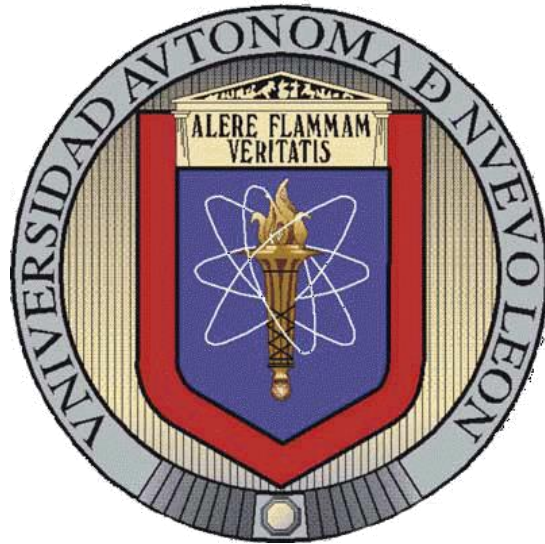


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide”

Presentado por:

Q.F.B. Vanessa Pérez Silos

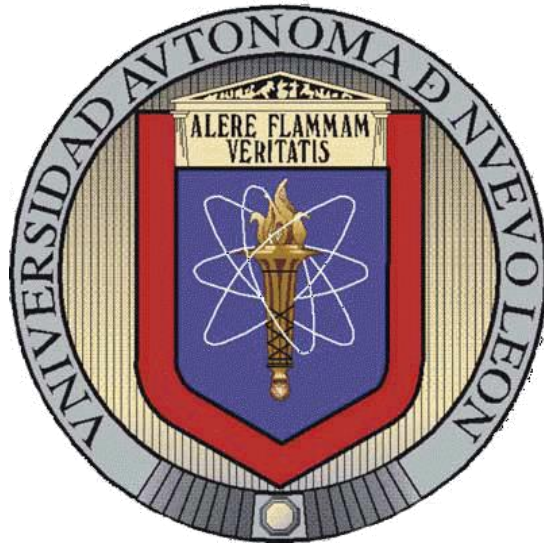
Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

ASESOR: Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Monterrey, Nuevo León; Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide”

Presentado por:

Q.F.B. Vanessa Pérez Silos

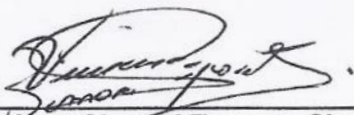
Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

ASESOR: Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Monterrey, Nuevo León; Noviembre del 2014

**Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y  
citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide**

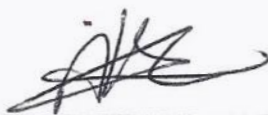
Aprobación de la Tesis:



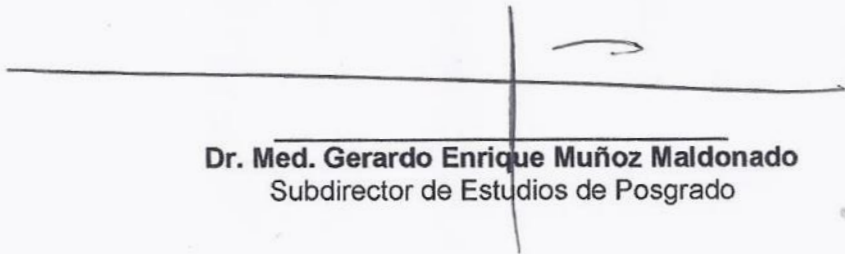
**Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret**  
Directora de Tesis



**Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez**  
Co-Director de Tesis



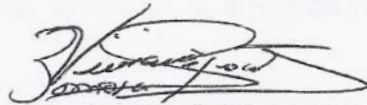
**Dr. C. Alberto Camacho Morales**  
Miembro de Tesis



**Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue llevado a cabo en los laboratorios de Biología Estructural e Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, N.L. Bajo la dirección de la Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret y la Co-Dirección del Dr. Román Vidal Tamayo Rodríguez y el Dr. Alberto Camacho Morales.

**Vo.Bo.**



---

**Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret**

**Director de Tesis**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre estar conmigo y permitirme cumplir una meta más en mi vida.

A mis padres por creer en mí y haberme apoyado en todos los aspectos durante estos dos años (y toda la vida).

A mis hermanas (Isabel Janeth Pérez Silos y Guadalupe Pérez Silos), familia y amigos (Sandra Gpe. Uribe Morales, Rocío Nava Charles y Cynthia K. Arredondo Moreno) por siempre estar ahí cuando las necesito.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante la maestría.

Gracias a la Dra. Viviana Zomoza Signoret, el Dr. Román Vidal Tamayo Rodríguez y el Dr. Alberto Camacho Morales por su ayuda en la dirección durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Ana María Rivas y el Dr. Jorge Ascasio por permitirme trabajar en sus laboratorios y por los consejos dados.

A mis compañeros Guillermo Guerrero y Carlos Muza por la asesoría durante la elaboración de algunos experimentos, así como por permitirme trabajar y usar algunos de sus equipos y material de laboratorio.

A Gysela López, Jesús Borrego y Cesar Gómez por desvelarse escuchando mis exposiciones y acompañarme al laboratorio por las noches.

A Quirino Silos Victorino, Rosalba de León Gámez y Víctor Javier Rincón Vazquez por su apoyo.

A Juany Hinojosa, Ariadna López, Lourdes Mendoza y Ammir Breton por su amistad y consejos.

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente ayudaron durante el desarrollo de este proyecto.

## DEDICATORIA

*A mis padres, Ignacia Silos Victorino*

*Y Juan Antonio Pérez Covarruvia.*

*Gracias por apoyarme*

*y respetar cada decisión que tomo*

*aunque esta no los haga felices.*

*Los amo, son los pilares de mi vida.*

## ÍNDICE

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO

### I.- INTRODUCCIÓN

1.1.	Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.2.	Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer en el mundo .....	1
1.3.	Síntomas y etapas de la Enfermedad de Alzheimer.....	3
1.4.	Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer.....	5
1.5.	Características histopatológicas.....	7
1.5.1.	Ovillos neurofibrilares.....	8
1.5.1.1.	Tau.....	8
1.5.2.	Placas amiloides.....	10
1.5.2.1.	Proteína Precursora de Amiloide (APP).....	12
1.5.2.1.1.	Gen APP.....	12
1.5.2.1.2.	Mutaciones en APP incrementan la producción del Péptido A $\beta$ .....	13
1.5.2.1.3.	Tráfico y procesamiento de APP.....	14
1.5.3.	Hipótesis de la Cascada Amiloide.....	16
1.5.4.	Péptido $\beta$ -Amiloide.....	17
1.5.4.1.	Papel fisiológico del péptido A $\beta$ .....	18
1.5.4.2.	Agregación.....	19
1.5.4.3.	Oligomerización.....	20
1.5.4.4.	Efecto de la secuencia del péptido A $\beta$ sobre su agregación y citotoxicidad..	22
1.5.4.5.	Péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	24
II.-	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	25

### III.- OBJETIVOS

3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	26
3.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26

### IV.- MATERIALES

4.1.	REACTIVOS.....	27
4.1.1.	Solubilización del péptido A $\beta$ .....	27
4.1.2.	Cinéticas de agregación.....	27
4.1.3.	Tricina-SDS-PAGE y Western blot (WB).....	27
4.1.4.	Cultivo y viabilidad celular.....	28
4.2.	MATERIALES.....	28
4.2.1.	Materiales de uso general.....	28
4.2.2.	Cinéticas de agregación.....	29
4.2.3.	TRICINA-SDS-PAGE, Western blot.....	29
4.2.4.	Cultivo celular.....	29
4.2.5.	Material biológico.....	29
4.3.	EQUIPOS.....	30
4.3.1.	Equipo de uso general.....	30
4.3.2.	Solubilización y cinéticas del péptido.....	30
4.3.3.	Cultivo celular.....	31

### V.- MÉTODOS

	ESTRATEGIA GENERAL.....	32
5.1.	Solubilización del péptido A $\beta$ .....	32
5.2.	Cinéticas de agregación de cada péptido.....	33
5.2.1.	En presencia de Tioflavina T.....	33
5.2.2.	En presencia de 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS).....	33



5.3.	Cinética de agregación de los péptidos wt en combinación de los péptidos mutados.....	33
5.3.1.	En presencia de ThT.....	33
5.4.	Western-blot (WB).....	34
5.4.1.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (TRICINA-SDS-PAGE).....	34
5.4.2.	Electrotransferencia.....	34
5.4.3.	Bloqueo e incubación.....	35
5.5.	Viabilidad, citotoxicidad y apoptosis.....	35
5.5.1.	Cultivo de células C6 glioma de rata.....	35
5.5.2.	Ensayo de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de los péptidos A $\beta$ en células C6 de glioma de rata.....	36
<b>IV.- RESULTADOS</b>		
6.1.	Cinética de agregación de cada péptido.....	39
6.1.1.	En presencia de ThT.....	39
6.1.2.	En presencia de ANS.....	40
6.2.	Cinética de agregación de los péptidos wt en combinación de los péptidos mutados.....	42
6.2.1.	En presencia de ThT.....	42
6.3.	Western-blot.....	43
6.4.	Ensayo de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de los péptidos A $\beta$ en células C6 de glioma de rata.....	46
<b>VI.- DISCUSION</b> .....		
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....		
<b>IX.- PERSPECTIVAS</b> .....		
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....		
<b>XI.- ANEXOS</b> .....		

## RESUMEN

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide.

**Nombre:** Q.F.B. Vanessa Pérez Silos

**Institución:** Universidad Autónoma de Nuevo León

**Localización:** Monterrey, Nuevo León

**Fecha de titulación:** Noviembre 2014

**Páginas en el estudio:** 77

**Introducción:** La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo y la forma más frecuente de demencia senil. Con el incremento en la esperanza de vida, la prevalencia de demencia aumentará a nivel mundial, por lo que representa un desafío cada vez mayor para la salud pública.

Hasta ahora, ha habido un gran número de estudios que han sugerido mecanismos de la enfermedad y la mayoría apoya la hipótesis amiloide, la cual propone que la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) es la patología inicial que desencadena la enfermedad.

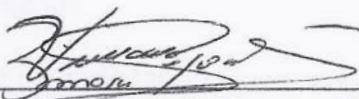
Se sabe que la agregación del péptido  $A\beta$  depende de su secuencia aminoacídica, por lo que mediante la creación de mutantes que pueden inhibir el cambio conformacional y dar lugar a estructuras secundarias estables, puede ser posible identificar residuos clave que afectan los procesos de agregación y el cambio conformacional.

**Objetivo:** Estudiar la agregación y citotoxicidad del péptido  $A\beta$  y sus mutantes.

**Materiales y métodos:** En el presente trabajo se examinó la agregación y citotoxicidad de los péptido  $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$  wild type, así como de las mutantes  $A\beta(K28A)$ ,  $A\beta(A30W)$  y  $A\beta(M35C)$  mediante ensayos de unión a Tioflavina T, determinación del peso molecular de los agregados amiloides por western blot, y estudios in vitro sobre la línea celular C6 de glioma de rata.

**Resultados:** Las mutantes presentaron una cinética de agregación y citotoxicidad diferente a los péptidos silvestres. En especial, la mutante  $A\beta_{1-40}(M35C)$  mostró una mayor cinética de agregación, forma agregados más estables y tuvo una menor viabilidad celular en comparación con el  $A\beta_{1-40}WT$ .

**Conclusión:** se comprobó el efecto de la secuencia del péptido sobre su agregación y citotoxicidad, demostrando que el cambio de un sólo aminoácido cambian la agregación y toxicidad del péptido sin inhibirla por completo.



**Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret**

Firma del asesor

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados.
<b>µg</b>	Microgramos.
<b>µl</b>	Microlitros.
<b>µm</b>	Micras.
<b>µM</b>	Micromolar.
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>APFs</b>	Protofibrillas anulares
<b>ADDL</b>	Ligando difusible derivados del péptido Aβ.
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína Precursora del péptido Beta Amiloide.
<b>Aβ</b>	Péptido Beta amiloide.
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina.
<b>CO</b>	Dióxido de carbono.
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>DMEM</b>	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco.
<b>EA</b>	Enfermedad del Alzheimer
<b>EAF</b>	Enfermedad del Alzheimer Familiar
<b>EAOD</b>	Enfermedad del Alzheimer de inicio temprano
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino.
<b>HCA</b>	Hipótesis de la cascada amiloide
<b>LOAD</b>	Enfermedad del Alzheimer de inicio tardío
<b>LPT</b>	Potencia a largo plazo

**MCI** Deterioro cognitivo leve

**NFT's** Ovillos Neurofibrilares

**PSEN1** Presenilina-1

**PSEN2** Presenilina-2

**PSP** Parálisis progresiva supranuclear

**SNC** Sistema nervioso central

**Ser** Serina

**RE** Retículo endoplásmico

**Thr** Treonina

**ThT** Tiolfavina T

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Incidencia específica por edad de la EA (por cada 1000 personas por año) entre continentes y países.....	3
2. Etapas de la EA.....	5
3. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más grande (441 aminoácidos).....	9
4. Tau hiperfosforilada.....	10
5. Estructura de APP y de sus fragmentos proteolíticos.....	13
6. Tráfico intracelular de APP.....	15
7. Metabolismo de la Proteína Precursora de Amiloide (APP).....	16
8. Hipótesis de la Cascada Amiloide.....	17
9. Los oligómeros A $\beta$ son los ensamblajes neurotóxicos clave en la EA.....	20
10. Estrategia general del proyecto.....	32
11. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>25-35</sub> en presencia de ThT.....	39
12. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> en presencia de ThT.....	40
13. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>25-35</sub> en presencia de ANS.....	41
14. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> en presencia de ANS.....	41
15. Cinéticas de agregación del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> wt en combinación de los péptidos mutados, ensayo de unión a ThT.....	42
16. Cinéticas de agregación del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> wt en combinación de los péptidos mutados, ensayo de unión a ThT.....	43
17. Western blot de los péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> y mezclas del péptido silvestre y mutados.....	44
18. Western blot de los péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> y mezclas del péptido silvestre y mutados.....	45

19. Dot blot.....	46
20. Viabilidad celular determinado por el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay.....	46
21. Citotoxicidad y apoptosis celular determinado por el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay.....	48

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Genes relacionados con la EA.....	7
2. Lista de péptidos A $\beta$ y secuencia de aminoácidos.....	30
3. Tratamientos.....	38
4. Preparación de PBS 1X.....	60
5. Preparación PBS 10X.....	60
6. Gel concentrador 4%.....	61
7. Gel separador 15%.....	61
8. Buffer de corrida.....	62
9. Buffer de carga.....	62
11. Buffer de bloqueo.....	62
12. Buffer de lavado.....	62
13. Buffer de disolución de anticuerpo primario.....	62
14. Componentes para suplementar Medio DMEM Advanced al 10% SBF.....	63



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Enfermedad de Alzheimer

La demencia se define como una falla adquirida y progresiva de la función cerebral, lo suficientemente grave para interferir en las actividades de la vida del individuo [1]. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en ancianos, representando del 60-70% de todos los casos de demencia [2].

La EA, que lleva el nombre del psiquiatra alemán Alois Alzheimer, se identificó por primera vez hace más de 100 años, pero la investigación de sus causas, factores de riesgo y tratamiento ha cobrado impulso en los últimos 30 años [3]. Aunque las investigaciones han revelado mucho sobre la EA, las alteraciones fisiológicas que pudieran explicar el desarrollo de la enfermedad siguen siendo en gran parte desconocidos [4].

El principal factor de riesgo para la EA es la edad. La incidencia de la enfermedad se duplica cada 5 años después de los 65 años de edad, con 1275 nuevos casos por año por cada 100,000 personas mayores de 65 años [5]. Se estima que la EA ha costado al mundo \$604 billones de dólares solo en el año 2010. Estos números son asombrosos, particularmente a la luz de las predicciones de que el número mundial de casos de EA, que actualmente se estima en 36 millones, se triplicara para el 2050 [6].

#### 1.2. Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer en el mundo

La ocurrencia de una enfermedad se puede medir como una proporción de personas afectadas por la enfermedad en una población definida en un punto de tiempo específico (prevalencia), o como el número de nuevos casos que se producen durante un período de tiempo específico en una población de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (incidencia). La prevalencia refleja la carga de salud pública de la enfermedad, mientras que la incidencia indica el riesgo de desarrollar esta enfermedad. La prevalencia es determinada por la incidencia y la duración de la enfermedad, y en ciertas circunstancias, la prevalencia se puede estimar como la incidencia x duración media de la enfermedad [4].



## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



**Prevalencia:** Datos agrupados de estudios basados en la población Europea, sugiere que la prevalencia estandarizada por edad en personas mayores de 65 años fue de 4.4% para la EA [7]. En los EE.UU., se conoce que personas mayores de 70 años presentan una prevalencia de 9.7% [8].

Mientras que en China, un meta-análisis que incluyó 18 estudios durante 1990-2010 mostró una prevalencia de 1.9% [9].

La epidemiología de la EA en los países de bajos y medianos ingresos ha llamado mucho la atención en los últimos años. Una revisión sistemática estima que la prevalencia global de la EA en los países en desarrollo fue del 3.4% [10].

**Incidencia:** La tasa de incidencia combinada de la EA entre las personas mayores de 65 años en Europa fue de 19.4% por cada 1000 personas por año [11]. Los datos agrupados de dos estudios a gran escala en personas mayores de 65 años en las áreas de Seattle y Baltimore EE.UU. dieron una tasa de incidencia de la EA de 15 por cada 1000 personas por año [12, 13]. La incidencia de EA aumenta casi exponencialmente con la edad hasta los 85 años de edad (Figura 1). Un aumento constante exponencial de la incidencia de EA, a medida que avanza la edad sugiere que la enfermedad es una consecuencia inevitable del envejecimiento, mientras que una convergencia o una disminución en cierta edad puede sugerir que las personas de edad muy avanzada pueden haber reducido la vulnerabilidad, debido quizá a factores genéticos o ambientales. Varios estudios europeos observaron una mayor tasa de incidencia de la EA en mujeres que en hombres, especialmente entre los grupos de mayor edad, mientras que estudios en América del Norte no encontraron diferencia significativa entre sexos [3]. Diversos, estudios han confirmado que la incidencia de EA en países desarrollados es generalmente menor que en países subdesarrollados de América y Europa. Por ejemplo, la tasa de incidencia de EA entre personas mayores de 65 años fue 7.7 por cada 1000 personas por año en Brasil y 3.2 por cada 1000 personas por año en India [10, 14].

