



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO SOBRE FRAGMENTOS DEL  
PÉPTIDO BETA-AMILOIDE  
DESPLEGADOS EN EL  
FAGO FILAMENTOSO M13**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:

**HORACIO DAVID HERAS SANDOVAL**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. GOHAR GEVORGYAN**



2006



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.

A la vida.

A mis padres y hermanos, de quienes he recibido su apoyo incondicional y su cariño inagotable.

## Agradecimientos:

A la Dra. Gohar Gevorgyan por permitirme desarrollar el presente trabajo en su laboratorio y por su apoyo.

Al Dr. Karen Manoutcharian por su apreciable apoyo durante la elaboración de éste trabajo y por su alegría.

Al Biólogo experimental Gonzalo Acero, por su gran ayuda durante el trabajo experimental, por sus consejos e invaluable su amistad.

A la M. en C. Ma. Elena Munguía, por su ayuda y consejos.

Al M. en C. Erik González Martínez por su apoyo en el trabajo experimental.

A los amigos de la generación de IBB quienes me acompañaron durante los años de la carrera y de quienes recibí apoyo, estímulos, muchas lecciones y alegrías.

A los amigos del laboratorio Claudia, César, Jorge, Erika, Marcia, Gilda, Mactzil, Julia, Carmen, Lucy, Lety, Prisco, Rodrigo y de todos aquellos cuyo nombre no está aquí por mi mala memoria. Gracias por su ayuda, consejos y los buenos ratos dentro y fuera del lab.

A los compañeros y compañeras que recuerdo con gran cariño y de quienes recibí apoyo, cariño y comprensión, y que han seguido su propio camino.

## Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	5
2.1. Enfermedad de Alzheimer.....	5
2.2. Histopatología de la EA.....	6
2.2.1. Placas amiloides.....	7
2.2.2. Marañas Neurofibrilares.....	9
2.2.3. Daño Celular.....	10
2.3. Biosíntesis del Péptido $\beta$ A.....	11
2.4. Etiología de la EA.....	16
2.4.1. Factores genéticos en la EA.....	17
2.4.1.1.1. Mutaciones en el gen de la APP.....	17
2.4.1.1.2. Mutaciones de los genes de Presenilina 1 y 2 en la EA.....	18
2.4.1.1.3. Otros factores genéticos.....	19
2.4.2. Hipótesis amiloidea.....	21
2.5. Propuestas Terapéuticas.....	29
2.6. Tecnología de Despliegue en Fagos (Phage Display).....	31
3. Objetivo.....	35
3.1. Objetivos Particulares.....	35
4. Metodología.....	36
4.1. Diseño de Oligonucleótidos.....	36
4.2. Clonación de Oligonucleótidos y Confirmación por PCR.....	36
4.3. Obtención de Fago a partir de células E. coli TG1 Transformadas.....	38
4.4. Confirmación de la Clonación de Oligonucleótidos en el Genoma de Fagos.....	38
4.5. Confirmación de la Expresión de fragmentos en la superficie del fago M13.....	39
4.6. Análisis de resultados.....	40
5. Resultados.....	41
6. Discusión.....	48
7. Conclusión.....	52
8. Perspectivas.....	53
9. Breviario.....	54
10. Referencias.....	55

## 1. Resumen.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en el mundo, y el péptido beta-amiloide ( $\beta$ A), principal componente molecular de las placas amiloides en el cerebro enfermo, está relacionado con el daño neuronal y las consecuencias clínicas observadas en la enfermedad. La forma predominante del  $\beta$ A, encontrada en las placas amiloides maduras, es el péptido de 42 residuos aminoacídicos ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>). Éste se produce por corte proteolítico de la proteína precursora del péptido  $\beta$ A, APP (Amyloid beta peptide precursor protein), y es realizado por las beta y gamma secretasas. *In vitro*, el  $\beta$ A forma fibrillas que son tóxicas para las neuronas y provocan su muerte (Chesselet, 2001; Selkoe, 2001; Morgan, 2004).

Diferentes grupos han propuesto compuestos para prevenir la agregación y/o promover la desagregación del péptido  $\beta$ A. Entre estos compuestos están los anticuerpos anti- $\beta$ A, los cuales se unen a las fibrillas preformadas, degradándolas e inhibiendo sus efectos neurotóxicos. Además, se ha demostrado que la inmunización de ratones transgénicos, que sobreexpresan APP humano, con péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, y la inmunización de monos con péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, puede prevenir los signos neuropatológicos tipo EA y disminuir significativamente los agregados de péptido  $\beta$ A (Selkoe, 2003; Meret, 2005; Schenk, 1999).

Estos estudios han sugerido el uso de la inmunización con  $\beta$ A como una estrategia terapéutica, con el objetivo de prevenir y posiblemente tratar la EA. La posibilidad de utilizar vacunas contra la enfermedad ha llevado a la realización de estudios para determinar las interacciones entre los anticuerpos anti- $\beta$ A y fragmentos del péptido  $\beta$ A, con la finalidad de diseñar estrategias de vacunación más específicas (Manoutcharian, 2004; Manoutcharian, 2003).

El objetivo de este trabajo se centra en la producción de proteínas recombinantes que contienen los fragmentos amino terminal (aminoácidos 1-16), central (aminoácidos 12-28) y carboxilo terminal (aminoácidos 17-42) del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, expresadas en la superficie del bacteriófago filamentososo M13, haciendo uso de la tecnología de “Phage Display” (despliegue en fagos).

Para tales motivos se diseñaron oligonucleótidos con secuencias codificantes para las regiones del extremo amino, parte media y extremo carboxilo del  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, los cuales contienen regiones de anclaje para los sitios de restricción de endonucleasas Sfi I y NotI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Estos oligonucleótidos se introdujeron dentro de

los sitios de restricción adyacentes al gen que codifica a la proteína III (pIII), dentro del vector fagémido pCANTAB 5E de M13. Los oligonucleótidos se ligaron con ligasa de ADN T4 al ADN del vector fagémido para obtener fusiones de los fragmentos del péptido  $\beta A$  al extremo amino a la proteína pIII expresada sobre la superficie del bacteriófago M13. Los productos de ligación se utilizaron para transformar células E.coli TG1. Luego se aislaron diferentes clonas de células transformadas con el vector fagémido y fueron utilizadas para obtener partículas de bacteriófago M13. Los genomas de los bacteriófagos se corroboraron por el método de secuenciación de Sanger. Finalmente, para corroborar la expresión del fragmento peptídico deseado se realizaron ensayos ELISA y se determinó la reactividad de las diferentes construcciones con sueros de ratón inmunizados con el péptido  $\beta A_{1-42}$  y  $\beta A_{8-42}$ , así como anticuerpos monoclonales contra diferentes regiones del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

Los análisis de secuencia mostraron que los bacteriófagos producidos a partir de las clonas seleccionadas contienen la secuencia del fragmento del  $\beta A_{1-42}$  correspondiente, fusionada al extremo amino de la proteína pIII. Así también, se observó que la construcción con el fragmento 1-16 expresado en fago es reconocido por suero de ratones inmunizados con péptido  $\beta A_{1-42}$ , pero no por el suero de ratones inmunizados con el péptido  $\beta A_{8-42}$ . Las construcciones que expresan el fragmento 12-28 y 17-42 son reconocidas por anticuerpos monoclonales generados contra las secuencias de los fragmentos 13-28 y 17-24 del  $\beta A_{1-42}$ , ya que la mayoría de los anticuerpos presentes en suero reconocen la región amino del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

La ventaja de obtener los fragmentos amino, medio y carboxilo del  $\beta A$ , sobre la superficie del fago M13, es el uso en la selección de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, que reaccionen contra estas regiones del  $\beta A$  específicamente. Anteriormente, se ha discutido que los anticuerpos de ratón contra el  $\beta A$  fibrilar, que reconocen el extremo amino del  $\beta A_{1-42}$ , poseen una mayor afinidad por depósitos de amiloide vascular y que esto tiene relación con la aparición de microhemorragias en modelos murinos y pruebas en humanos (Herzig, 2004; Racke, 2005; Miller, 2003; Pfeifer, 2002). Así, los fragmentos medio y carboxilo del  $\beta A$ , permitirían la selección de anticuerpos menos dañinos, evitando la utilización de anticuerpos generados contra la región amino, relacionada con microhemorragias.

Diferentes péptidos truncados del  $\beta A$  poseen efectos citotóxicos sobre las células (Wei, 2002; Casas, 2004), por lo que la utilización de los diferentes fragmentos del  $\beta A$  expresados sobre la superficie del fago M13, usados como inmunógenos para producir

anticuerpos contra esas regiones, o para seleccionar anticuerpos contra estas regiones, serian útiles para secuestrar las especies de  $\beta$ A truncadas con epítomos de la región amino, media y carboxilo, antes de su agregación o del daño de la función neuronal.

En suma, en el presente trabajo se clonó y demostró la expresión de los fragmentos del extremo amino, parte media y extremo carboxilo del péptido  $\beta$ A, involucrado en la EA. Se hizo uso de la tecnología de despliegue en fagos (Phage Display) para obtener fusiones al extremo amino de pIII, sobre la superficie del fago M13, con los diferentes fragmentos del péptido  $\beta$ A. La utilización de la tecnología de Phage Display, utilizada en el presente trabajo, permite la obtención de fagos en pocas semanas. Lo anterior reduce los costos de obtención de los fragmentos del péptido  $\beta$ A, al expresarlos en la superficie del fago M13 y permite su fácil uso en el laboratorio. Los fragmentos desplegados en fagos pueden ser utilizados para la selección de anticuerpos contra el péptido  $\beta$ A, como inmunógenos para producir anticuerpos contra el péptido  $\beta$ A, como ligandos de moléculas que puedan reconocer estas regiones del péptido  $\beta$ A y en varias estrategias experimentales de selección de ligandos que reconozcan estas secuencias en particular.



## 2. Introducción.

### 2.1. Enfermedad de Alzheimer.

La EA (EA) es la principal causa de demencia en el mundo, representando entre el 50% y 60% de los casos. La probabilidad de desarrollar demencia es menor del 1% en personas de 60-64 años y muestra un incremento casi exponencial con la edad; de esta manera en sujetos de 85 años o más la probabilidad es de entre el 24% y 33% (Ferri, 2005). No se sabe con exactitud cuantas personas sufren de EA en todo el mundo, algunas estimaciones calculan que 25 millones de personas tienen la enfermedad (Chesselet, 2001; Selkoe, 2003). La EA es una enfermedad muy común y por lo mismo un problema de salud pública. En México aproximadamente 350,000 personas están afectadas por la enfermedad y mueren por ella anualmente 2030 (INNN, <http://www.innn.edu.mx/>).

La EA fue descrita en 1906 por Alois Alzheimer, psiquiatra austriaco, quien fue el primero en describir el síndrome clínico-patológico en Auguste D, una mujer de 51 años. En los cerebros de los enfermos con EA se observan dos tipos de lesiones características: las placas neuríticas, o seniles, y las marañas neurofibrilares. Autopsias de pacientes con demencia senil han demostrado que las placas seniles y las marañas neurofibrilares (MNFs) parecen ser el sustrato patológico para el 50 a 70 % de los casos (Chesselet, 2001; Siegel, 1999; Van Gassen, 2003).

La EA es un síndrome neurodegenerativo irreversible, que se desarrolla en periodos de años y que afecta la memoria, el pensamiento, el comportamiento y el estado emocional del paciente, debido a la muerte y daño en grupos de neuronas. Esto lleva a una pérdida progresiva y grave de las funciones mentales, y a la reducción de la expectativa de vida EA (Price, 1994).

Aunque aún no se saben las causas de la enfermedad, se han podido identificar un tipo de EA esporádica (EAE) y otro tipo que es la EA hereditario o familiar (EAH o EAF). En el caso de la enfermedad esporádica no se sabe que la produce y esta se presenta frecuentemente en mayores de 65 años. Los casos de EAH se deben a mutaciones genéticas, se presentan antes de los 65 años y representan menos del 5%, y otros autores reportan hasta menos del 0.1%, de los casos de la EA (Selkoe, 2001; Harvey, 2003).

El diagnóstico de la EA se determina por medio de la historia clínica del paciente, exámen físico, pruebas de las habilidades mentales e imagenología de cerebro en individuos con problemas de memoria u otras funciones mentales, descartando factores que puedan producir trastornos similares (NIH, 2005).

El costo anual de la EA a nivel mundial se calcula que asciende a varios miles de millones de dólares y en E.E.U.U. el gasto social oscila entre los 100 y los 140 mil millones de dólares. Lo anterior se debe a que las personas con EA suspenden eventualmente su actividad laboral, y es la familia sobre quien recae la atención del enfermo, el cual, en la fase tardía, depende en su totalidad del cuidado familiar o de los diferentes organismos de asistencia social (Chesselet, 2001).

## 2.2. Histopatología de la EA.

En los cerebros de pacientes diagnosticados con EA se pueden observar algunas características típicas de la enfermedad. Generalmente se observa atrofia de las cortezas límbica y asociativa y agrandamiento de los ventrículos laterales. A nivel histológico se puede observar pérdida de neuronas, la presencia de marañas neurofibrilares (MNF's) intraneuronales y depósitos extracelulares de filamentos de péptido  $\beta$ A rodeados por procesos neuríticos alterados y células gliales activadas. La principal causa del síndrome en la EA es el daño neuronal en regiones localizadas del cerebro relacionadas con los procesos de almacenamiento de memoria, aprendizaje y la modulación de la conducta. Este daño se extiende después a la corteza cerebral causando un deterioro mayor de las funciones mentales (Chesselet, 2001; Siegel, 1999; Selkoe, 2003; Selkoe, 2001; Morgan, 2004; Van Gassen, 2003).

### 2.2.1. Placas amiloides.

Las placas amiloides son depósitos insolubles de péptido  $\beta$ A encontrados en el parenquima cerebral, que contienen, además, proteínas y remanentes de neuronas rodeadas por células de la glia activada (Price, 1994; Gandy, 2000) (Figura 1). El  $\beta$ A es un producto del corte proteolítico de la APP, una proteína transmembranal de tipo I (De Strooper, 2000; Bayer,

2001). Las placas se forman principalmente en áreas del cerebro relacionadas con funciones cognitivas (Morgan, 2004; Van Gassen, 2003).

Se ha visto que las placas amiloides tienen un desarrollo temporal hasta lograr las estructuras complejas observadas en el tejido cerebral. Se tiene evidencia de que estas empiezan como grandes agregados no filamentosos y amorfos del péptido  $\beta$ A, proteínas de 40 a 42 residuos de aminoácidos (Chesselet, 2001). Estos agregados son los llamados depósitos difusos del  $\beta$ A, los cuales se vuelven cada vez más fibrilares y gradualmente adquieren las características clásicas de las placas amiloides, bultos compactos de filamentos  $\beta$ A de alrededor de 50-200  $\mu$ m, que tienen principalmente una conformación proteica de lamina beta plegada y los cuales capturan colorantes como Rojo Congo y Tioflavina (Selkoe, 2001; Morgan, 2004). Las placas amiloides compactadas o maduras, también llamadas placas seniles o neuríticas, están asociadas frecuentemente con numerosos procesos dendríticos y axones distróficos dentro o alrededor del depósito amiloide, las cuales se pueden observar en tinciones de plata (Selkoe, 2003; Morgan, 2004). Tales placas maduras también muestran microglía activada asociada íntimamente con el centro de la placa amiloide, y astrocitos fibrosos rodeando la placa (Mattson, 1997).

También las arterias, arteriolas, capilares, y en menor grado vénulas, corticales y meníngeas del cerebro, pueden contener depósitos amiloides en la membrana basal abluminal de estos microvasos, compuestos principalmente por  $\beta$ A<sub>39</sub> y  $\beta$ A<sub>40</sub>. No existe una relación entre la presencia de estos depósitos vasculares y presencia o grado de demencia, ya que sujetos que presentan estos depósitos pueden o no tener demencia, o sujetos que son diagnosticados con EA pueden o no tener depósitos de amiloide vascular, aunque en estos últimos si incrementa la frecuencia de presentar estos depósitos. Se cree que los depósitos vasculares son más jóvenes que las placas amiloides maduras y posiblemente son una fuente de amiloide que contribuye a la formación de placas seniles (Siegel, 1999, Morgan, 2004; Herzig, 2004; Racke, 2005; McCarron, 2000; Rensink, 2003).

La relación entre la presencia de las placas amiloides y el daño cognitivo observado en la EA no está clara, ya que los depósitos amiloides se pueden observar en varios individuos sanos después de la edad de 60 años, principalmente en el hipocampo, la amígdala y otras estructuras límbicas. Además, hay evidencia que sugiere que las especies no fibrilares y multiméricas de agregados del  $\beta$ A son los principales responsables del daño celular en la EA, e incluso algunos investigadores sugieren que las placas neuríticas pueden ser un mecanismo para evitar el daño tóxico por  $\beta$ A (Chesselet, 2001; Selkoe, 2001; Kokubo, 2005; Kokubo, 2005a; Walsh, 2002; Cleary, 2005).



Figura 1. Placa amiloide típica. Corte de hipocampo humano con tinción de plata de Bielschowsky. Se observa un núcleo central y neuritas en degeneración abultadas alrededor de ella. También se aprecian marañas neurofibrilares intraneuronales. Las placas amiloides se observan como pequeños agregados de estructuras oscuras irregulares con forma de hebras y con un material café frecuentemente en el núcleo central. El núcleo central esta conformado por péptido  $\beta$ -amiloide y las estructuras lineares irregulares en forma de cuentas son neuritas distróficas (dendritas y axones en degeneración). La flecha señala la placa amiloide. Tomado de [www.pathology.vcu.edu/education/cns/lab1.c.html](http://www.pathology.vcu.edu/education/cns/lab1.c.html).

### 2.2.2. Marañas Neurofibrilares.

Además de las placas amiloides, la mayoría de los cerebros con EA presentan fibras de proteína tau ( $\tau$ ) dentro de las neuronas, llamadas marañas neurofibrilares (MNF's) y que se observan muy bien con tinción de plata de Bielschowsky (figura 2) (Selkoe, 2001). La proteína  $\tau$  se une y estabiliza a los microtúbulos. En la EA  $\tau$  se encuentra hiperfosforilada, lo que induce su separación de los microtúbulos y agregación. Los agregados de  $\tau$  forman primero filamentos helicoidales pareados (FHP's) y estos constituyen después las MNF's (Chesselet, 2001). Esto provoca que los microtúbulos se desintegren y el sistema de transporte celular se colapse, provocando el mal funcionamiento del sistema de transporte de microtúbulos y una mala comunicación intercelular que conduce a la enfermedad (Guzik, 2004).

