y desensamble son codificados por los genes en el operon del plásmido conjugativo F. Normalmente el pilli F es requerido para la transferencia conjugada del ADN del plásmido F de una célula donadora a una célula receptora la cual no tiene los genes que codifican para el pilli F mediante un proceso llamado conjugación. El resultado de este proceso es la presencia del plásmido en ambas bacterias, tanto donadora como receptora (Webster, 2001).

La infección inicia con el reconocimiento del pilli de las células macho (F^+) mediante el dominio N-terminal de la proteína pIII del fago. Los subsecuentes pasos que envuelven la infección del fago no son muy claros, pero se sabe que las proteínas capsídicas pIII y probablemente pVII y pIX que se encuentran en menor cantidad, se desensamblan dentro de la membrana citoplasmática liberando también el ADN del fago. Una vez que la cadena (+) de ADN entra al citoplasma, la cadena complementaria (-) es sintetizada por enzimas bacterianas. Después de la retracción del pilli y la penetración del genoma viral a través de la membrana bacteriana, la bacteria replica y traduce su genoma así como el del fago. El ensamblaje de los fagos toma lugar en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV (Webster, 2001). (Figura 7)

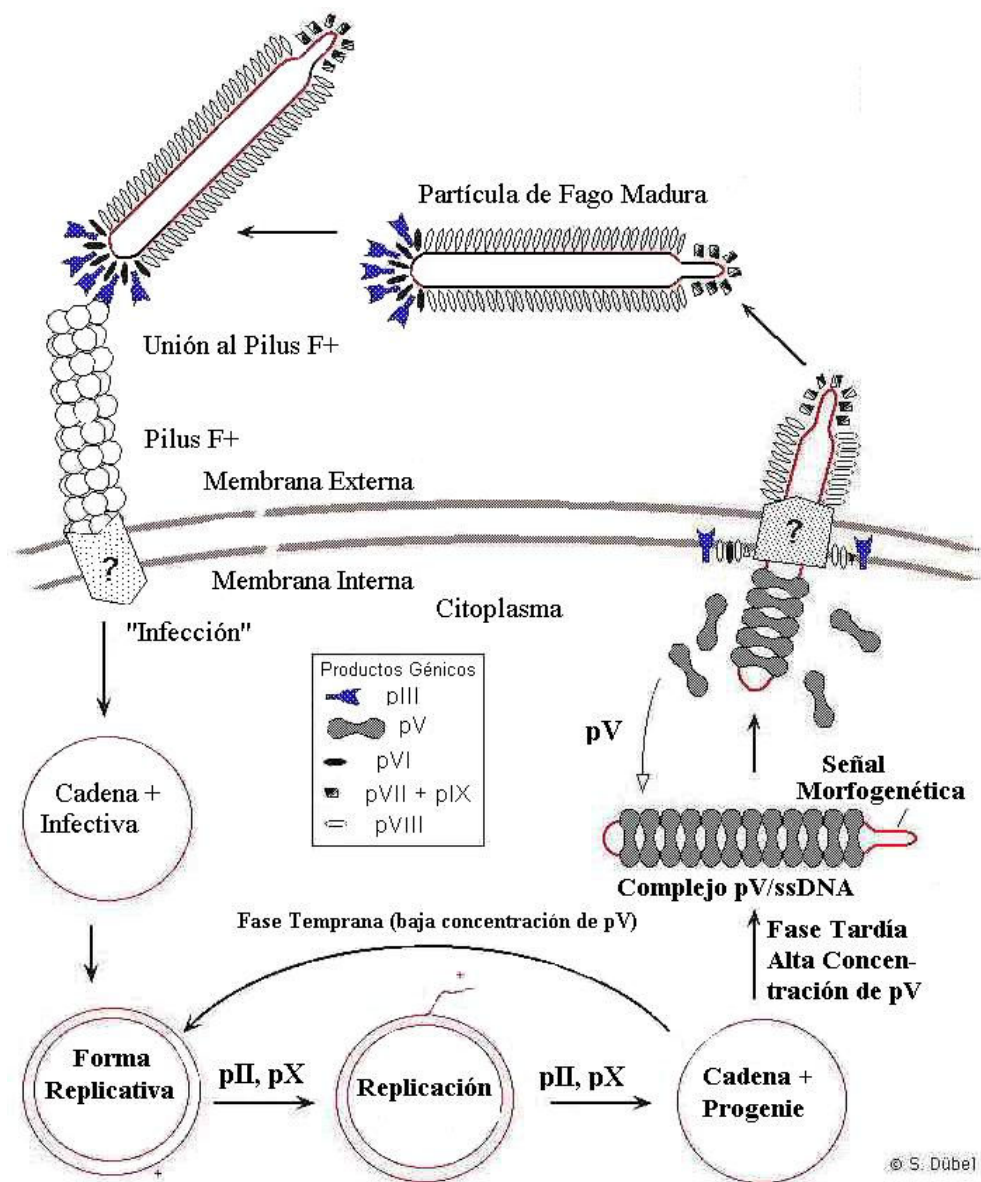


Figura 7. Ciclo de Vida del Fago M13 (www.bricker.tcnj.edu/tec)

Durante el proceso de infección productiva de los fagos M13 que son fagos no líticos, a diferencia de los fagos líticos, no matan ni lisan a sus hospederos. Esto representa una gran ventaja, ya que facilita los procesos de expansión y purificación de las partículas virales. Se sabe que hay una producción de cerca de 1000 partículas de fagos durante la primera generación después de la infección, y cerca de 100 a 300 fagos son liberados durante las siguientes generaciones. Este proceso se repite durante varias generaciones, resultando en títulos de 10^{11} hasta 10^{13} fagos por ml de medio de cultivo (Russel, 1994).

1.11. BIOSELECCIÓN (BIOPANNING)

El despliegue de fagos ha permitido utilizar la unión física entre una vasta biblioteca de secuencias peptídicas aleatorias y la secuencia de ADN de cada una de ellas, permitiendo una rápida identificación de ligandos peptídicos para una variedad de moléculas blanco (anticuerpos, enzimas, receptores en capas celulares, etc.) por un proceso de selección *in vitro* llamado “biopanning” o bioselección y la secuenciación del ADN de clonas aisladas individualmente. La bioselección se lleva a cabo al permitir la interacción de una biblioteca de fagos con una molécula blanco inmovilizada en una fase sólida, se eliminan los fagos no específicos por medio de lavados y se eluyen los fagos que se unieron específicamente (Molenaar *et al.*, 2002).

El fago eluído es amplificado en bacterias *E. Coli*, purificado y posteriormente se llevan a cabo varios ciclos o rondas adicionales de unión/amplificación para enriquecer el purificado de fagos en favor de aquellos que expresan los péptidos o proteínas que se unieron con mayor afinidad. Después de 3 o 4 rondas, se aíslan clonas independientes y el inserto de las clonas seleccionadas es caracterizado mediante la secuenciación de su ADN. Las secuencias identificadas son analizadas con el fin de encontrar homología con la secuencia del péptido original o posibles mimótopos de dichas secuencias (Scott *et al.*, 1990). (Figura 8)

La generación de bibliotecas que expresan péptidos al azar, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de ADN genómico o de genes y de ADNc y su aplicación en el procedimiento de selección ha permitido la rápida identificación de ligandos expresados en fagos y receptores implicados en interacciones proteína-proteína, antígeno-anticuerpo, proteína-ADN, enzima-sustrato y otras interacciones biológicamente importantes (Wilson *et al.*, 1998).

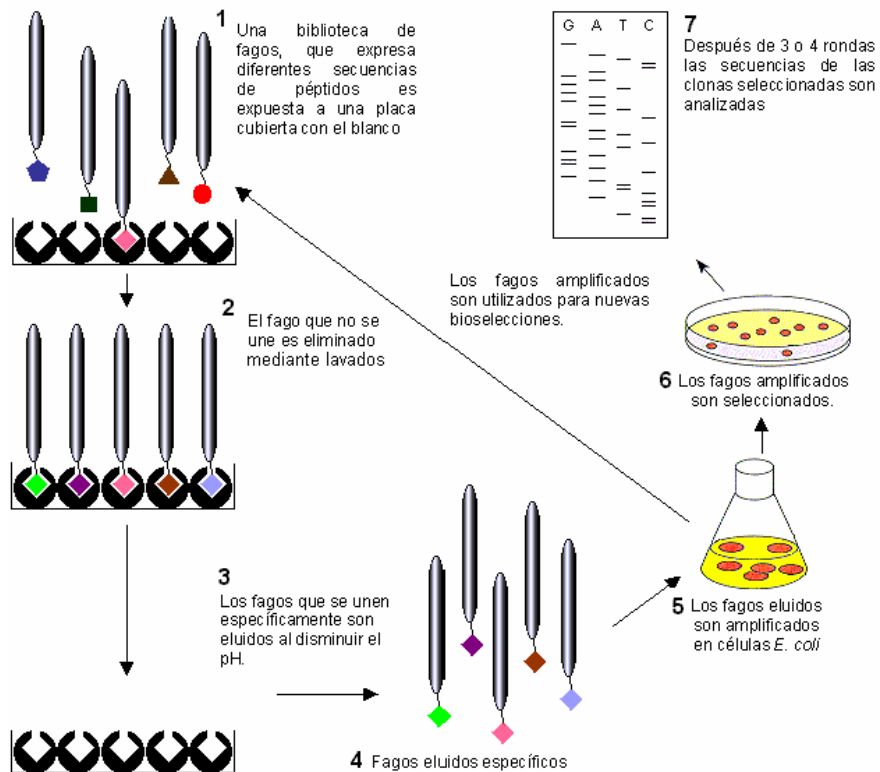


Figura 8. Proceso de Bioselección (www.immun.lth.se/).