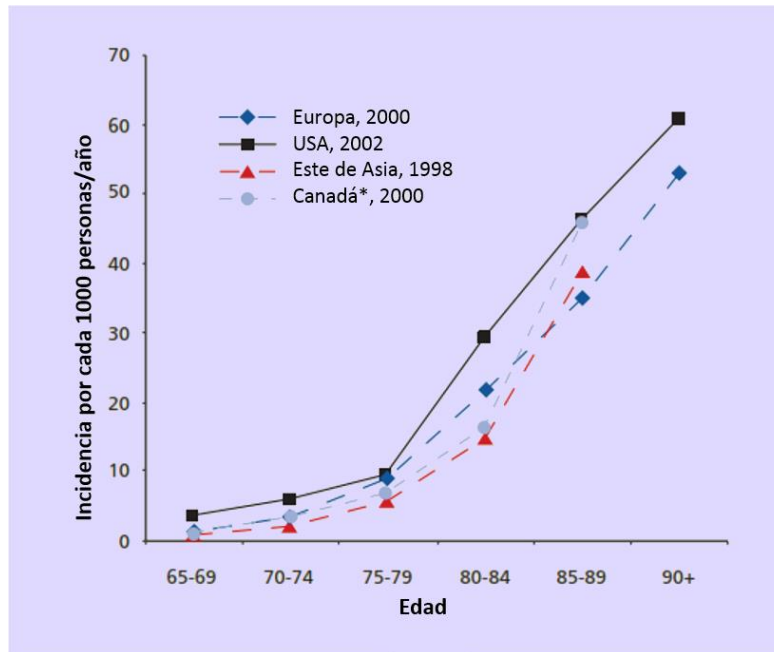


Figura 1. Incidencia específica por edad de la EA (por cada 1000 personas por año) entre continentes y países.

\*Incidencia de todos los tipos de demencia [3].

### 1.3. Síntomas y etapas de la Enfermedad de Alzheimer

La EA afecta a las personas de diferentes maneras, pero el síntoma más común comienza con una pérdida gradual de la capacidad para recordar nueva información. Esto ocurre debido a la interrupción de la función de las células cerebrales, comienza generalmente en las regiones del cerebro implicadas en la formación de nuevos recuerdos. Conforme se extiende el daño, los individuos experimentan otras dificultades [4]. La EA se puede dividir en cuatro etapas:

**Alzheimer temprano:** Los problemas de memoria son típicamente uno de los primeros signos de advertencia de pérdida cognitiva, posiblemente debido al desarrollo de la EA. Algunas personas con problemas de memoria tienen una condición llamada deterioro cognitivo leve (MCI). Las personas con esta condición tienen más problemas de memoria que los normales para las personas de su edad, pero sus síntomas no son tan graves como los que se observan en personas con la enfermedad de Alzheimer. Las personas mayores con MCI, en comparación con aquellas sin MCI, llegan a desarrollar la EA. Otras características que

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---

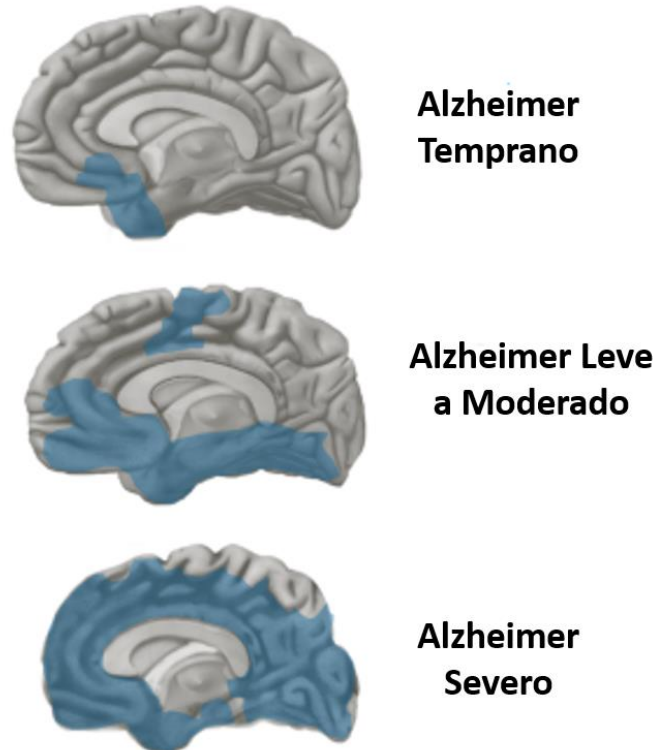


pueden señalar de las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer son una disminución en otros aspectos de la cognición, encontrar palabras, asuntos espaciales de la visión, y alteración del razonamiento o el juicio.

**Alzheimer leve:** Conforme la EA progresa, la pérdida de la memoria empeora, y los cambios en otras capacidades cognitivas son evidentes. Los problemas pueden incluir, por ejemplo, perderse, problemas para manejar dinero y pagar cuentas, repetir preguntas, tomar más tiempo para completar las tareas diarias normales, falta de criterio, poco humor y cambios de personalidad. Los pacientes a menudo son diagnosticados en esta etapa.

**Alzheimer moderado:** En esta etapa, el daño se produce en las zonas del cerebro que controlan el lenguaje, el razonamiento, el procesamiento sensorial y el pensamiento consciente. La pérdida de memoria y confusión empeoran, y la gente comienza a tener problemas para reconocer familiares y amigos. Pueden ser incapaces de aprender nuevas cosas, llevar a cabo tareas que implican varios pasos (como vestirse), o hacer frente a las nuevas situaciones. Ellos pueden tener alucinaciones, delirios y paranoia, y pueden comportarse de manera impulsiva.

**Alzheimer severo:** En la etapa final, las placas y los ovillos se han extendido por todo el cerebro y el tejido cerebral se ha reducido significativamente. Las personas con Alzheimer severo no pueden comunicarse y dependen completamente de otros para su cuidado. Cerca del final, la persona puede estar en la cama la mayor parte o todo el tiempo [4, 15, 16]. Cuando un individuo tiene dificultades de moverse a causa de la EA, ellos se vuelven más vulnerables a infecciones, incluyendo neumonía. La muerte suele producirse en general por inanición, desnutrición y neumonía [17].



**Figura 2. Etapas de la EA.** Conforme la EA progresa, los ovillos neurofibrilares se extienden por todo el cerebro (se muestra en azul). Las placas también se extienden por todo el cerebro, a partir de la neocorteza. Por la etapa final, el daño está muy extendido, y el tejido cerebral se ha reducido significativamente [16].

#### 1.4. Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es una entidad con heterogeneidad genética y clínica. Existen dos formas de EA 1) *EA Familiar* (EAF), en donde la mayoría de los casos los genes causan directamente la enfermedad. Estos casos son muy raros y se han identificado en un número relativamente pequeño de familias con muchas personas afectadas en varias generaciones. 2) *EA esporádico*, los genes no causan directamente la enfermedad, pero pueden influir en el riesgo de desarrollarla. La palabra esporádica se refiere al hecho de que estos casos se presentan de manera menos predecible y por lo general en un menor número de miembros de la familia afectados. Esta es la forma más común de la enfermedad [18].

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



La EAF es relativamente rara, representa menos del 10% de los casos y tiene un patrón autosómico dominante. Las mutaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP), la presenilina-1 (PSEN1) y presenilina-2 (PSEN2) causan la mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer familiar [19, 20]. Los genes PSEN1 Y PSEN2 son genes asociados a la maquinaria proteolítica que se encarga del procesamiento de la APP, y apoyan la hipótesis amiloide, ya que todas las mutaciones en estos genes conducen a un aumento de la producción del péptido  $A\beta_{1-42}$  y, por lo tanto, a la amiloidosis temprana del cerebro. La aparición ocurre a una edad temprana (EA de inicio temprano EAOD) desde los 30 a los 60 o 65 años, caracterizada por el deterioro cognitivo asociado con otros signos neurológicos tales como la espasticidad, trastornos de control motor, ataxia y convulsiones [17, 21]

En las formas esporádicas los síntomas tienen una aparición tardía, sobre los 60 años (LOAD). En total, más del 90% de los pacientes con la EA parecen presentar la enfermedad de tipo esporádico [22]. Una gran proporción de estos casos tienen antecedentes familiares de demencia lo que sugiere un fuerte componente genético. El gen de susceptibilidad mejor estudiado para la EA esporádico es APOE, que es responsable de la producción de una proteína que transporta colesterol y otras grasas en el cuerpo. El gen APOE tiene tres variantes comunes  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , los cuales difieren en la codificación para dos aminoácidos en la posición 112 y 158. Los genotipos APOE  $\epsilon 2/\epsilon 4$  o  $\epsilon 3/\epsilon 4$  presentan un incremento en el riesgo de 3 veces superior a desarrollar la EA, y el genotipo APOE  $\epsilon 4/\epsilon 4$  incrementa el riesgo aproximadamente 15 veces. Se sugiere que las variantes alélicas APOE pueden estar involucradas en la degradación o eliminación de  $A\beta$  del cerebro [23-25]. Los genes relacionados con la EA están localizados en 4 diferentes cromosomas (Tabla 1). Por otra parte, el antecedente de un familiar cercano diagnosticado con EA incrementa el riesgo de la misma de dos a siete veces [21].

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



Tabla 1. Genes relacionados con la EA\*

Edad de Inicio	Gen	Cromosoma	Herencia
<b>Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano (EOAD)</b>			
28-50	PSEN1	14q24.2	Autosómica Dominante
40-50	PSEN2	1q42.13	Autosómica Dominante
55-65	APP	21q21	Autosómica Dominante
<b>Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío (LOAD)</b>			
$\geq 65$	APOE	19q13.32	Esporádico

\*Tabla Modificada [17, 21].

Aparte de la diferencia en la edad de inicio, la enfermedad de Alzheimer familiar de aparición temprana y el tipo esporádico de aparición tardía son difíciles de distinguir clínica y patológicamente. No hay un gen particular que garantiza el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, una ligera variación en ciertos genes puede influir para determinar si alguien es más o menos susceptible a la enfermedad. Por lo tanto, la aparición de la enfermedad de Alzheimer puede representar una vía común de la neurodegeneración, que puede ser iniciada por uno de varios factores diferentes, incluyendo las mutaciones de genes individuales o una combinación de los efectos genéticos y ambientales [17].

### 1.5. Características histopatológicas

Las principales características neuropatológicas de la EA son la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares y placas amiloides extracelulares [26]. Las placas son depósitos de fibrillas y agregados amorfos del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ) los depósitos difusos de  $A\beta$  también están presentes en altas cantidades. Los ovillos neurofibrilares son agregados



intracelulares fibrilares de la proteína tau asociada a microtúbulos que exhibe la hiperfosforilación y modificaciones oxidativas [27].

### 1.5.1. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFTs) son agregados intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada y mal plegada. La proteína tau es una proteína axonal que en su estado normal se une a los microtúbulos y tiene un papel esencial en su montaje y estabilidad; los agregados se convierten en extraneuronales cuando las neuronas afectadas mueren [28, 29]. Los NFTs también se pueden encontrar en pacientes sin demencia, limitado a las estructuras temporales mediales, no son específicos de la EA, ya que también están presentes en otras enfermedades neurodegenerativas esporádicas y familiares como la parálisis progresiva supranuclear (PSP) y degeneración corticobasal [29].

#### 1.5.1.1. Tau

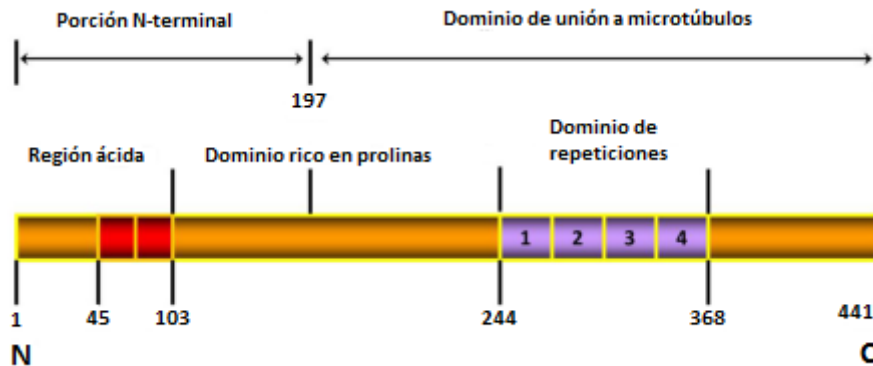
A mediados de 1980, una serie de laboratorios descubrió que la principal proteína que compone los NFTs era la proteína asociada a los microtúbulos, tau [30-32]. Tau normalmente estabiliza los microtúbulos, siendo esencial para el transporte axonal y por ende para la función neuronal [33]. Además de regular el ensamblaje de los microtúbulos, Tau participa en la polimerización de los microtúbulos [34], la regulación del diámetro axonal [35], regulación del transporte axonal [36], neurogénesis y el establecimiento de la polaridad neuronal en el desarrollo [37]. Además, tau participa en la regulación de las vías de señalización, al actuar como un andamio de proteína.

El gen que codifica para tau consta de 16 exones y está localizado en el cromosoma 17q21 [38]. A través del corte y empalme alternativo, se generan seis isoformas de tau en el SNC, que varían desde 352 a 441 aminoácidos de longitud. Estas isoformas se diferencian entre sí en la presencia o la ausencia de los exones 2, 3 y 10. Las combinaciones de estos exones son las que originan las seis isoformas. El tipo de isoforma que agrega en cada tipo de enfermedad neurodegenerativa es relativamente específico; así, mientras en la EA las 6 isoformas forman parte de los NFTs, en la PSP solamente se observan las isoformas que

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



contiene el exón 10 [39]. La proteína tau se puede dividir en tres dominios: una región ácida en el extremo N-terminal, un dominio rico en prolina y un dominio de unión a microtúbulos (Figura 3) [40]. La transcripción alternativa de los exones 2, 3 y 10 modifica la presencia de repeticiones en el extremo N-terminal de tau y el número de dominios de repetición de unión a microtúbulos (3 o 4), respectivamente [41].



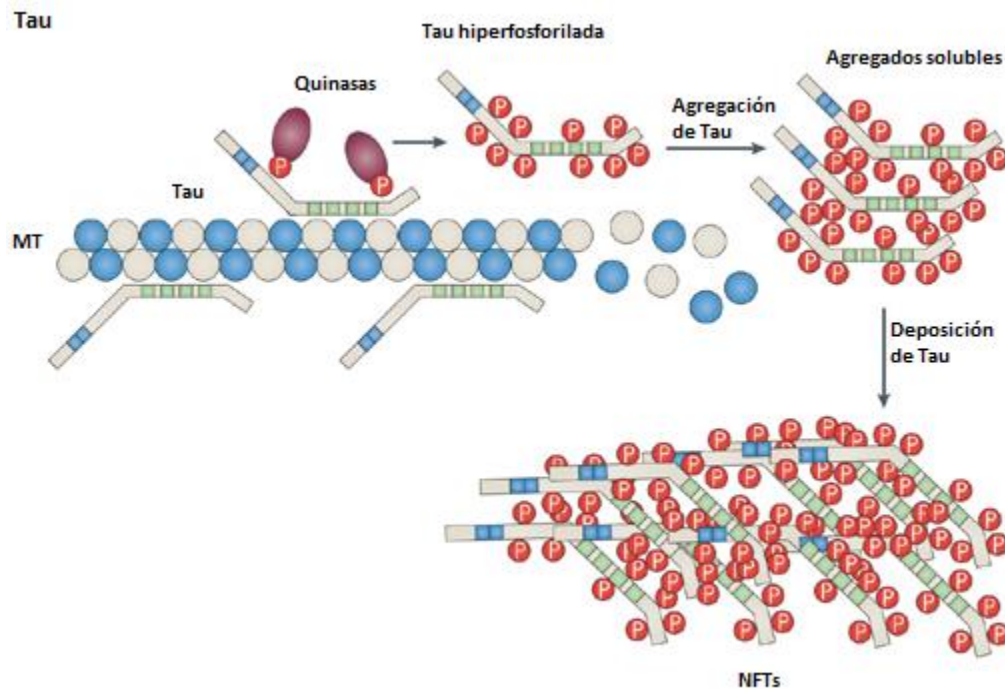
**Figura 3. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más grande (441 aminoácidos).**

El dominio de proyección, que incluye una región ácida y una región rica en prolina, interactúa con elementos del citoesqueleto para determinar el espaciado entre los microtúbulos en los axones. El extremo N-terminal también está implicado en las vías de transducción de señal mediante la interacción con proteínas tales como PLC- $\gamma$  y Src-quinasas. El extremo C-terminal, conocido como el dominio de unión a microtúbulos, regula la tasa de polimerización de los microtúbulos y está implicado en la unión con las proteínas funcionales, tales como PP2A o PSEN1 [42].

La fosforilación de proteínas es la adición de un grupo fosfato, por esterificación, a uno de los tres aminoácidos diferentes: serina, treonina y tirosina. La fosforilación después de la traducción es la modificación más común de tau, un aumento de la fosforilación de tau reduce su afinidad por los microtúbulos lo que conducen a la desestabilización del citoesqueleto. La fosforilación de la proteína tau afecta su solubilidad, localización, función, interacción con otras proteínas y la susceptibilidad a otras modificaciones postraduccionales. Tau es hiperfosforilada anormalmente en más de 30 sitios en la EA. La fosforilación de tau en Ser-262, Thr-231 y Ser-235 inhibe su unión a microtúbulos un 35, 25 y 10% respectivamente [43].



En condiciones patológicas, como en el caso de EA, la fosforilación anormal de tau disminuye su capacidad de unión a los microtúbulos, lo que no solo conduce a la desorganización de estos, sino también a la autopólimerización en agregados en forma de NFTs [44, 45].



**Figura 4. Tau hiperfosforilada.** Tau hiperfosforilada se disocia de los microtúbulos, haciendo que se despolimericen, mientras que tau se deposita en los agregados tales como NFTs [46].

### 1.5.2. Placas amiloides

Las placas amiloides, que igualmente pueden ser encontradas durante el envejecimiento normal pero en mucha menor cantidad (1,000 veces menos), son también llamadas neuríticas debido a que comúnmente poseen numerosas neuritas distróficas distribuidas hacia la periferia del centro amiloideo. Se encuentran en cerebros de los ancianos normales no dementes, característicamente carecen de componentes neuríticos asociados a la proteína amiloide [47]. Las placas amiloides descritas por Alois Alzheimer se forman por la acumulación anormal extracelular y deposición del péptido  $A\beta$  de 40 o 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



y  $A\beta_{42}$ ), dos bioproductos normales del metabolismo de la APP después de su escisión secuencial por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  en las neuronas [28]. Se han descrito cuatro tipos principales de placas seniles: difusa, primitiva, clásica y quemada (“burned-out”) [48-51].

**Placas difusas:** Las placas difusas son agregados amorfos del péptido  $A\beta$  con apariencia poco demarcada. Están formadas por una delicada red de finas fibrillas de filamentos de amiloide, sin neuritas degeneradas ni zona central de amiloide condensado [19, 52]. Solamente son visibles con técnicas inmunohistoquímicas y se hipotetiza que representa un estado temprano en la formación de las placas amiloides [29]. Este tipo de placas no se consideran para el diagnóstico patológico de EA porque se trata de un hallazgo relativamente común en el cerebro de personas mayores cognitivamente sanas.

**Placas primitivas:** Están compuestas por depósitos extracelulares  $A\beta$  no fibrilar o escasamente fibrilar que las hace insolubles. Tiene una distribución más extensa de lo que se había apreciado inicialmente con tinciones convencionales de amiloide o de plata y son el subtipo más frecuente de placa. Este tipo de deposición temprana de  $A\beta$  se da en ancianos sin clínica de EA y en pacientes con síndrome de Down. Las placas comienzan a aparecer en un neurópilo aparentemente normal y preceden el desarrollo de otros componentes de placa, tales como neuritas distróficas o células gliales reactivas. Por estos motivos las placas primitivas representan los cambios morfológicos más tempranos en la secuencia patogénica de la EA.

**Placas clásicas:** Están presentes en los estadios más avanzados de la enfermedad. Es un foco complejo de degeneración del neurópilo que contiene una región central de amiloide rodeada por astrocitos reactivos, microglía y axones degenerados.