Las neuronas provenientes de cerebros con EA poseen marañas que se componen generalmente de masas de FHP's de  $\sim 10$ nm de largo, frecuentemente mezclados con filamentos rectos de  $\sim 15$  nm (Price, 1994). Las MNF's están presentes frecuentemente en los cuerpos celulares de las neuronas cuyos axones se proyectan a los sitios de placas neuríticas, como la vía perforante hipocampo entorinal y la vía neocortical/hipocampal del cerebro anterior basal (Selkoe, 2001). Las MNF's pueden presentarse en la ausencia de placas neuríticas, y pueden estar asociadas a diversos desordenes neurológicos de etiología diversa, tales como la panencefalitis esclerosante subaguda, la enfermedad de Kuf, la parálisis supranuclear y la enfermedad de Hallervorden-Spatzson (Siegel, 1999; Selkoe, 2001).

Las MNF's se pueden observar en neuronas de las cortezas asociativas, límbicas y de los núcleos subcorticales que se proyectan a estas regiones, las cuales sufren encogimiento del cuerpo celular y muerte celular (Selkoe, 2003). Las MNF's también se encuentran en regiones del SNC poco involucradas, patológica y clínicamente, en la enfermedad (por ejemplo, el cerebelo), donde pueden existir depósitos de amiloide difusos o preamiloides con poca distrofia neurítica y casi siempre sin formación de MNF's (Siegel, 1999).

También se ha demostrado en modelos de ratones transgénicos, que expresan la proteína  $\tau$  mutada y la mutación swedish de la APP más la mutación en la proteína  $\tau$ , que la presencia o sobreproducción del  $\beta$ A puede ser un factor importante para inducir la formación de MNF's (Götz, 2001; Lewis, 2001)

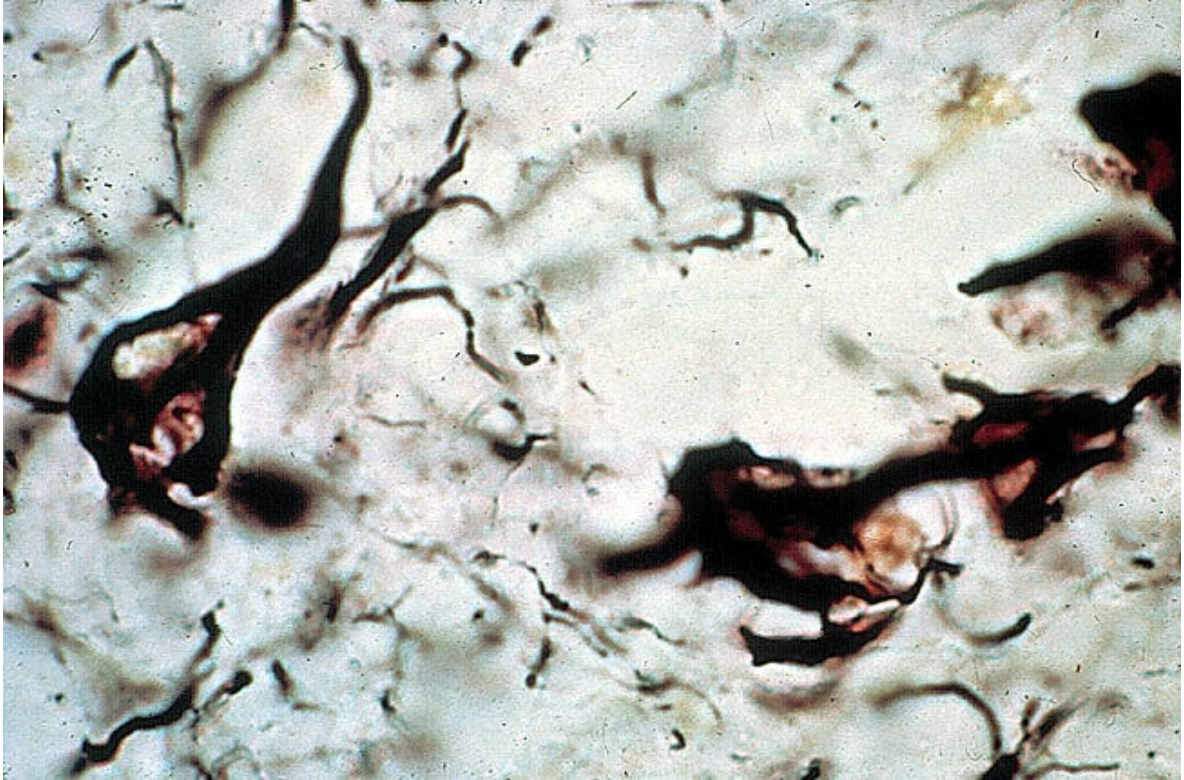


Figura 2. Amplificación de corte de hipocampo humano con tinción de plata de Bielschowsky. Se muestran marañas neurofibrilares intraneuronales (material fibrilar de tinción obscura dentro de las neuronas). Frecuentemente ocupan la neurona completa. Las neuronas se ven con forma de llama. Tomado de [www.pathology.vcu.edu/education/cns/lab1.c.html](http://www.pathology.vcu.edu/education/cns/lab1.c.html).

### 2.2.3. Daño Celular.

El daño sináptico es el principal causante del síndrome clínico en la EA ya que la pérdida gradual de conexiones entre las células nerviosas llevan a su mal funcionamiento, muerte y finalmente al encogimiento del tejido cerebral afectado. El daño celular se puede observar a nivel de neuritas, neuritas distróficas (Figura 1), en la pérdida de grupos celulares y pérdida de tejido cerebral, y a nivel de organelos y estructuras celulares (Kazuhiro, 2005). En modelos murinos se ha observado pérdida de cerca del 50% de células piramidales debido a citotoxicidad de  $\beta$ A intraneuronal (Casas, 2004). La pérdida de los diferentes grupos celulares en la EA se debe al daño producido por estrés oxidativo, cambio en la homeostasis iónica de la célula, activación de vías de señalización que promuevan programas de apoptosis y/o daño de las estructuras funcionales de las neuronas, promoviendo la degeneración de la misma (Chesselet, 2001). Como consecuencia de este daño celular hay un déficit de neurotransmisores debido a la pérdida de diferentes grupos neuronales (como células colinérgicas, importantes en el sistema límbico, células adrenérgicas, serotonérgicas en el tallo cerebral, células productoras de somatostatina o factor liberados de sustancia P y neuropéptido Y) y una alteración de la transmisión sináptica y comunicación celular (Siegel, 1999).

### 2.3. Biosíntesis del Péptido $\beta$ A.

El péptido  $\beta$ A es el principal componente de las placas amiloides. El  $\beta$ A es producto del corte proteolítico de una proteína transmembranal de tipo I llamada proteína precursora del péptido  $\beta$ A, APP (Figura 3). El descubrimiento de la secuencia amino terminal del  $\beta$ A permitió el aislamiento de un ADNc que codificaba la APP de 695 residuos de aminoácidos (APP<sub>695</sub>), con una secuencia transmembranal en el extremo carboxilo terminal (Turner, 2003; Glenner, 1984).

El gen de esta proteína se localiza en el cromosoma 21. La proteína se produce en todos los tejidos, y se han reportado al menos 8 isoformas de diferente número de residuos de aminoácidos (677, 695, 696, 714, 733, 751, 752 y 770) y peso molecular de entre 105 y 140 kDa. Las diferentes isoformas son el resultado del empalme alternativo de los 19 diferentes exones que conforman el gen de la APP en el humano. En el cerebro se expresa principalmente la APP<sub>695</sub>, en mayor grado por neuronas, mientras que las isoformas 751 y 770

se expresan principalmente en células periféricas, aunque también en cerebro (De Strooper, 2000). Se ha visto que la expresión de la APP<sub>695</sub>, la principal isoforma en neuronas, se eleva como respuesta a estrés, sobre todo en corteza límbica (Nunes, 2005).

Existen también otros genes homólogos a la APP que forman una familia de genes muy conservada en mamíferos y que pudieran intervenir en funciones parecidas dentro y fuera de la célula. La isoforma de 695 aminoácidos, APP<sub>695</sub>, está 100% conservada en el mono cinomologus y el humano. Incluso hay genes homólogos a la APP humana en otros organismos como *C. elegans* y *D. melanogaster* aunque no contienen la secuencia del  $\beta$ A.

Se han descrito funciones de la APP relacionadas con interacciones célula-célula, célula-sustrato, como receptor acoplado a proteína G, como inhibidor de proteasas (Factor XIa de la cascada de la coagulación), y se le atribuyen también funciones en el desarrollo neuronal y plasticidad del sistema nervioso (Siegel, 1999; Selkoe, 2001; De Strooper, 2000, Turner, 2003).

La APP se sintetiza co-traduccionalmente en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), siguiendo la vía secretora. Durante ésta vía la APP es glicosilada, sulfatada y fosfatada en residuos de tirosina hasta llegar a su destino en la membrana celular, donde tiene una vida media de 45-60 minutos. El  $\beta$ A puede ser generado durante la vía secretora de la APP, en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Además, la APP contiene un motivo Asn-Pro-Thr-Tyr en su dominio citoplasmático, involucrado en la internalización de receptores de superficie celular por medio de vesículas cubiertas de clatrina. Este dominio citoplasmático es muy importante en el metabolismo de la APP, ya que proteínas como las relacionadas con la cascada de señalización JNK (por ejemplo, JIP1b) modulan la movilización y el metabolismo de la APP. Otros estudios sugieren también que el  $\beta$ A es producido intracelularmente en microdominios ricos en colesterol y es transportado del Retículo Endoplásmico y la red de trans-Golgi a la membrana plasmática en rafts (Morishima-Kawashima, 1998; Langui, 2004; Koo, 1996; Wilde-Bode, 1997; Taru, 2002; Turner, 2003).

La APP, también puede ser internalizada de la superficie celular hacia el sistema endolisosomal (Langui, 2004). Los endosomas tempranos son los principales sitios de formación del  $\beta$ A como lo indica la evidencia relacionada con la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina y la reducción de la producción de  $\beta$ A, la ausencia de  $\beta$ A en endosomas tardíos, la endocitosis de APP marcada de la superficie celular que produce la liberación de  $\beta$ A marcados, la cinética de liberación de  $\beta$ A marcado, y la colocalización de marcadores del sistema de reciclaje celular de proteínas de membrana (Koo, 1996; Wilde-Bode, 1997). A su vez, existen varios estudios que insisten en la importancia de conocer la influencia de



proteínas adaptadoras, como Fe65, que pudieran intervenir en las rutas intracelulares de la APP y su procesamiento (Minopoli, 2001).

La proteólisis de la APP es llevado a cabo por tres diferentes actividades enzimáticas:  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, las cuales deben de estar distribuidas aparentemente en varios compartimentos subcelulares.

La actividad de  $\alpha$ -secretasa corta entre los aminoácidos lisina 16 y leucina 17, a la mitad de la secuencia del  $\beta$ A, evitando la producción del mismo péptido. La actividad de la  $\alpha$ -secretasa genera, principalmente, un péptido largo soluble ( $\alpha$ -APP<sub>S</sub>) (Figura 3). Algunas funciones del  $\alpha$ -APP<sub>S</sub> son: como factor autocrino, neuroprotector, factor neurotrófico, inhibidor de proteasas, y adhesión celular (Turner, 2003). Se han identificado proteínas de la familia ADAM (ADAM 10) como proteasas con actividad de alfa secretasa implicadas en el corte de la APP y otros sustratos (TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  y L-selectina) Este procesamiento parece ocurrir, principalmente, cerca de la superficie celular. Aunque también hay evidencia de que este procesamiento alfa ocurre en organelos intracelulares (Sambamurti, 1992; Selkoe, 2001; Gandy, 2000; De Strooper, 2000; Huse, 2000).

La actividad de  $\beta$ -secretasa corta antes del dominio del péptido  $\beta$ A. Esto genera un péptido soluble ( $\beta$ -APP<sub>S</sub>) y deja la secuencia del  $\beta$ A intacta. BACE (beta-site APP-cleaving enzyme) es la proteína responsable de este corte. BACE es una proteína integral de membrana de tipo I, relacionada con proteasas de grupos aspartilo. El fragmento carboxilo terminal de 99 residuos aminoácidos de la APP, el cual es el producto de la acción de la  $\alpha$ -secretasa, puede ser cortado por la  $\gamma$ -secretasa en el residuo 40 o 42 de la región del  $\beta$ A (Selkoe, D., 2001; De Strooper, B. et al., 2000; Huse, J. et al., 2000; Turner, P. et al., 2003).

Finalmente, la actividad de  $\gamma$ -secretasa actúa después de que la APP ha sido cortada por una de las dos actividades de secretasa anteriores, alfa o beta. El corte realizado por la  $\gamma$ -secretasa se lleva a cabo dentro del dominio transmembranal de la APP y produce el extremo carboxilo del  $\beta$ A. Dependiendo del corte anterior, por alfa o beta secretasa, se liberan el péptido p3 o el  $\beta$ A, respectivamente. Se han identificado a las presenilinas, PS1 y PS2, como las responsables de la actividad de  $\gamma$ -secretasa. En sí, la actividad de  $\gamma$ -secretasa se debe a un complejo formado por una de las presenilinas, nicastrina, Aph-1, y Pen-2. La actividad de este complejo podría ser modulado por la composición de los lípidos de membrana, y otros factores (De Strooper, 2000; Bayer, 2001; Huse, 2000; Funamoto, 2004).

De esa manera tenemos dos vías de procesamiento de la APP: la vía no amiloidogénica, de la alfa y gamma secretasas, y la vía amiloidogénica, de la beta y gamma secretasas.

La vía amiloidogénica de procesamiento de la APP produce el péptido  $\beta$ A y ocurre en la mayoría de las células, incluyendo neuronas donde la APP<sub>695</sub> es la principal isoforma y se produce abundantemente. Estudios con el  $\beta$ A<sub>1-40</sub> predicen una estructura predominantemente hidrofílica del aminoácido 1 al 14, mientras que para el extremo carboxilo sobrante se predice una hélice  $\alpha$  (Coles, 1998). El  $\beta$ A es liberado continuamente en cultivos celulares bajo condiciones metabólicas normales y es enteramente soluble. El  $\beta$ A también ha sido detectado en el plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo de individuos con EA y sanos. Estos antecedentes indican que el  $\beta$ A es un producto normal del ciclo biosintético de la APP. Por lo tanto, es posible que la producción de  $\beta$ A de todas las células del cerebro, aunado al  $\beta$ A producido en otros tejidos y que llegue al cerebro, contribuya al desarrollo de placas amiloides en el cerebro de pacientes con EA (Selkoe, 2001; Morgan, 2004; Bayer, 2001).

El procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica produce gran heterogeneidad en los fragmentos de  $\beta$ A. Sin embargo, las especies más importantes son las del  $\beta$ A<sub>1-40</sub> y  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. Estos péptidos contienen porciones de dos exones adyacentes, lo que sugiere que el procesamiento de la APP es por corte proteolítico y no por empalme alternativo de sus diferentes exones (Siegel, 1999; Selkoe, 2001; Gandy, 2000; Morgan, 2004; De Strooper, 2000).

Una vez cortado el  $\beta$ A es liberado al espacio extracelular, o bien es mantenido dentro del lumen de organelos como el retículo endoplasmico, el aparato de golgi, granulos de secreción y endosomas-lisosomas, donde permanece hasta que la célula degenera y finalmente muere, liberando estos agregados de  $\beta$ A (Langui, 2004; Koo, 1996).

El péptido  $\beta$ A es eliminado por enzimas como la neprelisina y la enzima degradadora de insulina (Insulin degrading Enzyme, IDE). La neprelisina se encuentra principalmente en la superficie exterior de la célula, mientras que la IDE se encuentra en el citoplasma. Además de estas enzimas se encuentran los sistemas de degradación de proteínas celulares, como el proteasoma y las chaperonas, manteniendo constantes los niveles de  $\beta$ A en el cerebro. Estas enzimas actúan sobre los monómeros de  $\beta$ A y una vez que éste oligomeriza o empieza a formar estructuras fibrilares es difícil su eliminación (Le Vine, 2004).

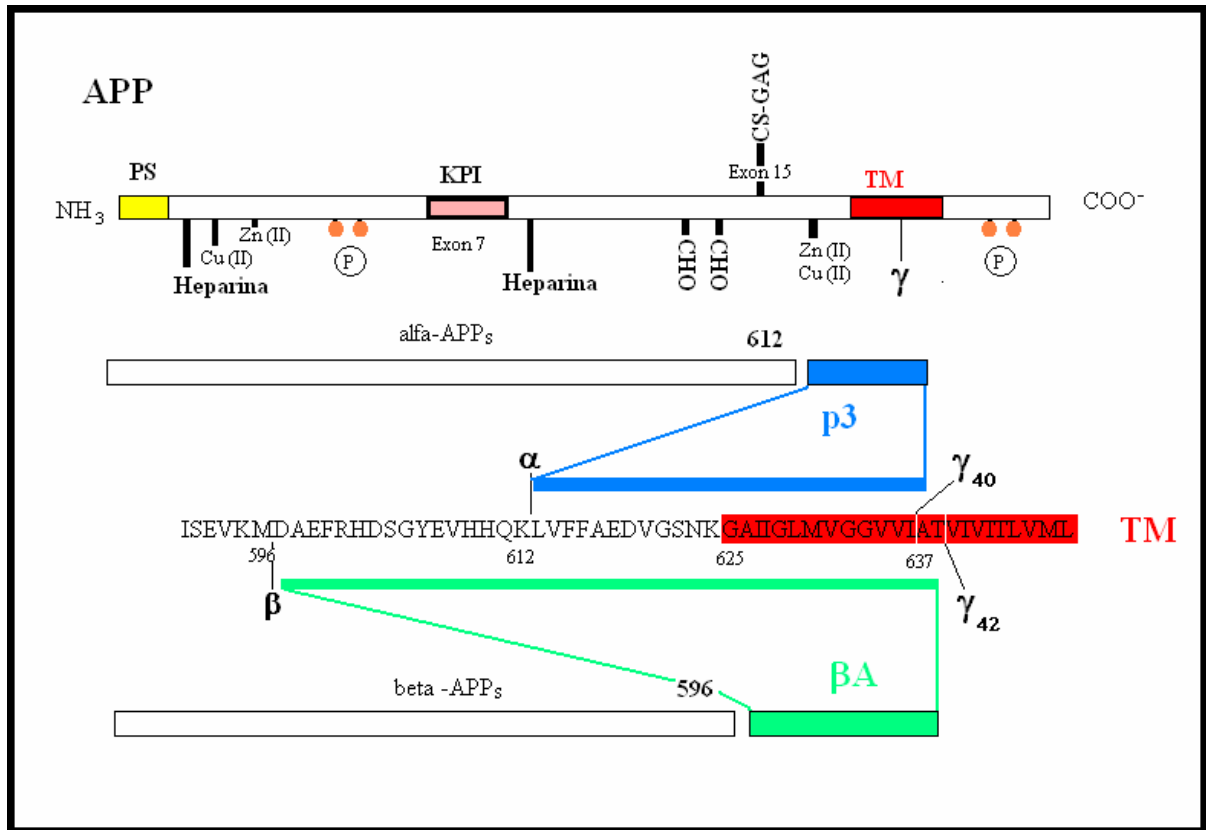


Figura 3. Diagrama esquemático de la proteína precursora del  $\beta$ A 695.

