

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Estudio del efecto del péptido beta amiloide ($A\beta$) sobre la infección
causada por el Virus del Herpes Simplex tipo 1**

Presentado Por:

Q.F.B. Lizbeth Reyes Moreno

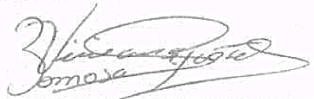
**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

ASESOR: Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

MONTERREY, N.L., OCTUBRE 2012.

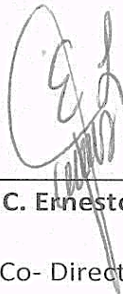
**Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección
causada por el Virus del Herpes Simplex tipo 1**

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Directora de Tesis



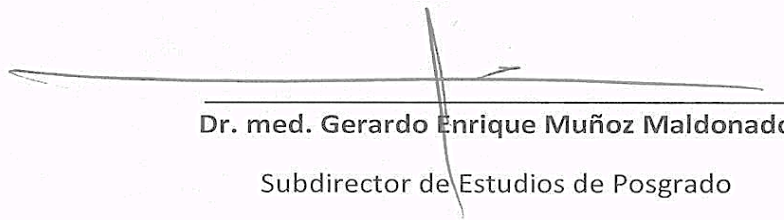
Dr. C. Ernesto Torres López

Co- Director de Tesis



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Co- Directora de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Infectología Molecular y Biología Estructural del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, así como en el laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología 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. Ernesto Torres López y la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla.

Vo.Bo.



Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret.

Director de Tesis.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darme la oportunidad de cumplir una meta más en la vida y sobretodo por sus bendiciones durante estos dos años.
- A mi familia, por todo el amor y apoyo incondicional, por confiar en mí y ser mi fortaleza en todo momento.
- A la Dra. Viviana Zomosa Signoret, por su ayuda en la dirección durante el desarrollo de éste proyecto.
- A la Dra. Ana María Rivas Estilla, por su apoyo y dirección durante éste último año.
- Al Dr. Ernesto Torres López, por su asesoría durante la realización de los experimentos.
- Al Dr. Román Vidaltamayo Ramírez, por su asesoría en los experimentos de inmunofluorescencia, aunque éstos no se hayan incluido en la tesis.
- A la M.C. Pilar del Carmen Morales San Claudio (Pili) por todos esos consejos en el área de Virología, quién me enseñó acerca del cultivo celular y viral. Además por su invaluable amistad y su apoyo, también en el ámbito personal.
- A mi gran amiga, la Q.B.P. Lorena Lugo Estrada y a su familia, especialmente a su mamá, Yolanda Estrada (QEPD), por su amistad, su apoyo y todo ese cariño que me brindaron desde el inicio de la maestría y durante toda mi estancia en Monterrey. Por tratarme y hacerme sentir como un integrante más de su familia.
- A mi querida amiga, la Q.F.B. Tanya Salas (Bambi), por sus abrazos, palabras de aliento, y esas tardes y fines de semana tan agradables trabajando en el laboratorio.
- A mis amigas la Q.B.P. Martha Rodríguez, Q.C.B. Maribel Montufar y Q.B.P. Paola Rivera, por los buenos momentos tanto en el laboratorio, como fuera de él.
- A mi amigo cinéfilo, el M.C. Alan Roberto Márquez por sus consejos y su amistad.
- Al M.C. Juan Castillo, por sus consejos acerca del péptido A β y su apoyo durante la tesis.
- A mis compañeros de generación: Yadira, Grecia, Marcela, Manuel.
- A mis compañeros del laboratorio de Infectología molecular: Daniel, Elda, Sonia y Owen.
- A las secretarias del departamento de Bioquímica, Norma, Juany y Ariadna.

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

Aristóteles (384 AC-322 AC).

DEDICATORIA

A Dios,

A mis padres Joel Reyes Cisneros y Nely Moreno Tirado,

A mi segunda madre, Sara Moreno (QEPD),

A mi hermana Nely Reyes, mi mejor amiga.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO

PÁGINA

I.- INTRODUCCION

1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)	1
1.1.1 Cambios biopatológicos en la Enfermedad de Alzheimer	2
1.1.1.1 Deterioro de la memoria episódica	2
1.1.1.2 Imágenes estructurales y cambios funcionales en un cerebro con EA.....	3
1.1.2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer	4
1.1.3 Síntomas de la Enfermedad de Alzheimer	5
1.1.4 Diagnóstico histopatológico de EA	7
1.1.4.1 Ovillos neurofibrilares	8
1.1.4.1.1 Proteína Tau	10
1.1.4.2 Placas amiloides	11
1.1.4.2.1 Proteína precursora del amiloide (APP)	11
1.1.4.2.1.1 Tráfico intracelular de APP	11
1.1.4.2.1.2 Procesamiento de APP	13
1.1.4.2.2 Péptido beta amiloide (A β)	15
1.1.4.2.2.1 Proporción de diferentes péptidos A β en las placas amiloides	15

1.1.4.2.2.2 Péptido A β ₂₅₋₃₅	18
1.1.4.2.2.3 Rutas de agregación de A β hacia ensamblados neurotóxicos.....	19
1.1.4.2.2.4 Liberación del péptido A β y el transporte a través de la barrera hematoencefálica	21
1.2 Herpes simplex virus	23
1.2.1 Alphaherpesvirinae	24
1.2.2 Estructura del virus del herpes simplex	25
1.2.2.1 Ciclo de replicación viral.....	27
1.2.2.2 Replicación del ADN viral de VHS-1	29
1.2.2.2 Genes esenciales para la replicación del ADN de VHS-1	29
1.2.2.1 Ciclos de replicación viral de VHS-1: Ciclo lítico y ciclo de latencia.....	30
1.2.2.3 Infección por VHS-1	34
1.2.2.3.1 Infección lítica y latente de VHS-1.....	35
1.2.2.3.2 Encefalitis herpética	37
1.3 Antecedentes de la relación entre VHS-1 y EA.....	38
II.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	46
III.- OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	47
3.2 Objetivos Específicos	47
IV.- MATERIALES	
4.1 Reactivos	48