**Placas “burned-out”:** representan el estado terminal de la evolución de una placa particular en la que ha desaparecido el componente celular (no contiene neuritas anómalas asociadas). Sólo contiene una zona central de amiloide condensado [52].

Estos tipos de placas representan diversos estadios de desarrollo, desde la forma de placa difusa, seguidos por estadios de placa primitiva y clásica, hasta la “burned-out”.



### 1.5.2.1. Proteína Precursora de Amiloide (APP)

La APP es una proteína de membrana de tipo I altamente expresada en el cerebro y se concentra en la sinapsis neuronal [53, 54]. APP ha sido implicada en neuroprotección y como un regulador del crecimiento neuronal, interacción célula-célula, célula-matriz y la plasticidad sináptica [55]. Sin embargo, los productos de su escisión de la vía amiloidogénica puede contribuir a la neurotoxicidad. APP comprende un grupo heterogéneo de polipéptidos ubicuos con un peso entre 110-140 kDa [56]. Esta heterogeneidad surge por el corte y empalme alternativo, resultando en tres principales isoformas de 695, 751 y 770 residuos, así como por una variedad de modificaciones postraduccionales, incluyendo glicosilación, sulfatación, y fosforilación. Las isoformas que contienen 751 o 770 aminoácidos se expresan ampliamente en las células no neuronales en todo el cuerpo y también se producen en las neuronas. Sin embargo, las neuronas expresan niveles más altos de la isoforma 695, que se produce en muy baja cantidad en las células no neuronales [57].

APP se puede dividir en tres dominios (Figura 5). El ectodominio de APP se localiza en el espacio extracelular (residuos 18 a 624, sin incluir el péptido señal). El dominio transmembrana hidrofóbico único seguido por un dominio intracelular corto (AICD, residuos 649 a 695).

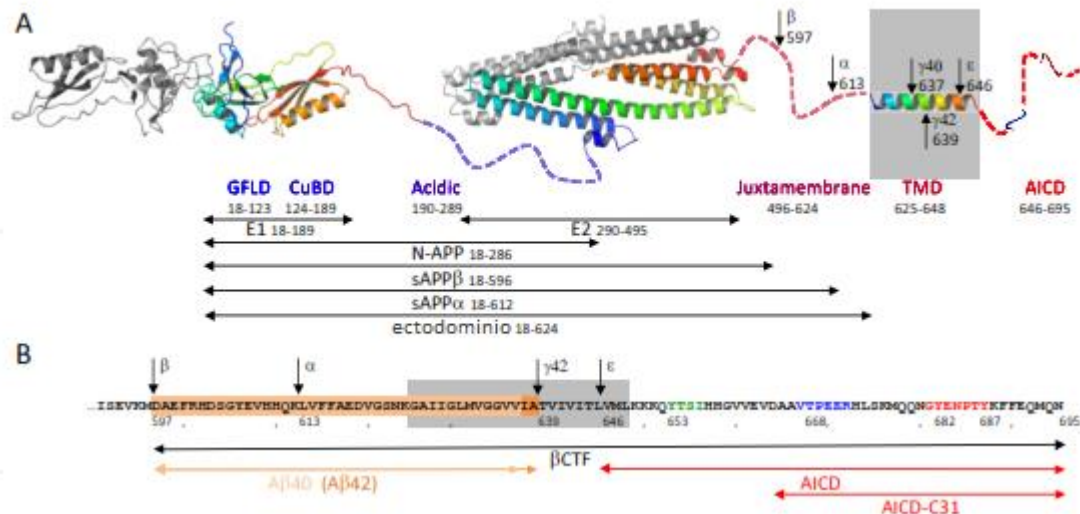
#### 1.5.2.1.1. Gen APP

El gen APP humano, está localizado en el cromosoma 21, el cual contiene al menos 18 exones [58]. Se han identificado más de 25 mutaciones en APP causales de la forma hereditaria de EAF. Estas mutaciones provocan sustituciones de aminoácidos dentro del dominio  $A\beta$ , además la mayoría de las mutaciones que causan EAF incrementan el procesamiento proteolítico de APP, incrementando la producción del péptido  $A\beta$  [54, 59-62]. Por otra parte, duplicaciones del gen APP también provocan EOAD con angiopatía amiloide cerebral.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



APP es miembro de una pequeña familia de genes, que incluye APLP1 y APLP2 (humano), Appl (mosca), y APL-1 (lombriz). Todos codifican para proteínas de membrana tipo I con un gran dominio extracelular y una región citoplásmica corta que se someten a procesamientos similares. Cabe destacar, que sólo APP, pero no cualquiera de los otros genes relacionados con el APP, contiene la secuencia que codifica el dominio  $A\beta$  [53, 54, 63].



**Figura 5. Estructura de APP y de sus fragmentos proteolíticos.** A. Estructura de los dominios de la variante APP695. Dominios con estructuras atómicas conocidas (E1 y E2) y el TMD se muestran en el diagrama de cinta en un código de color azul (N-termina) a rojo (C-terminal). Las líneas discontinuas representan regiones estructuralmente desconocidas. Los sitios de escisión de secretasa y los productos de degradación respectivos están etiquetados. B. secuencia y fragmentos proteolíticos dentro de  $\beta$ CTF. Péptidos  $A\beta$ , el TMD (gris), y las secuencias fingerprints dentro de AICD están en código de color [64].

### 1.5.2.1.2. Mutaciones en APP incrementan la producción del Péptido $A\beta$

Nueve mutaciones conocidas con cambio de sentido en APP han sido vinculadas con la EAF, las cuales aumentan la producción de  $A\beta$ . Una doble mutación en los dos aminoácidos que se encuentran inmediatamente antes del sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa induce aumento de escisión por  $\beta$ -secretasa lo que genera más  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ . Las cinco mutaciones que ocurren en el sitio de escisión de la  $\gamma$ -secretasa en el dominio C-terminal mejoran selectivamente la producción de especies  $A\beta_{42}$ . Las dos mutaciones restantes que se encuentran en el  $A\beta$  podrían mejorar las propiedades de agregación del mismo, aunque esto sólo se ha



demostrado para la mutación E693Q que causa hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch [65]. Otra mutación interna (A692G) conduce a un fenotipo mixto de 1) Placas tipo EA y formación de ovillos asociados con demencia y 2)  $\beta$ -amiloidosis microvascular severa con hemorragia cerebral ocasional [66].

#### 1.5.2.1.3. Tráfico y procesamiento de APP

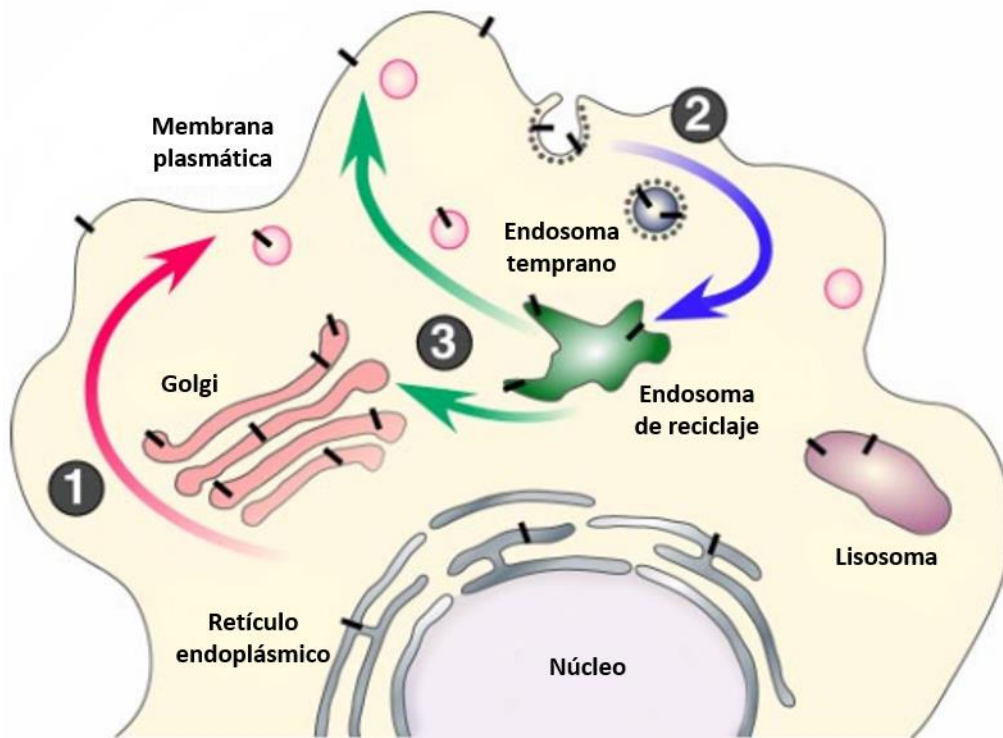
APP es una proteína transmembrana que se transloca cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico (RE) a través de su péptido señal y es modificada por N- y O-glicosilación, fosforilación y sulfatación de tirosina después de la traducción a través de la vía secretora [67]. Después de la clasificación en el RE y aparato de Golgi, APP se entrega al axón, donde es transportada mediante transporte axonal a las terminales sinápticas [68]. Solamente una pequeña fracción de moléculas de APP está presente en la membrana plasmática (se estima un  $\sim$ 10% basada en cultivos celulares con sobreexpresión de APP), mientras que la mayoría del APP en estado estacionario se localiza en el Golgi y TGN.

En células no neuronales APP es internalizado después de minutos de la llegada a la superficie debido a la presencia del motivo de internalización YENPTY cerca del extremo C-terminal (residuos 682-687 de la isoforma 695). Posterior a la endocitosis, APP se entrega a los endosomas, y una fracción de las moléculas de endocitosis se recicla a la superficie celular. Cantidades medibles de APP internalizada también se someten a degradación en el lisosoma (Figura 6) [54].

APP puede ser procesada por al menos tres proteasas denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, las cuales participan en dos vías 1) la vía no amiloidogénica, proceso que no genera el péptido  $A\beta$ ; 2) y la vía amiloidogénica, esta última da como resultado la producción del péptido  $A\beta$  (Figura 7) [54].

**Vía No Amiloidogénica:** Como se puede observar en la figura 7 el dominio  $A\beta$  se extiende por la membrana celular. APP es escindido dentro del dominio  $A\beta$  por la  $\alpha$ -secretasa, liberando un fragmento extracelular ( $\alpha$ -sAPP). La  $\alpha$ -secretasa escinde a APP dentro del dominio  $A\beta$ , previniendo la liberación del polipéptido  $A\beta$  de longitud completa. El fragmento  $\alpha$ -C-terminal

( $\alpha$ -CTF) es escindido por la  $\gamma$ -secretasa en la región transmembrana liberando un fragmento p3 el cual es inofensivo.



**Figura 6. Tráfico intracelular de APP.** Moléculas de APP (barras negras) maduran a través de la vía secretora constitutiva (paso 1). Una vez que APP llega a la superficie celular, es rápidamente internalizada (paso 2) y posteriormente endocitada y reciclada a la superficie celular (paso 3) o degradada en los lisosomas [54].

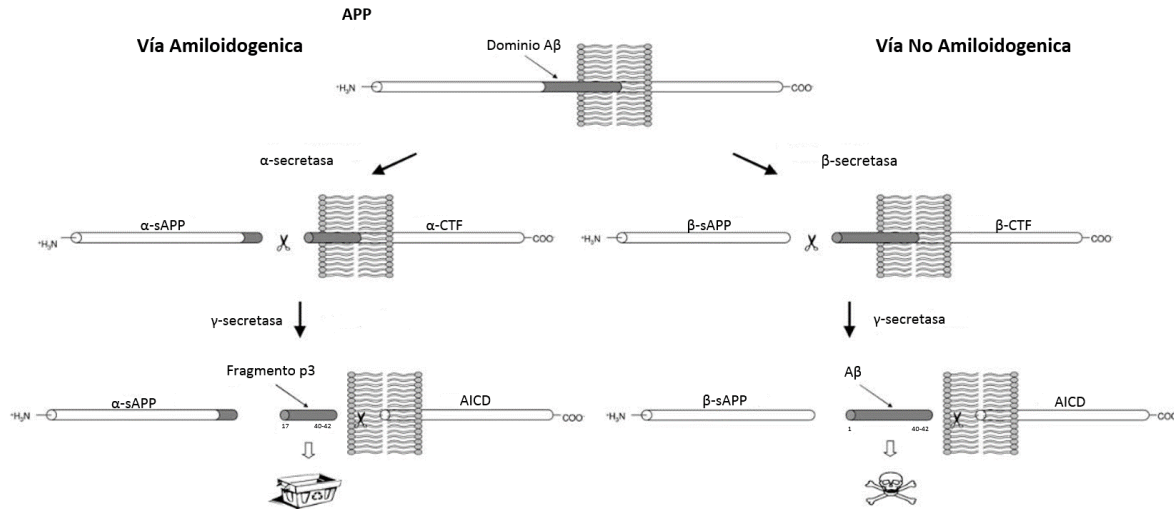
**Vía Amiloidogénica:** En la vía amiloidogénica APP es primero escindida por la  $\beta$ -secretasa, en lugar de la  $\alpha$ -secretasa, en la región N-terminal del dominio  $A\beta$ , liberando un fragmento extracelular  $\beta$ -sAPP. La escisión por la  $\beta$ -secretasa es a lado del dominio  $A\beta$ , adjunta al fragmento  $\beta$ -CTF, el cual, posteriormente es escindido por la  $\gamma$ -secretasa liberando el péptido  $\beta$ -amiloide [69]. Ambas vías están activas en el metabolismo normal. La escisión de APP por la  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa puede producir varias isoformas del péptido  $A\beta$ , de las cuales, las formas de 40 y 42 aminoácidos son las más comunes.

Debido a la identificación del péptido  $A\beta$  en las placas amiloides, y a estudios genéticos que identificaron mutaciones en los genes de APP, PSEN1 y PSEN2 que conducen a la

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



acumulación de  $A\beta$  y EOAD, se formuló la “Hipótesis de la Cascada Amiloide”. De acuerdo a la hipótesis amiloide la deposición del  $A\beta$  es la patología inicial que desencadena la enfermedad, lo que subsecuentemente conduce a la formación de NFTs, muerte neuronal y demencia [70].



**Figura 7. Metabolismo de la Proteína Precursora de Amiloide (APP).** La escisión de APP se lleva a cabo a través de la competencia de  $\alpha$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa, que liberan fragmentos extracelulares solubles ( $\alpha$ -sAPP y  $\beta$ -sAPP). La escisión de la APP por  $\alpha$ -secretasa tiene lugar en la región de  $A\beta$ , evitando así la liberación de la longitud completa  $A\beta$ ; la escisión del fragmento resultante C-terminal ( $\alpha$ -CTF) por la  $\gamma$ -secretasa libera un fragmento p3 inofensivo. Por el contrario, la escisión de la APP por la  $\beta$ -secretasa sale de la región  $A\beta$  unido al fragmento C-terminal ( $\beta$ -CTF); la posterior escisión por  $\gamma$ -secretasa libera diversas isoformas del péptido  $A\beta$  [29].

### 1.5.3. Hipótesis de la Cascada Amiloide

Como ya se mencionó, dos observaciones clave resultaron en la formulación de la Hipótesis de la Cascada Amiloide (HCA). Primero, la detección del  $A\beta$  como el principal componente de las placas amiloides [71] y segundo, mutaciones de los genes APP [72], PSEN1, y PSEN2, las cuales se encontraron en familias con EOAD (EAF) [73, 74]. Como consecuencia de estas observaciones, la presencia del  $A\beta$  en las placas amiloides se interpretó como un efecto de estas mutaciones que subsecuentemente conducen a la muerte celular y demencia [70].

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

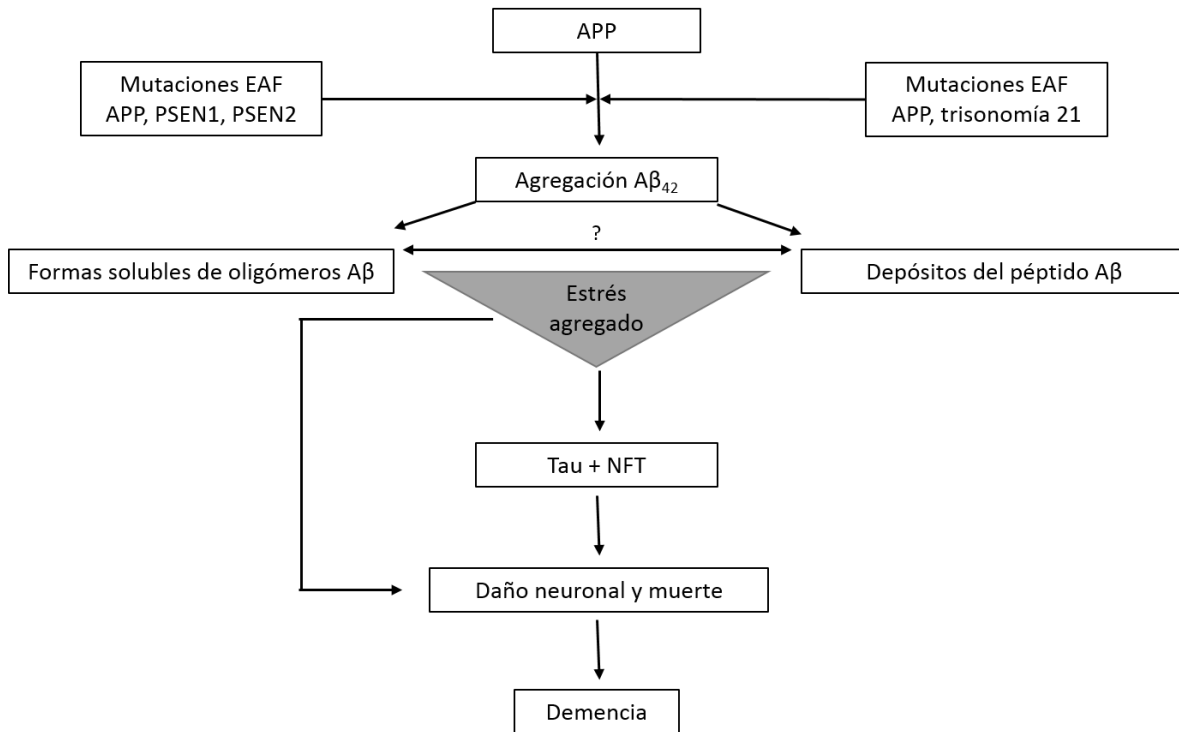


Figura 8. Hipótesis de la Cascada Amiloide [70]

### 1.5.4. Péptido $\beta$ -Amiloide

El  $A\beta$  es un péptido de 4kDa, como ya se mencionó anteriormente el péptido  $A\beta$  se origina de la proteólisis de la APP por la acción secuencial de las enzimas  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa y su generación está relacionada con la patogénesis de la EA [75]. Debido a que la  $\gamma$ -secretasa corta sus sustratos en varias posiciones muy cercanas, el péptido  $A\beta$  es en realidad un grupo de péptidos que difieren en longitud en su extremo C-terminal. Los péptidos  $A\beta$  son productos naturales del metabolismo, y consisten de 36 a 43 aminoácidos [5]. La especie predominante producida es  $A\beta_{40}$ . Una cantidad traza de  $A\beta_{42}$  es producida en un proporción de aproximadamente 99 a 1 [76].