Se han usado bibliotecas peptídicas aleatorias desplegadas sobre fagos en un buen número de aplicaciones, como son mapeo de epítomos, mapeo de contactos proteína-proteína, identificación de ligandos no peptídicos, péptidos activos, sustratos de proteasas, etc. La principal ventaja del despliegue en fago (Phage Display) sobre otras tecnologías de mapeo de epítomos es la capacidad de trabajar con un gran número de péptidos a la vez (complejidad de 10^9) y llevar a cabo rondas de selección suficientes para identificar clonas con alta afinidad (Dower *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se pretende identificar epítomos del péptido A β (Mutación Flemish) que sean importantes en la inhibición de la agregación del mismo y probablemente del péptido A β (Silvestre). Con el fin de identificar epítomos relevantes presentes en el péptido A β (Flemish) se decidió utilizar una biblioteca de péptidos al azar para ser seleccionada (tamizada) por su unión a Inmunoglobulinas tipo G (IgG) de un suero policlonal de ratón inmunizado con el péptido A β (Flemish). Los epítomos encontrados serán identificados por secuenciación del ADN de los fagos que los poseen.

2. JUSTIFICACIÓN

Un aspecto poco explorado en los intentos por la desagregación del péptido beta amiloide es la búsqueda de anticuerpos dirigidos a la región media o carboxilo terminal y su evaluación en la capacidad desagregante.

Debido a la tendencia del péptido A β mutación Flemish a provocar amiloidosis vascular es de gran interés identificar epítomos, ya sean lineales o conformacionales involucrados en la patología con el fin de desarrollar anticuerpos que neutralicen su efecto patológico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

IDENTIFICAR EPITOPOS DEL PEPTIDO BETA AMILOIDE (MUTACION FLEMISH) MEDIANTE EL USO DE UNA BIBLIOTECA DE PEPTIDOS DE SIETE AMINOACIDOS EXPRESADA EN FAGO, CON EL FIN DE DESARROLLAR MOLECULAS INMUNOTERAPEUTICAS UTILES EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

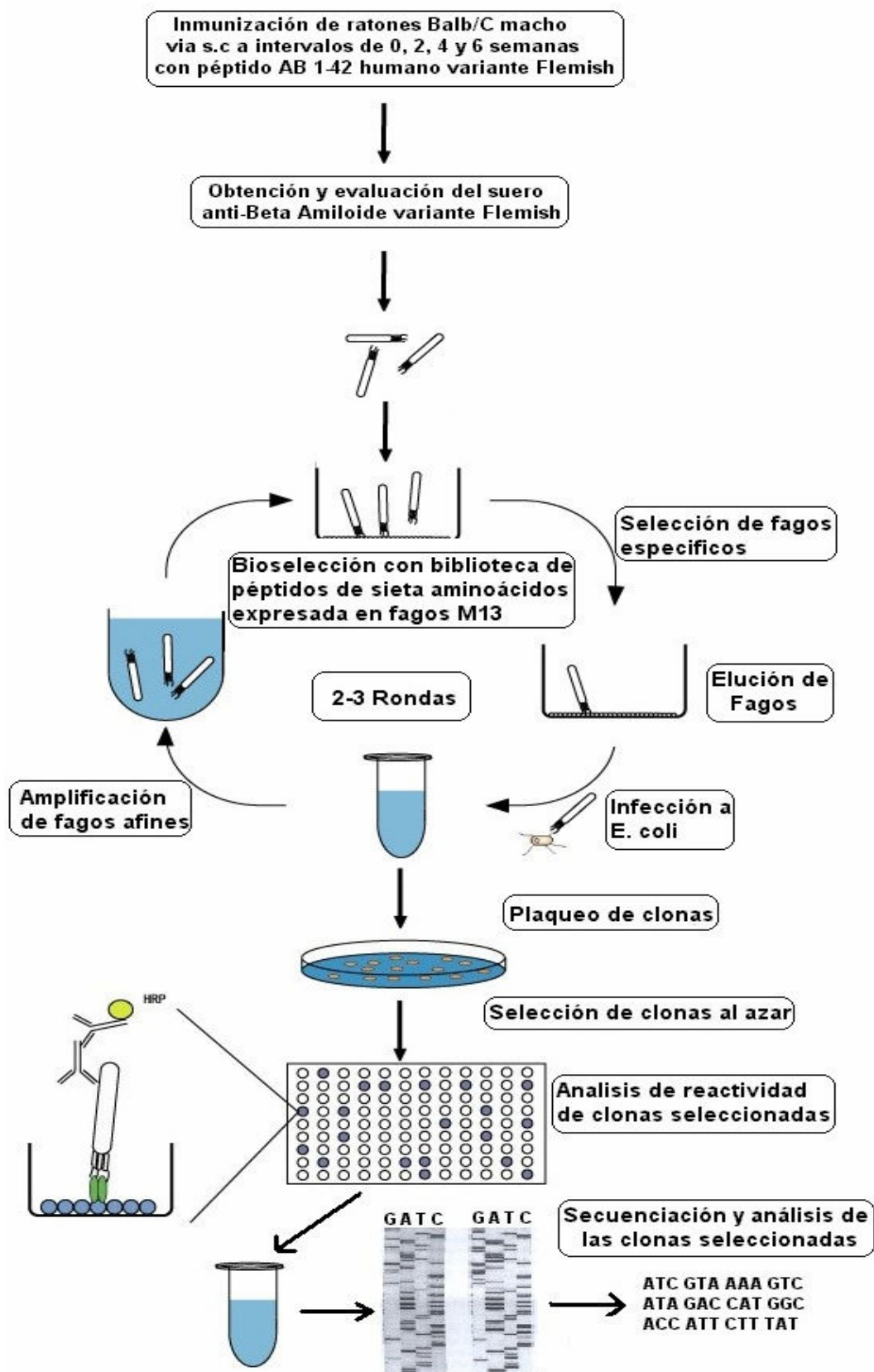
- PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE UN SUERO ESPECÍFICO CONTRA EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE (FLEMISH), EN RATONES BALB/C ANN MACHO.
- BÚSQUEDA DE EPÍTOPOS/MIMÓTOPOS DEL PÉPTIDO A β FLEMISH POR BIOSELECCIÓN CON UNA BIBLIOTECA COMERCIAL DE PÉPTIDOS ALEATORIOS EXPRESADA EN FAGO CONTRA EL SUERO POLICLONAL ANTI A β FLEMISH.
- SECUENCIACIÓN DEL ADN DE LAS CLONAS DE INTERÉS.
- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

BIOLÓGICO	VIDRIO, EQUIPO Y OTROS
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa de <i>E. coli</i> ER2738. • Ratones Balb/C Ann (♂). • Péptido Aβ1-42 humano (Bachem) variante Flemish. • Adyuvante Completo de incompleto de Freund. • Suero de cabra α-IgG de ratón conjugado a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA). • Biblioteca de péptidos comercial (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). • Anticuerpo monoclonal anti-IgG de Ratón (cadena Gamma). • Suero de conejo α-M13. • Kit Sequenase Quick-Denature Plasmid Secuencing (Amershan Pharmacia Biotech, OH, USA). • Suero anti- AβDM (Dutch Mutation). • Suero anti-AβWT (Wild Type). 	<ul style="list-style-type: none"> • Placas de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark). • Tubos de policarbonato (Nalgene, New York, USA). • Centrifuga Heraus (Biofuge Stratos, Madrid España). • Máquina de lavado automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA). • Cámara electroforética. • Placas de rayos X (Kodak). • Secador de geles (Bio-Rad, USA) • Microtubos de 0.6, 1.5 y 2 ml. • Cajas de Petri • Campana de flujo laminar • Lector de placas automático (Dynex, Virginia, USA) • Tubos cónicos desechables de 15 y 50 ml. • Balanza analítica.

4.2. ESQUEMA METODOLÓGICO



4.3. METODOLOGÍA

4.3.1. OBTENCION DE SUERO ANTI-BETA AMILOIDE MUTACIÓN FLEMISH

Se inmunizaron dos grupos de ratones Balb/C Ann (♂) vía subcutánea a intervalos de 0, 2, 4 y 6 semanas. El primer grupo se inmunizó con el péptido A β 1-42 humano (Bachem, Pennsylvania, USA) variante FLEMISH con Adyuvante Completo de Freund/Adyuvante Incompleto de Freund, con una dosis de 30 μ g/ratón. El segundo grupo (control) fue inyectado con buffer y adyuvante exclusivamente.

4.3.2. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-A β

Después de la sexta semana se extrajo sangre de plexo retroocular de los ratones inmunizados. La presencia de anticuerpos α - β A específicos fue evaluada en un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) durante toda la noche a 4°C depositando 100 μ l de una solución de péptido Beta amiloide 1-42 a 2 μ g/ml en buffer (0.1M Carbonato/bicarbonato) (ver apéndice B) por cada pozo toda la noche a 4°C. Después de un ciclo (4X) de lavado automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS-Tween 20 al 0.2% (ver apéndice B), se bloqueó con 200 μ l de PBS-BSA 2% (ver apéndice B) por 1 hora a 37°C. Después del lavado se incubaron los sueros obtenidos de la inmunización de ratones α -Adyuvante y α -Flemish a diluciones dobles seriales 1:200 - 1:12800 en 100 μ l/pozo de PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1% por una hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó con 100 μ l de suero de cabra α -IgG de ratón conjugado a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluído 1:5000 en PBS-BSA 0.1% Tween 20 al 0.1% durante 1 hora a 37°C. Se lavó y se le adicionaron 100 μ l/pozo de sustrato para peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco, CA, USA) protegiéndose de la luz directa e incubando 10 minutos a 37°C para llevar a cabo la reacción colorimétrica y finalmente se tomó la lectura en un lector de microplacas automático (Dynex, Virginia, USA) a 405 nm de Densidad Óptica.