4.1.1	Reactivos de uso general	48
4.1.2	Cultivo celular y viral	48
4.1.3	Solubilización y oligomerización del péptido A β	49
4.1.4	Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR).....	49
4.1.5	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot	49
4.2	Materiales	50
4.2.1	Material de uso general.....	50
4.2.2	Cultivo celular y viral	51
4.2.3	PCR en tiempo real	51
4.2.4	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot	51
4.2.5	Material Biológico.....	51
4.3	Equipos.....	52
4.3.1	Equipo de uso general	52
4.3.2	Cultivo celular y viral	52
4.3.3	Solubilización y oligomerización del péptido A β	53
4.3.4	Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR).....	53
4.3.5	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot	53

V.- MÉTODOS

5.1	Cultivo de células Vero	54
5.1.1	Células Vero.....	55
5.1.2	Subcultivo de células Vero.....	55

5.2 Cultivo viral de VHS-1 cepa KOS	56
5.2.1 Producción a escala de VHS-1 cepa KOS	56
5.3 Ensayo de Infectividad viral: Formación de placas líticas o unidades formadoras de placa (PFU)	57
5.3.1 Titulación viral por la técnica de formación de placas líticas o unidades formadoras de placas (PFU)	57
5.4 Determinación de MOI y condiciones generales de infección	59
5.5 Solubilización y oligomerización del péptido beta amiloide (A β).....	60
5.5.1 Solubilización del péptido A β	60
5.5.2 Oligomerización del péptido A β	61
5.6 Ensayo de citotoxicidad del péptido A β en células Vero.....	61
5.7 Infección de células Vero con VHS-1(KOS) y péptido beta amiloide	62
5.8 Extracción de ARN total por el método de TRIzol®	63
5.9 Retrotranscripción mediante M-MLV (RT-PCR M-MLV).....	64
5.10 PCR en tiempo real para:	
5.10.1 Gen ARNr 18S	65
5.10.2 Gen UL5	65
5.11 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	67
5.11.1 Extracción de proteínas totales	67
5.11.2 Cuantificación de proteínas por método de Bradford	68
5.12 SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas.....	69

5.12.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	69
5.12.2 Electrotransferencia en condiciones húmedas.....	69
5.13 Ensayo de Western blot	70
VI.- RESULTADOS	
6.1 Cultivo de células Vero y titulación viral de VHS-1 (KOS) mediante ensayo de formación de placas líticas o unidades formadoras de placa (PFU)	71
6.2 Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y condiciones generales de infección.....	74
6.3 Ensayo de citotoxicidad del péptido A β en células Vero.....	75
6.4 Infección de células Vero con VHS-1(KOS) y péptido beta amiloide	
6.4.1 Ensayo de formación de placas líticas o unidades formadoras de placa (PFU).....	76
6.4.2 PCR en tiempo real para genes ARNr 18S y UL5.....	79
6.4.3 Ensayo de Western blot.....	80
VII.- DISCUSIÓN	82
VIII.- CONCLUSIONES	89
IX.- PERSPECTIVAS	90
X.- BIBLIOGRAFÍA.....	91
XI.- ANEXOS.....	105

RESUMEN

Estudio del efecto del péptido beta amiloide ($A\beta$) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1

Nombre: Q.F.B. Lizbeth Reyes Moreno

Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León

Localización: Monterrey, Nuevo León

Fecha de titulación: Octubre 2012

Páginas en el estudio: 127

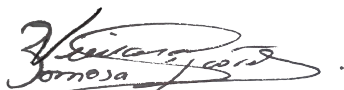
Introducción: La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo descrito por primera vez en 1906; es la causa más común, irreversible y progresiva de demencia. Dentro de las características neuropatológicas de la EA se menciona a las placas seniles, las cuales son depósitos extracelulares de distintas isoformas del péptido beta-amiloide ($A\beta$). En mayor proporción se encuentra el péptido de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$) del cual la región a la que se le ha atribuido la mayor actividad citotóxica es la comprendida entre los aminoácidos 25 y 35 ($A\beta_{25-35}$). Se ha propuesto una relación entre pacientes que presentan EA y pacientes con infección ocasionada por el virus del Herpes simplex tipo 1 (VHS-1); virus perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alphaherpesvirinae*, que presenta un ciclo de latencia en el ganglio trigémino. A la fecha se han definido importantes relaciones entre el péptido beta-amiloide ($A\beta$) y el VHS-1, debido a la localización del virus en su estado de latencia.

Objetivo: Evaluar el efecto que presentan dos isoformas del péptido β -amiloide sobre la infección causada por el virus del Herpes simplex tipo I.

Material y Métodos: Se infectó la línea celular Vero con la cepa KOS de VHS-1 en presencia y ausencia de los péptidos $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{35-25}$ (oligomerizados y sin oligomerizar). Después de 6 horas de infección, se extrajo ARN total para amplificar regiones de los genes UL5 y ARNr 18S mediante RT-qPCR, y proteínas totales para ensayos de Western blot. Para los ensayos de infectividad viral, mediante el ensayo de formación de placas líticas (PFU), después de las 6 horas de infección, se incubó durante 2 días a 37°C y 5% CO₂ y también se extrajo proteínas totales para el análisis de Inmunoelctrotransferencia (WB).

Resultados: La presencia de los péptidos $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{35-25}$ (oligomerizados y sin oligomerizar), disminuyen la infección del VHS-1 (KOS) en células Vero. Esto se demostró mediante ensayos de infectividad viral, en donde se observa un menor número de PFU con respecto al control de infección (VHS-1 sin péptido $A\beta$) y mediante ensayos de RT-qPCR, se observó la disminución en la expresión del ARN del gen UL5 del VHS-1, indispensable para la replicación viral. Por medio de WB se detectó el péptido a las 6 y/o 48 horas post-infección, sólo en extractos celulares.

Conclusiones: Las isoformas del péptido $A\beta$ ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{35-25}$) oligomerizados y sin oligomerizar, interfieren en el proceso de infección de células Vero por parte del VHS-1 (cepa KOS).