*In vivo*,  $A\beta$  es liberado como un péptido monomérico [77, 78], pero durante el envejecimiento normal o como resultado de un proceso de la enfermedad,  $A\beta$  se agrega en fibras que precipitan como placas en el parénquima cerebral. Este proceso se incrementa por un desbalance entre la producción, la eliminación y la agregación de los péptidos, un aumento en la concentración del péptido, alteración del pH, entre otros. Estudios *in vitro*





han demostrado que  $A\beta$  sintético puede agregarse espontáneamente en múltiples formas que contienen láminas- $\beta$  [79-81]. Estas fibrillas  $A\beta$  pueden inducir distrofia neurítica [82-84] y la degeneración celular inducida por  $A\beta$  se produce debido a la estimulación de señales celulares inadecuadas [85-87].

#### 1.5.4.1. Papel fisiológico del péptido $A\beta$

A pesar del papel aparentemente negativo que presenta el  $A\beta$  en la EA, este péptido participa, de una forma que no ha sido explicada con exactitud en varias funciones celulares normales, por ejemplo:

- En concentraciones fisiológicas puede actuar como factor neurotrófico y neuroprotector [88, 89].
- Se ha planteado que es regulador fisiológico de la función de canales iónicos ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) en neuronas [90, 91] y que es secretado por algunas de estas células en respuesta a la actividad neuronal para regular negativamente la transmisión sináptica excitatoria [92].
- Se ha propuesto que los depósitos de  $A\beta$  pueden atrapar iones metálicos potencialmente peligrosos [93, 94].
- Concentraciones nanomolares del péptido pueden bloquear la apoptosis neuronal provocada por la ausencia de factores tróficos [95].

El  $A\beta$  posee una alta afinidad por  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  y también puede catalizar la dismutación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) a  $H_2O_2$ , actuando entonces como antioxidante [96, 97].

Algunos grupos de estudio han mostrado que el número de placas de  $A\beta$  en la corteza cerebral están correlacionadas inversamente con el estrés oxidativo [98, 99], por lo que cuando la concentración del  $A\beta$  se incrementa, el daño citoplasmático disminuye.

Sin embargo, a pesar de que se han aislado oligómeros solubles del  $A\beta$  tanto de cerebros normales como de cerebros afectados por la EA [100]; los niveles del péptido soluble suelen ser mayores en pacientes con esta enfermedad que en sujetos sanos, siendo mayor la

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



proporción del péptido 1-42 que la del péptido 1-40 [101]. El péptido 1-42 es menos soluble que las otras isoformas del péptido, desarrolla fibrillas mucho más rápido [102] y promueve la agregación de formas más pequeñas como la 1-40.

Varias líneas de evidencia sugieren que  $A\beta$  regula la actividad sináptica neuronal y que su acumulación en el cerebro causa una intrigante combinación de actividades aberrantes en la red neuronal y disminución sináptica [103]. La actividad neuronal aberrante puede desencadenar un ciclo vicioso aumentando la producción de  $A\beta$ , la cual es regulada, al menos en parte, por la actividad neuronal [104].

### 1.5.4.2. Agregación

Los agregados proteicos o “*amiloides*” se componen de diferentes proteínas, sin embargo, estas estructuras son similares desde el punto de vista morfológico y bioquímico.

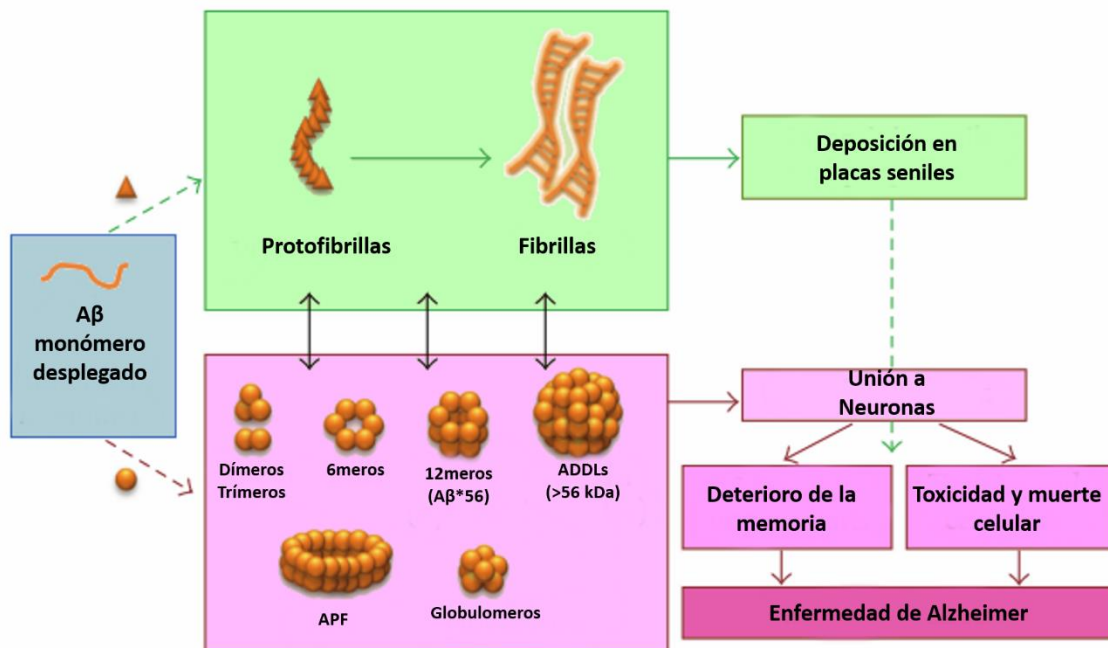
Desde un enfoque estructural, las proteínas presentes en este tipo de organizaciones se caracterizan por tener plegamiento del tipo  $\beta$ , favoreciendo la hidrofobicidad y la agregación en estructuras específicas denominadas hoja  $\beta$ -plegada [105]. Esta disposición conformacional, confiere a las proteínas resistencia a proteólisis, desnaturalización y a mecanismos generales de eliminación presentes en la célula. La formación de agregados del péptido  $A\beta$  es acompañada de una transición estructural desde una conformación de  $\alpha$ -hélice a hojas- $\beta$ . Uno de los modelos más aceptados para la formación de estructuras amiloidogénicas es el de nucleación-polimerización [106]. Este modelo propone una cinética particular de forma sigmoide definida por dos fases. La primera de ellas, denominada fase de retardo o *lag phase*, involucra los primeros eventos de formación de “núcleos” o “semillas” de polimerización a expensas de intermediarios solubles. La formación de estas pequeñas estructuras oligoméricas da paso a la segunda fase en este proceso (o fase exponencial), donde el reclutamiento exponencial de nuevas unidades a los agregados previamente formados, resulta en una gran carga de estructuras amiloides, las cuales se distribuyen en un amplio espectro de organizaciones como pequeños oligómeros, protofibras, fibras y, en algunos casos, placas amiloides.

A pesar de la relación existente entre este tipo de agregados y el desarrollo de la enfermedad, los mecanismos por los que se produce el típico daño celular en esta patología son un tema controvertido. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los oligómeros solubles serían las especies más tóxicas [107].

### 1.5.4.3. Oligomerización

Los amiloides insolubles no son los únicos productos de la agregación del péptido  $A\beta$ . Aparte de las fibrillas, el péptido se convierte fácilmente en diversos estados oligoméricos, los cuales son los candidatos más confiables para inducir los síntomas tempranos en la EA, así como el deterioro de la transmisión neuronal [108, 109].

Durante la fase de nucleación, monómeros solubles  $A\beta$  se asocian en forma de diferentes tipos de oligómeros no fibrilares, desde oligómeros de bajo peso molecular tales como dímeros o trímeros a grandes combinaciones globulares compuestas por cientos de monómeros y formas pre-fibrilares en las que grandes oligómeros se empiezan a combinar para formar fibrillas (Figura 9).



## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



**Figura 9. Los oligómeros  $A\beta$  son los ensamblajes neurotóxicos clave en la EA.** La forma nativa del péptido  $A\beta$  es de un monómero desplegado. Sin embargo, en respuesta a varios estímulos, incluyendo la concentración elevada, el  $A\beta$  se somete a cambios conformacionales complejos para formar oligómeros intermedios o fibrillas competentes. Se pueden formar una variedad de oligómeros, que pueden incluir formas de bajo peso molecular (dímeros y trímeros), globulómeros, hexámeros o dodecameros ( $A\beta^{*56}$ ), especies de alto peso molecular tales como Ligandos difusibles de amiloide (ADDLs) y protofibrillas anulares (APFs). Algunos oligómeros son estables, pero otros siguen sufriendo cambios conformacionales y agregación para formar protofibrillas y fibrillas. Las fibrillas  $A\beta$  son insolubles y se depositan dentro de las placas seniles. Los oligómeros  $A\beta$  son solubles y representan la especie neurotóxica en la EA [107].

A continuación se mencionan algunas características de estos oligómeros:

**Dímeros:** Los dímeros  $A\beta$  probablemente son la especie oligomérica más estudiada. Son estables en SDS, los niveles en el cerebro son elevados en modelos de ratón con EA y en sujetos con EA.

En modelos animales de EA tales como Tg2576 y J20, se pueden encontrar dímeros en extractos de proteínas solubles a los 10-12 y 10-14 meses de edad, respectivamente. Curiosamente, estas edades corresponden a la deposición de las placas amiloides en zonas corticales, lo que sugiere que los dímeros  $A\beta$  y las fibrillas  $A\beta$  están relacionadas entre sí.

En estudios en humanos, aparentemente los dímeros sólo se encontraron en cerebros de sujetos con EA.

**Trímeros:** Los trímeros son la especie más abundante producida y secretada por neuronas en cultivo. Es posible que esta preferencia se deba al requerimiento de menor energía para formar trímeros o a la ausencia de una proteína chaperona "X" que permite la conversión a dímeros. Los trímeros se han encontrado en tejido cerebral de Tg2576 desde el día embrionario 14 y persisten durante toda la vida. En humanos los trímeros se han encontrado desde el primer año de edad, en contraste con los dímeros los cuales no se detectan en sujetos hasta los 50-60 años de edad.

Es importante destacar que cuando se comparan las líneas Tg5469 y Tg2576, las cuales expresan cantidades iguales de APP humana pero muy diferentes niveles de  $A\beta$  debido a la

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



presencia de la mutación Swedish en la última línea, los trímeros no pudieron observarse fácilmente en cerebros de Tg5469. Esto sugiere que la formación de trímeros *in vivo* parece depender de los niveles de producción de  $A\beta$ . Los hallazgos sugieren que los trímeros son las primeras especies oligoméricas producidas y secretadas por las neuronas.

**$A\beta^{*56}$ :** El descubrimiento de  $A\beta^{*56}$  derivó de la observación del deterioro cognitivo en Tg2576, el cual inicia a los 6 meses de edad, cuando  $A\beta^{*56}$  aparece por primera vez [110, 111].

Contrario a los dímeros y trímeros, los cuales pueden ser detectados *in vitro*,  $A\beta^{*56}$  no se detecta en extractos de proteínas celulares de neuronas cultivadas o en medio condicionado indicando que no se producen ni secretan por neuronas primarias. Este hallazgo sugiere que este ensamble requiere de un co-factor "X", presente en tejido cerebral, para promover su formación. Además, el envejecimiento debe regular la expresión de este co-factor "X" explicando la acumulación repentina de  $A\beta^{*56}$  en cerebro de Tg2576 de 6 meses de edad.

**ADDLs:** se sabe que son un potente inhibidor de la potenciación a largo plazo (LTP), la cual es una intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas que resulta de la estimulación sincrónica de ambas. Se han relacionado con pérdida de la sinapsis y la falta de memoria en modelos transgénicos de ratón con EA.

**Globulómeros:** alteran la función mitocondrial e inhiben los canales de calcio presinápticos P/Q.

**Protofibrillas anulares (APFs):** alteran la capacidad neuronal, bloquean *in vitro* la LTP, causan pérdida de memoria y fomentan la fosforilación de Tau [110, 111].

### 1.5.4.4. Efecto de la secuencia del péptido $A\beta$ sobre su agregación y citotoxicidad

La agregación y toxicidad del péptido  $A\beta$  está altamente correlacionada con su secuencia y estructura [112, 113]. El efecto de la secuencia del péptido en su agregación y toxicidad se ha estudiado usando diferentes fragmentos  $A\beta$  o péptidos  $A\beta$  truncados [114]. En general,

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



se ha identificado a los residuos 17-21, 30-35 y 41-42 como regiones importantes para la agregación y neurotoxicidad [113, 115].

Se sabe que mutaciones dentro de la secuencia del péptido afectan su agregación. Existen “variantes de secuencia aminoacídica” que representan mutaciones patogénicas asociadas a la EAF, las cuales generalmente resultan en acumulaciones amiloides masivas en el cerebro [65]. De las mutaciones relacionadas con EAF, la variante Flemish (A21G) se caracteriza por una menor propensión a formar agregados [116]. En contraste, las variantes Dutch (E22Q), Arctic (E22G), Italian (E22K), y Iowa (D23N) conducen a una formación acelerada de protofibrillas [116, 117].

Se ha reportado que una sola mutación de Ala del  $A\beta$  causa diferencias en la estabilidad estructural del péptido, sin inhibir la agregación por completo [118]. Por lo que se han producido mutantes sintéticas con el fin de identificar residuos clave que afecten la agregación y citotoxicidad del péptido. Gracias a ello se han reportado mutantes tales como L17A y F19A, las cuales reducen la agregación y citotoxicidad no solo del péptido  $A\beta$ wt, sino también de mutantes relaciones con EAF como Artic [119, 120].

Los efectos patogénicos del  $A\beta$  se han atribuido al tramo hidrofóbico C-terminal de 14 aminoácidos, la cual se ha pensado es la semilla de la agregación [106]. Dentro de esta región, tres motivos de repetición GxxxG que abarca los residuos G25 a G37 promueve la agregación del péptido independientemente de la identidad de los residuos hidrofóbicos en la posición “x” [121].

La sustitución de G33 o G37 por leucinas previene la fibrilación del péptido  $A\beta_{1-40}$  y desestabiliza la estructura fibrilar [122]. De forma similar, fue descrito que la sustitución de glicina por leucina de péptidos sintéticos decrecen los niveles de dímeros y trímeros en solución y causa una reducción de la toxicidad [122, 123].

Otro residuo muy importante relacionado con la neurotoxicidad del péptido es la Metionina 35, el cual se ha implicado en el estrés oxidativo causado por la EA. Existen datos contradictorios con respecto al papel de la Met35 en la neurotoxicidad del  $A\beta$ , diversas investigaciones sugieren que es de suma importancia en la química redox del mismo [124].

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



La sustitución de Met35 por valina incrementa la toxicidad del péptido comparada con el péptido silvestre, mientras que un residuo que no sea isoleucina o cisteína la disminuye [125].

### 1.5.4.5. Péptido $A\beta_{25-35}$

La síntesis de grandes péptidos, especialmente péptidos con capacidad de agregarse, es costosa y difícil. En consecuencia, una dirección importante para estudiar la formación amiloide ha surgido a partir de la utilización de fragmentos de péptidos [126].

El péptido  $A\beta_{25-35}$  es el péptido más corto que retiene su actividad biológica comparada con el péptido de longitud completa  $A\beta_{1-42}$  [127, 128]. Además, el  $A\beta_{25-35}$  está presente en las placas seniles y en neuronas dañadas del hipocampo en cerebro de pacientes con EA, pero no en sujetos control emparejados por edad. Ciertas formas de  $A\beta_{1-40}$  pueden ser convertidas a  $A\beta_{25-35}$  por proteasas del cerebro [129].

La estructura del fragmento 25-35 determina la alta toxicidad de los péptidos anormales. Debido a estas características, el  $A\beta_{25-35}$  es utilizado con frecuencia en los laboratorios para sustituir al péptido de longitud completa  $A\beta_{1-42}$  en los ensayos de agregación y citotoxicidad [130].



## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo y la forma más frecuente de demencia senil. Con el incremento en la esperanza de vida, la prevalencia de demencia aumentará a nivel mundial, por lo que representa un desafío cada vez mayor para la salud pública.

Hasta ahora, diversos estudios han propuesto a la hipótesis amiloide como la causa etiológica de la enfermedad. Por lo anterior, prevenir el ensamble del péptido  $A\beta$  en oligómeros tóxicos o fibrillas es el objetivo principal de diversas estrategias terapéuticas.

Es por eso que el presente trabajo pretende identificar regiones clave para la citotoxicidad y agregación del péptido las cuales puedan ser blanco de fármacos o emplearse para evitar la agregación de los mismos.

### HIPOTESIS

Las mutantes  $A\beta(K28A)$ ,  $A\beta(A30W)$  y  $A\beta(M35C)$  tienen un distinto patrón de formación de agregados y citotoxicidad con respecto al  $A\beta_{wt}$  e influyen en su cinética de agregación.





### CAPÍTULO III

#### OBJETIVOS

##### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la agregación y citotoxicidad del péptido  $A\beta$  y sus mutantes.

##### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las cinéticas de agregación de los péptidos silvestres y mutantes.
2. Determinar el efecto que ejercen los péptidos mutantes en la agregación de los péptidos silvestres.
3. Determinar el peso molecular de los agregados amiloides.
4. Determinar la citotoxicidad de los péptidos amiloides.