4.3.3. BIOSELECCION (BIOPANNING)

Para la identificación de epítomos del péptido Beta Amiloide se usó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados al azar sobre la proteína pIII del fago filamentoso M13 (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra).

El proceso de bioselección se llevó a cabo en un formato en fase sólida para lo cual cuatro pozos de una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark), se sensibilizaron con 100 μ l de una solución de anticuerpo monoclonal anti-IgG de Ratón (cadena Gamma) a una concentración de 0.5 μ g/pozo en Buffer 0.1M de carbonatos pH=9.6 (ver apéndice B), durante 1 hora a 37°C. Posteriormente los pozos se lavaron manualmente 5 veces (5X) con 200 μ l de PBS-Tween al 0.2%. Se bloqueó con 200 μ l/pozo de PBS-BSA al 2% durante 1 hora a 37°C y se lavaron de igual manera. Se agregó el suero anti-Flemish (α -FM) diluido 1:400 en PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1% y se incubó 1 hora a 37°C. Posterior a la incubación se lavó una vez mas de forma idéntica al primer lavado y se agregaron 100 μ l de una solución de la biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresada en fagos (2.2×10^{11} fagos/ml) en PBS/BSA 0.1%/Tween 20 0.1% durante toda la noche a 4°C. Se lavaron los pozos cinco veces con PBS-Tween 0.1% y dos veces con PBS (ver apéndice B) únicamente.

4.3.4. ELUCIÓN DE FAGOS.

Se agregaron 100 μ l a cada pozo de Buffer de Glicina-HCl 0.1M pH=2.0 (ver apéndice B), se incubó 10 minutos a 37°C y 10 minutos a temperatura ambiente. Se reunió el volumen de las cuatro pozas (400 μ l en total) y se neutralizó a pH=7.2 con 25 μ l de Tris-Base 2M pH= 9.0.

4.3.5. TITULACIÓN DE FAGOS.

Para la titulación de los fagos eluidos, se usaron células *E. coli* (cepa ER-2738) crecidas en 10 ml de medio liquido 2YT (ver apéndice B) durante toda la noche obteniendo una concentración de células de aproximadamente 10^8 células por mililitro. Posteriormente se agregaron 200 μ l de la suspensión de células a cuatro microtubos y se llevó a cabo la infección de la siguiente manera: directamente del eluido se tomaron 20 μ l y se infectó el

tubo 1, se realizó una dilución 1:10 de la cual se tomaron 20 μ l y se infectó el tubo 2, de la misma dilución se tomaron 2 μ l y se infectó el tubo 3. El tubo 4 no fue infectado para quedar como control. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos. Después de estos 15 minutos a cada microtubo se le agregó 25 μ l de Xgal/IPTG (ver apéndice B), se transfirió a 3 ml de Top agar previamente calentado a 45°C y se vació uniformemente en las cajas de LB para incubar durante toda la noche a 37°C.

Se identificaron y cuantificaron las unidades formadoras de placas y se calculó el número de estas por mililitro (pfu/ml).

4.3.6. AMPLIFICACIÓN.

De un cultivo de toda la noche de *E.coli* (ER2738) en medio líquido 2YT, se hizo una dilución 1:100 tomando 500 μ l de esta suspensión llevándolos a 50 ml con medio líquido 2YT e infectando con 380 μ l del eluido recuperado, se dejó en reposo durante 15 minutos a 37°C para que se llevara a cabo la infección y posteriormente se incubó en agitación a 240 rpm a 37°C durante 4.5 horas. Se centrifugó a 10000 rpm con un rotor JA20 en una centrifuga Heraeus (Biofuge Stratos, Madrid España) 10 minutos a 4°C en tubos de policarbonato (Nalgene, New York, USA). El sobrenadante fue recuperado en tubos frescos estériles y se precipitaron los fagos presentes en el sobrenadante agregando 1/6 de volumen de PEG/NaCl (ver apéndice B) 4 ml a cada tubo aproximadamente, dejando precipitar durante toda la noche. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos lavando y resuspendiendo el precipitado en 1 ml de TBS pH=7.5 (ver apéndice B) para una segunda precipitación con 1/6 de volumen de PEG/NaCl e incubado por 1 hora en hielo. Finalmente se centrifugó una vez más lavando cuidadosamente el pellet para resuspenderlo en 200 μ l de TBS estéril. Se tituló siguiendo el procedimiento arriba mencionado y se inicio la segunda ronda de bioselección.

4.3.7. SELECCION DE CLONAS DE FAGO AL AZAR.

Del eluido de la tercera ronda de bioselección se seleccionaron 21 clonas individuales al azar, las cuales fueron amplificadas y tituladas de la siguiente manera:

Después de realizar el conteo de unidades formadoras de placas (pfu) para la titulación se seleccionó una de las cajas con suficiente numero de placas, de esta se seleccionaron 21 placas (clonas) al azar aislándolas con asa bacteriológica en esterilidad, colocándolas en tubos con 3 ml de medio líquido 2YT y con 30 µl de bacterias *E.coli* ER2738 crecidas toda la noche. Se incubó en agitación constante a 230 rpm durante 4.5 horas. Se continuó de igual manera que en la amplificación y titulación de los eluidos obtenidos en cada ronda de bioselección. La suspensión de cada una de las 21 clonas seleccionadas se purificó, para obtener partículas de fagos y ADN de fago.

4.3.8. PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS DE FAGO Y ADN.

Los 21 tubos con las clonas seleccionadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante (3 ml aproximadamente) y dividiéndolo en dos microtubos de 1.6 ml (2 tubos por c/clona) de la siguiente manera:

Para la purificación del fago se utilizaron 1.2 ml de sobrenadante adicionando 200 µl de PEG y dejando toda la noche a 4°C para la precipitación del fago. Se centrifugaron los tubos a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 1 ml de TBS y 170 µl de PEG para una segunda precipitación incubando durante una hora a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 200 µl de TBS, se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C, finalmente se transfirió el sobrenadante a tubos frescos y se guardaron a 4°C para posteriormente titularlos y determinar la reactividad de las clonas mediante un ensayo de ELISA.

Para la purificación del ADN de cadena sencilla de fago se utilizó 1 ml de sobrenadante adicionando 400 µl de PEG, dejando los tubos toda la noche a 4°C para la precipitación de fago. Se centrifugaron los tubos a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos, desechando el sobrenadante. Para la obtención de ADN se resuspendió el pellet con 200 µl de Buffer de yoduro (ver apéndice B) adicionando inmediatamente 500 µl de etanol absoluto agitando

vigorosamente y dejando reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm a Temperatura Ambiente durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μ l de etanol frío al 70%, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 5 minutos y finalmente se resuspendió el pellet en 20 μ l de agua estéril, refrigerando el ADN de cadena sencilla a -20°C para posteriormente determinar la secuencia de cada una de las clonas seleccionadas.

4.3.9. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES.

Para analizar la reactividad de clonas individuales con los sueros problema α -Ady y α -Flemish se realizó el siguiente ensayo inmunoenzimático (ELISA): Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 μ l por pozo de una solución α -IgG de ratón (cadena gamma, Zymed, San Francisco, CA, USA) a una concentración de 0.2 μ g por pozo en buffer de carbonatos (0.1M de Carbonato/bicarbonato) y se incubó 1 hora a 37°C . Después de un ciclo (4X) de lavado automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS-Tween 20 al 0.2% (ver apéndice B), se bloqueó con 200 μ l de PBS-BSA 2% (apéndice B) por 1 hora a 37°C . Se lavó de igual manera y se agregaron 100 μ l por pozo de una solución de los diferentes sueros problema α -Ady o α -Flemish diluidos 1:400 en PBS-BSA 0.1%-Tween 0.1% incubando durante 1 hora a 37°C . Después del lavado, se agregaron por duplicado las 21 clonas individuales seleccionadas al azar aproximadamente 5×10^{12} fagos por pozo diluidos en PBS-BSA 0.1%-Tween 0.1%, añadiendo 100 μ l por pozo e incubando toda la noche a 4°C . Se lavó nuevamente y se adicionaron 100 μ l por pozo de una solución de suero de conejo α -M13 diluido 1:3000 en PBS-BSA 1%- Tween 0.1% incubándose 1 hora a 37°C . Se lavó nuevamente y se incubó con 100 μ l de suero de cabra α -IgG de conejo conjugada a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1:5000 en PBS-BSA 0.1% Tween 20 0.1% durante 1 hora a 37°C . Se lavó y se le adicionaron 100 μ l por pozo de sustrato para peroxidasa (ABTS Single solution, Zymed, San Francisco, CA, USA) protegiéndose de la luz directa e incubando 10 minutos a 37°C para llevar a cabo la reacción colorimétrica y finalmente se tomó lectura en un lector de placas automático (Dynex, Virginia, USA) a 405 nm.