Se muestran las posiciones de un péptido señal (PS) en el extremo amino, sitios de unión de metales, heparina, fosforilación (P), y Glicosilación (CHO). También se muestran dos variantes de empalme, una contiene un dominio inhibidor de proteasas serínicas de tipo Kunitz (KPI) en el exon 7 y la otra un sitio de unión para condritin sulfato glucosaminoglicano (CS-GAG). Se muestra el dominio transmembranal (TM), cerca del extremo carboxilo. Se indica el sitio del corte proteolítico hecho por la  $\alpha$ -secretasa, que permite la secreción de el gran ectodominio soluble de la APP (alfa-APPs) al medio y la retención del fragmento carboxilo terminal de ~10 kDa en la membrana. El fragmento de 10-kDa puede ser cortado por la  $\gamma$ -secretasa para liberar el péptido pIII. Se indica también el sitio de corte proteolítico alternativo hecho por la  $\beta$ -secretasa, lo que resulta en la secreción de una molécula de APPs truncada (beta-APPs) y la retención de un fragmento carboxilo terminal de 12 kDa. Este fragmento puede ser cortado por la  $\gamma$ -secretasa liberando al péptido  $\beta$ A de 40 o 42 aminoácidos, dependiendo del sitio de corte.

## 2.4. Etiología de la EA.

Actualmente no se sabe que causa la EA, aunque sí se han sugerido diferentes factores de riesgo que pudieran intervenir en la enfermedad. Entre estos factores el principal es la edad avanzada, siendo otros factores importantes los genéticos, toxicológicos y de estilo de vida de cada individuo.

La EA es una enfermedad relacionada con el envejecimiento. Se cree que el medio ambiente del cerebro durante el envejecimiento es distinto al cerebro en edades tempranas, y que a ese cambio se debe la degeneración neuronal observada en la EA. Así, el envejecimiento, y sus consecuencias en el cerebro, es uno de los factores más relacionados con la aparición de la EA.

Una explicación para los factores genéticos llegó con el hallazgo de la APP como proteína precursora del  $\beta$ A. La localización del gen que codifica a la APP, en el brazo largo del cromosoma 21, ofreció una explicación a las observaciones neuropatológicas de los pacientes con trisomía 21. Estos individuos, si llegan a los 40 años o más, desarrollan placas amiloides y otras lesiones observadas en la EA. Los sujetos con trisomía 21 que mueren jóvenes, 20 años o menos, muestran de baja a moderada densidad de depósitos difusos de  $\beta$ A en las cortezas límbicas y asociativas. Estos depósitos se encuentran en ausencia de cambios detectables de las células neuronales y gliales adyacentes, neuritas distróficas o marañas neurofibrilares. Estas observaciones han fortalecido el concepto de que la acumulación de  $\beta$ A es un evento muy temprano en la EA y precede otros cambios histológicos (Chesselet, 2001; Siegel, 1999; Huse, 2000).

A su vez, la detección de algunos casos de EA que se heredan de una forma autosómica dominante sugirió una base genética de la enfermedad. Este tipo de EA aparece antes de los 65 años de edad, EA Temprana (EAT), y representa menos del 5% de todos los casos de EA. Aún así, la mayor parte de los casos de EA son de presentación tardía y es difícil saber si miembros de generaciones anteriores sufrieron la enfermedad (Siegel, 1999). Es importante decir que el 95% de los casos de EA se presentan arriba de los 65 años, EA esporádica (EAE) o de manifestación tardía (EAMT). Estos casos esporádicos, probablemente se deben a la combinación de factores genéticos, ambientales, de forma de vida y pueden variar entre individuos (Selkoe, 2001).

Dentro de los factores toxicológicos y ambientales se han sugerido a algunos iones metálicos como posibles causantes de cierto daño observados en la EA. Por ejemplo, se descubrió que el aluminio inducía fibras en las neuronas del sistema nervioso del conejo,

aunque estas lesiones son distintas de las MNF's de la EA, estructural y bioquímicamente. Asimismo, la presencia de aluminio en cerebros con EA y especialmente asociado a MNF's sugirió relación con la EA. La presencia de estas mismas características en otras enfermedades con MNF's sin otros daños presentes en la EA, sugiere que la acumulación de aluminio no es factor único para la EA. Lo anterior sugirió que el aluminio puede asociarse con las MNF's, sin importar la enfermedad específica que cause la formación de marañas. También se ha reportado la presencia del cobre, zinc y hierro en los centros de las placas amiloides, así como en las neuronas de la EA. A su vez, se ha observado el metabolismo de la APP esta regulado por estos iones dentro de la célula, uniéndose directamente a sitios en la APP o promoviendo el procesamiento amiloidogénico de la misma. Estos iones también están implicados en la producción de radicales libres y por lo tanto la producción de estrés oxidativo en las células (Siegel, 1999; Selkoe, 2001; Morgan, 2004; Bayer, 2001)

#### 2.4.1. Factores genéticos en la EA.

##### 2.4.1.1. Mutaciones en el gen de la APP.

El primer factor genético identificado con la EA fueron las mutaciones en el gen de la proteína precursora del péptido  $\beta$ A, APP (tabla1). El estudio de las mutaciones en el gen de la APP en diferentes familias que presentan enfermedad con amiloidosis o demencia del tipo Alzheimer de herencia autosómica dominante, han permitido asociar dichas mutaciones con la producción excesiva de  $\beta$ A y los fenotipos observados en estos trastornos (Le Vine, 2004).

Una de las primeras mutaciones estudiadas, del codón 693 de la APP<sub>770</sub>, se detectó en una familia que presentaba hemorragia cerebral hereditaria tipo Dutch (HCHWAD o FAD-Dutch). La enfermedad se caracteriza por acumulación de  $\beta$ A en la vasculatura meníngea y cerebro, presencia de numerosas placas difusas, pocas o ninguna placas neuríticas maduras, pocas o ninguna marañas neurofibrilares, y con hemorragias cerebrales múltiples. En estos pacientes no se describió ningún tipo de demencia del tipo de Alzheimer (Herzig, 2004).

En el codón 717 de la APP<sub>770</sub>, de algunas familias inglesas, se encontró la mutación de un residuo de valina por isoleucina, glicina o fenilalanina (Val-Ile, Val-Gly y Val-Phe). Este tipo de mutaciones se han encontrado en familias de origen americano, europeo y asiático, y es la más común de las mutaciones de la APP que causan EA hereditaria (Gandy, 2000).

También se descubrió una mutación, de alanina por glicina (Ala-Gly) en el codón 692 de la APP<sub>770</sub>, denominada Flemish. Los individuos con esta mutación presentaban amiloidosis vascular con hemorragia, depósitos de  $\beta$ A en el parénquima cerebral y demencia progresiva.

Otra mutación descubierta es la tipo swedish, donde hay una mutación secuencial, una en el codón 670 de la APP<sub>770</sub>, de lisina por asparagina (Lys-Asn), y otra en el codón 671, de metionina por leucina (Met-Leu). Estas mutaciones preceden inmediatamente la región amino terminal del  $\beta$ A y los individuos con esta mutación presentan EA hereditaria.

Las mutaciones descubiertas en el gen de la APP son la primera explicación genética para el desarrollo de la EA (tabla 1). Estas mutaciones de la APP, relacionadas con la EAH, se encuentran cerca o en los sitios de corte de las distintas secretasas, en la región del  $\beta$ A. Esto ha sugerido una modificación en el procesamiento de la APP que favorece la alta producción de  $\beta$ A, especialmente el  $\beta$ A<sub>42</sub> que es más amiloidogénico, lo que ha sido demostrado en células cultivadas y ratones transgénicos (Chesselet, 2001; Siegel, 1999; Selkoe, 2001; Gandy, 2000; Van Gassen, 2003).

#### 2.4.1.2. Mutaciones de los genes de Presenilina 1 y 2 en la EA.

Se han identificado otros genes relacionados con la herencia de la EA, sobre todo en los casos de la EAF (Tabla 1). El primer gen fue localizado en el cromosoma 14 y el estudio del mismo permitió la identificación de una proteína de 463 aminoácidos, la presenilina 1 (PS1) (Sherrington, 1995). Se han encontrado alrededor de 84 mutaciones dentro de la PS1 en familias de diversos orígenes étnicos (Van Gassen, 2003). Después de haber clonado el gen de PS1 se descubrió el gen homólogo de la presenilina 2 (PS2), de 448 aminoácidos. Éste fue identificado en el cromosoma 1 y siete mutaciones se han descubierto hasta la fecha en éstos casos de EA hereditario (Levy-Lahad, 1995; Van Gassen, 2003; Huse, 2000).

Las presenilinas son homólogos del gen sel-12 de *C. elegans*, un facilitador de la función de la proteína lin-12/Notch involucrada en el reconocimiento célula-célula y que determina el destino de la célula durante la embriogénesis. Estudios de las actividades funcionales y las mutaciones de las presenilinas en *C. elegans* y mamíferos, llevaron a la observación de que, si bien la expresión de PS1 es importante en la embriogénesis en mamíferos, su mutación no afecta las funciones del desarrollo. Otras funciones de las presenilinas se relacionan con la degradación de proteínas inútiles para la célula, neurogénesis, y señalización celular (Selkoe, 2001; Huse, 2000).

Las mutaciones en PS1 y PS2, ligadas a la EAH, pueden impedir la correcta regulación del complejo de la  $\gamma$ -secretasa, del cual forman parte, produciendo una ganancia de función tóxica (Van Gassen, 2003). El resultado observado de esta falta de regulación sobre el procesamiento de la APP, en cerebros, modelos transgénicos y cultivos celulares, con el gen de PS1 mutado, ha sido un incremento marcado en la producción de  $\beta A_{42}$  principalmente (Scheuner, 1996; Duff, 1996; Borchelt, 1996; Strittmatter, 1993). La manera en que las mutaciones en las presenilinas incrementan la generación de  $\beta A_{42}$  no se sabe aún, pero los efectos podrían involucrar la formación de complejos entre presenilinas y APP u otras proteínas o moléculas.

#### 2.4.1.3. Otros factores genéticos.

Otro factor genético que se ha relacionado con la EA es la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (ApoE $\epsilon 4$ ) (Selkoe, 2001; Turner, 2003) (Tabla 1). La ApoE está involucrada en la homeostasis de colesterol y es importante para el tráfico de colesterol intercelular. La ApoE está presente en el cerebro y líquido cefalorraquídeo. La ApoE se une a partículas de lipoproteínas, que contienen esteres de colesterol, y forma complejos con estas. El tráfico de la Apo E es mediado por interacciones específicas con múltiples receptores celulares que tienen diversas funciones e interacciones muy complejas. Las señales de estos receptores modulan varios procesos celulares muy importantes (Strittmatter, 1999).

Se ha visto que este gen, localizado en el cromosoma 19, se encuentra altamente representado en sujetos con EAE en comparación con sujetos de la misma edad. Los datos epidemiológicos confirman que la herencia de uno o dos alelos de la ApoE $\epsilon 4$  aumenta significativamente, 2-10 veces, la probabilidad de desarrollar EAE, así como disminuir la edad de presentación de la EA. Los sujetos con al menos uno de los alelos de la ApoE $\epsilon 4$  incrementan la probabilidad de presentar EAE entre los 60 y 70 años de edad. Por el contrario, la herencia del alelo 2 de la ApoE parece disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad (Morgan, 2004). Se ha observado que los sujetos con EA con los dos alelos de la ApoE $\epsilon 4$  tienen un número significativamente alto y una mayor densidad de depósitos de  $\beta A$  en el cerebro que los sujetos que presentan los otros alelos (ApoE  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$ ), mientras que los sujetos con un alelo ApoE $\epsilon 4$  presentan una densidad de placas intermedia entre los sujetos que presentan los dos alelos  $\epsilon 4$  y los sujetos que presentan los alelos  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$  (Selkoe, 2001).

Estudios bioquímicos *in vitro* han sugerido que la ApoE $\epsilon$ 4 puede ser menos efectiva para retardar la agregación del  $\beta$ A en fibras amiloides en comparación con ApoE $\epsilon$ 2 o ApoE $\epsilon$ 3. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la ApoE $\epsilon$ 4 se relaciona con la manifestación de la enfermedad no se han esclarecido. Se ha sugerido que la ausencia de cisteínas en la ApoE $\epsilon$ 4, las cuales se involucran en la formación de puentes disulfuro, intra e inter moleculares, podría explicar la relación de ApoE $\epsilon$ 4 con la EAE, ya que ApoE $\epsilon$ 2 y ApoE $\epsilon$ 3 si las contienen (Selkoe, 2003).

Otra hipótesis alternativa respecto al efecto de la ApoE $\epsilon$ 4 en la EA ha sido propuesta con base en la evidencia de que la ApoE $\epsilon$ 4 no mantiene el crecimiento neurítico *in vitro* y es menos beneficioso para la estructura y función neuronal normal que la ApoE $\epsilon$ 3 (Siegel, 1999).

Otros genes podrían estar implicados en la predisposición para la manifestación de la EA. Uno de estos podría ser el de la  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), situado en el cromosoma 12, el cual podría ser producto de un polimorfismo en un intron del gen de la  $\alpha$ 2-M (Selkoe, 2001). Otro locus relacionado con la EA se encuentra en el cromosoma 10, cerca del gen de la enzima de degradación de la insulina (IDE), la cual está relacionada con la eliminación del  $\beta$ A. La falta de una relación lineal entre los factores genéticos que se han relacionado con la manifestación de la EA, hace pensar que aún más genes pudieran contribuir al desarrollo de la EA (Bertram, 2000).

<b>Cromosoma</b>	<b>Defecto genético</b>	<b>Edad de manifestación</b>	<b>Fenotipo en <math>\beta</math>A</b>
21	Mutaciones en el gen de la APP	50	Elevada producción de $\beta$ A total
19	Polimorfismo de la ApoE4	>60 (EAE)	Alta densidad de placas amiloides y depósitos vasculares
14	Mutaciones PS1	40 y 50	Alta producción de $\beta$ A <sub>42</sub>
1	Mutaciones PS2	50	Alta producción de $\beta$ A <sub>42</sub>
12	Polimorfismo de la $\alpha$ 2-Macroglobulina	> 60 (EAE)	No se sabe
10	IDE	> 60 (EAE)	No se sabe



#### 2.4.2. Hipótesis amiloidea.

Existen diferentes estudios que apuntan a que el péptido  $\beta$ A está involucrado directamente en la fisiopatología de la EA. Diferentes estudios genéticos sobre las mutaciones de la APP y presenilinas en diferentes familias sugieren que la acumulación elevada del  $\beta$ A esta relacionada con la presentación temprana de la EA. También los estudios en modelos de ratones transgénicos, que contienen los genes mutados relacionados con la EA, han permitido confirmar que la sobreproducción del  $\beta$ A está relacionada con el daño cognitivo; aunque estos modelos no reproducen todo el daño patológico observado en los cerebros con EA. Por otro lado, varios estudios han demostrado que el  $\beta$ A, así como diferentes fragmentos de éste, son neurotóxicos e inducen daño en axones y apoptosis celular (Wei, 2002; Datki, 2004; Wei, 2000).

Proteínas como la ApoE $\epsilon$ 4 y otras encargadas de la degradación del  $\beta$ A podrían jugar un papel importante en la eliminación del  $\beta$ A, y su disfunción podría ayudar a que el péptido se acumule en el cerebro. Estudios realizados en animales que desarrollan lesiones tipo EA, cultivos celulares, tejidos de pacientes diagnosticados con EA, u otras enfermedades con características genéticas o fisiológicas relacionadas en algún aspecto con la EA, como la trisomía 21 (T21), también apuntan a que el péptido  $\beta$ A es uno de los principales agentes etiológicos en el desarrollo de la EA. Todo lo anterior ha permitido establecer una serie de pasos patológicos que anteceden las manifestaciones observadas en los casos clínicos de la EA (Siegel, 1999; Le Vine, 2004; Chesselet, 2001; Huse, 2000).

#### Desequilibrio en la producción y eliminación del Péptido $\beta$ A.

Los niveles de  $\beta$ A en el sistema nervioso central (SNC) son mantenidos constantes por medio de un proceso de síntesis, degradación, entrada y salida de  $\beta$ A en el cerebro (Le Vine, 2004). Un primer evento en el curso de la enfermedad es la falta de regulación de este proceso, conduciendo a una elevación en los niveles del péptido  $\beta$ A.

Esta sobreproducción se ha observado en los casos de EAH, T21 y otras amiloidosis, como la Polineuropatía amiloidótica Familiar (PAF) (Siegel, 1999; Le Vine, 2004). En los casos de EAH las mutaciones en los genes de la APP, PS1 y PS2, son causantes de la enfermedad en diferentes grupos de familias. En cada uno de los tres casos de estas mutaciones hay evidencia de que el mecanismo patogénico involucra el catabolismo alterado

de la APP para generar grandes cantidades de péptido  $\beta$ A, particularmente la forma más agregable,  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. También se ha visto que en pacientes con EAE y gran cantidad de  $\beta$ A hay una gran incidencia del alelo  $\epsilon$ 4 de la ApoE. En estos pacientes la formación de depósitos amiloides ocurre en edades más tempranas (Le Vine, 2004). En pacientes con T21, donde se tiene una copia extra del gen de la APP, también se observa una sobreproducción del  $\beta$ A con varias características histopatológicas presentadas en la EA (Huse, 2000).

Hay más factores que pudieran intervenir a favor de una producción excesiva de péptido  $\beta$ A. Proteínas relacionadas con el metabolismo de la APP, que interactúan directamente con las enzimas involucradas en el catabolismo del precursor, pueden perder su función. Por ejemplo, la proteína modificadora de la adhesión celular (MOCA, Modifier of cell adhesion protein) reduce la secreción de APP y  $\beta$ A en células nerviosas de rata al interactuar con las presenilinas, la falta de esta función incrementa los niveles de APP y  $\beta$ A (Koo, 1996). A su vez, la respuesta inflamatoria induce la síntesis y secreción de APP en astrocitos reactivos de rata (Lee, 1999). También se ha visto que los sistemas de degradación del  $\beta$ A, Neprelisina, IDE, etc., se encuentran disminuidos en los cerebros con EA (Le Vine, 2004; Kokubo, 2005a). Se ha observado que la expresión de APP<sub>695</sub> se eleva por causa de estrés en ratas (Nunes, 2005).

#### Agregación y acumulación del péptido $\beta$ A.

La producción continua de  $\beta$ A puede inducir la formación de diferentes tipos de agregados, desde las formas oligoméricas solubles hasta sus formas altamente insolubles y fibrilares. Estudios bioquímicos sugieren que la desprotonación de dos aminoácidos promueve una transición conformacional que precede a la agregación (Coles, 1998). El proceso de agregación y formación de depósitos de  $\beta$ A es muy complejo y depende del microambiente y superficies que rodean al  $\beta$ A (Shanmugam, 2004). Varios estudios han sugerido que las diferentes formas de agregados están implicadas en las primeras etapas de la enfermedad y que preceden el daño celular y otras lesiones observadas en la EA (Siegel, 1999; Le Vine, 2004).