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Firma de Asesor

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APP	Proteína precursora de amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
A β	Péptido beta amiloide
BACE	Enzima de corte de APP en sitio beta
BSA	Albúmina sérica bovina
c.b.p.	Cuanto baste para
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco
dNTP's	Desoxirribonucleósidos trifosfato
DS	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
ICP	Proteína de célula infectada
IgG	Inmunoglobulina G
KCl	Cloruro de potasio
KOS	Cepa de virus de Herpes simplex tipo 1
l	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
milliQ	Agua ultra pura
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M-MLV RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina
MOI	Multiplicidad de infección
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos

°C	Grados Centígrados
p.i.	Post infección
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PFU	Unidad formadora de placa
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
ARNse	Inhibidor de ribonucleasas
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
Rx	Reacción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
TA	Temperatura ambiente
TBS	Tris buffer salino
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
UL	Región única larga
V	Voltios
Vero	Línea celular, fibroblastos de riñón de mono verde africano
VHS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1
WB	Western Blot
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Comparación de un cerebro normal y uno con enfermedad de Alzheimer.....	1
2. Función normal de la proteína Tau	9
3. Tau en neuronas normales y tautopatías.....	10
4. Tráfico intracelular de APP.....	13
5. Diagrama del procesamiento de la proteína APP.....	14
6. Procesamiento secuencial del APP por la γ secretasa.....	15
7. Modelo de polimerización dependiente de nucleación en la agregación amiloide	20
8. Modelo propuesto de la producción oligomérica endógena de $A\beta$	21
9. Taxonomía de los virus de herpes neuroinvasivos.....	24
10. Representación esquemática del virión de VHS-1 y su organización genómica.....	27
11. Glicoproteínas de VHS-1 necesarias para la entrada viral y sus receptores.....	28
12. Ciclo de replicación del VHS-1.....	32
13. Infección lítica y latente de VHS-1.....	36
14. Co-localización del ADN de VHS-1 (PCR <i>in situ</i>) y placas amiloides (tinción con tioflavina S).....	40
15. Homología de secuencia entre $A\beta$ y la glicoproteína B (gB) de VHS-1.....	41
16. Diagrama que muestra la interacción de APP con VHS-1 durante el transporte intracelular a través de cinesinas.....	42
17. Esquema de diluciones seriadas de VHS-1 cepa KOS en PBS glucosado al 1%.	58
18. Distribución de soluciones virales en placa de 6 pozos con células Vero.	58

19. Esquema de distribución de diluciones virales en placas de 12 pozos con células Vero	62
20. Células Vero con y sin infección por VHS-1 (KOS)	72
21. Titulación viral del concentrado de VHS-1 (KOS) mediante PFU.....	73
22. Resultados del ensayo de PFU para determinar la MOI.....	74
23. Resultados de los ensayos de citotoxicidad de los péptidos A β oligomerizados y sin oligomerizar sobre células Vero	75
24. Resultados del ensayo de formación de placas líticas (PFU) utilizando los diferentes péptidos A β oligomerizados y sin oligomerizar	76
25. Gráfica del porcentaje de PFU de los péptidos A β ₃₅₋₂₅ , A β ₂₅₋₃₅ y A β ₁₋₄₀ oligomerizados y sin oligomerizar, comparado con el control de infección sin péptido	77
26. Gráfica del porcentaje de reducción en el número de PFU de los péptidos A β ₃₅₋₂₅ , A β ₂₅₋₃₅ y A β ₁₋₄₀ oligomerizados y sin oligomerizar.	78
27. Gráfica de resultados de PCR en tiempo real para el gen UL5 del VHS-1, en muestras de células Vero infectadas con VHS-1, con y sin péptido A β oligomerizado y sin oligomerizar	79
28. Western blot de lisado celular y sobrenadantes después de 6 y 48 horas de infección con VHS-1 y cada uno de los péptidos A β	80
29. Resultados de Western blot de los controles de infección y de péptido A β	81

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Genes asociados a la Enfermedad de Alzheimer	5
2. Oligonucleótidos para amplificar gen UL5 de VHS-1	49
3. Lista de péptidos A β y secuencia de aminoácidos	52
4. Reactivos mezcla 1 para RT-PCR MMLV	64
5. Reactivos mezcla 2 para RT-PCR MMLV	64
6. Condiciones de RT-PCR	65
7. Reactivos para preparar mezcla para qPCR para amplificar ARNr 18S	65
8. Condiciones generales para qPCR.....	66
9. Reactivos para qPCR del gen UL5	66

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) (OMIM #104300) es un trastorno neurodegenerativo descrito por primera vez en 1906 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer; es la causa más común, irreversible y progresiva de demencia, representando más del 50% de todos los casos (Mattson 2004). La EA se caracteriza por una pérdida neuronal, en especial del sistema colinérgico (Sims, Bowen et al. 1980) y retracción cerebral masiva (Carter 2011). En pacientes con esta enfermedad, existe una reducción en el tamaño de las regiones cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria; incluyendo los lóbulos temporal y frontal, como resultado de la degeneración de las sinapsis y de la muerte de las neuronas, ocasionando una pérdida gradual de la memoria y las habilidades cognitivas. (Figura 1) (Mattson 2004).

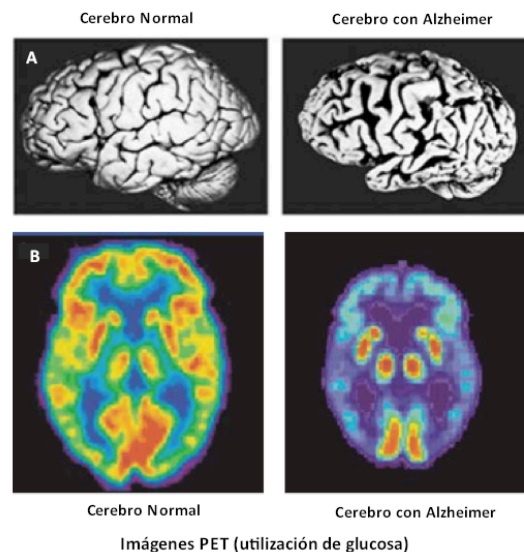


Figura 1.- Comparación de un cerebro normal y uno con enfermedad de Alzheimer. En EA se presenta una contracción de las regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje y la memoria; esto se correlaciona con importantes reducciones en el metabolismo energético celular en pacientes vivos. A.- El cerebro de los pacientes con EA presentan una marcada contracción de circunvoluciones en el lóbulo temporal y los lóbulos frontales. B.- imágenes de tomografías de emisión de positrones (PET) que revelan la captación de glucosa (rojo y amarillo indican altos niveles de la captación de glucosa) en una persona saludable y un sujeto de control normal (Mattson 2004).