4.3.10. SECUENCIACIÓN DE CLONAS.

Antes de llevar a cabo la secuenciación de cada una de las clonas, se verificó la presencia de ADN de cadena sencilla en un gel de agarosa al 0.8% (ver apéndice B) en Buffer de TBE 1X. Dentro de una cámara electroforética se cargaron 3 μl de ADN de cadena sencilla en una mezcla de 1 μl de Azul de Bromofenol con 3 μl de H_2O estéril y se corrió a voltaje constante de 100 V durante 1.5 horas. Se retiró el gel de la cámara y se sumergió en una solución de Bromuro de etidio y finalmente se leyó iluminado con luz ultravioleta.

La secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos seleccionados se realizó utilizando el Kit Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing (Amershan Pharmacia Biotech, OH, EAU) y dATP $\alpha\text{-S}^{35}$, de la siguiente manera:

Por separado se incubó 10 minutos a 37°C una mezcla (Reacción de Annealing) de 12 μl de ADN purificado de cada una de las clonas con 1.5 μl de primer -28 (Secuencing Primer -28) y 2 μl de Buffer de reacción. Por otro lado se realizó otra mezcla (cóctel) de 11 μl de DTT, 22 μl de labeling mix y 8.25 μl de S^{35} dATP. Después de los 10 minutos de incubación a cada uno de los tubos de Annealing se les adicionó 3.5 μl de la mezcla cóctel y 2.5 μl de la enzima secuenasa (V.2.0) por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 1 μl de buffer de Mn y a cuatro tubos por reacción, precalentados a 37°C que contenían 2.5 μl de ddNTPs (80 μM) nucleótidos análogos de terminación G, A, T, C, se les agregó 5.5 μl de la mezcla anterior incubando 5 minutos a 37°C . Posteriormente, a cada uno de los tubos se les agregó 4 μl de solución de paro (Stop mix) incubando 2 minutos a 75°C e inmediatamente se inyectaron 7 μl de cada una de las muestras en los carriles seleccionados de un gel de poliacrilamida al 8% (ver apéndice B) corriéndose aproximadamente 1.5 horas a 1700 V. Después, se secó el gel en un secador de geles (Bio-Rad, USA) durante 1 hora a 80°C . Transcurrido el tiempo de secado se colocó en un casete de exposición sobre una placa de rayos X (Kodak) durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se reveló la placa y se llevó a cabo la lectura manual de la placa para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los insertos de los fagos seleccionados.

4.3.11. ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS

La homología de las regiones de aminoácidos entre los insertos de péptidos de las clonas seleccionadas y la secuencia del péptido β -amiloide, se comparó alineando las secuencias obtenidas con la secuencia del péptido A β mutación Flemish.

4.3.12. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES CON SUEROS CONTRA DIFERENTES FORMAS DEL PEPTIDO A β .

Con el fin de continuar el análisis de las clonas seleccionadas se realizó otro ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de las 21 clonas usando también sueros de ratón contra otras formas del péptido A β (suero control anti-adyuvante de Freund, suero anti-A β FM (Flemish Mutation), suero anti- A β DM (Dutch Mutation) y suero anti-A β WT (Wild Type), de la siguiente manera:

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 μ l por pozo de una solución α -IgG de ratón (cadena gamma) a una concentración de 0.2 μ g por pozo en buffer de carbonatos y se incubó 1 hora a 37°C. Después de un ciclo (4X) de lavado automático (WellWash, Thermo Electron Corporation, USA) con PBS-Tween 20 al 0.2% (ver apéndice B), se bloqueó con 200 μ l de PBS-BSA 2% (ver apéndice B) por 1 hora a 37°C.

Se lavó nuevamente y se agregó 100 μ l por pozo de los sueros contra diferentes formas del péptido A β , α -Ady, α -FM, α -DM y α -WT diluïdos 1:800 en PBS-BSA 0.1%-Tween 0.1% incubando durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, se agregaron las 21 clonas individuales seleccionadas a cada uno de los sueros, a una concentración de 10¹⁰ fagos por pozo en 100 μ l de PBS-BSA 0.1%-Tween 0.1% y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó una vez más y se adicionaron 100 μ l por pozo de una solución de suero de conejo anti-M13 diluïdo 1:2000 en PBS-BSA 1%- Tween 0.1% incubándose 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se reveló con 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugada a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase/conjugate, Zymed, San Francisco, CA, E.U.A) diluïdo 1:5000 en PBS-BSA 0.1% Tween 20 0.1% durante 1 hora a 37°C. Se lavó y se adicionaron 100 μ l por pozo de sustrato para peroxidasa ABTS (Single solution, Zymed,

San Francisco, CA, E.U.A) protegiéndose de la luz directa e incubando 10 minutos a 37°C para llevar a cabo la reacción colorimétrica y finalmente se tomó lectura en un lector de placas automático (Dynex, Virginia, USA) a 405 nm.

5. RESULTADOS

5.1. TITULACIÓN DE SUEROS EXPERIMENTALES

Se inmunizaron dos grupos de ratones Balb/C Ann (♂) vía s.c. a intervalos de 0, 2, 4 y 6 semanas (30 µg/ratón). A partir de la cuarta inmunización se extrajo suero de los ratones experimentales y se evaluó la presencia de anticuerpos anti-Aβ fue evaluada mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA doble sándwich utilizando los sueros anti-Adyuvante y anti-AβFM a diluciones dobles seriales 1:200 a 1:12800 (Figura 9).

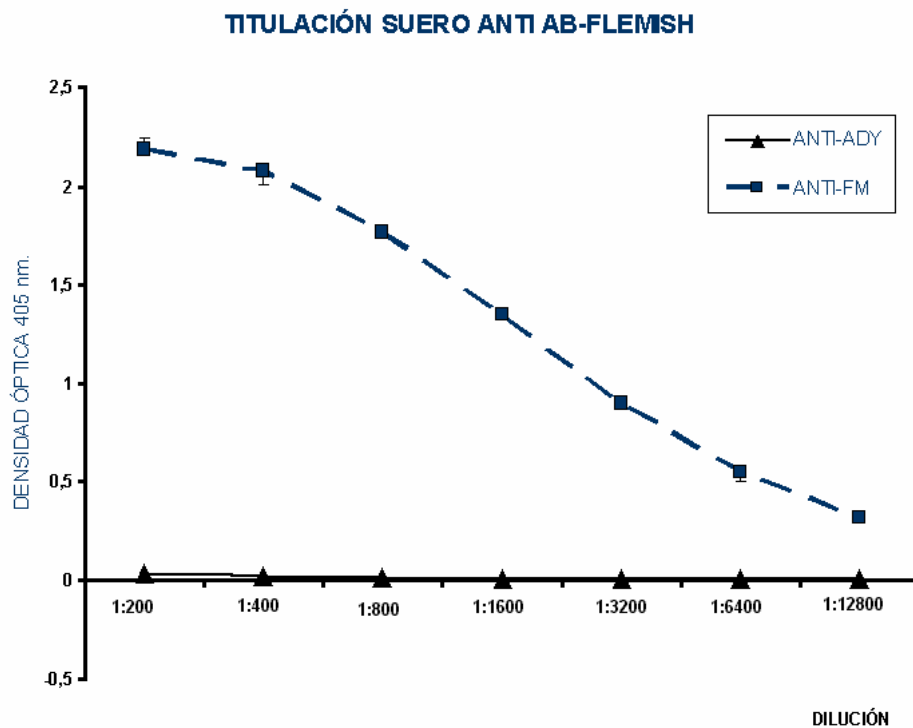


Figura 9. Titulación por ELISA de los sueros anti mutantes contra la mutación FLEMISH (A21G). El formato de ELISA es doble sandwich y se usaron los sueros α -Ady y α -Flemish dil. 1:200 a 1:12800. La lectura se hizo a una densidad óptica a 405 nm

Se observa claramente en el gráfico anterior que las diluciones 1:6400 y 1:12800 dan una diferencia de entre 0.4 a 0.2 unidades DO respecto al suero control por lo que puede ser una buena estimación del título del suero. Sin embargo, debido a que se sabe que casi la totalidad de la respuesta de anticuerpos está dirigida a la región amino terminal (alrededor del 95%) y no queremos perder información de los anticuerpos contra la región media y carboxilo terminal, decidimos utilizar la dilución 1:400 para los ensayos de bioselección.

5.2. BIOSELECCIÓN

Para la identificación de epítomos del péptido β A-FM se realizaron tres rondas de bioselección con una biblioteca de siete aminoácidos expresada en fago (PhD.7. New England Biolabs) con el suero de ratón anti-FM inmovilizado en placa. Al final de cada ronda de bioselección se cuantificaron los fagos eluidos y se obtuvieron los siguientes títulos (Tabla 1).

TITULO DE RONDAS DE BIOPANNING α -FM

RONDA DE BIOSELECCIÓN	TITULO DE ENTRADA pfu	TITULO DE SALIDA pfu
1	10^{11}	3.8×10^3
2	2×10^{12}	1×10^7
3	2×10^{12}	9×10^8

Tabla 1. Títulos de los eluidos en cada ronda de bioselección. Los títulos de entrada corresponden a los usados para la bioselección y los de salida corresponden a los eluidos después de cada ronda de bioselección. Nótese el aumento de magnitud en los títulos de salida de cada una de las rondas de bioselección.

En la tabla 1 puede observarse que los títulos de salida se incrementaron con cada una de las rondas de bioselección es decir en cada ronda la cantidad de fagos específicos aumentaba, lo que señaló que el proceso de bioselección estaba siendo eficiente.