Se ha visto que la oligomerización inicia en el interior de la célula y no en su exterior. Varios estudios en pacientes con EA, T21 y ratones transgenicos han demostrado que el  $\beta$ A se localiza en el interior de las neuronas y que esta acumulación se presenta con daño de las funciones cognitivas. El  $\beta$ A intracelular ha demostrado ser también tóxico para la célula, y en

algunos modelos de ratones transgénicos se ha observado pérdida de cerca del 50% de células piramidales de la capa CA1/2 (Casas, 2004; Oddo, 2006). Tanto el  $\beta$ A como los oligómeros son llevados a las terminales presinápticas para su liberación, donde pueden ser degradados por la acción de la neprelisina; de no ser así se pueden acumular en las sinapsis, sirviendo como sitio de acumulación de  $\beta$ A y formación de placas seniles (Kokubo, 2005a; Lazarov, 2002). Diferentes especies de  $\beta$ A se localizan en procesos celulares, en la terminal axónica, en la zona activa presináptica y en las zonas postsinápticas, en rafts ricos en colesterol, y tanto en membranas celulares como en placas seniles de ratones transgénicos (Kokubo, 2005; Kokubo, 2005a).

Diferentes estudios han propuesto que estas especies oligoméricas del péptido  $\beta$ A están involucradas en el daño cognitivo observado en la EA. Se han identificado ciertas especies de oligómeros especialmente tóxicos, los trimeros y múltiplos de trimeros del  $\beta$ A, así como un oligómero de 56 KDa (Cleary, 2005; Lesné, 2006). Estudios de inhibición de la LTP en el hipocampo de rata, usando oligómeros de  $\beta$ A a niveles fisiológicos, han sugerido que éstos son los principales efectores de la disfunción y pérdida sináptica características de la EA (Walsh, 2002). La acumulación de los oligómeros de  $\beta$ A en la terminación axonal, especialmente en los componentes sinápticos de las neuronas puede producir la disfunción sináptica y cognitiva en la EA. La inhibición en la LTP puede deberse a cambios funcionales y no estructurales ya que ni en los cerebros de EA ni en los normales hay pérdida de marcadores sinápticos (Kokubo, 2005a). Los efectos de los oligómeros del  $\beta$ A podrían contribuir a la ligera disfunción cerebral observada en etapas presintomáticas de la EA (Cleary, 2005).

Por otro lado, la formación de placas difusas, agregados amorfos no fibrilares de  $\beta$ A, se ha sugerido como el primer cambio morfológico observado en la EA. Lo anterior se apoya en las observaciones de cerebros de pacientes con EA, normales, individuos con T21, y ratones transgénicos. En los sujetos con T21, que poseen una carga extra del gen de la APP, se observan placas difusas en edades jóvenes, mientras que en edades avanzadas se observan, además, placas maduras de amiloide y citopatología parecida a la de los cerebros con EA (Selkoe, 2001). Tanto en sujetos normales y con EA se observan placas difusas, y en el caso de los cerebros de pacientes con EA estas se observan antes del desarrollo de otras lesiones, al igual que en T21. También los ratones transgénicos que expresan una cantidad elevada de APP y  $\beta$ A soluble desarrollan placas difusas y compactadas que asemejan a las de la EA desde el quinto u octavo mes. Durante los meses siguientes, los ratones muestran un número mayor de depósitos amiloides de tipo fibrilar y neuritis anormales asociadas íntimamente con las placas amiloideas (Games, 1995; Kazuhiro, 2005).

Algunos estudios en ratones transgénicos han establecido cierta relación entre las reservas de  $\beta$ A intraneuronal y las placas amiloides. Mientras el  $\beta$ A intraneuronal disminuye el  $\beta$ A extracelular aumenta. Esto es un proceso que depende de la edad. También en éstos casos se observa daño cognitivo en presencia de  $\beta$ A intraneuronal el cual se hace mas severo conforme aumenta la cantidad de placas. Lo anterior ha sido consistente con lo observado en cerebros de pacientes con T21. La acumulación de  $\beta$ A extracelular y la formación de placas pueden depender en parte del  $\beta$ A acumulado dentro de las neuronas. Aún así, la formación de placas es un proceso complejo que puede ocurrir por diferentes vías. Ciertas cantidades del  $\beta$ A extracelular pueden no provenir de las neuronas (Oddo, 2006).

Finalmente, en la formación de las placas seniles o neuríticas, características de la EA, que se lleva a cabo en un proceso dinámico de asociación y disociación del  $\beta$ A, donde se establece un equilibrio dinámico entre el  $\beta$ A soluble y fibrilar, las fibrillas se van haciendo más largas por la agregación de  $\beta$ A, el cual va haciendo su disociación cada vez más lenta, probablemente debido a cambios conformacionales o creación de enlaces entre las moléculas de  $\beta$ A, lo que estabiliza a las fibrillas y las vuelve insolubles y resistentes a proteólisis (Cruz, 1997). También se ha visto que moléculas, como los proteoglicanos de heparan sulfato, promueven la acumulación de  $\beta$ A (Morgan, 2004; Le Vine, 2004).

### Respuesta celular a las diferentes especies de $\beta$ A

La acumulación gradual de  $\beta$ A, en sus formas solubles, oligoméricas, de placas difusas y después de placas fibrilares, promueve la activación de células de la microglía, astrocitos y produce daño en neuritas. Los mecanismos por los que el  $\beta$ A ejerce su efecto tóxico sobre las células aun están siendo estudiados; sin embargo diferentes estudios sugieren que el  $\beta$ A puede actuar de varias maneras sobre las células, ya sea modificando el medio ambiente celular o dañando a la célula directamente.

La presencia de oligómeros o fibrillas de  $\beta$ A puede producir una respuesta inflamatoria por parte de células de la microglía. A su vez se han observado células de microglía activadas dentro y alrededor de placas maduras de amiloide, e incluso se ha sugerido que puede haber microgliosis en placas difusas. La activación de la microglía por  $\beta$ A, o moléculas asociadas a éste, puede promover la activación de la vía clásica del complemento y liberación de citocinas, oxido nítrico, y radicales libres (Monsonogo, 2003). El C1q un componente inicial de la vía clásica del complemento, se une a  $\beta$ A y desencadena la cascada del complemento, incluyendo

la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) (Selkoe, 2001). La microglía activada es capaz de liberar varias citocinas que pueden estimular a los astrocitos locales para liberar otros mediadores inflamatorios, como citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ ) y proteínas de fase aguda ( $\alpha$ 1-antiquimotripsina) (Chesselet, 2001; Siegel, 1999; Selkoe, 2001; Le Vine, 2004).

Otro efecto de la acumulación del  $\beta$ A es la generación de radicales libres y peroxidación de proteínas y lípidos celulares (Pike, 1997). Al parecer los oligómeros y polímeros formados por el  $\beta$ A producen daño en la membrana celular y sus moléculas de superficie. Lo anterior puede tener múltiples efectos sobre la célula neuronal. Uno de ellos es el desequilibrio en la homeostasis de iones en la célula, por ejemplo, se ha visto que el  $\beta$ A disminuye la actividad de ATPasas o bien que puede formar poros en la misma membrana celular, los cuales pueden funcionar como canales iónicos (Morgan, 2004; Dickey, 2005). Especialmente, el incremento en la concentración de calcio celular hace más susceptible a la célula a la toxicidad del  $\beta$ A, debido a la importancia del calcio en la regulación de diferentes vías metabólicas y de señalización en la célula (Selkoe, 2001; Morgan, 2004). Otro evento de importancia es la desregulación de la actividad de diferentes grupos de cinasas, como GSK3 $\beta$  o cdk5, relacionadas con la hiperfosforilación de tau, que intervienen en diferentes procesos celulares, como ciclo celular y del desarrollo. Algunas de éstas cinasas se encuentran reguladas por proteínas involucradas en el metabolismo de la APP, como la PS1 (Kazuhiro, 2005). La hiperfosforilación de tau, la acumulación de fibras de polímeros de tau y la incapacidad para mantener la estabilidad de los microtúbulos representan una amenaza principal para mantener la forma y función neuronal (Selkoe, 2001; Datki, 2004).

## Muerte neuronal

Los cambios producidos en el ambiente celular del cerebro, aunados a los cambios en la fisiología celular de las neuronas, pueden llevarlas a apoptosis (Morishima, 2001). Varios estudios han señalado que la presencia de  $\beta$ A incrementa la expresión bax y reduce la expresión de bcl2, produciendo apoptosis (Morgan, 2004). Se ha visto también que el  $\beta$ A promueve la apoptosis celular a través de la activación de caspasas por cinasas JNK de la vía Fas-ligando, por activación de receptores de membrana y probablemente fosforilando e inhibiendo a bcl2 (Morgan, 2004; Wei, 2002; Marx, 2001). A su vez, se ha señalado que la muerte neuronal, debido al efecto tóxico del  $\beta$ A, se lleva a cabo por medio de fosforilación de

proteínas adaptadoras como FISH, la cual regula proteínas de la familia ADAM. En especial la interacción entre FISH y ADAM 12 están involucrados con muerte neuronal en ratones transgénicos (Malinin, 2004).

La vía apoptótica puede ser activada por diferentes causas, entre ellas el daño sufrido por mitocondria y retículo endoplásmico, lo cual activa caspasas y señales apoptóticas. El daño en estos organelos puede deberse, en el caso de la mitocondria, a mutaciones en el ADN mitocondrial, interacción del mismo  $\beta$ A con elementos de la mitocondria y, en el caso del RE a estrés por acumulación excesiva de proteínas defectuosas. Otros estudios sugieren que la muerte neuronal puede deberse a deficiencias o daño en la actividad del proteasoma y el sistema de degradación por lisosomas, así como el cambio en los niveles de expresión de genes relacionados con el ciclo celular, procesos inflamatorios, control de calcio y degradación de proteínas. También se han encontrado marcadores de necrosis en modelos *in vitro* de EA (Kazuhiro, 2005; Mattson, 2004).

En suma, la cascada amiloidea propone que la alta producción, agregación (placas difusas y placas con fibras compactas de  $\beta$ A) y toxicidad del  $\beta$ A producen en el cerebro una respuesta inflamatoria por parte de las células gliales, así como estrés oxidativo. Lo anterior aunado a los cambios en el metabolismo celular, debidos a la toxicidad del  $\beta$ A, producen la distrofia neurítica, pérdida sináptica, encogimiento del cuerpo neuronal y la pérdida neuronal observada en la EA (Kazuhiro, 2005; Wei, 2002; Datki, 2004) (Figura 4). Este proceso se da principalmente en células del neocórtex y el hipocampo que se encuentran alrededor de los depósitos de amiloide, aunque los cambios bioquímicos y morfológicos pueden ocurrir también en neuronas corticales, subcorticales y sus procesos no íntimamente asociados con depósitos amiloides, y cuyos axones se proyecten hacia áreas corticales ricas en placas. Estas regiones muestran frecuentemente encogimiento, formación de MNF's y pérdida celular. Lo anterior implica daño de los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores, comprometiendo la transmisión sináptica y justificando los síntomas clínicos cognitivos de la EA.

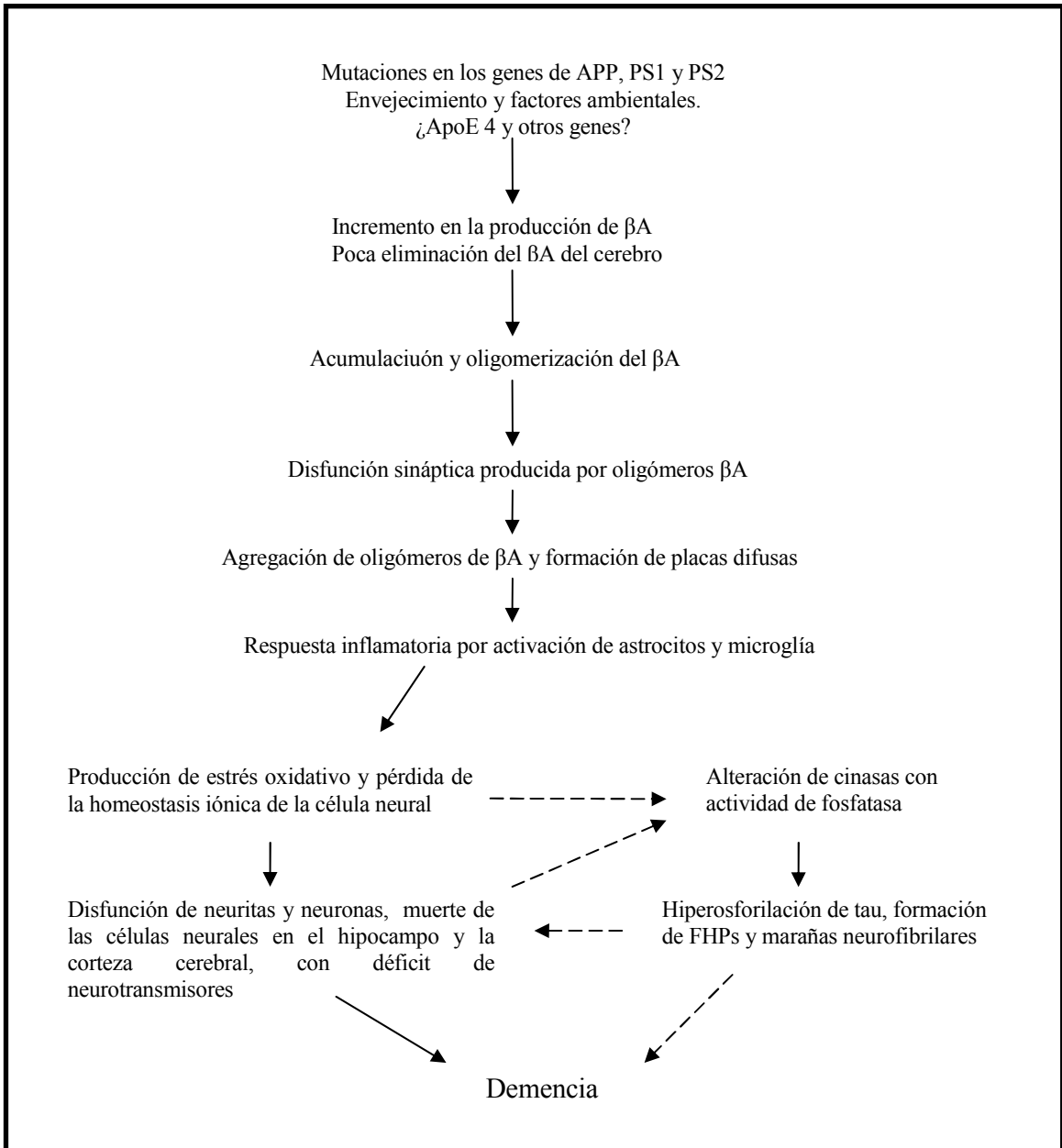


Figura 4. Hipótesis Amiloidea. De acuerdo con la hipótesis amiloidea el evento central en la patogénesis de la enfermedad es el desequilibrio entre la producción de  $\beta A$  y su eliminación, con alta producción en los casos hereditarios y poca eliminación en del  $\beta A$  en los casos esporádicos. Los oligómeros de  $\beta A$  pueden interferir directamente con la potenciación a largo plazo y dañar la función sináptica, aunado al estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria causados por los depósitos y agregados de  $\beta A$ . Este proceso daña la función neuronal y sináptica resultando en déficits de neurotransmisores y síntomas cognoscitivos. La patología de tau con la formación de marañas neurofibrilares es un evento posterior, pero que puede contribuir a la disfunción neuronal y los síntomas cognoscitivos de la EA.

## 2.5. Propuestas Terapéuticas.

Hasta ahora ninguno de los tratamientos utilizados contra la EA contribuye a un mejoramiento significativo de la enfermedad. Sin embargo, se han usado diferentes fármacos que contribuyen a un mejoramiento temporal de algunos de los síntomas cognitivos de la EA.

Actualmente se utilizan medicamentos como la tacrina, donezepil, rivastigmina y galantamina para tratar los síntomas leves y moderados de la EA. Estos fármacos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, la cual actúa en la degradación del neurotransmisor acetilcolina, involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria. Estos fármacos mejoran un poco los síntomas cognitivos de la EA, pero su duración es de unos cuantos meses y hasta unos pocos años. Otro fármaco utilizado recientemente es la memantina, el cual actúa bajando los niveles de glutamato, otro neurotransmisor relacionado con memoria y que en altas concentraciones es neurotóxico. La memantina se prescribe para los casos moderados y severos de la EA (Selkoe, 2003).

Evidencia epidemiológica sugiere que los individuos que han estado bajo tratamiento de anti-inflamatorios no esteroides tienen una menor probabilidad de desarrollar las características patológicas y clínicas de la EA, por lo que el uso de drogas anti-inflamatorias que puedan interferir en la activación de la microglía, la liberación de citocinas y la respuesta de fase aguda provocada por las placas amiloides en formación podrían ayudar a tratar algunos síntomas de la EA (Selkoe, 2003; Selkoe, 2001).

Dada la relación entre la alta producción de  $\beta$ A y el desarrollo de la EA, una meta sería inhibir o reducir la producción del  $\beta$ A. Una manera de lograrlo es diseñando inhibidores específicos de las  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa (Selkoe, 2003). Se ha visto que inhibidores químicamente distintos de  $\gamma$ -secretasa, como MWIII-20 y DAPM, bloquean la formación de dímeros y trímeros a dosis que permiten una producción de monómeros apreciable (Walsh, 2002). También se podrían utilizar compuestos, como agonistas colinérgicos, que disminuyen la producción de  $\beta$ A al modificar el procesamiento de la APP, favoreciendo el procesamiento de la APP por  $\alpha$ -secretasa y disminuyendo la producción de  $\beta$ A (Selkoe, 2003).

Otra propuesta terapéutica es impedir la agregación del  $\beta$ A, secretado, en oligómeros tóxicos. Sin importar que tipos de oligómeros solubles dañen la función cognitiva, prevenir su acumulación al inhibir su ensamblaje, promover su eliminación o reducir la producción de monómeros son todas metas terapéuticas racionales (Cleary, 2005). Estudios *in vitro* de algunas moléculas, como el colorante rojo congo, han sugerido que se puede retardar la agregación de péptidos del  $\beta$ A sintéticos. La importancia de estos compuestos es que pueden



actuar en el espacio extracelular del cerebro, evitando la interferencia con el metabolismo de la APP y otras moléculas dentro de las células (Siegel, 1999).