## CAPÍTULO IV

### MATERIALES

#### 4.1. REACTIVOS

##### 4.1.1. Solubilización del péptido A $\beta$

- Agua milliQ
- NaOH (Sigma Aldrich)

##### 4.1.2. Cinéticas de agregación

- PBS 1x
- Tioflavina T (ThT) (Sigma Aldrich)
- 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS)

##### 4.1.3. Tricina-SDS-PAGE y Western blot (WB)

###### Reactivos para geles de poliacrilamida:

- Acrilamida (SIGMA)
- N-N metilen-Bis acrilamida (SIGMA)
- Tris-Base (Amresco)
- Tricina (BioRad)
- SDS (Bio-Rad)
- Buffer Tris-HCL 2.5M pH8.8
- PSA (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- Protein Dual Color Standards (Bio-Rad)
- $\beta$ -mercaptoeranol (Bio-Rad)
- Azul de Coomassie (SIGMA)

###### Reactivos para Western blot:

- Metanol (J.T. Baker)

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



- Leche en polvo sin grasa (BioRad 170-6404)
- Glicina (Amresco)
- PBS 1X
- Tween 20 (Bio-Rad)
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Bio-Rad)
- Anticuerpo IgG anti  $A\beta_{25-35}$  de conejo (GenScript A00687-40)
- Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con HRP (GenScript A00098)
- Luminol para WB (Santa Cruz biotechnology, Inc)

### 4.1.4. Cultivo y viabilidad celular

- ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega)

#### Todos los reactivos de la marca Invitrogen-Gibco

- Aminoácidos no esenciales (10mM 100X)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM)
- L-Glutamina (200mM 100X)
- Suero Bovino Fetal (FBS)
- Tripsina –EDTA (0.25%)
- Solución de antibiótico-penicilina-estreptomicina (100 UI/ml de penicilina G de sodio y 100  $\mu$ l/ml de sulfato de estreptomicina)
- Azul de Tripano (0.4%) (Gibco)

## 4.2. MATERIALES

### 4.2.1. Materiales de uso general

- Micropipetas automáticas (Bio Pet) de volumen variable:  
0.5-10  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l
- Puntillas para micropipetas
- Tubos eppendorf de 0.2, 0.6 y 2 ml



#### 4.2.2. Cinéticas de agregación

- Tubos Falcon de 50 ml
- Microplacas de 96 pozos negras

#### 4.2.3. TRICINA-SDS-PAGE, Western blot

- Cámara de electroforesis vertical y para electrotransferencia en condiciones humedad (Bio-Rad)
- Membranas de PVDF de 0.45 $\mu$  (General Electric)

#### 4.2.4. Cultivo celular

- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10 ml (Corning)
- Placas Petri de 100 x 15 mm (Corning)
- Placas de 96 pozos, tratadas, estériles, de fondo transparente (Corning)
- Crioviales de 1.5 ml (Corning)
- Cámara de Neubauer (Baxter Scientific Products)
- Pipetas Pasteur (Corning)

#### 4.2.5. Material biológico.

- Línea celular C-6 Glioblastoma de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).
- Péptidos

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



Tabla 2. Lista de péptidos  $A\beta$  y secuencia de aminoácidos

Péptido $A\beta$	Secuencia de aminoácidos	Marca
$A\beta_{35-25}$	MLGIIAGKNSG	GenScript
$A\beta_{25-35}$ wt	GSNKGAIIGLM	GenScript
$A\beta_{25-35}(K28A)$	GSNAGAIIGLM	GenScript
$A\beta_{25-35}(A30W)$	GSNKGWIIGLM	GenScript
$A\beta_{25-35}(M35C)$	GSNKGAIIGLC	GenScript
$A\beta_{1-40}$ wt	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGVV	GenScript
$A\beta_{1-40}(K28A)$	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNAGAIIGLMVGGVV	GenScript
$A\beta_{1-40}(A30W)$	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGWIIGLMVGGVV	GenScript
$A\beta_{1-40}(M35C)$	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLCVGGVV	GenScript

#### 4.3. EQUIPOS

##### 4.3.1. Equipo de uso general

- Vortex Genie

##### 4.3.2. Solubilización y cinéticas del péptido

- Sonicator ultrasonic processor
- Baño de agua
- GloMax<sup>®</sup>-Multi Detection System (Promega)



#### 4.3.3. Cultivo celular

- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuair)
- Incubadora con agitación MaxQ4000 (Thermo Scientific)
- Incubadora de CO<sub>2</sub> (Nuair)
- Microscopio óptico invertido Olympus CKX41
- Baño de agua Precision180

## CAPÍTULO V

### MÉTODOS

#### ESTRATEGIA GENERAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente proyecto de tesis, se realizó la siguiente estrategia general (Figura 10).

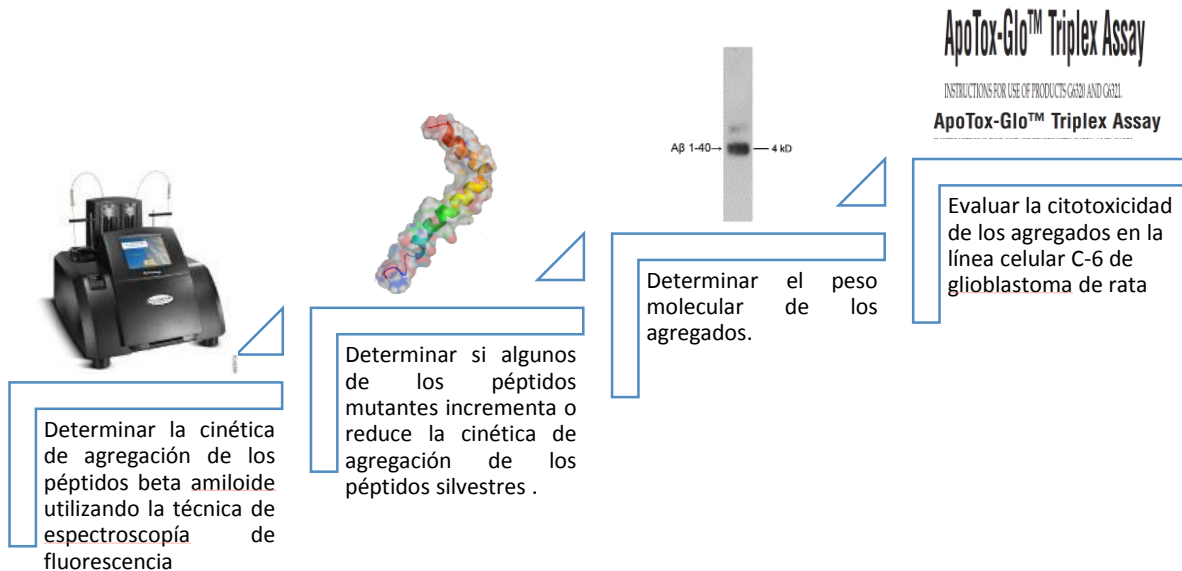


Figura 10. Estrategia general del proyecto.

#### 5.1. Solubilización del péptido $A\beta$

1. En campana de flujo laminar, a un vial con 1 mg del péptido liofilizado, se le adicionó con jeringa de insulina 200  $\mu$ l de NaOH 2mM y 300  $\mu$ l de agua miliQ.
2. Se sonicó en baño de agua durante 15 minutos. Después se adicionaron 500  $\mu$ l de agua miliQ.
3. Finalmente, se hicieron alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos Eppendorf de 0.2 ml, se etiquetaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



## 5.2. Cinéticas de agregación de cada péptido

### 5.2.1. En presencia de Tioflavina T

1. Los péptidos se diluyeron en PBS a una concentración de 10  $\mu$ M.
2. Se incubaron a 37°C en un periodo de 0 a 48 h. Pasado este tiempo se agregó Tioflavina T (ThT) a una concentración de 20  $\mu$ M, y se incubó en oscuridad por 2.30 minutos.
3. Se leyó la fluorescencia por triplicado a una longitud de onda de 405 nm de excitación y un rango de 495-505 nm de emisión.

La técnica se basa en el aumento de la fluorescencia de la ThT cuando ésta se intercala en las hojas beta de los agregados, por lo que el aumento de la fluorescencia se relaciona con la agregación del péptido en forma de agregados amiloides.

### 5.2.2. En presencia de 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS)

1. Los péptidos se diluyeron en PBS a una concentración de 10  $\mu$ M.
2. Se incubaron a 37°C en un periodo de 0 a 48 h. Pasado este tiempo se agregó ANS a una concentración de 50  $\mu$ M, y se incubó 2.30 min en oscuridad.
3. Se leyó la fluorescencia por triplicado a una longitud de onda de 365 nm de excitación y un rango de 410-460 nm de emisión.

La técnica se basa en la capacidad del ANS de unirse a sitios hidrofóbicos expuestos de las proteínas lo que aumenta su fluorescencia indicando la formación de agregados sin orden de tipo no amiloide.

## 5.3. Cinética de agregación de los péptidos wt en combinación de los péptidos mutados

### 5.3.1. En presencia de ThT

1. Los péptidos mutados se preincubaron a una concentración de 10  $\mu$ M a 37°C durante 48h.
2. Una vez que se cumplió el tiempo, se mezclaron con el péptido wt en una relación de 25:1 (wt:mutante).





3. Se incubaron a 37°C en un periodo de 0 a 48 h.
4. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se agregó ThT a una concentración de 20  $\mu$ M, se incubó 2.30 min en oscuridad, y se leyó la fluorescencia por triplicado a una longitud de onda de 405 nm de excitación y un rango de 495-505 nm de emisión.

#### 5.4. Western-blot (WB)

##### 5.4.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (TRICINA-SDS-PAGE)

1. Se incubaron 3.5  $\mu$ g de los péptidos silvestres y mutantes durante 48h a 37°C. Para las mezclas se preincubaron 3.5  $\mu$ g de los péptidos mutantes, posteriormente se mezclaron con los péptidos silvestres en una relación de 25:1 (2.2  $\mu$ g: 0.09  $\mu$ g, silvestre:mutante) y se incubaron a 37°C durante 48h.
2. Se prepararon minigeles de poliacrilamida al 15% de un grosor de 0.75 mm (ver anexos).
3. Se adicionó en cada pozo el péptido con buffer de carga en una relación de 1:1.
4. Se realizó el corrimiento electroforético a 80 V durante 30 min y después a 100 V durante 3 h.

##### 5.4.2. Electrotransferencia

1. Se recortó la membrana Hybond-P PVDF (General Electric) con dimensiones de 6x8 cm y se sumergió en metanol al 100 % por 30 seg.
2. Se colocó la membrana PVDF, dos esponjas y cuatro piezas de papel filtro en buffer de transferencia por 5 min.
3. Después de la electroforesis se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se desechó el gel concentrador.
4. Se abrió el casete de transferencia y se preparó el sándwich de transferencia partiendo del panel negro con cuidado de remover las burbujas de aire:
  - a. Una esponja
  - b. Dos papel filtro
  - c. Gel poliacrilamida



- d. Dos papel filtro
- e. Una esponja
5. Se cerró el casete de transferencia y se insertó en la cámara de electroforesis.
6. Se insertó la unidad de refrigeración y se llenó con el buffer de transferencia.
7. La transferencia se llevó a cabo durante 2h a 100 V a 4°C.

#### 5.4.3. Bloqueo e incubación

1. La membrana se incubó con buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación.
2. Después se realizaron 4 lavados con Buffer de lavado durante 5 min por cada lavado en agitación.
3. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario IgG de conejo anti  $A\beta_{25-35}$  (1:1000) por 10 h a 4°C en agitación.
4. Se lavó la membrana 4 veces con buffer de lavado durante 5 minutos por cada lavado en agitación.
5. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con HRP, 1:1000) durante toda la noche a 4°C en agitación.
6. La membrana se lavó 4 veces con buffer de lavado durante 5 minutos por cada lavado en agitación.
7. Por último, se llevó a cabo el ensayo de quimioluminiscencia:
  - a. Primero se secó el excedente del buffer de lavado y se humedeció la membrana en las soluciones de luminol para revelar.
  - b. Se mezcló durante 1 min y se reveló en el ChemiDoc<sup>TM</sup> (Bio-Rad).

#### 5.5. Viabilidad, citotoxicidad y apoptosis

##### 5.5.1. Cultivo de células C6 glioma de rata

1. Se descongeló a temperatura ambiente un vial con células C6 de glioma de rata almacenadas a -80°C.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



2. Se adicionó 1ml del vial de células C6 a una caja Petri de 100 x 15 mm conteniendo 10 ml de medio DMEM advanced con 10% de SBF y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al obtener una confluencia celular de 85 al 90%, se realizó un subcultivo.
3. Se recuperaron todas las células utilizando una solución de tripsina-EDTA (para despegar las células de las placas) por 5 minutos y se neutralizó la reacción con DMEM-FBS al 10%. Las células se cuantificaron con azul de tripano en cámara de Neubauer.
4. Conteo celular:
  - a. En un tubo Eppendorf de 0.6 ml, se hizo una dilución 1:8 de células en medio de cultivo. Por lo tanto, se adicionaron 60  $\mu$ l de medio más 10  $\mu$ l de las células.
  - b. Se agregaron 10  $\mu$ l de azul de tripano al 0.4%, mezcló y colocó el volumen necesario en cámara de Neubauer para realizar el conteo celular.
  - c. Se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas, se obtuvo el promedio del número de células contadas en los cuadrantes, y multiplicó de acuerdo a la siguiente formula:  
$$\# \text{ de Células/ml} = \text{Promedio de células} \times 8 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$
5. Finalmente, se sembraron 15,000 células por pozo en placas negras de 96 pozos y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.5.2. Ensayo de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de los péptidos A $\beta$ en células C6 de glioma de rata

Para medir la viabilidad, citotoxicidad y apoptosis se utilizó el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay de Promega. El kit combina tres ensayos químicos (viabilidad, citotoxicidad y apoptosis) en un solo ensayo. La primera parte del ensayo mide simultáneamente dos actividades de proteasa; una es un marcador de viabilidad celular y la otra es un marcador de citotoxicidad. La actividad de proteasas de células vivas está restringida a células vivas intactas y es medida usando un fluorógeno, permeable, substrato peptídico (glicilfenilalanil-aminofluorocoumarin; GF-AFC). El substrato entra a las células intactas, donde es escindido

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



por proteasas de células vivas para generar una señal de fluorescencia proporcional al número de células vivas. Estas proteasas se inactivan una vez que las células pierden la integridad de su membrana. Un segundo fluorógeno sustrato peptídico impermeable (bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina 110; bis-AAF-R110) es usado para medir la actividad de proteasas de células muertas, las cuales son liberadas desde las células que pierden la integridad de su membrana. Debido a que el bis-AAF-R110 es impermeable, no es escindido por células vivas. Los sustratos GF-AFC y bis-AAF-R110 tienen diferentes espectros de excitación y emisión, por lo que pueden ser detectados simultáneamente.

La segunda parte del ensayo usa el Caspase-Glo® Assay Technology proporcionando un sustrato de caspasa-3/7 luminógeno, el cual contiene el tetrapéptido DEVD, adicionando el reactivo bajo las condiciones establecidas por el fabricante, el sustrato será escindido por caspasas generando una señal de luminiscencia, la cual es proporcional a la actividad de caspasas presente.

1. Se sembraron 15,000 células por pozo en placas negras de 96 pozos y se les adicionaron 100  $\mu$ l de medio DMEM advanced al 10% de SBF.
2. Se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
3. Después, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100  $\mu$ l de medio con o sin péptido A $\beta$  (tabla 3) y de forma independiente albúmina y el péptido antisentido A $\beta$ <sub>35-25</sub> ambos a una concentración de 40  $\mu$ M. Esto se realizó por triplicado.
4. Se incubó durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
5. Se adicionaron 20  $\mu$ l del reactivo de viabilidad/citotoxicidad que contiene los sustratos GF-AFC y bis-AAF-R110 a cada pozo y se mezcló por 30 seg a 500 rpm.
6. Se incubó por 30 min a 37°C.
7. Una vez concluido el tiempo de incubación se midió la fluorescencia a las siguientes longitudes de onda:
  - a. 400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub> (viabilidad)
  - b. 485<sub>Ex</sub>/520<sub>Em</sub> (citotoxicidad)

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



8. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 a cada pozo, y se mezcló por 30 seg a 500rpm.
9. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
10. Finalmente, se midió la luminiscencia (activación de caspasas, un marcador de apoptosis).
11. El blanco de la reacción fueron células sin tratamiento.
12. Se graficaron los resultados obtenidos en Excel y en la gráfica se colocó en el eje de las abscisas el compuesto a evaluar y en el eje de las ordenadas el porcentaje de viabilidad (para el ensayo de viabilidad), las intensidad de fluorescencia (URF- para el ensayo de citotoxicidad) y la luminiscencia (URL-para el ensayo de apoptosis).

Tabla 3. Tratamientos

Tratamiento	
Blanco	Células sin tratamiento
Control protéico	BSA
T1	A $\beta$ <sub>25-35</sub> wt
T2	A $\beta$ <sub>25-35</sub> (K28A)
T3	A $\beta$ <sub>25-35</sub> (A30W)
T4	A $\beta$ <sub>25-35</sub> (M35C)
T5	A $\beta$ <sub>1-40</sub> (K28A)
T6	A $\beta$ <sub>1-40</sub> (A30W)
T7	A $\beta$ <sub>1-40</sub> (M35C)

\*Todos los tratamientos se utilizaron a una concentración de 40  $\mu$ M.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Cinética de agregación de cada péptido

6.1.1. En presencia de ThT

Se investigaron las cinéticas de agregación de los péptidos  $A\beta_{25-35}$ wt y  $A\beta_{1-40}$ wt y de las mutantes  $A\beta$ (K28A),  $A\beta$ (A30W) y  $A\beta$ (M35C) usando el ensayo de unión a ThT, las cinéticas se muestran en la figura 11. El péptido silvestre  $A\beta_{25-35}$  presentó una mayor cinética de agregación en comparación con las mutantes, mientras la mutante  $A\beta_{25-35}$ (A30W) presenta la menor cinética de agregación. En la figura 11 se puede observar al péptido antisentido  $A\beta_{35-25}$  el cual no mostró un aumento en la fluorescencia de ThT, por lo que no se observa agregación, comprobando que para que un péptido forme agregados beta éste debe de tener cierta secuencia y características.

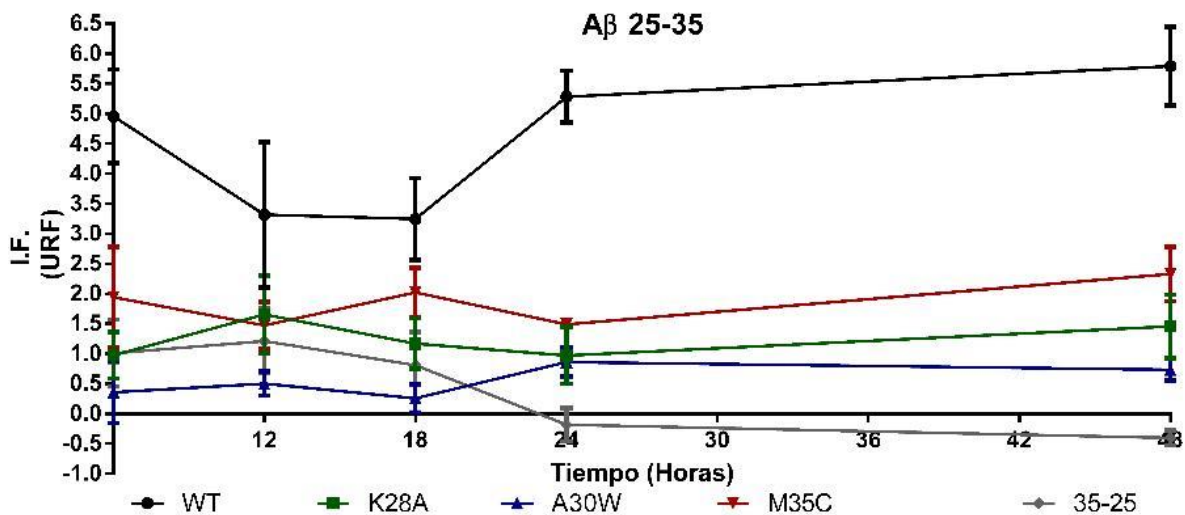


Figura 11. Cinéticas de agregación de los péptidos  $A\beta_{25-35}$  en presencia de ThT. El péptido  $A\beta_{25-35}$ wt presentó una cinética de agregación mayor comparado con las mutantes  $A\beta_{25-35}$ (K28A),  $A\beta_{25-35}$ (A30W) y  $A\beta_{25-35}$ (M35C).

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



Las cinéticas de agregación de los péptidos  $A\beta_{1-40}$  en presencia de ThT se muestran en la figura 12. Los péptidos  $A\beta_{1-40}$ wt y  $A\beta_{1-40}$ (K28A) presentaron una cinética similar, mientras que las mutantes  $A\beta_{1-40}$ (A30W) y  $A\beta_{1-40}$ (M35C) tuvieron una agregación mayor en comparación con el péptido  $A\beta_{1-40}$ wt.