Actualmente, la EA afecta a más de 35 millones de personas en todo el mundo (Alzheimer's Disease Group, 2010) y se reportan más de 5 millones de nuevos casos de Alzheimer cada año; la incidencia aumenta el 1% entre las edades de 60 y de 70, a 6% al 8% a la edad de 85 años. La prevalencia y la incidencia de la EA sugieren fuertemente que la edad es el factor de riesgo más significativo. De hecho, la posibilidad de desarrollar Alzheimer se duplica cada cinco años después de los 65 y la incidencia de la enfermedad aumenta de 2.8 por 1,000 personas al año (para las personas entre 65 y 69 años) a 56.1 por cada 1,000 personas en mayores de 90 años. Se estima que un 25% a 45% de las personas mayores de 85 años tienen demencia. La duración de la enfermedad es normalmente de 8 a 10 años, con un rango de 2 a 25 años después del diagnóstico. Sin embargo, alrededor del 5% de los pacientes con EA desarrollan el fenotipo de la enfermedad a una edad mucho más joven y se clasifican como de inicio temprano, la mayoría de los cuales son también del caso familiar (Zhang, Ma et al. 2012) presentando una incidencia estimada de 4.2 por cada 100,000 personas en el grupo de edad de 45-64 años (Bekris, Yu et al. 2010).

En lo que respecta a México, se estima que más de 600 mil personas mayores de 60 años padecen esta enfermedad (Instituto de Geriátrica, México, 2011).

1.1.1 Cambios biopatológicos en la Enfermedad de Alzheimer

1.1.1.1 Deterioro de la memoria episódica

En un individuo afectado con EA, la nueva información no se capta, codifica y almacena adecuadamente a largo plazo y en consecuencia no se puede recuperar, lo que resulta en lo denominado deterioro de la memoria episódica (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).

La memoria se compone de impulsos eléctricos a lo largo de las conexiones neuronales en el cerebro, formadas por la apertura y cierre de las sinapsis y facilitando por un marco de tiempo específico un circuito específico que codifica la información. El

aprendizaje implica la formación de nuevas conexiones sinápticas y esto requiere la expresión génica en el núcleo celular y la síntesis de proteínas en las sinapsis. La formación de la memoria episódica requiere, en particular, las conexiones neuronales de pequeñas áreas de la corteza entorrinal y el hipocampo en el lóbulo temporal medial (hipocampo y la circunvolución del hipocampo). La pérdida de estas conexiones es causa directa de los síntomas clínicos de deterioro de la memoria episódica. El déficit en la memoria episódica es el sello distintivo de la EA en el comienzo de la enfermedad (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).

1.1.1.2 Imágenes estructurales y cambios funcionales en un cerebro con EA

En el momento de los primeros síntomas de problemas de memoria episódica, ya están presentes severos cambios patológicos en los cerebros de pacientes con EA. Estos cambios se desarrollan gradualmente durante años en las áreas clave para la formación de la memoria. Hay una pequeña reducción con el envejecimiento normal, sin embargo, en pacientes con EA, en un punto distinto en el tiempo, que casi indica el comienzo del proceso de la enfermedad, el espesor del lóbulo temporal medial disminuye abruptamente reduciéndose a un ritmo de 15% por año (Jobst, Smith et al. 1994, Smith and Jobst 1996).

Imágenes por técnicas de resonancia magnética de imagen (IRM), no sólo confirman la reducción de volumen en la materia gris (neuronas), sino que han demostrado una correlación entre la atrofia de la corteza entorrinal y el deterioro de la memoria episódica en los pacientes con EA (Uotani, Sugimori et al. 2006, Di Paola, Macaluso et al. 2007, Ridha, Barnes et al. 2007). Además de las técnicas estructurales de resonancia magnética, la tomografía por emisión de positrones (PET) y técnicas funcionales, tales como la utilización de la glucosa y la resonancia magnética funcional (fMRI), se utilizan hoy para seguir el progreso de la enfermedad y hacer un diagnóstico temprano (Pike, Savage et al. 2007, Small, Bookheimer et al. 2008).



La atrofia en las áreas del cerebro afectadas de Alzheimer está causada por la pérdida de las dendritas y los axones, la reducción de la mielina, la contracción y, finalmente, la muerte de las neuronas (Sjöbeck, Haglund et al. 2005). 1,5 ml de un hipocampo saludable contiene alrededor de 9 millones de neuronas, en las etapas finales de la enfermedad, más de 80% de estas neuronas han desaparecido y el volumen se reduce a menos de la mitad (Mattson 2004).

1.1.2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad se divide en 2 subtipos en función de la edad de inicio: EA de inicio precoz (EOAD) y EA de inicio tardío (LOAD). La EA de inicio temprano corresponde aproximadamente del 1% al 6% de los casos, con intervalos aproximados de 30 años a 60 o 65 años. Sin embargo, la EA de inicio tardío o también denominada esporádica, es la forma más común de Alzheimer, con una edad de inicio de antes de los 60 o 65 años. Tanto EOAD y LOAD pueden ocurrir en personas con una historia familiar positiva de la EA. En la EA de inicio precoz, aproximadamente el 60% de los pacientes presenta familiares con EA y de estos casos (EA de inicio precoz familiar), el 13% se hereda de forma autosómica dominante con al menos 3 generaciones afectadas. La EA de inicio precoz también puede ocurrir en las familias con inicio tardío, con la excepción de unas pocas familias autosómicas dominantes que presentan un solo trastorno en un gen, la mayoría de los casos de EA parece ser un trastorno complejo que es probable que incluya múltiples genes susceptibles y factores ambientales (Bekris, Yu et al. 2010).