La Inmunoterapia ha sido sugerida para evitar la agregación y toxicidad del  $\beta$ A. En ratones transgénicos, que sobre-expresan APP, se ha observado que la inmunización con  $\beta$ A remueve los depósitos de  $\beta$ A, previene el desarrollo de nuevas placas, reduce otras lesiones de la EA, y mejora la función cognitiva (Schenk, 1999; Monsonego, 2003). Pruebas clínicas en humanos han probado ser efectivas en algunos sujetos, retardando la disminución en las funciones cognitivas, sin embargo algunos sujetos presentaron inflamación del cerebro después de la vacunación. Diferentes investigadores interpretaron la inflamación como resultado de la infiltración de linfocitos T auto-reactivos, resultado de la inmunización activa con  $\beta$ A. Por tales motivos se han propuesto otras alternativas de inmunización, como la inmunización pasiva y la modulación de la respuesta de células T cooperadoras, de manera que se eviten los daños observados en las pruebas clínicas en humanos y algunos modelos animales (Monsonego, 2003).

El desarrollo de inmunización pasiva con anticuerpos anti- $\beta$ A o con fragmentos de anticuerpos (Fab o scFv) ha demostrado ser útil en reducir la patología tipo EA en modelos murinos, incluyendo la remoción de oligómeros y la rápida restauración de la función cognitiva (Meret, 2005; Qiu-Lan Ma, 2006; Klyubin, 2005; Cleary, 2005). Aún así algunos estudios en ratones transgénicos, que expresan una forma mutada de la APP humana, sugieren que los anticuerpos anti- $\beta$ A, administrados de manera pasiva, podrían tener efectos adversos en el cerebro, sobre todo los anticuerpos dirigidos contra la región amino. Por lo mismo, varios investigadores han sugerido un estudio cuidadoso de las metodologías y resultados al aplicar este tipo de inmunoterapias (Racke, 2005; Monsonego, 2003). El uso de la tecnología de despliegue en fagos para seleccionar anticuerpos que reconozcan epítomos del  $\beta$ A que sean funcionales biológicamente y que no desarrollen eventos adversos puede permitir avances significativos para desarrollar vacunas efectivas contra la EA (Manoutcharian, 2004; Manoutcharian, 2003; Solomon, 2005).

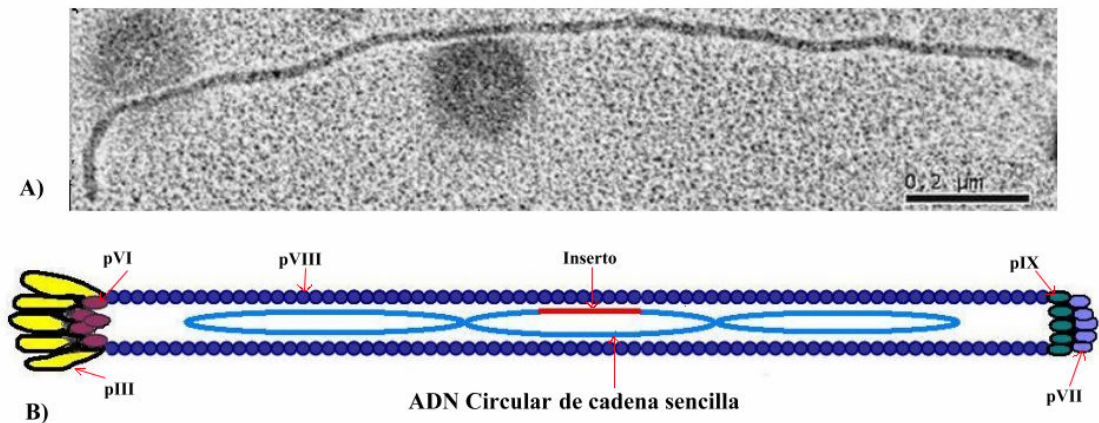
Ya que el daño característico de la EA se debe a la disfunción neuronal profunda y a la degeneración, diferentes estrategias neuroprotectivas pueden ser utilizadas. Entre otras se ha sugerido el uso de moduladores de vías de transducción de señales, uso de inhibidores de excitotoxicidad provocada por neurotransmisores, agentes que bloquean la entrada de calcio dentro de las células, rastreadores de radicales libres y tratamientos antioxidantes que puedan proteger del daño por  $\beta$ A. También se ha sugerido el uso de factores que restituyan la función neuronal, como neurotrofinas o compuestos con acción similar (Selkoe, 2003).

Varias interrogantes deben ser aún resueltas para poder desarrollar estrategias eficaces para detener o mejorar los síntomas clínicos de la EA. Se debe tratar de esclarecer cuales son las especies de  $\beta$ A más tóxicas para las células, cuál es el papel de la apoptosis en la EA y los factores implicados en su ejecución, la disfunción neuronal que precede a la muerte celular, y los factores que intervienen en la vulnerabilidad o resistencia de grupos neuronales al daño neuronal.

## 2.6. Tecnología de Despliegue en Fagos (Phage Display).

La tecnología de Despliegue en Fagos o “Phage Display” es una forma de clonar y expresar genes externos en bacteriófagos (fagos) (Clackson y Wells, 1994). La técnica fue descrita, por primera vez, en 1985 por George Smith quien logró expresar un segmento de la Endonucleasa EcoRI fusionada a la proteína III (pIII) del bacteriófago M13. La tecnología de Phage Display consiste en la inserción de fragmentos de ADN en el gen de una de las proteínas de la cubierta del fago. El gen modificado puede ser expresado como una proteína de fusión sobre la superficie del fago, sin que la capacidad de infección del fago se altere (Scott y Smith, 1990). La fácil manipulación de los fagos permite la producción de moléculas ligando, con altas afinidades de unión, desplegadas en la superficie del fago en poco tiempo (Smith, 1993).

Los bacteriófagos Ff (M13, fl y fd) son los bacteriófagos filamentosos más caracterizados y poseen una homología genómica del 98% (Figura 5). Las partículas virales silvestres de este tipo de fagos tienen un diámetro de 6.5 nm aproximadamente y su longitud es cercana a los 930 nm. Tiene un genoma de ADN circular de cadena sencilla, cerrado covalentemente, y cuyo peso es de aproximadamente 6.4 kb. Este codifica para 11 proteínas diferentes, las cuales están implicadas en replicación, formación de la cápside del virion, y proteínas que se encargan del ensamblaje del fago en la membrana. Además posee una región intergénica que sirve para regular el inicio del ciclo de replicación del fago, así como su ensamblaje.



**Figura 5.** Fago M13. A) Muestra una micrografía electrónica del fago filamentososo M13. B) Muestra una representación esquemática del fago M13, mostrando las proteínas que componen la cápside.

Estos fagos son capaces de infectar a la bacteria gram negativa *E. coli*. Esto sucede cuando el pilli F, de la bacteria  $F^+$ , interacciona con la proteína III, en uno de los extremos del fago. El pilli se retrae dentro de la membrana interna de la bacteria atrayendo al fago. El fago integra las proteínas de la cápside a la membrana de la bacteria y el ADN del fago entra al citoplasma bacteriano. La bacteria replica el genoma del fago produciendo la forma de genoma RF, un ADN de doble cadena super-enrollado. Esta molécula RF sirve como molde para transcribir y traducir el genoma del fago. Finalmente, las proteínas del fago se ensamblan en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV (Kay, 1996).

Los péptidos y/o proteínas expresados en la superficie de los fagos se fusionan al extremo amino de las proteínas de la capsida del fago, pIII o pVIII, generalmente (Bhardawaj, 1995). Otras proteínas, como pVI, pVII y pIX, han sido usadas para la expresión de péptidos (Hufton, 1999; Makoeski, 1993). Los péptidos fusionados a pIII pueden tener una longitud de 6 hasta 38 aminoácidos, mientras que para pVIII las longitudes son más restringidas, 6-8 aminoácidos. La proteína pIII expresa de 3-5 copias en el extremo del fago y pVIII 2700 copias aproximadamente (Kay, 1996).

Debido a que el ADN puede ser clonado en el gen codificante de alguna proteína de la cubierta, en el genoma del fago, se debe tener cuidado de no expresar proteínas muy grandes, ya que esto puede limitar la infectividad o estabilidad del fago. Esto se puede evitar haciendo

uso de fagos modificados, llamados fagémidos (Barbas, 2001). Estos fagos modificados permiten expresar proteínas silvestres y recombinantes en su superficie. La mayoría de los péptidos o proteínas expresados en fago tiene secuencias lineales, pero también se pueden expresar péptidos con estructuras secundarias mediante la adición de cisteínas, permitiendo la formación de asas por medio de puentes disulfuro (Smith, 1993; O'Neil, 1992)

M13 es un fago lisogénico, por lo que la bacteria puede mantenerse creciendo y dividiendo sin que haya un daño por la producción viral. La cantidad de fagos producida después de varias generaciones puede ser de  $10^{11}$  a  $10^{13}$  partículas virales por ml de medio de cultivo (Russel, 1994).

Actualmente se puede usar la tecnología de Phage Display para identificar, de forma rápida, *in vitro*, ligandos de distintas moléculas, a este tipo de selección se le llama biopanning o bioselección (Scott, 1990). Para poder hacer este tipo de bioselección se pueden usar bibliotecas de péptidos con secuencias aleatorias o fragmentos de anticuerpos. Estas bibliotecas han permitido identificar de manera rápida ligandos de péptidos expresados en la superficie de fago y también se han utilizado en el mapeo de epítomos lineales y conformacionales (Wilson, 1998; Gevorkian, 1998; Manoutcharian, 1999).

Se han construido bibliotecas que expresan fragmentos de anticuerpos, Fab, Fv y scFv, usando diferentes vectores de expresión, en fagos y fagémidos, amplificación por PCR y la clonación de los genes de Inmunoglobulinas (Ig) (Hoogenboom, 1991; Manoutcharian, 2001). Con la aplicación de las bibliotecas de anticuerpos se pueden identificar sitios específicos de pegado para terapia y diagnóstico humano, receptores agonistas y antagonistas e inhibidores de enzimas, así como marcadores específicos de células y tejidos (Smothers, 2002).

La inmunoterapia es otro tipo de aplicación de esta tecnología. Los fagos filamentosos, que expresan péptidos inmunogénicos en su superficie, han sido aislados y usados para inducir una respuesta inmune contra los péptidos recombinantes. También, se ha estudiado y demostrado que estos fagos son altamente inmunogénicos, capaces de inducir anticuerpos específicos para los antígenos presentados en el fago, sin requerir adyuvante, y también son capaces de reclutar células T (De la cruz, 1988; Manoutcharian, 1999; Manoutcharian, 2001).

### 3. Objetivo.

Expresar los fragmentos del extremo amino, región media y extremo carboxilo del péptido  $\beta$ A, como fusiones de la proteína pIII en la superficie del bacteriófago M13, y su evaluación por ensayos inmunológicos.

#### 3.1. Objetivos Particulares.

- a) Clonar los fragmentos del extremo amino, región media y extremo carboxilo del péptido  $\beta$ A en el plásmido pCANTAB 5 E.
- b) Obtener clonas de *E. coli* TG1 transformadas con el plásmido pCANTAB 5 E.
- c) Obtener fagos los fragmentos del extremo amino, región media y extremo carboxilo del péptido  $\beta$ A.
- d) Evaluar la expresión de los fragmentos recombinantes en la superficie del fago M13.

#### 4. Metodología.

##### 4.1. Diseño de Oligonucleótidos.

Se escogieron las secuencias derivadas de la región amino (aminoácidos 1-16), media (aminoácidos 12 -28) y carboxilo (aminoácidos 17-42) del péptido  $\beta$ A para diseñar oligonucleótidos que permitan la clonación de estas secuencias en el vector pCANTAB-5E (Amersham Pharmacia). Se diseñaron también oligonucleótidos control utilizando los aminoácidos de las secuencias seleccionadas ordenados al azar (SCR) (Cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Secuencias en aminoácidos de las regiones amino, media y carboxilo del péptido <math>\beta</math>A y sus secuencias control</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia en Aminoácidos</b>
<b>Ab 1-16</b>	D A E F R H D S G Y E V H H Q K
<b>Ab 1-16 SCR</b>	A R S D E V D F Q H G H Y K E H
<b>Ab 12-28</b>	V H H Q K L V F F A E D V G S N K
<b>Ab 12-28 SCR</b>	S H K V L H N G E A V D F V K F Q
<b>Ab 17-42</b>	L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A
<b>Ab 17-42 SCR</b>	G F E V L D V G M A K A N G S I V I F L G V A V I G

Estas secuencias de aminoácidos se tradujeron a secuencias de nucleótidos para obtener las cadenas codificante y su complementaria. Se agregaron, a ambas cadenas, nucleótidos extras con sitios de restricción para las enzimas Sfi I y Not I. Finalmente, los oligonucleótidos se mandaron a sintetizar con el proveedor de servicio (Invitrogen<sup>®</sup>).

##### 4.2. Clonación de Oligonucleótidos y Confirmación por PCR

Para hacer la clonación de los oligonucleótidos en el vector fagémido pCANTAB-5E, se hidrataron los oligonucleótidos con agua estéril a una concentración de 100  $\mu$ g/  $\mu$ l. Después, se mezclaron las cadenas de oligonucleótidos complementarias en proporciones equimolares. Esto nos permitió obtener un oligonucleótido de doble cadena con los sitios de anclaje para Sfi I y Not I en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Las mezclas se calentaron en un termociclador a 94°C 5 minutos y luego se bajó la temperatura lentamente en ciclos de 30 segundos hasta llegar a temperaturas debajo de los

37 °C. Este proceso de “alineación” permite la unión de cadenas complementarias. En seguida se fosforilaron 5µl de la mezcla anterior con enzima cinasa de polinucleótidos (New Englan Biolabs<sup>®</sup>). Las mezclas de oligonucleótidos (insertos) se ligaron al vector fagémido pCANTAB-5E, previamente digerido con las enzimas de restricción Sfi I y NotI (New Englan Biolabs<sup>®</sup>), siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante. Los oligonucleótidos de doble cadena fosforilados se mezclaron con 100 ng de ADN de pCANTAB5E en microtubos Eppendorf (aproximadamente 2-3 veces más inserto que vector). Finalmente, se agregó 1µl de enzima T4 ADN Ligasa (400 unidades). La mezcla de ligación se dejó incubando toda la noche a 16°C.

Con 10 µl de las mezclas de ligación se transformaron 100 µl de células *E. coli* de la cepa TG1 ( $2 \times 10^5$  células/µl), competentes por método químico. Se incubaron por 30 minutos los tubos con cada mezcla. Se calentaron las muestras a 42°C durante 1 hora y 30 minutos. Después se pusieron a 4°C por 5 minutos. Se agregaron 900 µl de medio SOC y se incubaron durante 1 hora. Se tomó una alícuota de cada muestra de transformación y se sembraron en cajas petri con medio de selección apropiado, LB y carbenicilina 50 µg/ml. De esta manera se seleccionaron solo aquellas células que contenían el vector con el gen de resistencia a ampicilina y el inserto de interés. Después, se picaron 2 clonas de cada caja y se resembraron en una caja petri (placa maestra). A cada clona se le realizó una reacción de PCR para determinar la presencia del inserto. En breve, una pequeña muestra de las clonas picadas de cada caja fue diluida en 20 µl de agua estéril. Se agregaron los primers S6 y S1, cuyas secuencias son complementarias a los sitios pCANTAB5E-S1 y pCANTAB5E-S6 en el genoma de pCANTAB-5E, y flanquean los sitios Sfi I y NotI. Se usó la enzima taq polimerasa (Roche<sup>®</sup>) y amortiguador de taq polimerasa (Roche<sup>®</sup>) en presencia de cloruro de magnesio y nucleótidos, siguiendo las recomendaciones del fabricante al mezclarlos con las muestras de las clonas. Las mezclas fueron llevadas a 94°C, luego a 55°C, y finalmente a 74°C por 30 segundos cada vez, en 30 ciclos. Finalmente, cada muestra se analizó en gel de agarosa al 1.5%.

#### 4.3. Obtención de Fago a partir de células E. coli TG1 Transformadas.

Se crecieron clonas transformadas en 3ml de medio YT 2X con glucosa al 2% y 50 µg/ml de carbenicilina en tubos falcon de 50ml. Se incubaron los tubos a 37°C y 250 RPM hasta haber obtenido una desidad óptica de ~0.5. A alícuotas de 1 ml se les agregó 30% de glicerol y se guardaron a -80°C. Al medio con bacterias restante se agregó 10 ml de medio YT 2X con glucosa al 2%, carbenicilina 50 µg/ml y 20 µl de fago helper M13KO7 (Invitrogen).

Se incubó el medio a 37°C sin agitación por 30 minutos y en seguida se incubó a 37°C en agitación por 30 minutos. Se centrifugaron los medios, con las clonas, a 3000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y resuspendió el botón celular en 1ml de medio YT 2X. La mezcla se transfirió a un matraz con 50 ml de medio YT 2X, carbenicilina 50 µg/ml y Kanamicina 50 µg/ml y se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm.

Los fagos producidos se rescataron por doble precipitación con poiletilenglicol-8000 al 20 % y Cloruro de sodio 2.5M (PEG/NaCl). El fago rescatado fue resuspendido en 200 µl de solución TBS (Tris-Buffered Saline).

#### 4.4. Confirmación de la Clonación de los Oligonucleótidos en el Genoma de Fagos.

Se extrajo ADN de cadena sencilla de 30 µl de los fagos rescatados. Se agregaron 100 µl de amortiguador de yoduros y 250 µl de alcohol absoluto a la muestra y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a temperatura ambiente y a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN, en el fondo del tubo, con 200 µl de etanol al 70%. Se retiró el etanol con vacío. Se dejó secar la muestra a 37°C por 5 minutos. El ADN se resuspendió en 20 µl de agua estéril.

En seguida, se usaron 7 µl de la solución de ADN de cadena sencilla de fago para hacer reacciones de secuenciación. Para la secuenciación se utilizó el estuche de secuenciación "Sequenase 7-deaza-dGTP Sequencing Kit" (USB corporation) y se siguió el protocolo del fabricante. Se cargaron 2-4 µl de las muestras en cada carril de un gel de arcilamida-bisarcilamida al 8%.



#### 4.5. Confirmación de la Expresión de fragmentos en la superficie del fago M13.

Para confirmar la expresión de los diferentes fragmentos del péptido  $\beta A$  como fusiones en el extremo amino de la proteína III del fago, se utilizó el método de ELISA. El método de ELISA permite ver las interacciones entre moléculas al fijarlas a una superficie plástica. Se utilizó una placa de 96 pozos (Nunc maxisorp™) y se estableció la cantidad de pozos a utilizar en el ensayo. Se agregó 200 ng de anticuerpos de cabra contra la cadena gamma de inmunoglobulina de ratón (Zymed®) en buffer de carbonatos a cada pozo y se incubó una hora a 37°C. Esto permite que el anticuerpo se fije a la placa. Posteriormente se lavó la placa con PBS (0.01 M de PBS (pH 7), 0.01M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.37 M de NaCl, 0.027 M KCl)-TWEEN al 0.2%, se bloqueó la placa con PBS-BSA al 2% y se incubó 1 hora a 37°C.