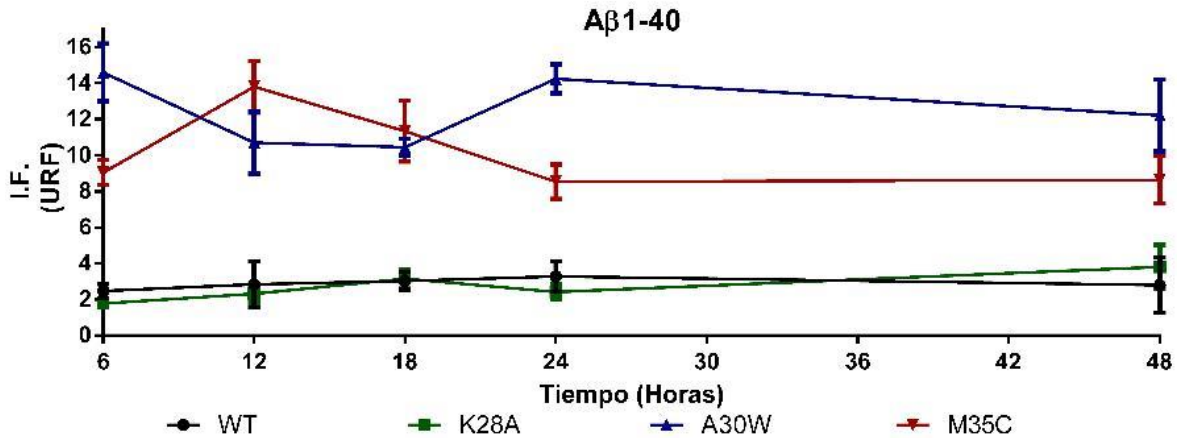


Figura 12. Cinéticas de agregación de los péptidos  $A\beta_{1-40}$  en presencia de ThT.

### 6.1.2. En presencia de ANS

Los péptidos  $A\beta_{25-35}$ wt (figura 13) mostraron una intensidad de fluorescencia menor a una unidad, además no se observó una diferencia entre las cinéticas de los péptidos mutantes y el péptido silvestre.

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide

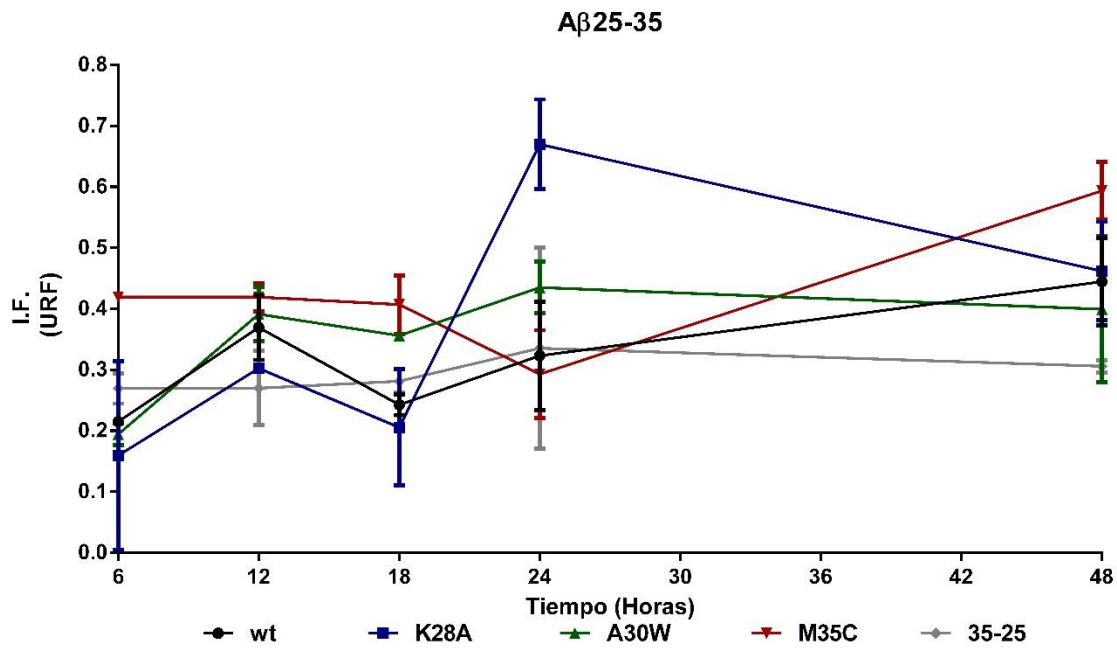


Figura 13. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>25-35</sub> en presencia de ANS. Los péptidos mostraron una intensidad de fluorescencia menor a una unidad.

En el ensayo de unión a ANS de los péptidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> se muestran resultados similares al ensayo de unión a ThT, sin embargo se observa una intensidad de fluorescencia mucho menor. Las cinéticas se muestran en la figura 14.

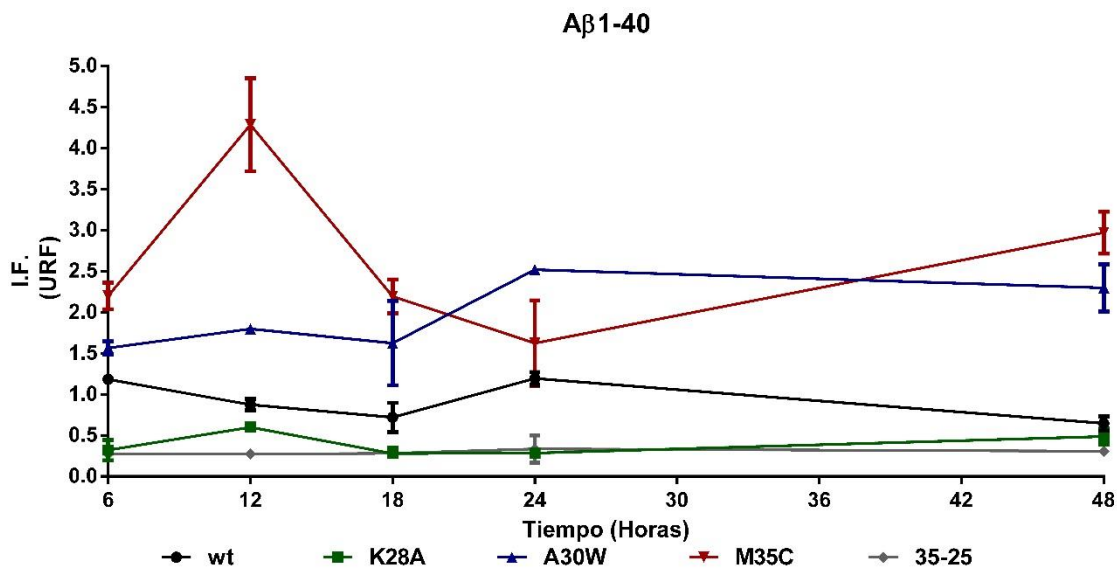


Figura 14. Cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> en presencia de ANS.



## 6.2. Cinética de agregación de los péptidos wt en combinación de los péptidos mutados

### 6.2.1. En presencia de ThT

Al combinar el péptido  $A\beta_{25-35}$ wt con los péptidos mutantes, cambió su cinética de agregación en presencia de ThT. En la figura 15 se muestran los resultados del péptido  $A\beta_{25-35}$ wt en combinación con las mutantes, como se puede observar, bajo las condiciones probadas, cuando el péptido silvestre se combinó con cada mutante su patrón de agregación fue similar al de ésta.

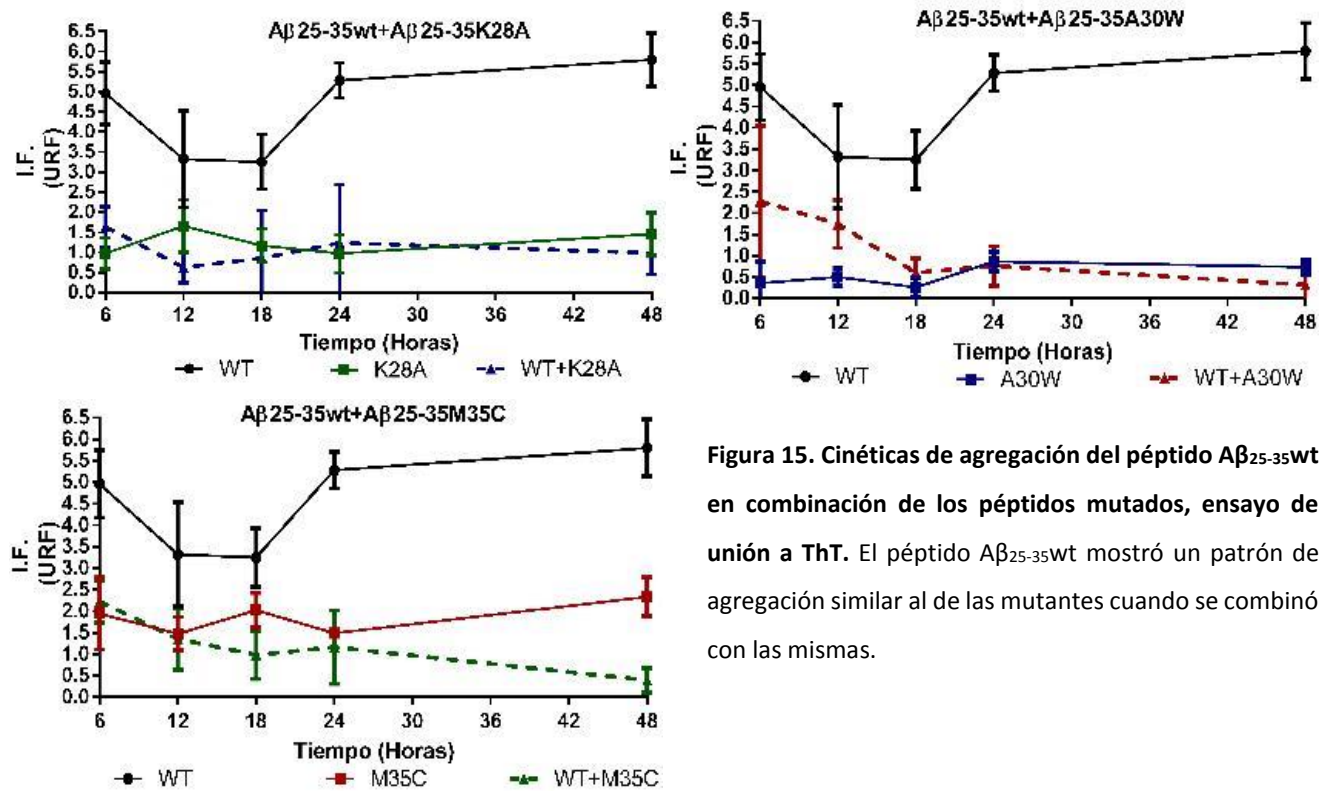
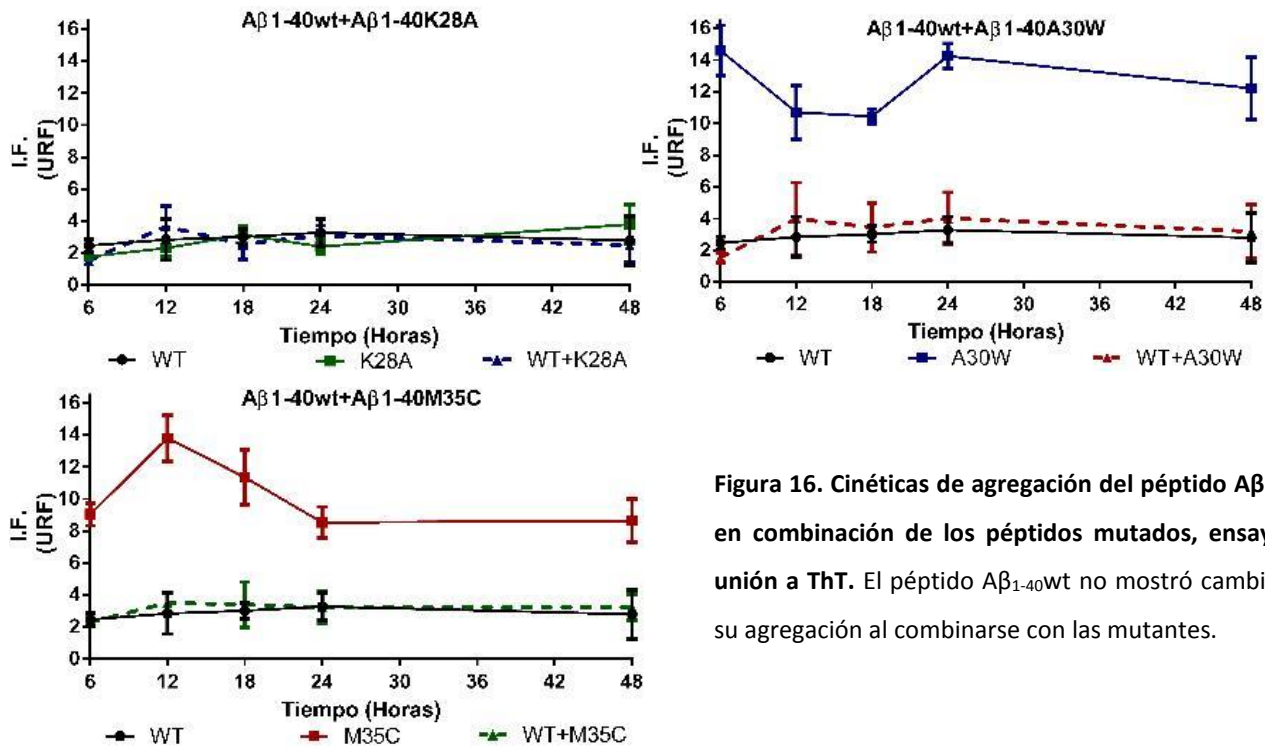


Figura 15. Cinéticas de agregación del péptido  $A\beta_{25-35}$ wt en combinación de los péptidos mutados, ensayo de unión a ThT. El péptido  $A\beta_{25-35}$ wt mostró un patrón de agregación similar al de las mutantes cuando se combinó con las mismas.

La combinación del péptido  $A\beta_{1-40}$ wt con las mutantes no mostró los mismos resultados. Bajo las condiciones probadas, la adición de las mutantes al péptido  $A\beta_{1-40}$ wt no cambió su cinética de agregación (figura 16).

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



**Figura 16. Cinéticas de agregación del péptido  $\text{A}\beta_{1-40}\text{wt}$  en combinación de los péptidos mutados, ensayo de unión a ThT. El péptido  $\text{A}\beta_{1-40}\text{wt}$  no mostró cambios en su agregación al combinarse con las mutantes.**

### 6.3. Western-blot

Después de 48h de incubación de cada uno de los péptidos y las mezclas de los péptidos silvestres con los péptidos mutantes, estos se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia, previo corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. Los péptidos se electrotransfirieron a membranas de PVDF y se incubó con un primer anticuerpo IgG anti  $\text{A}\beta_{25-35}$  de conejo y un segundo anticuerpo, Anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Los resultados obtenidos después de revelar mediante quimioluminiscencia se muestran en las figuras 17 y 18.

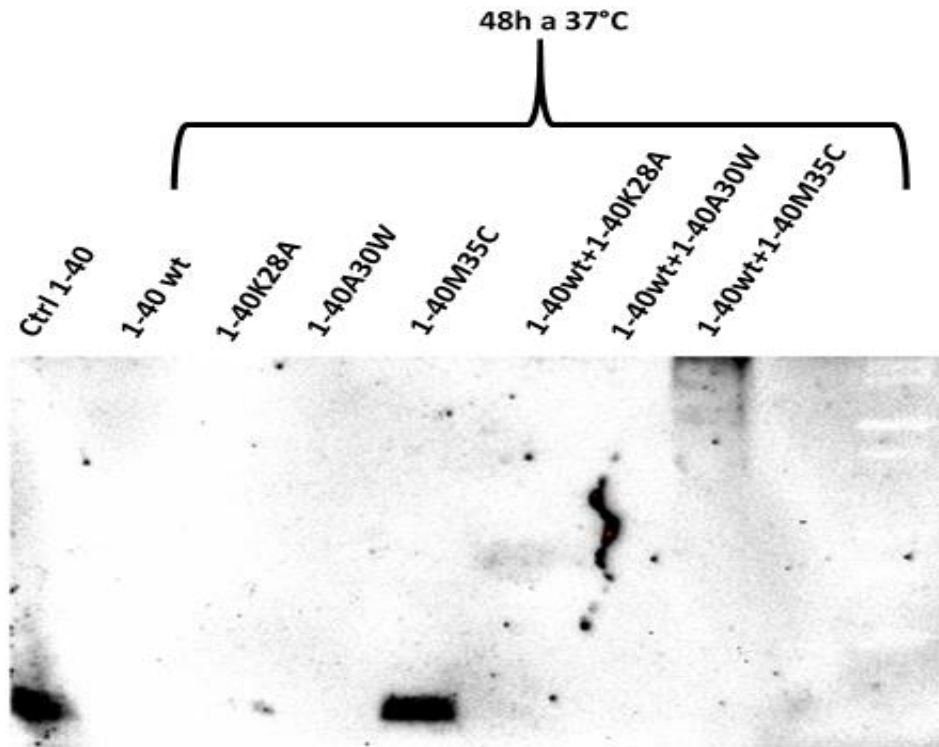


Figura 17. Western blot de los péptido  $A\beta_{1-40}$  y mezclas del péptido silvestre y mutados. Se cargaron 3.5  $\mu$ g del control. Los péptidos se incubaron 48h en PBS.

En la figura 17 se observa señal para el control  $A\beta_{1-40}$ wt, el cual se cargó directamente sin tratamiento previo. La mutante  $A\beta_{1-40}$ (M35C) mostró una banda intensa y cuando el péptido  $A\beta_{1-40}$ wt se combinó con la mutante  $A\beta_{1-40}$ (M35C) se observó un barrido a las 48h de incubación.

Los péptidos  $A\beta_{25-35}$  se probaron bajo las mismas condiciones, no se observó ninguna banda, sin embargo sí hubo señal para el control  $A\beta_{1-40}$ wt (figura 18).

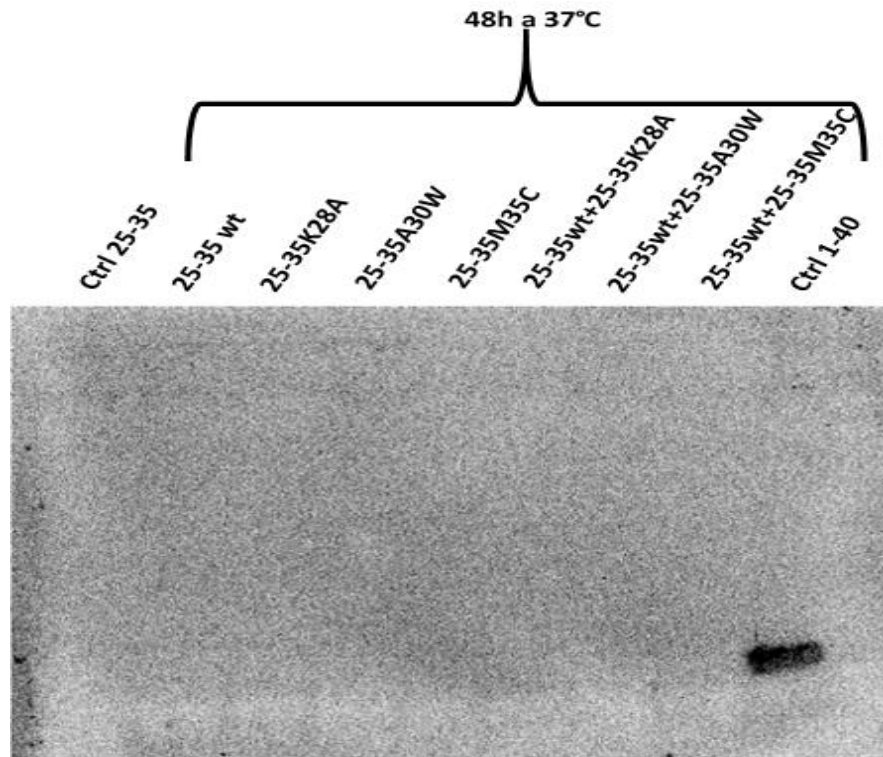


Figura 18. Western blot de los péptido  $A\beta_{1-40}$  y mezclas del péptido silvestre y mutados. Se cargaron 3.5  $\mu$ g del control. Los péptidos se incubaron 48h en PBS.