A pesar de que los casos de EA de inicio precoz ocurren muy raramente, han contribuido enormemente a la comprensión de la EA. Los genes involucrados, son genes asociados a la maquinaria proteolítica que se encarga del procesamiento de la proteína precursora de beta-amiloide o APP, como son la presenilina 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009), y apoyan la hipótesis amiloide, ya que todos los genes que portan las mutaciones EOAD conducen a un aumento de la

producción del péptido A β ₁₋₄₂ y, por lo tanto, a la amiloidosis temprana del cerebro. Estos genes codifican para la proteína precursora del beta-amiloide (APP), que da lugar a los péptidos beta amiloide (A β) después de su procesamiento proteolítico, y los genes de las presenilina 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), que son parte de la maquinaria proteolítica única que procesa APP.

En total, más del 90% de los pacientes con EA parecen presentar la enfermedad de tipo esporádico y tener una edad de inicio de los 60 a 65 años (LOAD) (Bertram and Tanzi 2004). A pesar de que los estudios en gemelos apoyan la existencia de un componente genético en la EA de inicio tardío, todavía no ha sido identificado ningún gen causante. De hecho, el único gen que se ha encontrado consistentemente asociado con casos de EA esporádico o de inicio tardío, a través de múltiples estudios genéticos, es el gen de la apolipoproteína E (APOE) (Selkoe 2001, Coon, Myers et al. 2007). Los genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer están localizados en 4 diferentes cromosomas y están asociados con herencia autosómica dominante o esporádica (Tabla 1).

Tabla 1.
Genes asociados a Enfermedad de Alzheimer*

Gen	Nombre	Localización cromosómica	Tipo de Herencia	Mecanismo Genético	Fenotipo Bioquímico
APP	Proteína Precursora del Amiloide	21q21	Autosómica dominante	EA inicio temprano	↑ Relación A β ₄₂ /A β ₄₀
				EA inicio tardío	↑ Generación A β /agregación A β
APOE	Apolipoproteína E	19q13.32	Esporádico	EA inicio tardío: asociación de riesgo (alelo ϵ 4)	↑ Agregación A β ↓ Degradación A β
PSEN1	Presenilina 1	14q24.2	Autosómica dominante	EA inicio temprano EA inicio tardío	↑ Relación A β ₄₂ /A β ₄₀
PSEN2	Presenilina 2	1q42.13	Autosómica dominante	EA inicio temprano EA inicio tardío	↑ Relación A β ₄₂ /A β ₄₀

*Tabla modificada de (Tanzi and Bertram 2005, Bekris, Yu et al. 2010)

1.1.3 Síntomas de la Enfermedad de Alzheimer

Tanto EOAD y LOAD se presentan clínicamente como demencia que comienza con una disminución gradual de la memoria y luego, poco a poco, aumenta en intensidad hasta que los síntomas eventualmente se convierten en incapacitantes. Como se

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



mencionó con anterioridad, la EA es un tipo de demencia, por ello es importante definir a ésta, la cual es causada por diversas enfermedades y condiciones que dan lugar a células cerebrales dañadas o conexiones entre las células cerebrales (Thies, Bleiler et al. 2011).

Al hacer un diagnóstico de demencia, los médicos comúnmente se refieren a los criterios que figuran en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) que consisten en disminución de la memoria, y al menos una de las capacidades cognitivas siguientes:

- 1) Capacidad de generar un discurso coherente o comprender el lenguaje hablado o escrito;
- 2) Capacidad para reconocer o identificar objetos, suponiendo que la función sensorial está intacta;
- 3) Capacidad para ejecutar actividades motoras, asumiendo las habilidades motoras intactas, la función sensorial y la comprensión de la tarea requerida y,
- 4) capacidad de pensamiento abstracto, tomar buenas decisiones y planificar y llevar a cabo tareas complejas.

La disminución de las capacidades cognitivas debe ser suficientemente grave como para interferir con la vida cotidiana.

El síntoma más común de la enfermedad de Alzheimer comienza con empeoramiento gradual como una dificultad para recordar información nueva. Esto se debe a una alteración de la función de las células cerebrales. Por lo general, comienza en las regiones que participan en la formación de nuevos recuerdos. Como el daño se extiende, los individuos experimentan otras dificultades.

Las siguientes son señales de advertencia de la enfermedad de Alzheimer:

- Pérdida de la memoria que altera la vida cotidiana
- Desafíos para planificar o resolver problemas
- Dificultad para realizar tareas familiares en el hogar, en el trabajo o en el ocio
- Confusión con el tiempo o el lugar



- Dificultad para comprender imágenes visuales y las relaciones espaciales
- Los nuevos problemas con las palabras para hablar o escribir
- Poner las cosas fuera y perder la capacidad de volver sobre los pasos
- Disminución o mal juicio
- El retiro del trabajo o actividades sociales
- Cambios en el estado de ánimo y personalidad (Thies, Bleiler et al. 2011).

La incapacidad para retener la información recientemente adquirida suele ser la presentación inicial, mientras que la memoria para acontecimientos remotos está relativamente a salvo hasta más tarde. Con la progresión de la enfermedad, el deterioro en otras áreas de la cognición (por ejemplo, el lenguaje, el razonamiento abstracto, y la función ejecutiva o de toma de decisiones) se presenta en diversos grados, y por lo general se asocia con dificultad en el trabajo o en situaciones sociales o actividades domésticas. Se presentan cambios de humor y disminución de la memoria. Los síntomas neurológicos que pueden ocurrir más adelante en el curso de la enfermedad incluyen convulsiones, hipertonía, incontinencia, etc. La muerte suele producirse por inanición en general, la desnutrición y neumonía (Bekris, Yu et al. 2010)

1.1.4 Diagnóstico histopatológico de EA

La Enfermedad de Alzheimer se caracteriza histológicamente por la presencia de los ovillos neurofibrilares (Ishino and Otsuki 1975) y las placas amiloides (Nikaido, Austin et al. 1970). Debido a que puede haber otras causas de pérdida de la memoria, el diagnóstico definitivo de la EA requiere un examen post-mortem del cerebro, el cual debe contener un número suficiente de "placas" y "ovillos" para calificarlo como afectado por EA. Las placas son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos del péptido beta amiloide (A β). Los depósitos difusos de A β también están presentes en altas cantidades. Los ovillos neurofibrilares intracelulares son agregados fibrilares de la proteína tau asociada a microtúbulos que exhiben la hiperfosforilación y las modificaciones oxidativas (Carter 2011). Las placas y los ovillos están presentes principalmente en las regiones del cerebro

implicadas en el aprendizaje y la memoria y las conductas emocionales, tales como la corteza entorrinal, hipocampo, el prosencéfalo basal y la amígdala. Las regiones del cerebro con las placas suelen exhibir a menudo, un número reducido de sinapsis y neuritas las cuales se encuentran dañadas, lo que sugiere que el péptido ocasiona tal daño (Mattson 2004). Las placas y los ovillos son considerados por muchos investigadores como los factores que conducen a la destrucción neuronal en esta enfermedad. La comprensión de su génesis es un objetivo clave en la investigación de la enfermedad (Perl 2010).