Después de haber lavado la placa de la manera antes descrita, se agregó suero anti- $\beta A_{1-42}$  y suero anti- $\beta A_{8-42}$  de ratón, a una dilución 1:400 en PBS-BSA al 1%-TWEEN al 1%. Los sueros usados fueron obtenidos de ratones inoculados con  $\beta A_{1-42}$  y  $\beta A_{8-42}$ , conforme al protocolo establecido en el laboratorio. Para detectar los fagos que expresan el fragmento 17-42 del  $\beta A$ , se agregó el anticuerpo monoclonal 4G8 (Sigma®) a una dilución 1:500 en PBS-BSA al 1%-TWEEN al 1%. Para los fagos que expresan el fragmento 12-28 del  $\beta A$  se usó el anticuerpo monoclonal BAM 90.1 (Dako®), a una dilución 1:500 en PBS-BSA al 1%-TWEEN al 1%. Como control negativo se usó suero de ratón inoculado solamente con adyuvante a una dilución 1:400 en PBS-BSA al 1%-TWEEN al 1%. Después de haber agregado los sueros, o anticuerpos monoclonales, a la placa, se incubó 1 hora a 37°C.

Se lavó la placa otra vez con la misma solución y se agregaron los fagos calculando obtener una concentración de  $10^{10}$  fagos por pozo. Los fagos se agregaron en una solución PBS-BSA al 1%-TWEEN al 0.1% y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se retiró el exceso de fago de cada pozo y se lavó la placa de manera similar. Después se agregó un anticuerpo anti-M13 hecho en conejo, diluido 1:2500 en PBS-BSA al 1%-TWEEN al 1% y se incubó 1 hora a 37°C. Después de haberse lavado la placa, se agregó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP) (Sigma®) y se incubó por 1 hora a 37°C. Después se reveló con 100  $\mu$ l de sustrato ABTS (Zymed®) y se tomaron lecturas de la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automático (Opsys MR Microplate Reader, DYNEX Technologies Inc., Chantilly, VA. USA).

#### 4.6. Análisis de resultados.

Los resultados se analizaron con el programa SAS version 6.02 (SAS institute Inc., Cary, NC 27511, USA) llevandose a cabo una prueba de ANOVA de comparación múltiple y un análisis “post-hoc” de tukey, para evaluar la significancia de las diferencias entre los fagos que expresan los fragmentos del péptido  $\beta$ A y los fagos con las secuencias aleatorizadas.

## 5. Resultados

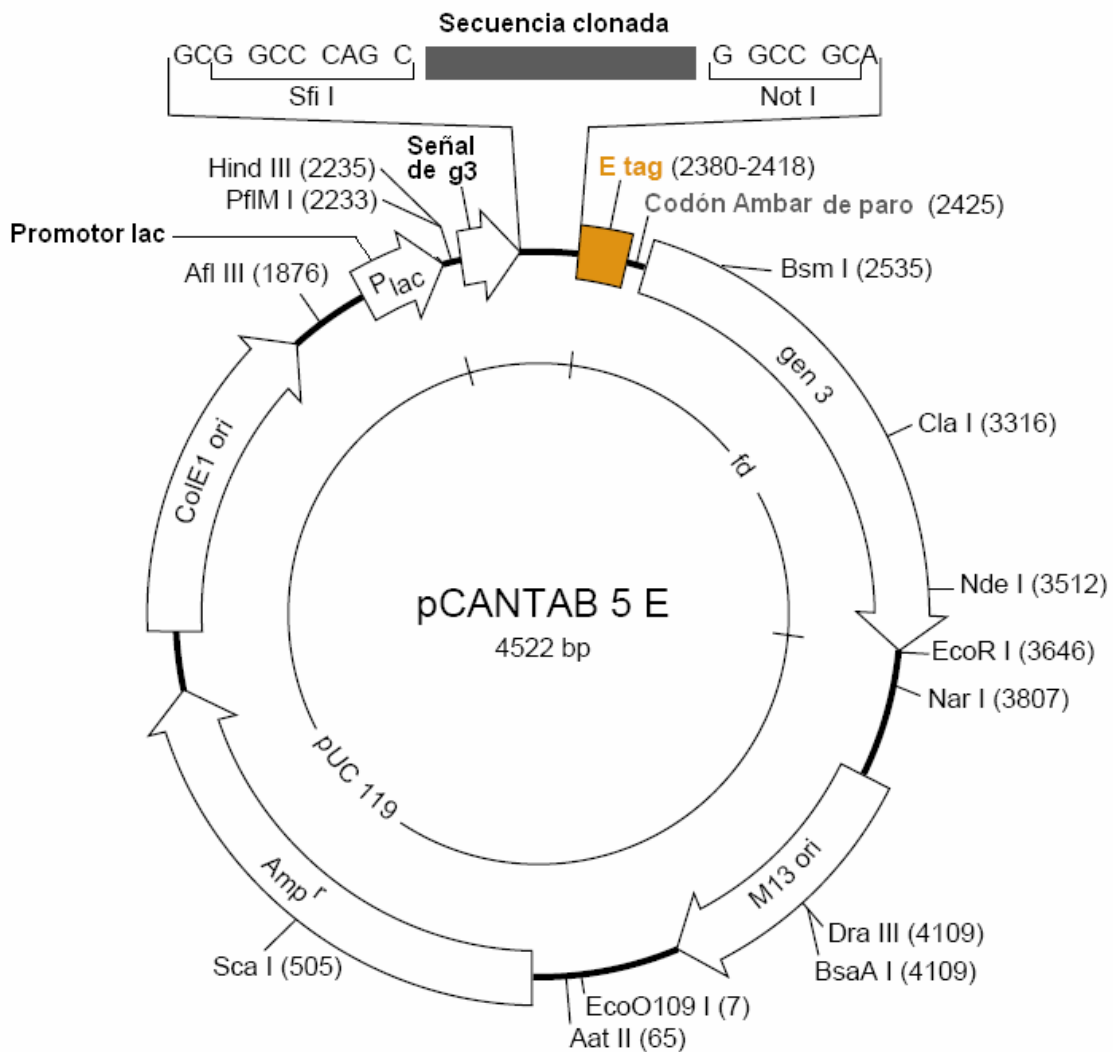
Se obtuvieron 12 oligonucleótidos con las secuencias que codifican para los fragmentos del extremo amino, la región media y el extremo carboxilo del péptido  $\beta$ A. Para cada fragmento y su secuencia control, se cuenta con una secuencia codificante y su complementaria. Cada secuencia complementaria presenta los sitios de anclaje para Sfi I y NotI (cuadro 2).

<b>Cuadro 2.</b> Oligonucleótidos para la clonación de fragmentos del péptido $\beta$ A	
*Las secuencias se muestran dirección 5'-3'	
Nombre	Secuencia en nucleotides
Ab 1-16.5	AT GAT GCA GAA TTC AGG CAT GAT TCA GGA TAC GAA GTA CAT CAT GAG AAG GC
Ab 1-16.3	GGCCGC CTT CTC ATG ATG TAC TTC GTA TCC TGA ATC ATG CCT GAA TTC TGC ATC ATG CT
Ab 1-16 SCR.5	CG GCA AGG TCA GAT GAA GTA GAT TCC CAG CAT GGA CAT TAC AAG GAA CAT GC
Ab 1-16 SCR.3	GGCCGC ATG TTC CTT GTA ATG TCC ATG CTG GGA ATC TAC TTC ATC TGA CCT TGC CGG CT
Ab 12-28.5	AT GTG CAC CAC CAG AAG CTA GTG TTC TTC GCT GAG GAT GTG GGA AGC AAC AAG GC
Ab 12-28.3	GGCCGC CTT GTT GCT TCC CAC ATC CTC AGC GAA GAA CAC TAG CTT CTG GTG GTG CAC ATGCT
Ab 12-28 SCR.5	AT AGC CAC AAG GTG CTA CAC AAC GGA GAG GCT GTG GAT TTC GTG AAG TTC CAG GC
Ab 12-28 SCR.3	GGCCGC CTG GAA CTT CAC GAA ATC CAC AGC CTC TCC GTT GTG CAG CAC CTT GTG GCT ATGCT
Ab 17-42.5	AT CTA GTG TTC TTC GCT GAG GAT GTG GGA AGC AAC AAG GGA GCT ATC ATT GGA CTA ATG GTG GGA GGA GTG GTG ATC GCT GC
Ab 17-42.3	GGCCGC AGC GAT CAC CAC TCC TCC CAC CAT TAG TCC AAT GAT AGC TCC CTT GTT GCT TCC CAC ATC CTC AGC GAA GAA CAC TAG ATGCT
Ab 17-42 SCR.5	AT GGA TTC GAG GTG CTA GAT GTG GGA ATG GCT AAG GCT AAC GGA AGC ATC GTG ATT TTC CTA GGA GTG GCT GTG ATC GGA GC
Ab 17-42 SCR.3	GGCCGC TCC GAT CAC AGC CAC TCC CAG GAA AAT CAC GAT GCT TCC GTT AGC CTT AGC CAT TCC CAC ATC CAG CAC CTC GAA TCC ATGCT

Se formaron los oligonucleótidos de doble cadena correspondiente por el método descrito en la metodología, obteniéndose 6 oligonucleótidos de doble cadena listos para ligar al vector fagémido pCANTB-5E (Cuadro 3).

<b>Cuadro 3.</b> Oligonucleótidos para la clonación de fragmentos del péptido $\beta$ A		
<b>Cadena codificante</b>	<b>Cadena complementaria</b>	<b>Secuencia para ligación</b> *ADN de doble cadena
Ab 1-16.5	Ab 1-16.3	Ab 1-16
Ab 1-16 SCR.5	Ab 1-16 SCR.3	Ab 1-16 SCR
Ab 12-28.5	Ab 12-28.3	Ab 12-28
Ab 12-28 SCR.5	Ab 12-28 SCR.3	Ab 12-28 SCR
Ab 17-42.5	Ab 17-42.3	Ab 17-42
Ab 17-42 SCR.5	Ab 17-42 SCR.3	Ab 17-42 SCR

Se clonaron los oligonucleótidos Ab1-16, Ab1-16 SCR, Ab12-28, Ab12-28 SCR, Ab17-42 y Ab17-42 SCR en los sitios Sfi I y NotI del vector fagémido pCANTB5E, (Figura 6). Se realizaron las reacciones de ligación correspondientes para introducir la secuencia de nucleótidos deseada en el vector digerido con las enzimas Sfi I y NotI. Después se usaron los productos de las reacciones de ligación para transformar células de *E. coli* TG1. Las células se sembraron en medio de restricción, para obtener solamente colonias que hayan absorbido el fagémido.



**Figura 6.** Esquema del genoma del vector fagémido pCANTAB-5E. Se muestran los sitios de las secuencias promotora p Lac, la secuencia señal de la proteína III (pIII) de M13, la cual dirige a pIII al periplasma bacteriano, los sitios de las secuencias para corte con enzimas de restricción, y en especial los sitios de Sfi I y Not I. El sitio donde es clonada la secuencia deseada se encuentra flanqueado por los sitios de Sfi I y Not I, seguido por la secuencia E-tag que codifica para un péptido de 13 aminoácidos que se usa para reconocimiento por anticuerpos. Se muestra un sitio donde hay un codón ambar de paro para producir fragmentos solubles en cepas apropiadas de *E. coli*. El sitio del gen de pIII sigue al extremo carboxilo de la secuencia clonada, de manera que la secuencia clonada se expresa como fusión en el extremo amino de pIII.

De las clonas obtenidas se picaron 2 por cada reacción de transformación, a cada muestra se le realizó una reacción de PCR y se corrieron los productos en un gel de agarosa al 1.5%, para confirmar la clonación del inserto y se seleccionaron las clonas que presentaron el tamaño esperado de inserto, de 214 a 244 pb, para producir fagos a partir de ellas.

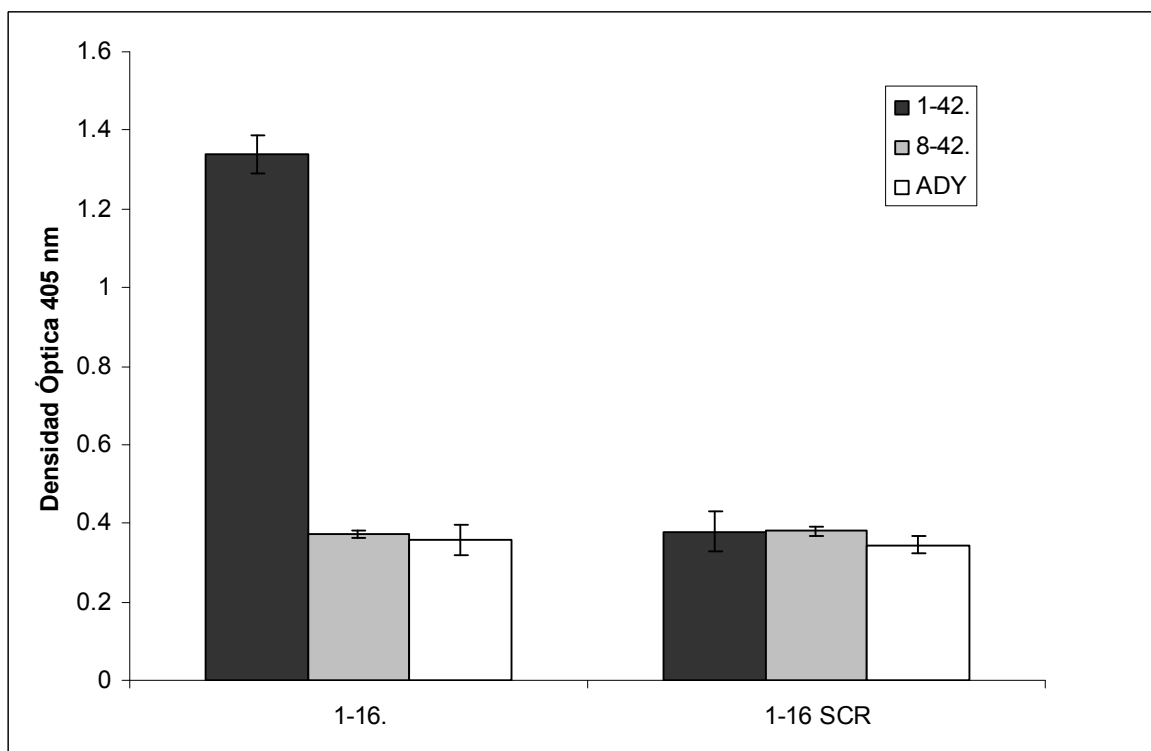
Se obtuvo una clona de Ab1-16, Ab1-16 SCR, Ab12-28, Ab12-28 SCR, Ab17-42 y Ab17-42 SCR. Las clonas se amplificaron y se rescató fago con pIII recombinante, producido a partir de estas clonas. De cada clona se rescataron 200  $\mu$ l de fago en TBS con concentraciones de fago de  $10^{12}$  a  $10^{13}$ .

Se confirmó la presencia de los insertos Ab1-16, Ab1-16 SCR, Ab12-28, Ab12-28 SCR, Ab17-42 y Ab17-42 SCR en el genoma del fago por secuenciación (cuadro 4).

<b>Cuadro 4. Secuencias confirmadas en el genoma de los fagos de diferentes clonas</b>	
*Las secuencias se muestran dirección 5'-3'	
Nombre	Secuencia en nucleotidos
Ab 1-16	<b>GAT GCA GAA TTC AGG CAT GAT TCA GGA TAC GAA GTA CAT CAT GAG AAG</b>
Ab 1-16 SCR	<b>GCA AGG TCA GAT GAA GTA GAT TCC CAG CAT GGA CAT TAC AAG GAA CAT</b>
Ab 12-28	<b>GTG CAC CAC CAG AAG CTA GTG TTC TTC GCT GAG GAT GTG GGA AGC AAC AAG</b>
Ab 12-28 SCR	<b>AGC CAC AAG GTG CTA CAC AAC GGA GAG GCT GTG GAT TTC GTG AAG TTC CAG</b>
Ab 17-42	<b>CTA GTG TTC TTC GCT GAG GAT GTG GGA AGC AAC AAG GGA GCT ATC ATT GGA CTA ATG GTG GGA GGA GTG GTG ATC GCT</b>
Ab 17-42 SCR	<b>GGA TTC GAG GTG CTA GAT GTG GGA ATG GCT AAG GCT AAC GGA AGC ATC GTG ATT TTC CTA GGA GTG GCT GTG ATC GGA</b>

Se demostró la expresión de los diferentes fragmentos del péptido  $\beta$ A por medio de ensayos ELISA.

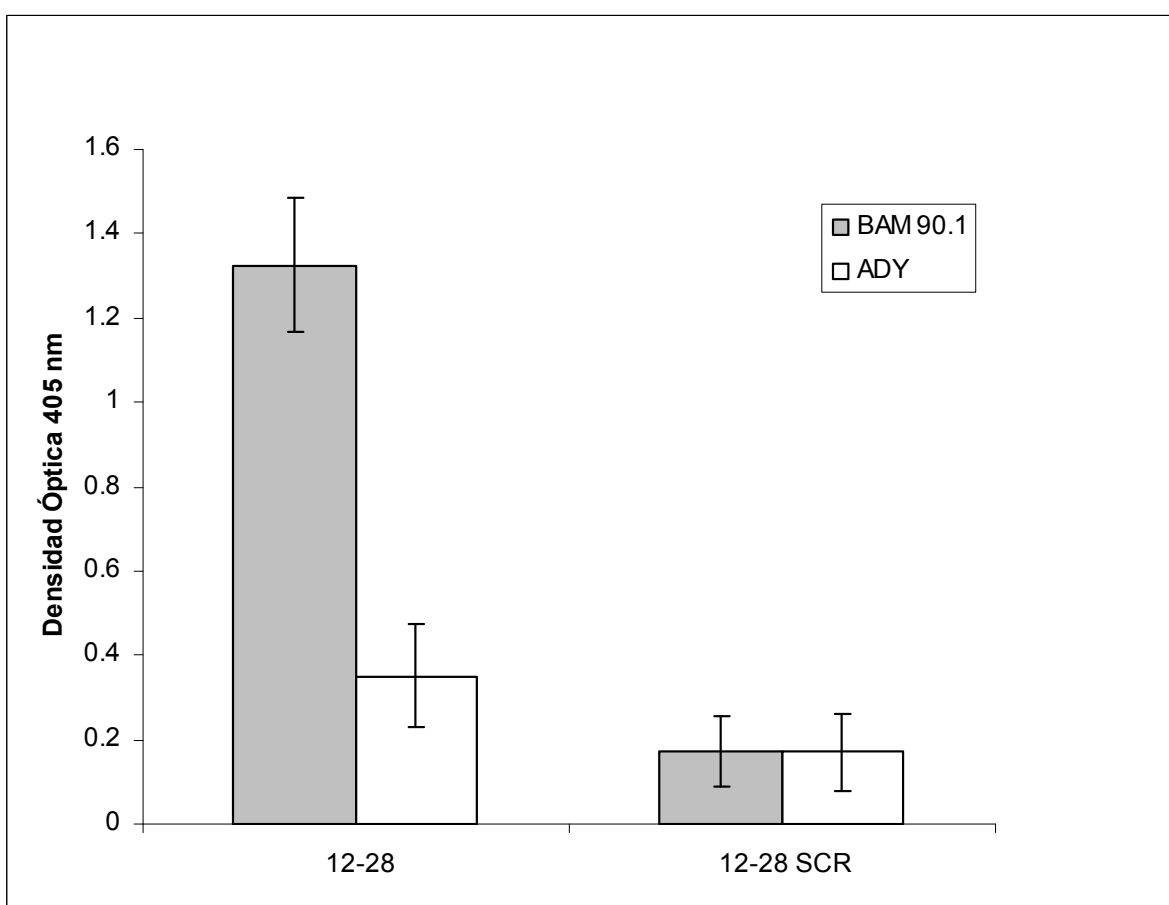
El fago que contiene la secuencia del fragmento 1-16 del  $\beta$ A (fago 1-16) fue reconocido por IgGs presentes en suero de ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ A (suero 1-42), mientras que las IgGs de sueros de ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ A<sub>8-42</sub> (suero 8-42), o de sueros de ratones inmunizados con adyuvante (suero anti-adyuvante) no reconocieron fago 1-16 (Figura 7). Por otro lado, el fago que contienen la secuencia 1-16 del  $\beta$ A aleatorizada (fago 1-16 SCR) no fue reconocido por los sueros (Figura 7).