Debido a los resultados obtenidos para los péptidos  $A\beta_{25-35}$  se realizó un dot blot, en la figura 19 se muestra que todos los péptidos muestran señal después de ser revelados por quimioluminiscencia.

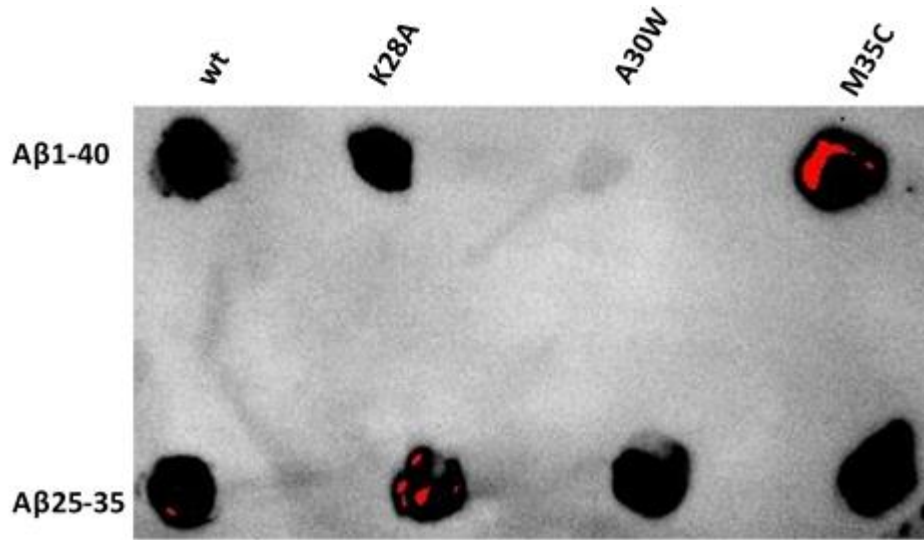


Figura 19. Dot blot. Se cargaron 3.5  $\mu$ l de cada péptido. No hubo tratamiento previo.

#### 6.4. Ensayo de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de los péptidos A $\beta$ en células C6 de glioma de rata

Después de 24h del tratamiento sobre la línea celular C6 de glioma de rata, se analizó la viabilidad, citotoxicidad y apoptosis inducidas por los péptidos sobre las células. Los resultados de viabilidad se muestran en la figura 20.

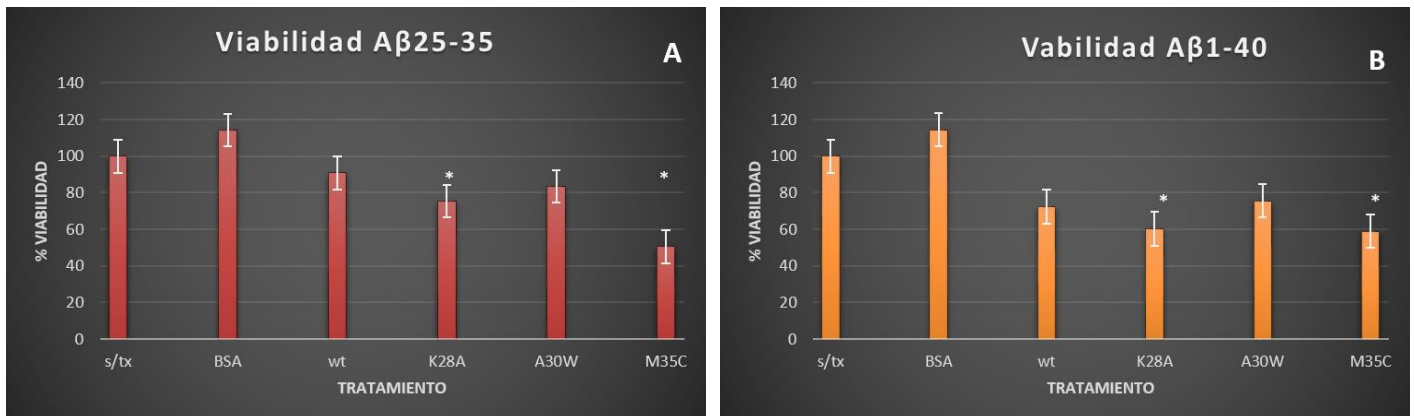


Figura 20. Viabilidad celular determinado por el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay. (A) Viabilidad péptidos A $\beta_{25-35}$ . (B) Viabilidad péptidos A $\beta_{1-40}$ . Los péptido se preincubaron 48h a 40 $\mu$ M y las células se expusieron al tratamiento por 24h.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



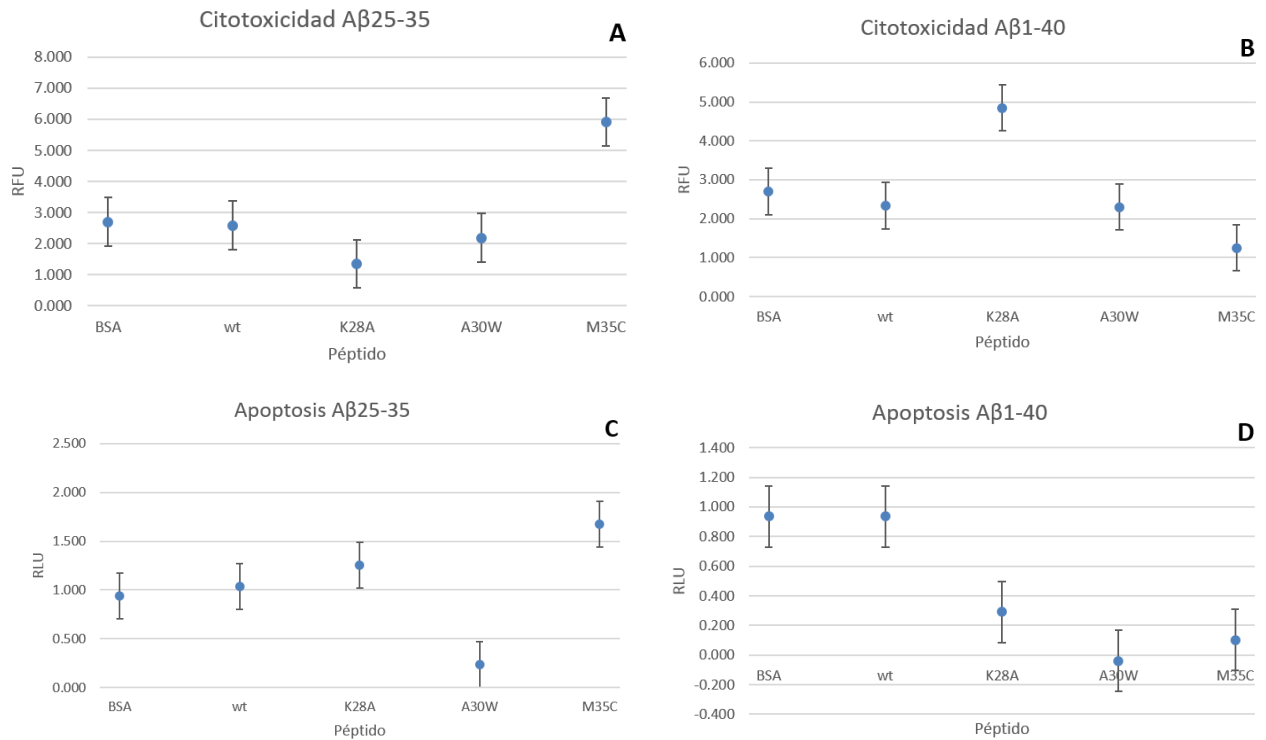
Tanto los péptidos silvestres como los péptidos mutados disminuyeron la viabilidad celular después de 24h de tratamiento. Mediante la prueba estadística de t de student ( $<0.05$ ), se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular para las mutantes  $A\beta(K28A)$  y  $A\beta(M35C)$  con respecto a los péptidos  $A\beta_{25-35}wt$  y  $A\beta_{1-40}wt$ .

Los ensayos de citotoxicidad y apoptosis indican el daño que los péptidos inducen en las células. Los resultados de los péptidos  $A\beta_{25-35}$  se muestran en la figura 21A; la mutante  $A\beta_{25-35}(M35C)$  es el péptido que induce mayor citotoxicidad comparado con el péptido  $A\beta_{25-35}wt$ .

Los resultados de los péptidos  $A\beta_{1-40}$  (figura 21B) indican que a las 24h de tratamiento la mutante con mayor citotoxicidad sobre las células fue el péptido  $A\beta_{1-40}(K28A)$ , comparado con el péptido  $A\beta_{1-40}wt$ .

En la figura 21 se muestran los resultados del ensayo de apoptosis, el péptido  $A\beta_{25-35}(M35C)$  (figura 21C) fue la mutante que induce mayor apoptosis comparado con el péptido  $A\beta_{25-35}wt$ . Sin embargo, los resultados de viabilidad mostraron que tanto para los péptidos  $A\beta_{25-35}$  como para los  $A\beta_{1-40}$  las mutantes  $A\beta(K28A)$  y  $A\beta(M35C)$  disminuyeron de forma significativa la viabilidad celular, por lo que se debió ver un efecto citotóxico o apoptótico en los ensayo correspondientes. El hecho de que esto no se observara puede deberse a que los péptidos son muy tóxicos, por lo que a las 24h de tratamiento, los marcadores de citotoxicidad y apoptosis pueden degradarse; por lo tanto, es necesario probar los tratamientos a un menor tiempo de exposición.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



**Figura 21. Citotoxicidad y apoptosis celular determinado por el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay.** (A) Citotoxicidad inducida por los péptidos  $A\beta_{25-35}$ . (B) citotoxicidad inducida por los péptidos  $A\beta_{1-40}$ . (C) Apoptosis péptidos  $A\beta_{25-35}$ . (D) Apoptosis péptidos  $A\beta_{1-40}$ . Los péptido se preincubaron 48h a  $40\mu\text{M}$  y las células se expusieron al tratamiento por 24h.



## CAPÍTULO VII

### DISCUSION

Las principales características neuropatológicas de la EA son la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares y placas amiloides extracelulares [26]. Las placas resultan de la acumulación anormal extracelular y deposición del péptido  $A\beta$  de 40 o 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ ), dos bioproductos normales del metabolismo de la APP después de ser procesada por la vía amiloidogénica, en donde es escindida secuencialmente por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa en las neuronas [28].

Debido a la identificación del péptido  $A\beta$  como el principal componente de las placas amiloides, y a estudios genéticos que identificaron mutaciones en los genes de APP, PSEN1 y PSEN2 que conducen a la acumulación de  $A\beta$ , se formuló la “Hipótesis de la Cascada Amiloide”, la cual propone que la deposición del  $A\beta$  es la patología inicial que desencadena la enfermedad, lo que subsecuentemente conduce a la formación de NFTs, muerte neuronal y demencia [70].

La agregación y toxicidad del péptido  $A\beta$  están altamente correlacionadas con su secuencia y estructura [112, 113]. El efecto de la secuencia del péptido en su agregación y toxicidad se ha estudiado usando diferentes fragmentos  $A\beta$  o péptidos  $A\beta$  truncados [114]. Además, se han producido mutantes sintéticas con el fin de identificar residuos clave que afecten la agregación y citotoxicidad del péptido.

Los resultados mostraron diferencias en la agregación de los péptidos mutados con respecto al  $A\beta_{wt}$ . Lo cual coincide con lo reportado por William et al. (2006), en los que se muestra que una sola mutación de Ala de la secuencia  $A\beta$  causa diferencias en la estabilidad estructural del péptido, pero no inhibe la agregación [118].



## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

---



Cuando se mezcló  $A\beta_{25-35}$ wt con las mutantes se observó una disminución en su agregación; sin embargo, este efecto no fue observado sobre el péptido  $A\beta_{1-40}$ wt. El péptido  $A\beta_{1-40}$ wt contiene 30 aminoácidos más que el péptido  $A\beta_{25-35}$ wt. Se ha identificado a los residuos 17-21, 30-35 y 41-42 como regiones importantes para la agregación [113, 115], por lo que las diferencias observadas en los resultados pueden deberse al efecto de estas regiones sobre la agregación del péptido.

Shahnawas et al., realizaron mezclas de los péptidos  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  wild-type, Flemish y Dutch y evaluaron la agregación y citotoxicidad, observando que éstas cambiaban al aumentar la concentración del péptido  $A\beta_{1-40}$ . Por lo tanto, en nuestro modelo es importante conocer si la relación entre los péptidos silvestres y mutados promueve diferentes patrones de agregación dependientes de la concertación.

Como ya se mencionó la toxicidad del  $A\beta$  está altamente correlacionada con su secuencia y estructura [112, 113], lo que explica las diferencias observadas en la citotoxicidad de las mutantes y los péptidos silvestres.

Los resultados mostraron que la mutación M35C afecta la agregación y citotoxicidad del péptido  $A\beta$ . Varadarajan et al., reportaron por primera vez que el aminoácido M35 tiene un rol importante en la citotoxicidad del péptido al asociarse con el estrés oxidativo. Por lo que hacen falta estudios estructurales para identificar el efecto que tiene el cambio de Met por Cys, así como ensayos *in vitro* para evaluar el estrés oxidativo que provoca esta sustitución.



## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

- Tanto las mutantes  $A\beta_{25-35}$  como  $A\beta_{1-40}$  mostraron diferentes cinéticas de agregación con respecto a su péptido wt.
- Las mutantes  $A\beta_{25-35}$  disminuyeron la agregación del péptido  $A\beta_{25-35}$ wt cuando se mezclaron en una relación de 25:1 ( $A\beta$ wt: $A\beta$ mut).
- La mutante  $A\beta_{1-40}$ (M35C) mostró una mayor cinética de agregación, forma agregados más estables y tuvo una menor viabilidad celular en comparación con el  $A\beta_{1-40}$ wt.



## CAPÍTULO IX

### PERSPECTIVAS

1. Realizar cinéticas de agregación, así como Western blot con una mayor concentración de péptido.
2. Variar la relación en la concentración de las mezclas de los péptidos A $\beta$ wt y las mutantes.
3. Evaluar la citotoxicidad de las mezclas de los péptidos A $\beta$ wt y las mutantes.
4. Evaluar la citotoxicidad de los péptidos sobre la línea celular C6 de glioma de rata a un menor tiempo de exposición a los tratamientos.
5. Realizar estudios estructurales (DC, MET) para evaluar los cambios conformacionales de los péptidos durante su agregación.



## CAPÍTULO X

### BIBLIOGRAFÍA

1. Behrens M., V.F., *Cien años de la enfermedad de Alzheimer. La inmunoterapia ¿una esperanza?* Revista Médica de Chile, 2007. **135**: p. 103-110.
2. Fratiglioni L, W.B., von Strauss E., *Prevention of Alzheimer's disease and dementia. Major findings from the Kunmgsholmen Project.* . Physiology & Behavior, 2007. **92**(1-2): p. 98-104.
3. Qiu Ch., K.M., von Strauss E., *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention.* Dialogues in clinical neuroscience, 2009. **11**: p. 111-128.
4. Xu, W., C. Ferrari, and H.-X. Wang, *Epidemiology of Alzheimer's Disease.* 2013.
5. Henry W. Querfurth, M.D., Ph.D, and Frank M. LeFerla, Ph.D., *Alzheimer's Disease.* The New England Journal of Medicin, 2010. **362**: p. 329-344.
6. Huang, Y. and L. Mucke, *Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1204-22.
7. Lobo A, L.L., Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al. , *Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group.* Neurology, 2000. **54**((11 Suppl 5)): p. S4-9.
8. Plassman BL, L.K., Fisher GG, Heeringa SG, Weir DR, Ofstedal MB, et al., *Prevalence of dementia in the United States: the aging , demographics, and memory study.* Neuroepidemiology, 2007. **29**(1-2): p. 125-132.
9. Zhang Y, X.Y., Nie H, Lei T, Wu Y, Zhang L, et al., *Prevalence of dementia and major dementia subtypes in the Chinese populations: A meta-analysis of dementia prevalence surveys.* J Clin Neurosci, 2012. **19**(10): p. 1333-37.
10. Kalaria RN, M.G., Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, et al., *Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors.* Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 812-26.
11. Fratiglioni L, L.L., Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, et al., *Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group.* Neurology, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S10-15.
12. Kawas C, G.S., Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. , *Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging.* Neurology, 2000. **54**(11): p. 2072-77.
13. Kukull WA, H.R., Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Schellenberg GD, et al., *Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study.* . Arch Neurol, 2002. **59**(11): p. 1737-46.
14. Chandra V, P.R., Dodge HH, Johnston JM, Belle SH, DeKosky ST, et al., *Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study.* . Neurology, 2001. **57**(6): p. 985-89.
15. Thies, W., L. Bleiler and A. s. Association, *2011 Alzheimer's disease facts and figures.* Alzheimer Dement, 2011. **7**(2): p. 208-244.
16. ADEAR, *Alzheimer's Disease.* National Institutes of Health.
17. Bekris, L.M., et al., *Genetics of Alzheimer disease.* J Geriatr Psychiatry Neurol, 2010. **23**(4): p. 213-27.
18. Association, A.s., *About genes and Alzheimer's disease.* Alzheimer's Association

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



2004.