1.1.4.1 Ovillos neurofibrilares

El transporte axonal continuo, anterógrado (desde el cuerpo celular hacia la sinapsis) y retrógrado, rápido y lento, es un requisito indispensable para el funcionamiento de las neuronas. Proteínas motoras como cinesinas y dineínas transportan su carga a grandes distancias a través de los microtúbulos (Marx, Hoenger et al. 2009). Los microtúbulos, que forman parte del citoesqueleto, son polímeros de tubulina y se unen a las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), que regulan su estabilidad. La proteína asociada a microtúbulos más prominente en el axón es la proteína tau (MAPT) (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009)

1.1.4.1.1 Proteína Tau

La Proteína Tau fue descubierta en la década de 1970 mediante el estudio de los factores necesarios para la formación de microtúbulos (MT). Ésta proteína promueve el montaje de la tubulina en microtúbulos, uno de los principales componentes del citoesqueleto neuronal que define la morfología normal y proporciona soporte estructural a las neuronas (Figura 2) (Kolarova, García-Sierra et al. 2012). Tau es una proteína muy hidrofílica, soluble en agua y en su mayoría sin plegar, que contiene a lo largo de su secuencia al menos 25 sitios potenciales de fosforilación. La fosforilación dentro de dominios repetidos de tau puede ocasionar su separación de los microtúbulos; algunos sitios específicos de fosforilación a lo largo de tau se han

correlacionado con la gravedad de la lesión neuronal en la EA (Alonso, Li et al. 2008).

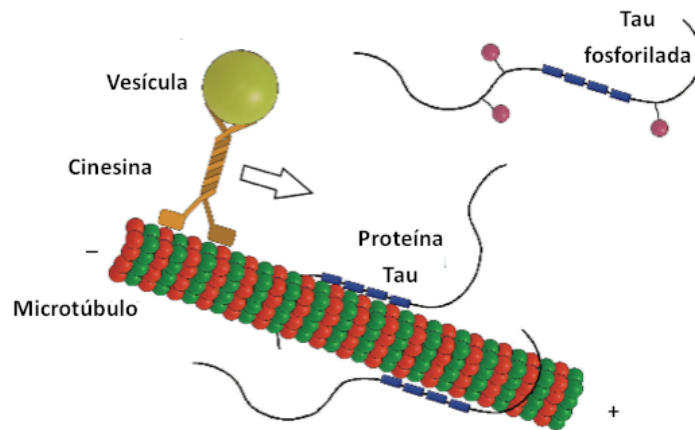


Figura 2.-Función normal de la proteína Tau. La proteína Tau estabiliza los microtúbulos a través de cuatro dominios de unión a la tubulina (cuadros) en caso de la isoforma de mayor longitud. La unión de tau a los MT es mantenida en equilibrio por la acción coordinada de cinasas y fosfatasa. La fosforilación de tau (círculos) regula su actividad de unión a MT y puede afectar el transporte axonal. La proteína Tau puede inhibir el transporte dirigido de vesículas a lo largo de los MT por cinesinas (Kolarova, García-Sierra et al. 2012).

Las seis isoformas de la proteína tau humana en las neuronas comprenden entre 352 y 441 aminoácidos de largo, y se expresan en una proporción constante. Contienen en la región C-terminal tres o cuatro unidades que se repiten con una longitud de 31 aminoácidos cada una. Estos son los dominios de unión a los microtúbulos y también los dominios responsables de la agregación en los filamentos helicoidales apareados (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009)

La unión de tau a la tubulina está regulada por su estado de fosforilación, que se rige normalmente por la acción coordinada de las cinasas y fosfatasa en la molécula de tau (Liu, Iqbal et al. 2005). En condiciones patológicas, como el caso de EA, la fosforilación anormal de tau disminuye su capacidad de unión a la tubulina, lo que no sólo conduce a la desorganización de los microtúbulos, sino también a la autopimerización en agregados en forma de ovillos neurofibrilares (Avila 2008, Iqbal and Grundke-Iqbal 2008)

Tau hiperfosforilada en cerebro de pacientes con EA pueden secuestrar a proteínas tau en

estado normal y otras proteínas asociadas a microtúbulos, ocasionando un deterioro en el transporte axonal y una disminución de la neurotransmisión, lo cual tiene un impacto inmediato en las funciones cognitivas. El exceso de fosforilación rompe esta unión y los dominios de unión a microtúbulos liberados se asocian intermolecularmente y forman pequeños depósitos (pre-ovillos) que finalmente adoptan una estructura de hojas beta con filamentos helicoidales apareados. Estos finalmente se ensamblan para formar grandes ovillos neurofibrilares en los que parte de la proteína es objeto de una serie de modificaciones adicionales, como por ejemplo, los truncamientos, glicosilación, o entrecruzamiento a través de transglutaminasas, que confieren una lesión tóxica adicional dentro de la neurona (Figura 3) (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009)