5.3. TITULO DE CLONAS ANTI-FM

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

TITULO DE CLONAS α -FM			
No de Clona	TITULO	No de Clona	TITULO
1	2.9×10^{11}	12	1.4×10^{12}
2	2.4×10^{11}	13	1.03×10^{12}
3	4.9×10^{11}	14	1.01×10^{12}
4	4.2×10^{11}	15	2.3×10^{12}
5	2.3×10^{11}	16	4.3×10^{11}
6	1.3×10^{12}	17	1.8×10^{11}
7	1×10^{12}	18	1.37×10^{11}
8	1.13×10^{12}	19	1.2×10^{12}
9	1.75×10^{12}	20	4.4×10^{11}
10	4.15×10^{11}	21	1.9×10^{12}
11	3.8×10^{11}		

Tabla 2. Titulo de cada una de las 21 clonas individuales seleccionadas al azar después de ser amplificadas.

5.4. REACTIVIDAD DE CLONAS INDIVIDUALES

Se realizó un ensayo inmunoenzimático ELISA para analizar la reactividad de las 21 clonas de la tercera ronda, seleccionadas al azar, contra el péptido A β Mutación Flemish (Figuras 10 y 11). Se utilizó como anticuerpo de captura IgG de ratón α -A β Flemish inmovilizada con α -IgG (gamma) de ratón, usando posteriormente IgG's de conejo α -M13 y suero de cabra α -conejo conjugado a la enzima HRP para finalmente revelar con el sustrato ABTS y leer a 405 nm de longitud de onda. Se observó claramente que el 85% de las clonas, es decir dieciocho de ellas presentaron reactividad contra el péptido A β (clonas positivas) y únicamente el 15% de las clonas no presentaron esta reactividad (tres clonas negativas 10, 14 y 20).

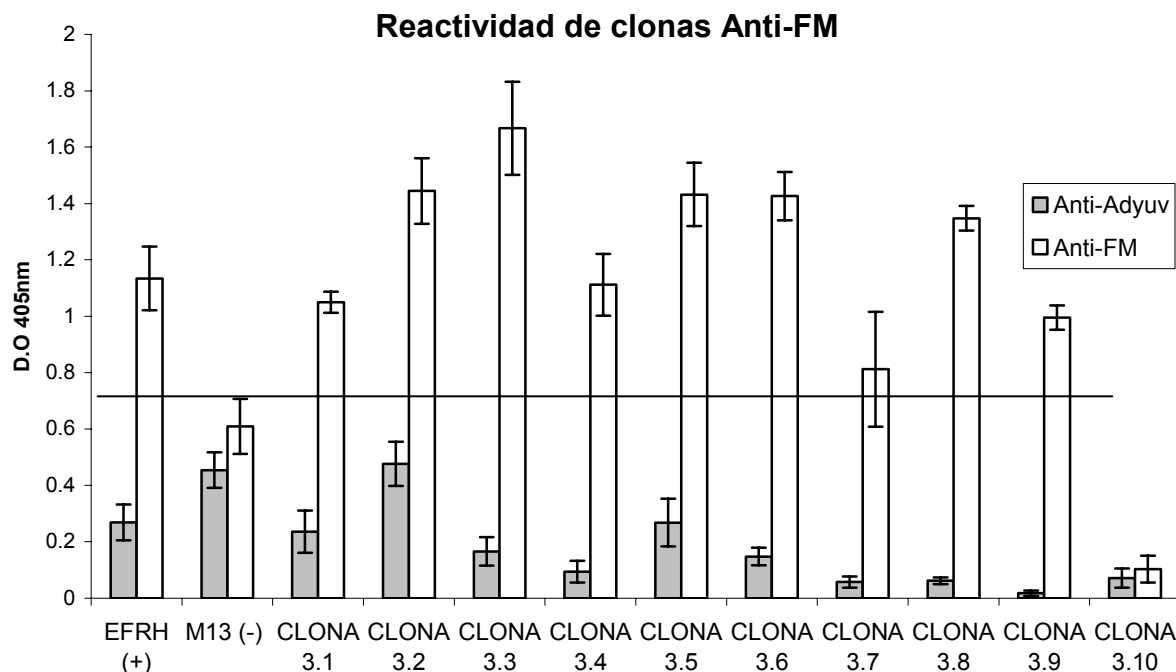


Figura 10. Evaluación de la reactividad por ELISA doble-sandwich, de 10 de las 21 clonas de fagos individuales aisladas de 3ra Ronda de Bioselección (Clonas 3.1-3.10). Se utilizó como control positivo una clona que expresa la secuencia EFRH amino terminal de $A\beta_{42}$ y fago M13 como control negativo a 405 nm. El valor de corte se estimó como el promedio de todas las negativas \pm 3 SD.

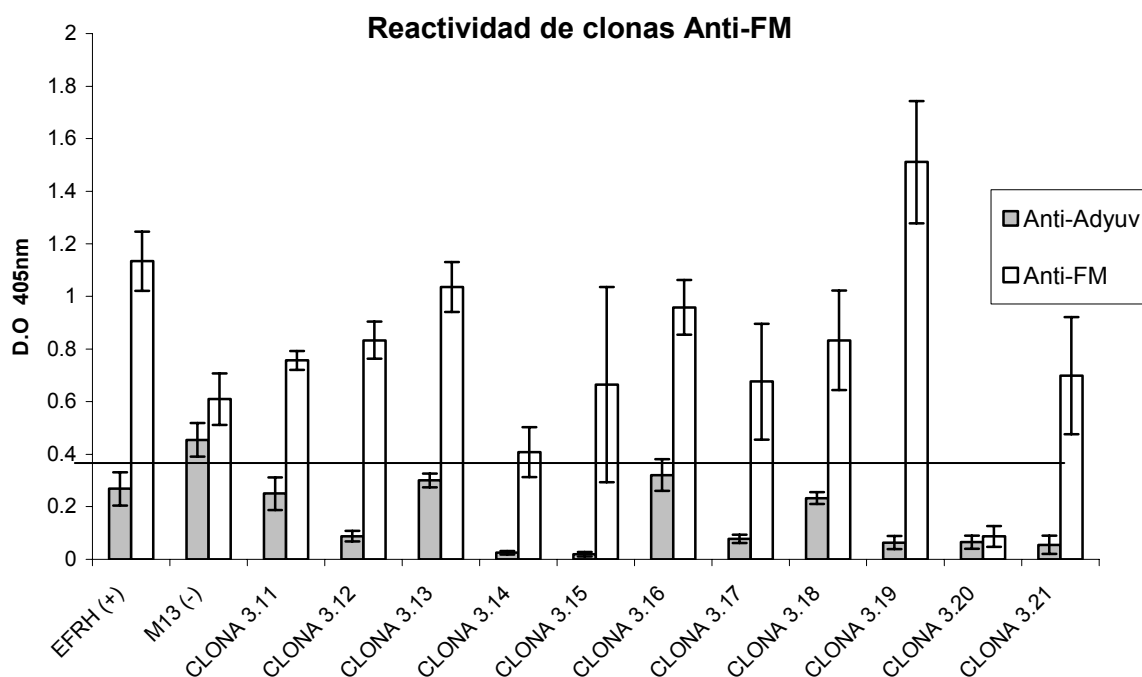


Figura 11. Evaluación de la reactividad por ELISA doble-sandwich, de 11 de las 21 clonas de fagos individuales aisladas de 3ra Ronda de Bioselección (Clonas 3.11-3.21). Se utilizó como control positivo una clona que expresa la secuencia EFRH amino terminal de $A\beta_{42}$ y fago M13 como control negativo a 405 nm. El valor de corte se estimó como el promedio de todas las negativas \pm 3 SD.

5.5. SECUENCIACIÓN

Se llevó a cabo la purificación de ADN de cadena sencilla para posteriormente secuenciar cada una de las clonas aisladas. Se verificó la presencia de ADN de cadena sencilla de cada una de las veintiún clonas individuales en un gel de agarosa al 0.8% en Buffer de TBE 1X con tinción de Bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta (figura 12).

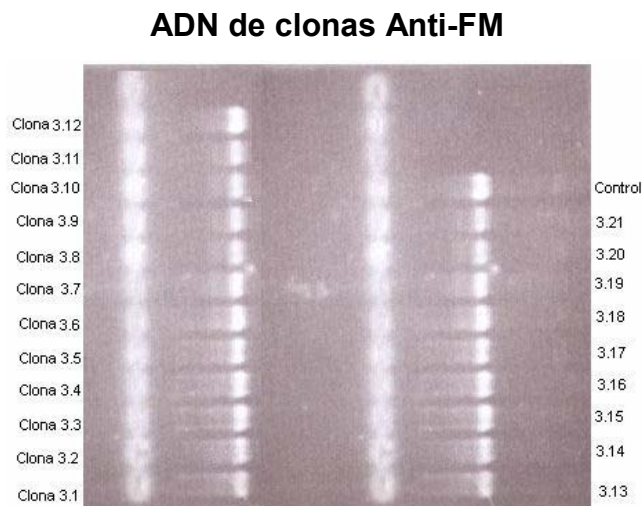


Figura 12. Análisis del ADN de las 21 clonas seleccionadas en gel de agarosa al 0.8% en Buffer de TBE 1X con tinción de Bromuro de etidio e iluminación UV.