**Figura 7.** Reconocimiento del fago que contiene la secuencia 1-16 del  $\beta$ A en ensayo ELISA. Se agregó fago 1-16 a placas con IgGs de sueros de ratón inmunizado con péptido beta-amiloide 1-42 (barra negra) y 8-42 (barra gris). Como controles negativos se usó el fago 1-16 SCR, e IgGs de suero de ratón inmunizado sólo con adyuvante (barra blanca). Los datos presentados son promedios  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes. Las diferencias entre el reconocimiento del fago 1-16 y el fago 1-16 SCR por los diferentes sueros, así como las diferencias entre el reconocimiento del fago 1-16 por los sueros 1-42, 8-42 y anti-adyuvante, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Para confirmar la expresión del fragmento 12-28 sobre la superficie del fago M13 se utilizó el anticuerpo monoclonal, elaborado en ratón, que reconoce el fragmento 13-28 del  $\beta$ A, BAM 90.1 (Figura 8).

El fago que contiene la secuencia 12-28 del péptido  $\beta$ A (fago 12-28) fue reconocido por las IgGs del anticuerpo monoclonal BAM 90.1, mientras que el fago que contiene la secuencia 12-28 del péptido  $\beta$ A aleatorizada (fago 12-28 SCR) no fue reconocido por las IgGs del anticuerpo monoclonal BAM 90.1 (IgGs BAM 90.1) (Figura 8). El fago 12-28 no fue reconocido por las IgGs del suero de ratón inmunizado con adyuvante (Figura 8).

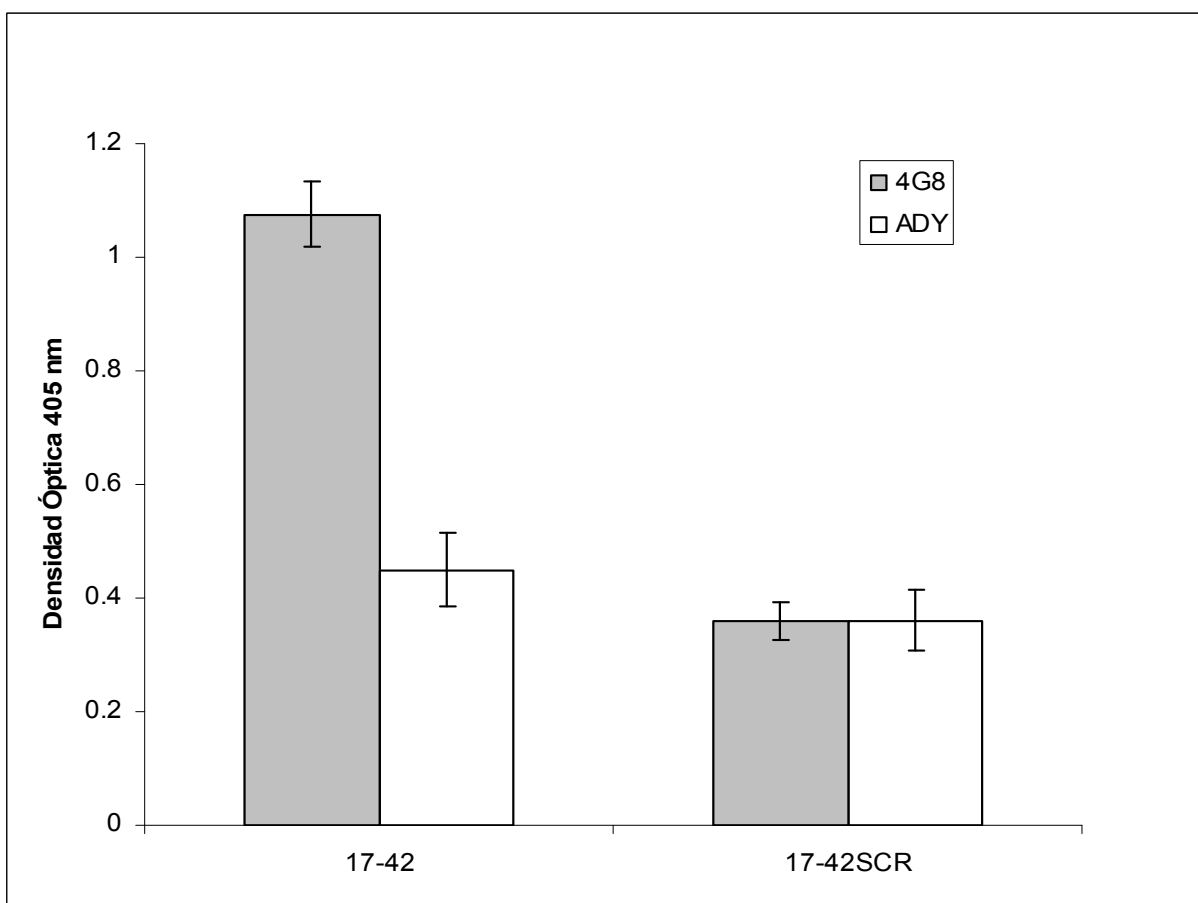


**Figura 8.** Reconocimiento del fago que contiene la secuencia 12-28 del  $\beta$ A en ensayo ELISA. Se agregó fago 12-28 a placas con IgGs monoclonales BAM 90.1 que reconocen la secuencia 13-28 del péptido  $\beta$ A (barra gris). Como controles negativos se usaron fago 12-28 SCR y suero de ratón inmunizado con adyuvante (barra blanca). Los datos presentados son promedios  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos independientes. El reconocimiento del fago 12-28 y del fago 12-28 SCR por las IgGs BAM 90.1 y suero anti-adyuvante es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ).



Finalmente, para confirmar la expresión del fragmento 17-42 del  $\beta$ A se usó el anticuerpo monoclonal 4G8, que reconoce el fragmento 17-24 del  $\beta$ A (Figura 9).

El fago que contiene la secuencia 17-42 del  $\beta$ A fue reconocido por las IgGs monoclonales 4G8 (IgGs 4G8), mientras que el reconocimiento del fago que contiene la secuencia 17-42 SCR no fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) (Figura 9). Las IgGs de suero de ratón inmunizado con adyuvante no reconocieron al fago que contiene la secuencia 17-42 del  $\beta$ A y tampoco reconocieron al fago que contiene la secuencia 17-42 SCR.



**Figura 9.** Reconocimiento del fago que contiene la secuencia 17-42 del  $\beta$ A en ensayo ELISA. Se agregó fago con la secuencia 17-42 a placas de cubiertas con IgGs monoclonales que reconocen la secuencia 17-24 del péptido  $\beta$ A (barra gris). Como controles negativos se usaron la clona con la secuencia 17-42 aleatorizada (17-42 SCR), y suero de ratón inmunizado con adyuvante (barra blanca). Los datos presentados son promedios  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes. Las diferencias entre el reconocimiento del fago 17-42 y el fago 17-42 SCR por las IgGs 4G8 y las IgGs de suero anti-adyuvante fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 6. Discusión.

La clonación y expresión de los fragmentos de las regiones amino terminal, media y carboxilo terminal del péptido  $\beta A$ , como fusiones amino de la proteína pIII del bacteriófago M13, dio como resultado tres clonas que expresan las diferentes regiones del  $\beta A$  y tres clonas control que expresan fragmentos con los aminoácidos aleatorizados (SCR).

Para poder expresar los fragmentos en pIII de M13 se clonó cada secuencia codificante por separado, para los diferentes fragmentos del péptido  $\beta A$ , en el vector fagémido pCANTAB-5E. Este vector contiene el gen de la proteína pIII de M13 y permite la inserción de un fragmento de ADN de doble cadena en el extremo 5' del gen de pIII. Además, el vector contiene el promotor lac para inducir la expresión de pIII sólo cuando es requerida, evitando la posible toxicidad de las secuencias clonadas en el fagémido. La formación de partículas virales de M13 se induce infectando con fago helper M13KO7. El fago helper contiene una secuencia errónea en el origen de replicación, por lo que la tasa de producción de su genoma es menor. Así las partículas virales de M13 obtenidas en este estudio contienen en mayor proporción el genoma fagémido y una mezcla de proteínas pIII recombinantes y silvestres, de 0 a 5 recombinantes. La reducción en el número de pIII recombinantes expresadas en M13 permite mantener la infectividad del fago y observar la afinidad de los péptidos fusionados a pIII al disminuir la avidéz (Kay, 1996).

Se confirmó la presencia de los insertos que codifican para las regiones amino, media y carboxilo del péptido  $\beta A$ , primero por una reacción de PCR, después de la cual se seleccionaron seis clonas, una de cada construcción. El peso esperado para confirmar la clonación exitosa era de 214 a 244 pb. Esta región contiene los sitios Sfi I y Not I, donde se lleva a cabo la ligación de las secuencias codificantes para las regiones amino, media y carboxilo del péptido  $\beta A$ .

Después de producir el fago a partir de las clonas confirmadas por PCR, se verificó que para cada construcción seleccionada, estuviera presente el genoma del fagémido con el inserto correcto en los sitios de Sfi I y Not I. Lo anterior se hizo por secuenciación manual. Esto nos permitió suponer que en las clonas Ab1-16, Ab1-16 SCR, Ab12-28, Ab12-28 SCR, Ab17-42 y Ab17-42 SCR, con el inserto correcto, se estuviera expresando correctamente el fragmento deseado del péptido  $\beta A$ .

Finalmente, se demostró la expresión de los fragmentos del péptido  $\beta A$  sobre la superficie del fago M13 con ensayos ELISA.

El fago que expresa el fragmento 1-16 del  $\beta A$  en la superficie es reconocido por las IgGs de los sueros de ratones inmunizados contra el  $\beta A_{1-42}$ , mientras que las IgGs de suero de ratones que reconocen el péptido  $\beta A_{8-42}$  no reconocen el fragmento 1-16 del  $\beta A$  en la superficie del fago.

También se probó el reconocimiento de los fagos que expresan los fragmentos 12-28 y 17-42 del  $\beta A$  por IgGs de sueros de ratones inmunizados con  $\beta A_{1-42}$ , y  $\beta A_{8-42}$ , sin embargo estos fagos no fueron reconocidos por estos sueros. Estos resultados no se mostraron por no ser relevantes para el propósito del trabajo: expresión de los fragmentos en la superficie del fago y la evaluación de su expresión en la superficie del fago.

Anteriormente se ha observado, por nuestro grupo y otros, que el suero producido por ratones silvestres, inmunizados con péptido  $\beta A_{1-42}$  fibrilar humano, produce anticuerpos que reconocen frecuentemente el epítipo lineal EFRH o motivos EFRH (XFXH) desplegado en clonas de fagos. Este epítipo se encuentra en la región del extremo amino del  $\beta A$ , de los aminoácidos 3 al 6, del  $\beta A_{42}$ . El  $\beta A_{42}$  fibrilar humano no es un antígeno propio de ratón, y su secuencia difiere de la de roedores en los aminoácidos 5, 10 y 13 (Hilbich, 1991). Esto puede explicar que la mayoría de los anticuerpos reconozcan la región del extremo amino del  $\beta A_{42}$  (Gevorkian, 2004).

Por lo tanto el reconocimiento de la secuencia 1-16 del  $\beta A$  en el fago M13 se puede explicar en base a la presencia del epítipo EFRH inmunodominante en el fragmento 1-16 del  $\beta A$  expresado en la superficie del fago. Sin embargo, la falta de reconocimiento de esta secuencia por el suero generado contra  $\beta A_{8-42}$ , indica que las IgGs del suero anti- $\beta A_{8-42}$  no reconocen un epítipo lineal en la superficie del fago M13. A su vez, la falta de reconocimiento de los fagos que expresan los fragmentos 12-28 y 17-42 del  $\beta A$  por los sueros de ratones inmunizados con  $\beta A_{1-42}$ , y  $\beta A_{8-42}$ , no sugiere que los fragmentos no hayan sido expresados en la superficie del fago, sino que la mayoría de las IgGs presentes en los sueros reconocen otros epítipos en la región amino, ya que esta región ha demostrado ser la región contra la que se generan mayor número de anticuerpos en roedores (Gevorkian, 2004).

Por otro lado, diferentes estudios en animales inmunizados con  $\beta A_{1-42}$  fibrilar, han demostrado que los anticuerpos generados reconocen determinantes antigénicos conformacionales en éste péptido (Cribas, 2003; Miller, 2003). Estudios de competencia

entre  $\beta A$  fibrilar y fragmentos del mismo sugieren la presencia de anticuerpos anti- $\beta A_{1-42}$  policlonales específicos contra epítomos conformacionales en ratones silvestres de diferentes haplotipos. También se han identificado péptidos lineales que mimetizan epítomos conformacionales del  $\beta A_{42}$ , usando la tecnología de despliegue en fagos. Es más se ha descubierto que en algunos haplotipos de ratones, EFRH no es el epítomo contra el que se generan mayor número de anticuerpos y que en estos ratones generan mimotopos de  $\beta A_{42}$  fibrilar (Gevorkian, 2004).

Para evaluar la expresión de los fragmentos 12-28 y 17-42 del  $\beta A$  en la superficie del fago M13, se usaron anticuerpos monoclonales generados contra epítomos o secuencias exclusivas de la región media y carboxilo del péptido  $\beta A$ . De esa manera, se demostró la expresión del fragmento 12-28 en la superficie del fago M13, el cual fue reconocido con el anticuerpo monoclonal BAM90.1, que reconoce del aminoácido 13 al 28 del  $\beta A$ . A su vez, la expresión del fragmento 17-42 del  $\beta A$  se demostró usando el anticuerpo monoclonal 4G8, el cual reconoce la secuencia 17-24 del  $\beta A$ .

Los anticuerpos monoclonales BAM90.1 y 4G8 también fueron usados para comprobar la expresión de los fragmentos 17-42 y 12-28 del  $\beta A$ , respectivamente. Los resultados no se muestran. Estos fragmentos expresados en M13, comparten la secuencia del aminoácido 17 al 28 del  $\beta A$ , lo que sugeriría que tanto BAM90.1 como 4G8 podrían reconocer los fragmentos 17-42 y 12-28 del  $\beta A$  en M13. Sin embargo, BAM90.1 fue incapaz de reconocer la clona que expresa el fragmento 17-42 del  $\beta A$  en la superficie de M13, así como 4G8 fue incapaz de reconocer el fago que expresa el fragmento 12-28 del  $\beta A$ . Lo anterior abre la incógnita de qué epítomos son reconocidos por estos anticuerpos monoclonales, cómo está siendo expresado el fragmento en la superficie del fago, y cómo influye el contexto molecular en la estructura y reconocimiento de estos fragmentos fusionados a pIII.

Finalmente, una ventaja de obtener los fragmentos medio y carboxilo del  $\beta A$ , sobre la superficie del fago M13, es la producción y selección de anticuerpos que reconozcan estos fragmentos específicamente y evitar la utilización de anticuerpos generados contra la región amino, ya que diferentes estudios han señalado que los anticuerpos de ratón contra el  $\beta A$  fibrilar, que reconocen el extremo amino del  $\beta A_{1-42}$ , poseen una mayor afinidad por depósitos de amiloide vascular. Estos anticuerpos se han relacionado con la inflamación meníngea observada en pacientes con EA reportada en diferentes artículos y microhemorragias observadas en ratones vacunados con anticuerpos anti- $\beta A_{1-42}$  (Miller, 2003; Monsongo 2003; Pfeifer, 2002). A parte, la secuencia amino

del  $\beta A_{1-42}$ , del aminoácido 4 al 10, es compartida con la APP asociada a la célula, la APP circulante y el fragmento carboxilo de la APP resultado de la proteólisis por  $\beta$ -secretasa. Por lo tanto, las consecuencias de tratar humanos con anticuerpos contra el extremo amino puede producir problemas inmunológicos para los pacientes con EA (Miller, 2003). Los anticuerpos que reconozcan los fragmentos medio y carboxilo del  $\beta A$ , podrían actuar secuestrando las diferentes especies de  $\beta A$  truncadas en el extremo amino, que contienen epítomos de la región media y central, ya que se ha visto que muchos de estos péptidos truncados, poseen efectos citotóxicos sobre las células y los cuales serían inadvertidos para anticuerpos generados con  $\beta A_{1-42}$ , que reconocen la región del extremo amino del  $\beta A$  principalmente (Wei, 2002; Casas, 2004).

En apoyo a esto diferentes investigadores han demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región central del  $\beta A$  revierte los déficits de memoria en ratones, y que la administración de anticuerpos dirigidos contra el extremo carboxilo del  $\beta A$  reduce significativamente el número de células en degeneración en el hipocampo (Mohajeri, 2002; Dodart, 2002). También, varias especies truncadas en la región amino del  $\beta A$  contienen estas regiones. Estas especies se producen en el curso temprano de la enfermedad, son patológicas, y son antígenos abundantes que existen durante la patogénesis de la EA. Por lo que estas especies de  $\beta A$  son blancos potenciales para estrategias de vacunación (Seargent, 2003).