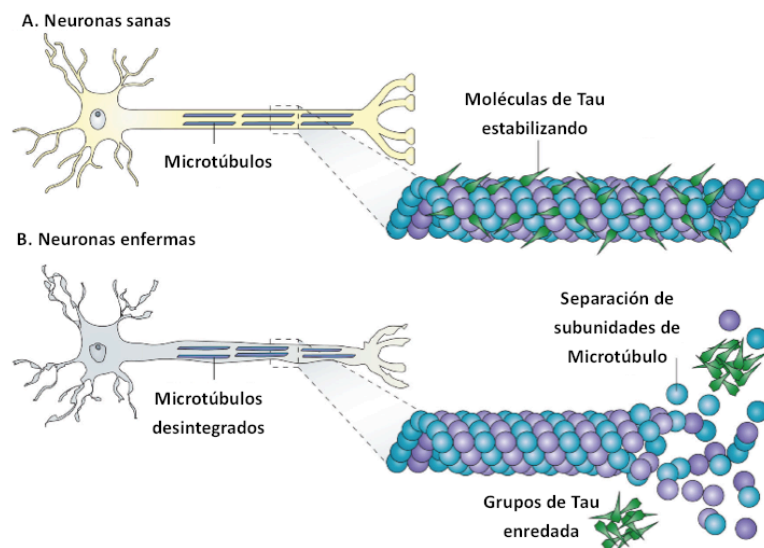


Figura 3.- Tau en neuronas normales y en tautopatías. Tau facilita la estabilización de microtúbulos (MT) en las células, sirviendo como "pistas" esenciales para el tráfico normal de la carga celular a lo largo de las largas proyecciones axonales de neuronas. El resultado de la hiperfosforilación de tau, reduce su unión a MTs. El secuestro de tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares (ONF), ocasiona que una menor cantidad de tau se encuentre unida a MTs. La pérdida de la función de tau conduce a la inestabilidad MT y reducción del transporte axonal, lo que podría contribuir a la EA (Brunden, Trojanowski et al. 2009).

1.1.4.2 Placas amiloides

Las placas amiloides son depósitos extracelulares de pequeños péptidos de diferente longitud llamados beta-amiloide (A β) que se derivan a través de sucesivas escisiones proteolíticas de la proteína precursora del péptido beta amiloide (APP) (Selkoe 1998).

A pesar de que la proteína APP ha sido objeto de mucho estudio, desde su identificación, su función fisiológica permanece desconocida. Se ha sugerido un papel de APP en el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis, en el tráfico neuronal de proteínas a lo largo del axón, la transducción de señales transmembrana, la adhesión celular, el metabolismo del calcio, etc., pero se requieren más pruebas *in vivo* (Zheng and Koo 2006). APP es escindida en varios fragmentos durante su tráfico intracelular, y estos metabolitos APP median diversas funciones y en ocasiones causan efectos adversos. Por lo tanto, el efecto neto de APP sobre la actividad celular puede ser una combinación de las funciones de sus metabolitos, dependiendo de la proporción de los niveles de cada metabolito en el tiempo y el espacio (Zhang, Ma et al. 2012).

1.1.4.2.1 Proteína precursora del amiloide (APP)

La proteína APP es una proteína integral de membrana tipo I con una gran porción extracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana, y un dominio intracelular (C-terminal) corto. El gen que codifica para la proteína APP se encuentra en el cromosoma 21 en humanos, con tres isoformas principales derivadas de “splicing” (corte y empalme) alternativo. Estas isoformas son APP695, APP751 y APP770 (que contiene 695, 751, y 770 aminoácidos, respectivamente); la isoforma APP695 se expresa predominantemente en neuronas (Zhang, Ma et al. 2012).

1.1.4.2.1.1 Tráfico intracelular de APP

La proteína APP es sintetizada en el retículo endoplásmico (RE) y luego se transporta a través del aparato de Golgi a la red trans-Golgi (TGN), donde la más alta concentración de la APP se encuentra en las neuronas (Xu, Sweeney et al. 1997). El péptido A β se genera en el RE y en la red Trans-Golgi. Desde la red trans-Golgi, la

proteína APP puede ser transportada en vesículas secretoras a la superficie de la célula donde es escindida por la α -secretasa para producir una molécula soluble sAAP α (Sisodia 1992), o re-internalizada a través de una vía de degradación endosomal/lisosomal [38,39]. Se ha propuesto que el péptido A β también puede ser generado en el sistema endosomal/lisosomal (Haass, Hung et al. 1993, Zhang, Ma et al. 2012) Aunque APP inicialmente es dirigida hacia la ruta secretora, es proteolíticamente procesada en varios sitios subcelulares diferentes (Weidemann, Eggert et al. 2002). En el procesamiento proteolítico de APP se encuentran involucradas las proteasas: alfa, beta, y gama secretasas (α , β y γ) (Masters et al., 2012).

Durante su tránsito desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática a través de la vía secretora constitutiva, la APP naciente sufre modificaciones post-traduccionales por N-y O-glicosilación, fosforilación ectodominio y citoplásmica, y sulfatación de la tirosina. En células en cultivo, se estima que sólo alrededor del 10% de las moléculas nacientes de APP se liberan correctamente a la membrana plasmática. APP puede ser procesada proteolíticamente en la superficie celular principalmente por α -secretasas, resultando en la liberación del ectodominio APPs α (Sisodia 1992).

A diferencia de muchos receptores de superficie celular, la proteína APP completa no reside mucho tiempo en la superficie celular. Aproximadamente, el 70% de la superficie de APP se internaliza a los pocos minutos de llegar a la membrana plasmática. Después de la endocitosis, APP se entrega en endosomas tardíos y una fracción de las moléculas endocitadas se recicla a la superficie celular.

Los estudios realizados en líneas celulares no neuronales y en neuroblastoma muestran que A β se genera principalmente en la red trans-Golgi conforme se transporta al APP a través de las vías de secreción y reciclaje (Figura 4).