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

Secuencia de nucleótidos

Clonas	Dirección	Secuencias							
Clona 1	(5'→3')	TCA	AAC	ATA	TAA	GGC	AAA	AAA	
Clona 2	(5'→3')	ACA	AAA	AAA	CCA	GTC	ACA	CAA	
Clona 3	(5'→3')	TGA	CTC	AAA	GCC	GTA	GTC	CAA	
Clona 4	(5'→3')	GTC	GTT	TGA	CTC	AAA	GCA	GTA	
Clona 5	(5'→3')	ACA	AAA	AAA	CCA	GTC	ACA	CAA	
Clona 6	(5'→3')	ATA	CTC	AAA	GCA	GTA	TCA	AGA	
Clona 7	(5'→3')	ATC	GGA	AAA	GCA	GTA	AGA	AAC	
Clona 8	(5'→3')	AGC	AAC	AAA	TCC	GTA	CTA	ATA	
Clona 9	(5'→3')	GTC	GAC	AAA	TCC	GTA	CTC	TGA	
Clona 10	(5'→3')	GTA	CGA	TAA	ATA	GGC	GCA	GTA	
Clona 11	(5'→3')	AGA	AGC	GAC	GAA	CTA	AAA	AAA	
Clona 12	(5'→3')	ACC	CCA	CTA	GAA	AGA	AAA	ACC	
Clona 13	(5'→3')	ACC	CCA	CTA	GAA	AGA	AAA	ACC	
Clona 14	(5'→3')	GTC	GTA	TTA	CTC	AAA	GCA	GTA	
Clona 15	(5'→3')	TCA	ATA	CTC	AAA	GCA	GTA	GTA	
Clona 16	(5'→3')	TCA	AAC	ATA	TAA	GGC	AAA	AAA	
Clona 17	(5'→3')	AGA	GTC	AAA	TCC	GTA	CTA	AGC	
Clona 18	(5'→3')	ACC	CCC	GGA	GAA	CGC	AAA	AAA	
Clona 19	(5'→3')	AGC	AAA	AAA	TCC	GTA	TGA	CAA	
Clona 20	(5'→3')	GTA	CGA	TAA	ATA	GGC	GCA	GTA	
Clona 21	(5'→3')	CAC	GGC	AAA	GCA	GTA	CTA	CTC	

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de cada una de las 21 clonas seleccionadas. La lectura se llevo a cabo en dirección 5'→3'.

Las secuencias de aminoácidos se leyeron a partir de la secuencia de nucleótidos de la cadena complementaria de 5'→3', es decir la cadena 3'→5'. Esto debido a que dentro del genoma del fago M13 la cadena 3'→5' es la cadena codificadora.

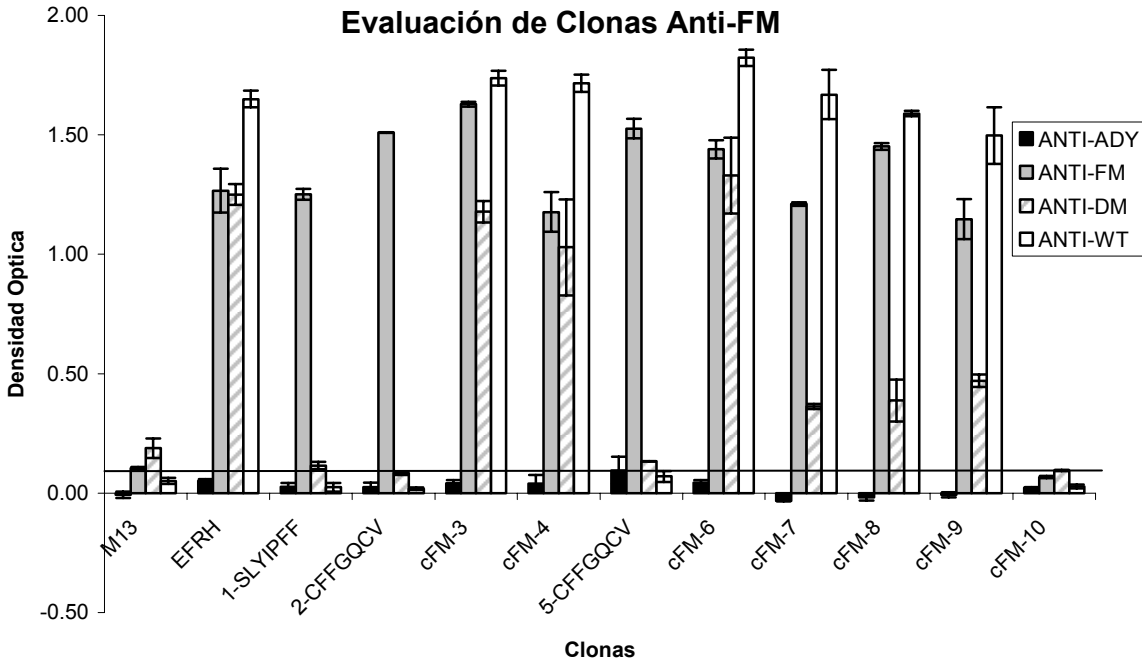
Secuencia de aminoácidos de clonas Anti-FM

CLONA	SECUENCIA	CLONA	SECUENCIA
1 y 16	S L Y I P F F	11	S S L L D F F
2 y 5	C F F G Q C V	12 y 13	W G D L S F W
3	T <u>E F R H</u> Q V	14	Q H N <u>E F R H</u>
4	Q Q T <u>E F R H</u>	15	S Y <u>E F R H H</u>
6	Y <u>E F R H</u> S S	17	S Q <u>F R H</u> D S
7	Q P <u>F R H</u> S L	18	W G P L A F F
8	S L <u>F R H</u> T Y	19	S F <u>F R H</u> T V
9	Q L <u>F R H</u> E T	21	V P <u>F R H</u> D E
10 y 20	H A I Y P R H		

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de las 21 clonas tercera ronda seleccionadas al azar. Se observa claramente la presencia del motivo EFRH en distintas clonas. Aproximadamente el 65% de las clonas presentan el motivo EFRH, lo cual nos confirma la inmunogenicidad de la región amino terminal.

5.6. EVALUACIÓN DE CLONAS INDIVIDUALES CON SUEROS CONTRA DIFERENTES FORMAS DEL PEPTIDO Aβ.

Después de obtener la secuencia de cada una de las clonas seleccionadas se decidió realizar otro ensayo inmunoenzimático ELISA para analizar la reactividad de las 21 clonas usando diferentes sueros de ratón con otras formas del péptido Aβ (α-Ady, α-FM, α -DM y α -WT) (Figura 13 y 14), debido a que aproximadamente un 35% de las secuencias no presentaban el motivo EFRH.



Figura

13. Evaluación de la reactividad de 10 clonas de la 3ra ronda de biopanning por ELISA doble sandwich contra 4 sueros (α -Ady, α -FM, α -DM y α -WT) inmovilizados en placa y se utilizó como control positivo una clona que expresa la secuencia EFRH y fago M13 como control negativo. El valor de corte se estimó como el promedio de todas las negativas \pm 3 SD.

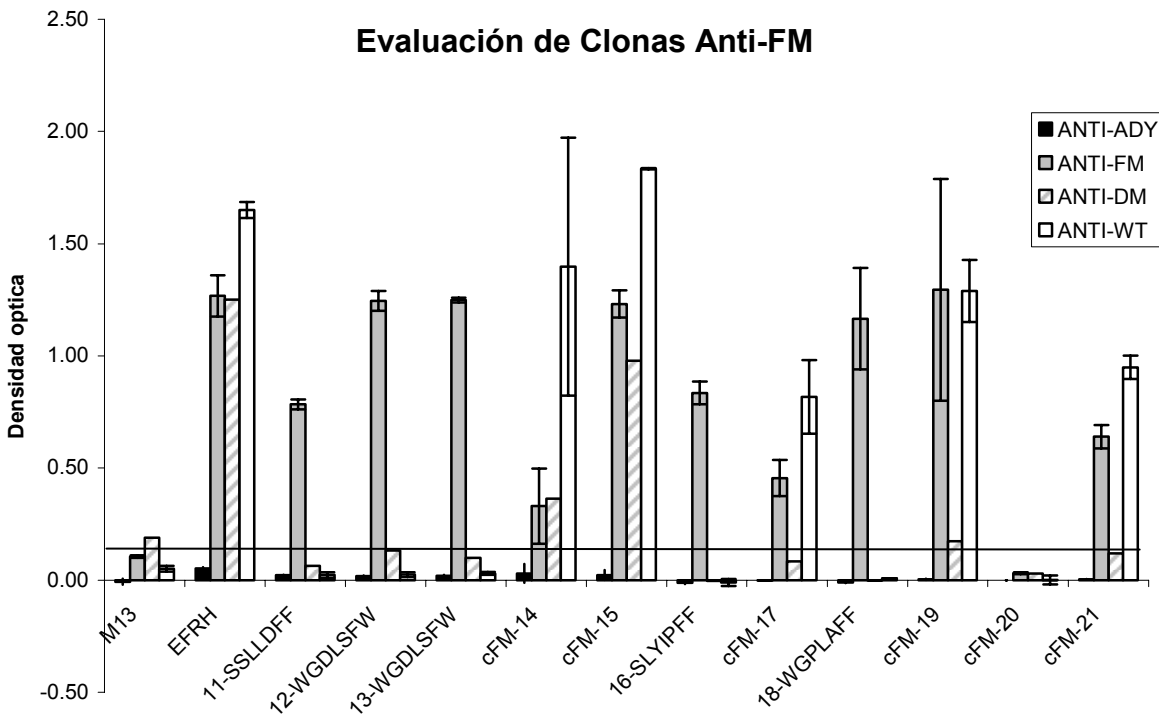


Figura 14. Evaluación de la reactividad de 11 clonas de la 3ra ronda de biopanning por ELISA doble sandwich contra 4 sueros (α -Ady, α -FM, α -DM y α -WT) inmovilizados en placa y se utilizó como control positivo una clona que expresa la secuencia EFRH y fago M13 como control negativo. El valor de corte se estimó como el promedio de todas las negativas \pm 3 SD.