En la EA se producen varias especies oligoméricas de  $\beta A_{42}$ , monómeros, tetrameros, hexámeros, y oligómeros grandes, las cuales pueden intervenir en los primeros síntomas relacionados con el daño cognitivo en la EA (Dodart, 2003). Ciertas especies de oligómeros del  $\beta A$ , como los trímeros y múltiplos de trímeros, son especialmente tóxicos (Cleary, 2005; Lesné, 2006). Por lo que la producción y selección de anticuerpos contra diferentes fragmentos del  $\beta A$  podría ser útil en la prevención de la formación de especies oligoméricas de  $\beta A$ .

## 7. Conclusión.

En el presente trabajo se clonó y demostró la expresión de los fragmentos del extremo amino, parte media y extremo carboxilo del péptido  $\beta A$ , involucrado en la EA. Se hizo uso de la tecnología de despliegue en fagos (Phage Display) para obtener fusiones al extremo amino de pIII, sobre la superficie del fago M13, con los diferentes fragmentos del péptido  $\beta A$ .

La utilización de la tecnología de Phage Display permite la obtención de fagos, con proteínas recombinantes en su superficie, en pocas semanas. Lo anterior reduce los costos de obtención de los fragmentos del péptido  $\beta A$ , ya que son expresados en la superficie del fago M13, y permite su uso fácil en el laboratorio.

Estos fragmentos tienen un uso importante en el laboratorio en estudios de reconocimiento molecular en el estudio de la EA. Tener los fragmentos del péptido  $\beta A$  en un sistema biológico que se puede mantener por largo tiempo, reduce los gastos en el laboratorio, al evitar la adquisición de péptidos sintéticos de los fragmentos del péptido  $\beta A$  más costosos.

Los fragmentos del  $\beta A$ , desplegados en fagos, pueden ser utilizados para la selección de anticuerpos contra el péptido  $\beta A$ , como inmunógenos para producir anticuerpos contra el péptido  $\beta A$ , como ligandos de moléculas que puedan reconocer estas regiones del péptido  $\beta A$  y en varias estrategias experimentales de selección de ligandos, que reconozcan estas secuencias en particular.

## 8. Perspectivas.

Como perspectiva al presente trabajo se tienen estudios de citotoxicidad, ya que estos fragmentos se derivan del péptido  $\beta A_{1-42}$ , implicado en daño citotóxico en células neuronales. Estos fragmentos expresados sobre la superficie del fago M13 podrían ayudar a determinar el papel de las diferentes regiones del péptido  $\beta A$ , extremo amino, parte media y extremo carboxilo, en el daño citotóxico.

Otro objetivo es usar los fagos que expresan en la superficie los diferentes fragmentos del péptido  $\beta A$  para inmunizar animales e inducir la producción de anticuerpos contra estas regiones, específicamente las regiones media y carboxilo terminal del péptido  $\beta A$ . Esto puede ayudar a esclarecer si los anticuerpos que reconocen las regiones media y carboxilo terminal pueden tener una aplicación terapéutica potencial en la EA.

El péptido  $\beta A$  ha demostrado tener un gran número de interacciones con diferentes estructuras y componentes celulares, por lo tanto, los diferentes fragmentos del péptido  $\beta A$ , expresados en la superficie del fago filamentoso M13, serán de gran ayuda para identificar las estructuras moleculares con las que pueden interactuar las diferentes regiones del péptido  $\beta A$ .

## 9. Breviario.

**ADAM (A disintegrin and metalloprotease).** Son un grupo de metaloproteasas. Proteínas transmembranales de tipo 1. En el extremo amino poseen un predominio que inhibe la actividad enzimática, un dominio de proteasa, un dominio de desintegrina y otro rico en cisteínas involucrados en adhesión y fusión celular, un dominio transmembranal y un pequeño extremo carboxilo. Tienen funciones proteolíticas y de adhesión celular (Eurekah Bioscience Collection, 2003).

**APP (Amyloid beta precursor protein).** Proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide.

**Bax y Bcl2. Proteínas de la familia Bcl-2.** Estas proteínas regulan cascadas de muerte celular y supervivencia en las células. Bax es una proteína pro-apoptótica, mientras Bcl-2 incrementa la supervivencia celular (Eurekah Bioscience Collection, 2003).

**Cinasas JNK (c-Jun N-terminal kinase).** Son cinasas activadas por diferentes estímulos nocivos como falta de factores tróficos, excitotoxicidad, hipoxia, exposición a  $\beta$ A, axotomía, y otros estímulos que producen estrés en la célula (Eurekah Bioscience Collection, 2003).

**LTP (Long term potentiation).** Potenciación a largo plazo, es un modelo celular de aprendizaje. En este modelo se dan impulsos eléctricos a una vía monosináptica aferente excitatoria, activándola por periodos breves y repetidos, obteniendo una respuesta sináptica persistente (Eurekah Bioscience Collection, 2003).



## 10. Referencias

**Barbas, C.** et al., 2001, Phage Display: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.E.U.U., 432 pp.

**Bayer, T.** et al., 2001, Key factors in Alzheimer's disease:  $\beta$ -amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport, Brain Pathology 11, pp. 1-11.

**Bertram, L.** et al, 2000, Evidence for genetic linkage of alzheimers disease to chromosome 10q, Science 290, pp. 2302-2303.

**Bhardwaj, D.** et al., 1995, Monoclonal antibodies against a minor and the major coat protein of filamentous phage M13: their application in phage display. Journal of Immunological Methods 179(2), pp. 165-175.

**Borchelt, D. R.** et al., 1996, Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, Neuron 17, pp. 1005-1013.

**Casas, C.** et al., 2004, Massive CA1/2 Neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A $\beta$ 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model, American journal of pathology 165(4), pp. 1289-1300.

**Chen, Q.** et al., 2005, A novel mechanism for the regulation of amyloid precursor protein metabolism, Journal of cell biology 158(1), pp. 79-89.

**Chesselet, M.**, 2001, Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 410 pp.

**Clackson, T.** y Wells, J., 1994, In vitro selection from protein and people libraries, Trends in Biotechnology 12, pp. 173-184.

**Cleary**, J. et al., 2005, Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt cognitive function, *Nature Neuroscience* 8(1), pp. 79-84.

**Coles**, M., 1998, Solution structure of amyloid  $\beta$ -peptide (1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is?, *Biochemistry* 37, pp. 11064-11077.

**Cribbs**, D. H. et al., 2003, Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid, *International Immunology* 15(4), pp. 505-514.

**Cruz**, L. et al., 1997, Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 94, pp. 7612-7616.

**Datki**, Z. et al., 2004, In vitro model of neurotoxicity of A $\beta$  1-42 and neuroprotection by a pentapeptide: irreversible events during the first hour, *Neurobiology of disease* 17, pp. 507-515.

**De la Cruz**, V.F. et al., 1988, Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage, *The journal of biological chemistry* 263, pp. 4318-4322.

**De Strooper**, B. y Annaert, W., 2000, Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein, *Journal of Cell Science* 113, pp. 1857-1870.

**Dickey**, C. et al., 2005, Dysregulation of Na/K ATPase by amyloid in APP+PSI transgenic mice, *BMC Neuroscience* 6(1), 11 pp. Fuente electrónica <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/7>

**Dodart**, J. C. et al., 2002, Immunization reverses memory deficits reducing A $\beta$  burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience* 5(5), pp. 452-457.

**Dodart, J. C. et al.**, 2003, Immunotherapy for Alzheimer's disease: will vaccination work?, Trends in Molecular Medicine 9(3), pp. 85-87.

**Duff, K. et al.**, 1996, Increased amyloid-beta 42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1, Nature 383, pp. 710-713.

**Eurekah Bioscience Collection**, 2003, Capítulos de la base de datos Eurekah bioscience, National Center for Biotechnology Information, E.E.U.U., National Library of Medicine, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Ferri, C.P. et al.**, 2005, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study, Lancet 366, pp. 2112-2117.

**Funamoto, S. et al.**, 2004, Truncated carboxyl-terminal fragments of  $\beta$ -amyloid precursor protein are processed to amyloid  $\beta$ -proteins 40 and 42, Biochemistry 43, pp. 13532-13540.

**Games, D. et al.**, 1995, Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein, Nature 373(6514), pp. 523-527.

**Gandy, S y Petanceska, S.**, 2000, Regulation of Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor trafficking and metabolism, Biochimica et Biophysica acta 1502, pp. 44-52.

**Gevorkian, G. et al.**, 1998, Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage display peptide library, Clinical immunology and immunopathology 86, pp. 305-309.

**Gevorkian, G. et al.**, 2004, Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amyloid, Journal of Neuroimmunology 156, pp. 10-20.

**Glenner**, G. G. y **Wong**, C. W., 1984, Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(3), pp. 885-890.

**Götz**, J. et al., 2001, Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils, *Science* 293, pp. 1491-1494.

**Guzik**, B. y **Goldstein**, L., 2004, Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction, *Current opinion in cell biology* 16, pp. 443-450.

**Harvey**, R.J. et al., 2003, The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74, pp. 1206-1209.

**Herzig**, M. C., 2004, A $\beta$  is targeted to the vasculature in amouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, *Nature neuroscience* 7(9), pp. 954-960.

**Hilbich**, C. et al., 1991, Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid beta A4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4, *European Journal of Biochemistry* 201(1), pp. 61-69.

**Hoogenboom**, H. et al., 1991, Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains, *Nucleic acids research* 19(15), pp. 4133-4137.

**Hufton**, E.E. et al., 1999, Phage display cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *Journal of Immunological Methods* 231 (1-2), pp. 39-51.

**Huse**, J. y **Doms**, R., 2000, Closing in on the amyloid cascade, *Molecular Neurobiology* 22, pp. 81-98.

**Kay, B.** et al., 1996, Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Editorial Academic Press, E.E.U.U., 344 Pp.

**Kazuhiro, T.** et al., 2005, Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in alzheimer's disease, Journal of pharmacological sciences 97, pp. 312-316.

**Klyubin, I.** et al., 2005, Amyloid  $\beta$  protein immunotherapy neutralizes A $\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo, Nature medicine 11, pp. 556-561.

**Kokubo, H.** et al., 2005, Oligomeric proteins ultrastructurally localize to cell processes, especially to axon terminals with higher density, but not to lipid rafts in Tg2576 mouse brain, Brain Research 1045, pp. 224-228.

**Kokubo, H.** et al., 2005 (a), Soluble A $\beta$  oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain, Brain Research 1031, pp. 222-228.

**Koo, E.** et al., 1996, Trafficking of cell-surface amyloid  $\beta$ -protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody, Journal of Cell Science 109, pp. 991-998.

**Langui, D.** et al., 2004, Subcellular topography of neuronal A $\beta$  peptide in APP $\times$ PS1 transgenic mice, American journal of pathology 165(5), pp. 1465-1477.

**Lazarov, O.** et al., 2002, Evidence that synaptically released  $\beta$  amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice, Journal of Neurosciences 22, pp. 9785-9793.

**Le Vine, H.**, 2004, The amyloid hypothesis and the clearance and degradation of Alzheimer's  $\beta$ -peptide, Journal of Alzheimer's disease 6, pp. 303-314.

**Lee, R. et al.**, 1999, Prostaglandin E2 stimulates amyloid precursor protein gene expression: inhibition by immunosuppressants, *The journal of Neuroscience* 19(3), pp. 940-947.

**Lesné, S. et al.**, 2006, A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory, *Nature* 440, pp. 352-357.

**Levy-Lahad, E. et al.**, 1995, A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1, *Science* 269, pp. 970-973.

**Lewis, J. et al.**, 2001, Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP, *Science* 293, pp. 1487-1491.

**Makowski, L.**, 1993, Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages, *Gene* 128 (1), pp. 5-11.

**Malinin, N. et al.**, 2004, Amyloid- $\beta$  neurotoxicity is mediated by FISH adapter protein and ADAM12 metalloprotease activity, *Proceedings of the national academy of sciences* 102(8), pp. 3058-3063.

**Manoutcharian, K. et al.**, 1999, Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library, *Clinical Immunology* 91(1), pp. 117-121.

**Manoutcharian, K. et al.**, 1999, Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infection and Immunity* 67(9), pp. 4764-4770.

**Manoutcharian, K. et al.**, 2001, Phage-displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current pharmaceutical biotechnology* 2(3), pp. 217-223.

**Manoutcharian, K.** et al., 2003, Amyloid-beta peptid-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library, *Journal of neuroimmunology* 145, pp. 12-17.

**Manoutcharian, K.** et al., 2004, Human single chain Fv antibodies and complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42, *Neurobiology of Disease* 17(1), pp. 114-121.

**Marvin, D.A.** et al., 1998, Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology* 8(2), pp. 150-158.

**Marx, J.**, 2001, New Leads on the how of alzheimer's. *Science* 293(5538), pp. 2192-2194.

**Mattson, M.**, 2004, Pathways towards and away from Alzheimer's disease; *Nature* 430, pp. 631-639.

**Mattson, M.**, 1997, Cellular actions of  $\beta$ -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives, *Physiological Reviews* 77(4), pp. 1081-1132.

**McCarron, M.** et al., 2000, Amyloid beta-protein length and cerebral amyloid angiopathy-related haemorrhage, *NeuroReport* 11, pp. 937-940.

**Meret, N.M.** et al., 2005, Modulation of Alzheimer's pathology by cerebro-ventricular grafting of hybridoma cells expressing antibodies against A $\beta$  in vivo, *Federation of European Biochemical Societies Letters* 579, pp. 753-756.

**Miller, D. L.** et al., 2003, Humoral immune response to fibrillar beta-amyloid peptide. *Biochemistry* 42, pp. 11682-11692.

**Minopoli, G.** et al., 2001, The  $\beta$ -amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 Nuclear translocation, *The journal of biological chemistry* 276(9), pp. 6545-6550.

**Mohajeri**, M. H. et al., 2002, Passive immunization against beta amyloid peptide protects central nervous system (CNS) neurons from increased vulnerability associated with Alzheimer's disease-causing mutation, *The Journal of Biological Chemistry* 277, pp. 33012-33017.

**Monsonogo**, A. y Weiner, H., 2003, Immunotherapeutic Approaches to Alzheimer's Disease, *Science* 302, pp. 834-838.

**Morgan**, C. et al., 2004, Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease, *Progress in Neurobiology* 74, pp. 323-349.

**Morishima-Kawashima**, M. et al., 1998, The presence of amyloid  $\beta$ -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells, *Biochemistry* 37, pp. 15247- 15253.

**NIH**, 2005, Progress report on Alzheimer's disease 2004-2005, NIH, E.E.U.U., 88 pp.

**Nunes**, M. et al., 2005, Restraint stress induces  $\beta$ -amyloid precursor protein mRNA expression in the rat basolateral amygdale, *Brain research bulletin* 65, pp. 69-75.

**O.M.S.**, 2001, Fact sheet: The world Health report 2001, Mental and neurological disorders, NMH communications, World Health Organization, Geneva, 4 pp.

**O'Neil**, K. T. et al., 1992, Identification of novel peptide antagonist for GIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library, *Proteins* 14, pp. 509-515.

**Oddo**, S. et al., 2006, A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of  $A\beta$ , *American journal of pathology* 168, pp. 184-194.

**Pfeifer**, M. et al., 2002, Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy, *Science* 298, Pág. 1379.



**Pike, C. et al.**, 1997, Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants, *Journal of neurochemistry* 69(4), pp. 1601-1611.

**Price, D. et al.**, 1994, Cellular and Molecular Biology of Alzheimer's Disease and Animal Models, *Annual Reviews, Medicine* 45, pp. 435-446.

**Qiu-Lan Ma et al.**, 2006, Antibodies Against  $\beta$ -Amyloid Reduce A $\beta$  Oligomers, Glycogen Synthetase Kinase-3 $\beta$  Activation and  $\tau$  Phosphorylation In Vivo and In Vitro, *Journal of Neuroscience Research* 83, pp. 374-384.

**Racke, M. M.**, 2005, Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid  $\beta$ , *The journal of neuroscience* 25(3), pp. 629-636.

**Rensink, A. et al.**, 2003, Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy, *Brain Research Reviews* 43(2), pp. 207-223.

**Russel, M.**, 1994, Phage assembly: A paradigm for bacterial virulence factor export, *Science* 265, pp. 612-614.

**Sambamurti, K. et al.**, 1992, Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells, *Journal of neuroscience research* 33(2), pp. 319-329.

**Schenk, D. et al.**, 1999, Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature* 400, pp. 173-177.

**Scheuner, D. et al.**, 1996, Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilina 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease, *Nature Medicine* 2(8), pp. 864-870.

**Scott, J. y Smith, G.**, 1990, Searching for peptide ligands with an epitope library, *Science* 249, pp. 386-390.

**Seargent, N. et al.**, 2003, Truncated beta-amyloid peptide species in preclinical Alzheimer's disease as new targets for vaccination approach, *Journal of Neurochemistry* 85(6), pp. 1581-1591.

**Selkoe, D. y Schenk, D.**, 2003, Alzheimer's Disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics, *Annual Reviews. Toxicology* 43, pp. 545-584.

**Selkoe, D.**, 2001, Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy, *Physiological Reviews* 81(2), pp. 741-766.

**Shanmugam, G. et al.**, 2004, Structural analysis of amyloid  $\beta$  peptide fragment (25-35) in different microenvironments, *Biopolymers (peptide science)* 76, pp. 421-434.

**Sherrington, R. et al.**, 1995, Cloning of a novel gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's disease, *Nature* 375, pp. 754 – 760.

**Siegel, G. et al.**, 1999, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, Williams & Wilkins, sexta edición, Philadelphia, E.E.U.U., 1216 Pp.

**Smith, G. et al.**, 1993, Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in Enzymology* 217, pp. 228-257.

**Smothers, J. F. et al.**, 2002, Phage Display. Affinity selection from biological libraries, *Science* 298, pp. 621-622.

**Solomon, B.**, 2005, Generation of anti- $\beta$ -amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer's disease vaccination, *Vaccine* 23, pp. 2327-2330.

**Strittmatter**, W.J., et al., 1993, Apolipoprotein E: high-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(5), pp. 1977-1981.

**Strittmatter**, W.J., 1999. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: signal transduction mechanisms, *Biochemical Society Symposium* 67, pp. 101–109.

**Taru**, H. et al., 2002, Differential roles of JIP scaffold proteins in the modulation of amyloid precursor protein metabolism, *The journal of biological chemistry* 277(30), pp. 27567-27574.

**Turner**, P. et al. 2003, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Progress in neurobiology* 70, pp. 1-32.

**Van Gassen**, G. y Annaert, W., 2003, Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease, *The Neuroscientist* 9(2), pp. 117-126.

**Walsh**, D. et al., 2002, Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature* 416, pp. 535-539.

**Wei**, W., 2002, A $\beta$  17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis, *Brain* 25, pp. 2036-2043.

**Wilde-Bode**, C. et al., 1997, Intracellular generation and accumulation of amyloid  $\beta$ -peptide terminating at aminoacid 42, *The Journal of biological chemistry* 272(26), pp. 16085-16088.

**Wilson**, D. R. et al., 1998, Phage Display: Applications, innovations and issues in phage and host biology, *Canadian Journal of Microbiology* 44(4), pp. 313-329.