19. Nowotny P, K.J., Goate A., *Alzheimer Disease*. Encyclopedia of life sciences, 2001.
20. Jakob-Roetne R, J.H., *Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches*. Angew Chem Int Ed Engl., 2009. **48**(17): p. 3030-59.
21. Álvarez M, S.C., Pedroso I, Bringas M, Padrón A, *Alzheimer's Disease – The New Actors of an Old Drama*. 2011.
22. Bertram, L. and R.E. Tanzi, *Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?* Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R135-41.
23. LW, C., *Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment*. Hong Kong Medical Journal 2012. **18**(3): p. 228-237.
24. Schipper, H.M., *Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(5): p. 778-90.
25. Cedazo-Mínguez A, C.R., *Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle*. J.Cel.Mol.Med., 2001. **5**(3): p. 254-266.
26. Hardy J, S.D., *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Sciece, 2002. **297**(5580): p. 353-356.
27. C.J., C., *Alzheimer's disease plaques and tangles: cemeteries of a pyrrhic victory of the immune defence network against herpes simplex infection at the expense of complement and inflammation-mediated neuronal destruction*. Neurochem Int, 2011. **58**(3): p. 301-320.
28. Serrano-Pozo, A., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006189.
29. Minati, L., et al., *Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review*. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2009. **24**(2): p. 95-121.
30. Grundke-Iqbal I, I.K., Tung Y.C, Quinlan M, Wisniewki H.M., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986. **83**(13): p. 4913-7.
31. Kosik K.S, J.C.L., Selkoe D.J, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986. **83**(11): p. 4044-48.
32. Wood J.G, M.S.S., Pollock N.J, Binder L.I., *Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986. **83**(11): p. 4040-43.
33. Billingsley M.L, K.R.L., *Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration*. Biochem. J., 1997. **323**: p. 577-91.
34. Witman, G.B., et al., *Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1976. **73**(11): p. 4070-4.
35. Harada, A., et al., *Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein*. Nature, 1994. **369**(6480): p. 488-91.
36. Dixit, R., et al., *Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1086-9.
37. Caceres, A.a.K.S.K., *Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 461-3.
38. Neve, R.L., et al., *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2*. Brian Rest, 1986. **387**(3): p. 271-80.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



39. J, P.-T., *La genética y la enfermedad de Alzheimer*. . Rev Neurol, 2000. **30**(2): p. 161-9.
40. Mandelkow EM, S.O., Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E., *Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein*. Ann N.Y. Acad Sci., 1996. **777**: p. 96-106.
41. Himmler A, D.D., Kirschner M, Martin D.W., *Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(4): p. 1381-88.
42. Luna-Munoz, J., et al., *Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease*. 2013.
43. Sengupta A, K.J., Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K., *Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules*. Arch. Biochem. Biophys., 1998. **2**: p. 299-309.
44. Avila, J., *Tau kinases and phosphatases*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(1): p. 258-59.
45. Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal, *Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(1): p. 38-55.
46. Ittner, J.G.a.L.M., *Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia*. Nature Reviews Neuroscience, 2008. **9**: p. 532-44.
47. Mena-López, R.-R.H., *La enfermedad de Alzheimer: una revisión*. Rev Biomed, 1993. **4**(4): p. 205-17.
48. Ferrer I, C.-S.F., Guionnet N, Tuñón T., *Estudio de las placas seniles con un método combinado en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer*. Arch Neurobiol, 1990. **6**(53): p. 222-27.
49. Braak H, B.E., Kalus P., *Alzheimer's disease: areal and laminar pathology in the occipital isocortex*. Acta Neuropathol, 1989. **77**(5): p. 494-506.
50. Ikeda K, H.C., Kosaka K, Oyanagi S., *Senile plaque-like structures: observation of a probably unknown type of senile plaque by periodic-acid methenamine silver (PAM) electron microscopy*. Acta Neuropathol, 1989. **78**(2): p. 137-42.
51. Yamaguchi H, H.S., Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y., *Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia*. Acta Neuropathol, 1988. **77**(2): p. 113-19.
52. Guimerà A, G.X., Cruz-Sánchez, *Actualización sobre la patología de la Enfermedad de Alzheimer*. Rev Esp Patol, 2002. **35**(1): p. 21-48.
53. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 2011. **34**: p. 185-204.
54. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29615-9.
55. Storey E, C.R., *The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A $\beta$  peptide*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1999. **25**(2): p. 81-97.
56. Selkoe DJ, P.M., Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, and Oltersdorf T.,  *$\beta$ -Amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110 $\pm$ 135 kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988. **85**: p. 7341-45.
57. DJ, S., *Alzheimer's Disease: Genes Proteins and Therapy*. Physiology Reviews, 2001. **81**(2): p. 741-766.
58. Yoshikai S, e.a., *Genomic organization of the human amyloid betaprotein precursor gene*. Gene, 1991. **87**(2): p. 257-63.
59. Cai, X.D., Golde, T.E. and Younkin, S.G., *Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor*. . Science, 1993. **259**: p. 514-516.

## Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



60. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg I. and Selkoe, D.J., *Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*. Nature, 1992. **360**: p. 672-74.
61. Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J. and Teplow, D.B., *Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 17741-48.
62. Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L., Jr, Eckman, C., Golde, T.E. and Younkin, S.G., *An increased percentage of long amyloid beta protoen secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants*. Science, 1994. **264**: p. 1336-40.
63. Zheng, H. and E.H. Koo, *Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein*. Mol Neurodegener, 2011. **6**(1): p. 27.
64. Muller, U. and K. Wil, *Structure and Function of the APP Intracellular Domain in Health and Disease*. 2013.
65. Levy E, C.M., Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bot GT, Luyendijk W, Frangione B., *Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type*. Science, 1990. **248**(4959): p. 1124-6.
66. Hendriks L, v.D.C., Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin J-J, Hofman A, Van Broeckhoven C, *Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the  $\beta$ -amyloid precursor protein gene*. Nature Genet, 1992. **1**: p. 218-221.
67. Strooper B, A.W., *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(11): p. 1857-70.
68. Koo, E.H., Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, et al., *Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990. **87**: p. 1561-65.
69. Nathalie P, J.-N.O., *Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity*. Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(2): p. 92-9.
70. Reitz, C., *Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 369808.
71. W., G.G.G.a.W., *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **122**(3): p. 1131-35.
72. Goate A, C.-H.M.C., Mullan M. et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-6.
73. Levy-Lahad E, W.W., Poorkaj P, et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **269**(5226): p. 973-977.
74. Sherrington R, R.E.I., Liang et al., *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-760.
75. DJ, S., *Alzheimer's Disease: Genes Proteins and Therapy*. Physiological Reviews 2001. **81**: p. 741-766.
76. Lublin A, G.S., *Amyloid- $\beta$  Oligomers: Possible Roles as Key Neurotoxins in Alzheimer's Disease*. Mount Sinai Journal of Medicine, 2012. **77**: p. 43-49.
77. Esch, F., O.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, and A.R. Culwell, *Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor*. Science, 1990. **248**: p. 1122-28.

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



78. Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Liberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe, *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature, 1992. **359**: p. 322-25.
79. Halverson, K., P. E. Fraser, D. A. Kirschner, and P. T. Lansbury. , *Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic beta-protein fragments*. . Biochemistry, 1990. **29**: p. 2639-44.
80. Kirschner, D.A., C. Abraham, and D. J. Selkoe. , *X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer's disease indicates crossbeta conformation*. . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986. **83**: p. 503-07.
81. Walsh, D.M., A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Comdrón, and D. B. Teplow. , *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate*. . J. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 22364-72.
82. Lorenzo, A., and B. Yankner. , *Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red*. . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994. **91**: p. 12243-47.
83. Pike, C.J., D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, and C. W. Cotman. , *Neurodegeneration induced by b-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state*. J. Neurosci, 1993. **13**: p. 1676-87.
84. Simmons, L.K., P. C. May, K. J. Tomaselli, R. E. Rydel, K. S. Fuson, E. F. Brigham, S. Wright, I. Lieberburg, G. W. Becker, D. N. Brems, and W. Y. Li. , *Secondary structure of amyloid  $\beta$  peptide correlates with neurotoxic activity in vitro*. Mol. Pharmacol, 1993. **45**: p. 373-79.
85. Behl, C., Davis, J. B., Klier, F. G., and Schubert, D. , *Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis*. Brian Res, 1994. **645**: p. 253-64.
86. Giulian, D., L. J. Haverkamp, J. H. Yu, W. Karshin, D. Tom, J. Li, J. Kirkpatrick, L. M. Luo, and A. E. Roher, *The HHQK domain of  $\beta$ -amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease*. J. Neurosci, 1996. **16**: p. 6021-37.
87. Paradis, E., H. Douillard, M. Koutroumanis, C. Goodyer, and A. LeBlanc., *Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons*. . J. Neurosci, 1996. **16**: p. 7533-39.
88. Yankner BA, D.L., Kirschner DA., *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein: reversal by tachykinin neuropeptides*. Science, 1990. **250**: p. 279-82.
89. Postuma RB, H.W., Nunan J, Beyreuther K, Masters CL, Barrow CJ, et al. , *Substrate-bound  $\beta$ -amyloid peptides inhibit cell adhesion and neurite outgrowth in primary neuronal cultures*. J Neurochem, 2000. **74**: p. 1122-1130.
90. Ramsden M, P.L., Webster NJ, Vaughan PF, Henderson Z, Pearson HA., *Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid  $\beta$  protein (1-40) on  $K^+$  channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurons*. J Neurochem, 2001. **79**: p. 699-712.
91. Ramsden M, H.Z., Pearson HA., *Modulation of  $Ca^{2+}$  channel currents in primary cultures of rat cortical neurons by amyloid  $\beta$  protein (1-40) is dependent on solubility status*. Brian Res, 2001. **956**: p. 254-61.
92. Kamenetz F, T.T., Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al., *APP processing and synaptic function*. Neuron, 2003. **37**: p. 925-37.
93. Atwood CS, H.X., Moir RD, Bacarra NM, Romano D, Tanzi RE, et al., *Dramatic aggregation of Alzheimer  $A\beta$  by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 1282-86.
94. Smith MA, N.A., Zhu X, Takeda A, Perry G., *Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease*. Antioxid Redox Signal, 2000. **12**: p. 13-20.



Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



95. Chan CW, D.A., Atwood CS, Huang X, Tanzi RE, Bush AI, Martins RN., *Anti-apoptotic action of Alzheimer A $\beta$* . *Alzheimer's Reports*, 1999. **2**: p. 1-6.
96. Bush AI, L.T., Cherny RC, Atwood CS, Goldstein LE, Moir RD, et al., *Alzheimer A $\beta$  functions as a superoxide antioxidant in vitro and in vivo*. *Soc Neurosci Abstrc*, 1999. **25**: p. 14.
97. Atwood CS, S.R., Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP et al., *Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid  $\beta$  peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid  $\beta$  1-42*. *J Neurochem*, 2000. **75**: p. 1219-33.
98. Cuajungco MP, G.L., Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, et al., *Evidence that the  $\beta$ -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A $\beta$  by zinc*. *J Biol Chem*, 2000. **275**: p. 19439-42.
99. Nunomura A, P.G., Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al., *Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer's disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001. **60**: p. 759-67.
100. Kuo YM, E.M., Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, et al., *Water-soluble A $\beta$  (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains*. *J Biol Chem*, 1996. **271**: p. 4077-81.
101. Funato H, Y.M., Kusui K, Tamaoka A, Ishikawa K, Ohkoshi N, et al., *Quantitation of amyloid  $\beta$ -protein ( $\alpha\beta$ ) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 1998. **152**: p. 1633-40.
102. Wisniewski T, G.J., Frangione B., *Biology of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Dis*, 1997. **4**: p. 313-28.
103. Palop, J.J., and Mucke, L. , *Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**: p. 812-18.
104. Bero, A.W., Yan, P., Roh, J.H., Cirrito, J.R., Stewart, F.R., Raichle, M.E., Lee, J.M., and Holtzman, D.M. , *Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- $\beta$  deposition*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**: p. 750-56.
105. Blake CC, S.L., Sunde M, Sandreg O, Lundgren E., *A molecular model of the amyloid fibril*. *Ciba Found Symp*, 1996. **199**: p. 6-15.
106. Jarrett JT, L.P.J., *Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* . *Cell*, 1993. **73**(6): p. 1055-8.
107. Rushworth, J.V. and N.M. Hooper, *Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes*. *Int J Alzheimers Dis*, 2010. **2011**: p. 603052.
108. Kaye R, H.E., Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis* *Science*, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
109. Pimplikar, S.W., *Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(6): p. 1261-8.
110. Larson, M.E. and S.E. Lesne, *Soluble A $\beta$  oligomer production and toxicity*. *J Neurochem*, 2012. **120 Suppl 1**: p. 125-39.
111. Shankar, G.M. and D.M. Walsh, *Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A $\beta$* . *Mol Neurodegener*, 2009. **4**: p. 48.
112. E.K. Lee, J.H.H., D.Y. Shin, D.I. Kim, Y.J. Yoo, *Production of recombinant amyloid-beta peptide 42 as an ubiquitin extension*. *Protein Expr. Purif.* , 2005. **40**: p. 183-89.
113. M.Q. Liao, Y.J.T., L.Y. Chang, H.B. Huang, T.H. Lin, C.L. Chyan, Y.C. Chen, *The correlation between neurotoxicity, aggregative ability and secondary structure studied by sequence truncated A $\beta$  peptides*. *FEBS Lett*, 2007. **581**: p. 1161-65.

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



114. R. Liu, C.M., Y. Lyubchenko, M.R. Sierks, *Residues 17-20 and 30-35 of beta amyloid play critical roles in aggregation*. J. Neurosci. Res., 2004. **75**: p. 162-71.
115. Paivio, A., et al., *Stabilization of discordant helices in amyloid fibril-forming proteins*. Protein Sci, 2004. **13**(5): p. 1251-9.
116. Yoshiike, Y., et al., *Specific compositions of amyloid-beta peptides as the determinant of toxic beta-aggregation*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23648-55.
117. Murakami K, I.K., Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. , *Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A beta 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2002. **294**: p. 5-10.
118. A.D. Williams, S.S., R. Wetzel, *Alanine scanning mutagenesis of Abeta(1-40) amyloid fibril stability*. J. Mol. Biol., 2006. **357**: p. 1283-94.
119. Chen, Y.R., et al., *Abeta40(L17A/F19A) mutant diminishes the aggregation and neurotoxicity of Abeta40*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **405**(1): p. 91-5.
120. Yi-Ru Chen, H.-b.H., Chi-Jen Lo, Chih-Ching Wang, Li-Kang Ho, Hsin-Tzu Liu, MingShi Shiao, Ta-Hsien Lin, Yi-Cheng Chen, *Effect of Alanine Replacement of L17 and F19 on the Aggregation and Neurotoxicity of Arctic-Type A $\beta$ 40*. Plos one, 2013. **8**(4).
121. Kim W, H.M., *Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006. **103**(43): p. 15824-29.
122. Kim S, J.T., Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU *Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2005. **102**(40): p. 14278-83.
123. Hung LW, C.G., Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ *Amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: A $\beta$  dimers and trimers correlate with neurotoxicity*. J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 11950-58.
124. DA., B., *Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review*. Free Radic Res, 2002. **36**(12): p. 1307-13.
125. Ciccotosto GD, T.D., Curtain CC, Smith D, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Barnham KJ, *Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid beta peptide with a methionine to valine substitution*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42528-34.
126. E, G., *Mechanisms of amyloid fi bril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool*. FEBS J., 2005. **272**(23): p. 5971-78.
127. Pike C J, W.-W.A.J., Kosmoski J, Cribbs D H, Glabe C G and Cotman C W, *Structure-activity analyses of  $\beta$ -amyloid peptides: contributions of the  $\beta$  25-35 region to aggregation and neurotoxicity*. J. Neurochem, 1995. **64**: p. 253-65.
128. D'Ursi A M, A.M.R., Guerrini R, Salvadori S, Sorrentino G and Picone D, *Solution structure of amyloid beta-peptide (25-35) in different media*. J. Med. Chem., 2004. **12**: p. 4231-38.
129. Kubo T, N.S., Kumagae Y and Kaneko Y, *In vivo conversion of racemized beta-amyloid ((D-Ser 26)A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ((D-Ser 26)A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients*. J. Neurosci. Res., 2002. **70**: p. 474-83.
130. Clementi M E, M.S., Coletta M, Orsini F, Giardina B and Misiti F, *A $\beta$ (31-35) and A $\beta$ (25-35) fragments of amyloid  $\beta$ -protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35*. FEBS Lett, 2005. **579**: p. 2913-18.

CAPITULO XI

ANEXOS

11.1. PBS

Tabla 4. Preparación de PBS 1X:

1X	Cf	250 mL	500 mL	1000 mL
NaCl	138 mM	2.015 g	4.03 g	8.06 g
KCl	3 mM	0.055 g	0.11 g	0.22 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM	0.2875 g	0.575 g	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM	0.05 g	0.10 g	0.20 g
dH <sub>2</sub> O	-	cbp 250 mL	cbp 500 mL	cbp 1 L

Tabla 5. Preparación PBS 10X

1X	Cf	250 mL	500 mL	1000 mL
NaCl	1.380 M	20.15 g	40.3 g	80.6 g
KCl	30 mM	0.55 g	1.1 g	2.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81 mM	2.875 g	5.75 g	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM	0.5 g	1.0 g	2.0 g
dH <sub>2</sub> O	-	cbp 250 mL	cbp 500 mL	cbp 1 L

Notas:

Las soluciones 10X de PBS poseen un pH~6.8 que se corrige automáticamente a pH7.4 una vez llevadas a 1X. Por ello en el caso de las soluciones 10X, no es necesario ajustar el pH sino hasta que son llevadas a 1X. Las soluciones 1X no presentan variaciones de pH dependientes de temperatura.

# Identificación de regiones clave en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide



## 11.2. Cinéticas de agregación

### 11.2.1. Preparación de Tioflavina T (ThT) 1mM.

1. Pesar 0.016g de ThT.
2. Disolver en 50 ml de agua MQ estéril.
3. Filtrar con filtro 0.2  $\mu$ . Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Estable durante un mes.

### 11.2.2. Preparación de ANS 1mM.

1. Pesar 0.016 g de ANS.
2. Disolver en 50 ml de agua MQ estéril.
3. Filtrar con filtro 0.2  $\mu$ . Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Estable durante un mes.

## 11.3. Preparación de geles de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE

Para preparar 2 mini geles de 6x8cm se mezclan los siguientes reactivos:

Tabla 6. Gel concentrador 4%

Reactivo	Volumen
Agua destilada	3.43 mL
Poliacrilamida	0.66 mL
Buffer Tris 2.5 M pH 8.8	0.76 mL
TEMED	5.0 $\mu$ L
APS	150 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>~5 mL</b>

Tabla 7. Gel separador 15%

Reactivo	Volumen
Agua destilada	0.29 mL
Poliacrilamida	5.00 mL
Buffer Tris 2.5 M pH 8.8	4.6 mL
TEMED	6.0 $\mu$ L
APS	100 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>~10 mL</b>

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



Tabla 8. Buffer de corrida

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.03 g
Tricina	4.5 g
SDS	0.5 g
dH <sub>2</sub> O	cbp 1 L

\* Almacenar a 4°C

Tabla 9. Buffer de carga

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 100 mM pH6.8	5 mL
SDS	0.05 g
2-mercaptoetanol	0.2 g
Azul de Commasie	0.001 g
Glicerol	1.2 mL

\*Almacenar a -20°C

#### 11.4. Preparación de soluciones para Western blot

Tabla 10. Buffer de transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
dH <sub>2</sub> O	cbp 1 L

\*Almacenar a 4°C

Tabla 11. Buffer de bloqueo

Reactivo	Cantidad
PBS 1X	100 mL
Leche en polvo sin grasa	5 g

\*Almacenar a 4°C

Tabla 12. Buffer de lavado

Reactivo	Cantidad
Tween 20	0.5 mL
PBS	1 L

\*Almacenar a 4°C

Tabla 13. Buffer de disolución de anticuerpo primario

Reactivo	Cantidad
Buffer de lavado	15 ml
BSA	0.15 g

\*Almacenar a 4°C

Identificación de regiones clave en el proceso de agregación  
y citotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide



11.5. Cultivo celular

Tabla 14. Componentes para suplementar Medio DMEM Advanced al 10% SBF:

Componentes	Volumen
Medio aDMEM	500 ml
Suero bovino fetal (SBF o FBS)	50 ml
Aminoácidos No esenciales	5 ml
Antibiótico (Penicilina/estreptomicina)	5 ml
L-Glutamina	5 ml