Se observa en las Figuras 13 y 14 que las clonas que no tienen en su secuencia el motivo EFRH presentan reactividad positiva únicamente contra el suero α -FM mientras que con los demás sueros su reactividad es negativa, aún contra el suero anti-péptido silvestre (α -WT). Cabe señalar también que las clonas que presentan un cambio en el aminoácido E presentando el motivo XFRH no reaccionan contra el suero α -DM mientras que con los otros sueros la reactividad es positiva. Lo que indica que la reactividad (o inmunogenicidad) del péptido A β -DM depende fuertemente de la presencia del aminoácido E en el motivo EFRH.

5.7. ALINEACIÓN DE CLONAS α -FM CON EL PEPTIDO A β -FM

Se alinearon las secuencias de las ocho clonas que resultaron positivas y que no presentan el motivo EFRH con la secuencia original del péptido A β -FM, observándose clara similitud en algunos aminoácidos presentes en las secuencias (Tabla 5).

Alineación de clonas α -FM con el péptido A β -FM

A β -FM	H Q K L V F F G₂₁ E D V
C-1,16	S L Y I P F F
C-2,5	C F F G ₂₁ <u>Q</u> C V
C-11	S S L L D F F
C-18	W G P L A F F
C-12,13	W G D L S F W

Tabla 5. Alineación de clonas α -FM de acuerdo a su similitud con el péptido A β -FM original.

En la Tabla 5 se observa la homología que tienen estas ocho clonas con la región central del péptido A β -FM, presentando aminoácidos idénticos en esta región, en especial las clonas 2 y 5 que incluyen la mutación de nuestro interés.

6. DISCUSION.

En el presente trabajo se tamizó un suero de ratón generado contra el péptido A β (A21G) con el fin de identificar epítomos relevantes para el tratamiento de la EA utilizando una biblioteca comercial de siete aminoácidos al azar expresada en fago (Despliegue en fago). Mediante la tecnología de despliegue en fago (Phage Display) es posible identificar epítomos y/o mimótopos lineales o conformacionales. Esta técnica tiene la ventaja de que una vez identificadas las clonas de fagos que expresan en su inserto dichos epítomos y/o mimótopos se pueden amplificar en pocas horas mediante la infección de *E.coli*, facilitando su disponibilidad en grandes cantidades.

Después de tres rondas de bioselección de esta biblioteca contra el suero inmune α -A β (A21G), se noto un aumento en la cantidad de clonas recuperadas. Esto indicó un enriquecimiento de la biblioteca en clonas específicas. Así que se plaquearon y colectaron 21 placas aleatoriamente para caracterizar la reactividad contra el suero original y conocer la secuencia original de las 21 clonas de fagos correspondientes. Es este enlace físico entre la molécula desplegada (su reactividad) y el genoma respectivo, lo que hace tan poderosa a esta tecnología de despliegue en fago (Phage Display).

A partir de un ensayo inmunoenzimático se analizó la reactividad de estas clonas hacia el péptido A β Mutación Flemish y se encontró que el 85% de las clonas seleccionadas resultaron positivas y únicamente el 15% de estas clonas resultaron negativas. Posteriormente mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de cada una de las clonas seleccionadas se observó que el 65% de las clonas seleccionadas es decir once de estas presentaban el motivo EFRH o FRH en común, lo que señala el por que de su reactividad hacia el péptido A β , ya que se sabe que la mayoría de los anticuerpos con alta afinidad hacia el péptido A β reconocen al motivo EFRH (Gevorkian *et al.*, 2004). Estas clonas son de poca importancia para nosotros ya que se ha reportado que el reconocimiento de esta región despierta un proceso inflamatorio severo (Wolfe, 2002).

El 35% de las clonas restantes que no presentan el motivo EFRH pero que resultaron positivas, revisten mayor interés por lo que se decidió realizar un nuevo ensayo

inmunoenzimático para analizar la reactividad de las 21 clonas usando diferentes sueros de ratón con especificidad hacia otras formas del péptido A β (α -FM, α -DM y α -WT).

En este ensayo se observó que las clonas que presentaban el motivo XFRH eran positivas hacia las formas del péptido A β silvestre (WT) y Mutación Flemish (FM), sin embargo resultaron negativas hacia la Mutación Dutch (DM). Esto señala que en la forma DM el intercambio del aminoácido E (Ac. Glutámico) en la secuencia EFRH cambia radicalmente la reactividad de las clonas, indicando que la presencia del aminoácido E en el motivo EFRH es de suma importancia en el caso del péptido A β -DM ya que en las formas WT y FM la reactividad positiva se conserva en ambos casos.

En el caso de las clonas negativas se observa claramente en las secuencias que no tiene ninguna relación con ninguna de las formas del péptido A β , lo que señala, el por que de su negatividad.

En cuanto a las ocho clonas positivas que presentaron una secuencia diferente al motivo EFRH, las cuales fueron alineadas con el péptido A β -FM, se encontró que presentan un alto grado de homología con el péptido A β -FM y es importante señalar que esta homología se presenta en la región central del péptido A β -FM, justamente la zona en la cual se estaban buscando epítomos de interés y es la región en la que se presenta el intercambio de Ala-21 por Gly, además de que en el ensayo inmunoenzimático con las diferentes formas del péptido A β , estas clonas solo resultaron positivas hacia el péptido A β -FM, lo que señala la alta especificidad de éstas clonas hacia el péptido A β -FM. Esta especificidad puede adjudicarse a cambios conformacionales que toma el péptido A β debido al intercambio de Ala por Gly, los cuales puede ser que expongan la región central y pueda ser reconocida por anticuerpos anti-FM, además de que las características de estos aminoácidos son antagonistas es decir la Alanina es un aminoácido no polar mientras que la Glicina presenta polaridad explicando también así el por que de la reactividad negativa hacia las otras formas del péptido A β , ya que al parecer la presencia del aminoácido glicina en la secuencia del péptido A β -FM da la especificidad a estos anticuerpos.

Es de gran importancia entonces analizar con más detalle estas secuencias para determinar si estas son mimótopos lineales y/o conformacionales o podrían mimetizar (mimótopos) motivos del péptido A β -FM, además de verificar si los anticuerpos dirigidos hacia estas regiones son capaces de despertar una respuesta inmunológica y analizar si tienen la capacidad de desagregar al péptido A β -FM.

7. CONCLUSIONES.

Se identificaron ocho secuencias homólogas a la región central del péptido A β -FM mediante el uso de una biblioteca de péptidos de siete aminoácidos expresados en fago, las cuales pueden ser consideradas como epítomos/mimótopos del péptido A β -FM ya que éstas son reconocidas por anticuerpos anti A β -FM.

Se generó y tituló un suero con anticuerpos contra el péptido Beta Amiloide Mutación Flemish, el cual fue evaluado mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Se realizó la búsqueda de epítomos/mimótopos del péptido A β Flemish, seleccionando y caracterizando 21 clonas individuales mediante la tecnología Phage Display, a partir de tres rondas de bioselección con una biblioteca de siete aminoácidos expresada en el bacteriófago M13, de las cuales 18 de ellas resultaron reactivas hacia el péptido A β -FM.

Se llevo a cabo la secuenciación de las 21 clonas individuales y posteriormente se realizo el análisis de de estas, en donde se encontraron las ocho secuencias antes mencionadas.

Se comprobó la especificidad de anticuerpos anti-A β -FM contra estas ocho secuencias mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

8. PERSPECTIVAS

Inmunización de ratones con las clonas que contienen las secuencias analizadas para obtener anticuerpos específicos contra estas secuencias.

Comprobar mediante ensayos inmunoenzimáticos ELISA sí las secuencias analizadas pertenecen a epítomos y/o mimótopos ya sean lineales o conformacionales del péptido A β -FM.

Analizar sí los anticuerpos generados contra estas secuencias son capaces de desagregar al péptido Beta Amiloide y/o neutralizar el efecto citotóxico del péptido en líneas celulares.

La posibilidad de desarrollar moléculas útiles para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

APENDICES

Apéndice A

ABTS. 2,2-azino-di-(3-etilbenziazolano-6-ácido sulfónico).

BSA. Bovine Serum Albumine (Albúmina Serica Bovina).

IPTG. (isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida) induce la actividad de beta-galactosidasa, una enzima que promueva la utilización de la lactosa, atando e inhibiendo *el represor* de Lac. IPTG se utiliza para inducir *la expresión* del gene del lacZ en experimentos de reproducción.

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

PBST. Phosphate Buffer Saline conteniendo Tween 20.

PEG. Polietilenglicol.

TBS. Tris Buffer Saline

X-Gal. (5-Bromo-4-Cloro-3-Idoly-²-D-Galactopyranoside) es usado extensamente como substrato para la detección del β -galactosidasa que produce un color azul claro. Frecuentemente el X-Gal se utiliza conjuntamente con IPTG para distinguir a colonias bacterianas recombinantes con el genotipo de Lac⁺. También se utiliza para reportar la selección de la actividad del gene de β -galactosidasa en la transfección de células eucarióticas.

Apéndice B

LB (Luria Bertani) 1L

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Top Agar 1L

Bacto Tryptone	10g
Extracto de Levadura	5g
NaCl	5g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1g
Agarosa	7g

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Medio 2xYT 1L

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer Salino de Fosfatos PBS 10X

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

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a 1litro.

Buffer de carbonatos 0.05M, pH=9.6

Solución de Na ₂ CO ₃ 0.05M Aforar a 200ml	31.8mg
Solución NaHCO ₃ 0.05M	21mg

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

PEG/NaCl (8000)

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

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

TBS (Tris Buffer Saline)

Tris-HCl (pH=7.5)	50mM
NaCl	150mM

Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de Yoduro

Tris-HCl (pH=8.0)	10mM
EDTA	1mM
NaI	4M

Proteger de la luz a temperatura ambiente.

X-Gal/IPTG

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

Mantener a -20°C

TBE 1L

Tris-HCl	54g
Acido Borico	27.5g
EDTA	20ml

Gel de Agarosa 0.8%

TBE	100ml
Agarosa	0.8g

Buffer de Glicerol (Tolerant Gel Buffer) 1litro 10X

Tris base	108g
Taurina	36g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	2g

Aforar a 1 litro, filtrar y almacenar a 4°C.

Gel de poliacrilamida al 8% (Gel de Secuencia)

Urea	42.0g
H ₂ O miliQ	45ml aprox.
Acrilamida/Bisacrilamida	20ml
Buffer de Glicerol 10X	10ml

BIBLIOGRAFIA.

1. Allsop D, (2000). Introduction to Alzheimer's Disease, en: Alzheimer's Disease, Methods and Protocols. Editado por Hooper M. Editorial Human Press, 1a ed. 1-22.
2. Atwood C, Obrenovich M, Liu T, Chan H, Perry G, Smith M, Martins R. (2003) Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . Brain Research Reviews. **43**, 1-16.
3. Bradbury A, Marks JD. (2004). Antibodies from phage antibody libraries. Journal of Immunological Methods, **290**, 29-49.
4. Citron M,(2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's Disease. Nature Reviews, vol. **5**, 667-685.
5. Cribbs D., Ghochikyan A., Tran M., Vasilevko V., Petrushina I., Sadzikava N., Kessler P., Kieber-Emmons T., Cotman C., Agadjanyan M. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. Int Immunology. **15**, 505-514.
6. Dickey C.A., Morgan D.G., Kudchodkar S., Weinwer D.B., Bai Y., Cao C., Gordon M.N., Ugen K.E. (2001). Duration and specificity of humoral immune responses in mice vaccinated with the Alzheimer's disease-associated beta-amyloid 1-42 peptide. DNA Cell. 723-729.
7. Dower WJ, Cwirla SE, (2000), Epitope mapping using libraries of random peptides displayed on phage, en: Peptide Antigens A practical Approach. Editado por Wisdom GB, Editorial The Practical Approach Series. 1ra ed. 219-243
8. El-Agnaf O, Guthrie D, Walsh D, Irvine B. (1998). The influence central containing residues 19-25 on the aggregation properties and secondary structure of Alzheimer's β -amyloid peptide. Eur. J. Biochem. **256**, 560-569.

9. Flaten TP. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull;Review* **55** (2):187-96.
10. Gevorkian G, Petrushina I, Manoutcharian K, Ghochikyan A, Acero G, Vasilevko V, Cribbs D, Agadjanyan M. (2004) Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar β -amyloid. *Journal of Neuroimmunology*. **156**, 10-20.
11. Hardy J, Allsop D, (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's Disease, *TiPs*, **12**, 383-388.6
12. Hardy J, Selkoe D.J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, **297**, 353-358.18.
13. Hendriks L, Van Broeckhoven C, (1996). The βA_{42} amyloid precursor protein gene and Alzheimer's Disease. *Eur. J Biochem*. **273**, 6-15.
14. Hock C., Konietzko W., Streffer J., Tracy J., Signorell., Muller-Tillmanns B., Lemke U., Henke K., Moritz E., Garcia E., Wollmer A., Umbricht D., De Quervain D., Hofmann M., Maddalena A., Papassotiropoulos A., Nitsch R. (2003) Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. **38**, 547-54.
15. Kumar-Singh S, Cras P, Wang R, Kros J, Van Sweiten J, Lubke U, Ceuterick C, Serneels S, Vennekens K, Timmermans J, Van Marck E, Martin J, van Duijn C, Van Broeckhoven C. (2002). Dense-Core Senile Plaques in the Flemish Variant of Alzheimer's Disease Are Vasocentric. *American J. of pathology*. **161**, 507-519.
16. Kumar-singh, Julliams A, Nuydens R, Ceuterick C, Labeur C, Serneels A, Vennekens K, Van Osta P, Geerts H, De Strooper B, Van Broeckhoven C, (2002). In Vitro Studies of Flemish, Dutch, and Wild-Type β -Amyloid Provide Evidence for Two-Stage Neurotoxicity. *Neurobiology of Disease* **11**, 330-340

17. LeVine H. (2004). The Amyloid Hypothesis and the clearance and degradation of Alzheimer's β -peptide. *Journal of Alzheimer's disease*. **6**, 3003-314.
18. Marvin DA. (1998) Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol*; **8**: 150-158
19. Menéndez S. Padrón N. Llibre J. (2002) Peptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Cub. Inv. Biomed.* **21**, (4), 253-61
20. Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F, Cortese R, Galfre G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J of Immunology*. **154** (7) 3162-72.
21. Medina J, Ralph (1998) *Molecular Cloning*. volumen **3** pag B23.
22. Molenaar T, Michon I, De Hass S, Van Berkel T, Kuiper J, Biessen E. (2002). Uptake and Processing of Modified Bacteriophage M13 in Mice: Implications for Phage Display. *Virology*. **293**, 182-191.
23. Monsonogo A., Weinwer H. (2003) Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* **302**, 834-838.
24. Montero J.A. (2004) Tesis: Identificación de Biomoléculas Inhibidoras de agregados de Peptido Beta-Amiloide. Editado por la UNAM Facultad de Ciencias. 10-13.
25. Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. (2002). Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **294**, 5-10.

26. Parmley SF, Smith GP, (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. **73**, 305-318.
27. Pfiifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalde a, Deller T, Staufenbiel M, Mathews P, Jucker M. (2002) Cerebral Hemorrhage After Passive Anti-A β Immunotherapy. *Science*. **298**, 1379.
28. Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Research Bulletin*. 61, 1-24.
29. Roks G, van Harskamp F, De Koning I, Cruts M, De Jonghe C, Kumar-Singh S, Tibben A, Tanghe H, Niermeijer M, Hofman A, Van swieten J, Van Broeckhoven C, Van Duijn C. (2000) Presentation of amyloidosis in carriers of codon 692 mutation in the amyloid precursor protein gene (APP692). *Brain*. **123**, 2130-2140.
30. Roth T, Weeiss G, Eigenbrot C, Sidhu S. (2002) A Mimized M13 Coat Protein Defines the Requirements for Assembly into the Bacteriophage Particle. *J. Mol. Biol.* **322**, 357-367.
31. Russel, M. (1994). Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export. *Science* ; **265**: 612-614.
32. Santamaría H, Manoutcharian K, Rocha L, Gonzalez E, Acero G, Govezensky T, Uribe LI, Olguin A, Paniagua J, Gevorkian G. (2001). Identification of peptide sequence specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. *Clin Immunology*. **101** (3), 296-302.
33. Scott, J., and Smith, G. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*; **249**: 386-390.
34. Shenk D. (2002) Opinion: amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat. Rev. Neuroscience*. **3**, 824-828.

35. Simons, M et al. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. Proc. National Acad. Sci. USA **95**, 6460-6464.
36. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985; **228**: 1315-1317.
37. Tanzi R. Bertram L. (2001) New frontiers in Alzheimer's Disease Genetics. Neuron, **32**, 181-184.
38. Tschampa HJ, Neumann M, Zerr I, Henkel K, Schroter A, Schulz-Schaeffer WJ, Steinhoff BJ, Kretschmar HA, Poser S. (2001) Patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies mistaken for Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. **71** (1) :33-9.
39. Van Duinen SG, Vinters HV, (2000). Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) Mutant Amyloid β Proteins to Human Cerebral Microvessel and Aortic Smooth Muscle Cells. Stroke **February**, 534-538.
40. Van Gassen G, Annaert W, (2003). Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease. The neuroscientist, **9**, No 2, 117-126.
41. Walsh D, Hartley D, Condron M, Selkoe D, Teplow D. (2001). In vitro studies of amyloid β -protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of flemish variant (Ala⁶⁹²-->Gly) Alzheimer's disease. Biochem. J. **355**, 869-877.
42. Wang Z, Natté R, Berliner JA, Van Duinen SG, Vinters HV, (1999). Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) Mutant Amyloid β Proteins to Human Cerebral Microvessel and Aortic Smooth Muscle Cells. Stroke **February** 2000, 534-538.

43. Webster R. (2001). Filamentous Phage Biology, en: Phage Display a Laboratory Manual. Editado por Barbas C, Burton D. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1a ed. 1.1-1.11
44. Weiner H., Selkoe D. (2002) Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* **420**, 879-884.
45. Wilson, DR., Finlay, B.B. (1998) Phage Display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* ; **44**: 313-329.
46. Wolfe M. (2002) Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Nature Reviews*. **1**, 859-866.
47. www.alzheimer.org.mx
48. www.who.int/es/ (Pagina de la Organización Mundial de la Salud)