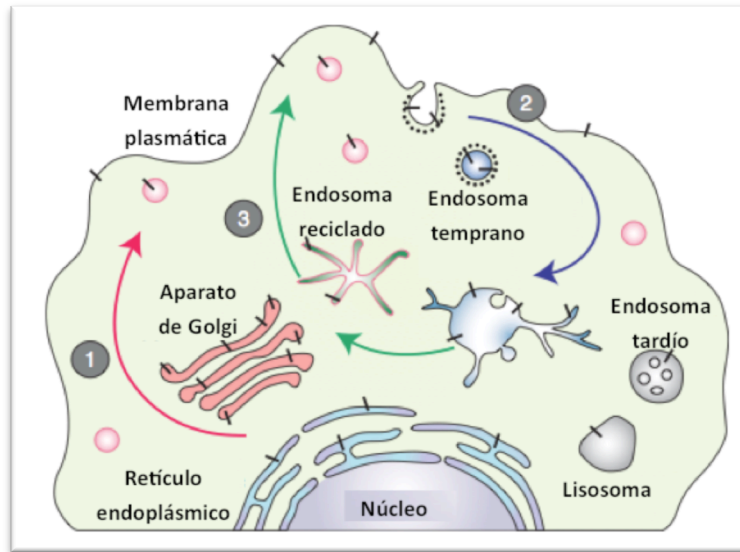


Figura 4.- Tráfico intracelular de APP. Las moléculas nacientes de APP maduran a través de la vía secretora constitutiva. 1) Una vez que APP alcanza la superficie celular, es rápidamente internalizada, 2) posteriormente, a través de los compartimentos endocíticos y el reciclado, es devuelta a la superficie celular o 3) degradada en lisosomas. No se produce ningún procesamiento amiloidogénico en la superficie celular, donde están presentes las α -secretasas. El procesamiento Amiloidogénico es a través del tránsito de los orgánulos endocíticos, donde APP se encuentra con las β -y γ -secretasas (Haass, Kaether et al. 2012).

En estado estacionario, la mayoría de BACE1 se localiza a finales de la red Trans-Golgi y endosomas, de acuerdo con la escisión amiloidogénica de APP durante las etapas de endocitosis/reciclaje (Koo, Squazzo et al. 1996) (Figura 4). BACE1 tiene actividad óptima a pH ácido *in vitro*, apoyando a la idea de que BACE1 se unirá a APP probablemente durante el tránsito en compartimentos endocíticos ácidos. Los datos disponibles indican la presencia de actividad γ -secretasa compleja y la enzima en los compartimientos múltiples, incluyendo el retículo endoplásmico, red trans-Golgi, endosomas y en la membrana plasmática (Haass, Hung et al. 1993).

1.1.4.2.1.2 Procesamiento de APP

APP se somete a procesamiento post-traducciona, que involucra a varias secretasas diferentes y proteasas, a través de dos vías principales. En la vía no amiloidogénica, APP es escindida por la α -secretasa seguida de la γ -secretasa. La α -secretasa que

corta al APP en el aminoácido número 17 dentro de la secuencia del péptido $A\beta$ (Figura 5), libera una gran dominio extracelular ($sAPP-\alpha$) y un fragmento C-terminal asociado a membrana que consta de 83 aminoácidos (C83). El fragmento C83 es escindido por la γ -secretasa para liberar el péptido P3 y el AICD, ambos se degradan rápidamente. En la vía amiloidogénica, APP es procesada principalmente por la β -secretasa en el primer residuo, o en el residuo 11 (llamado sitio b') de la secuencia del péptido $A\beta$ (Figura. 5), perdiendo $sAPP-\beta$ y dando lugar a la generación del fragmento C-terminal asociado a membrana que consta de 99 aminoácidos (C99). La γ -secretasa se unirá más tarde a C99 para liberar AICD y el péptido $A\beta$, el cual, posteriormente se agrega y forma fibras para dar lugar a placas amiloides en el cerebro (Zhang, Ma et al. 2012).

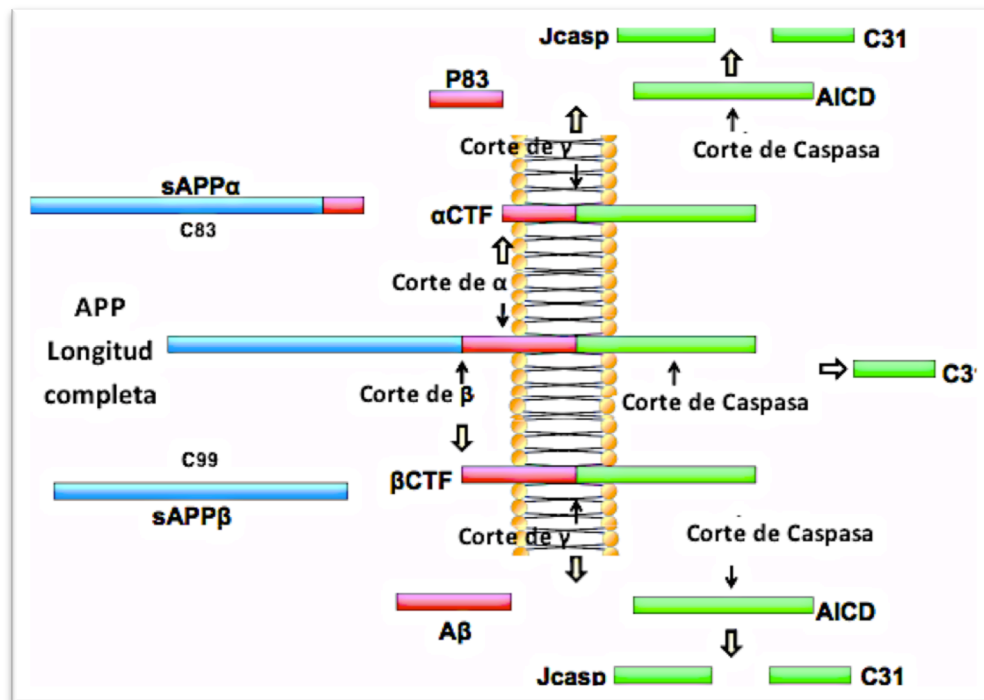


Figura 5- Diagrama del procesamiento de la proteína APP. Modificado de (Zhang, Ma et al. 2012).

1.1.4.2.2 Péptido Beta amiloide (A β)

1.1.4.2.2.1 Proporción de diferentes péptidos A β en las placas amiloides

El A β como se mencionó, se deriva de la proteína precursora del amiloide (APP) después de la escisión por secretasas. Debido a que la γ -secretasa corta sus sustratos en varias posiciones muy cercanas, el péptido denominado A β es en realidad un grupo de péptidos que difieren en longitud en su extremo C-terminal. La especie predominante es el péptido A β_{40} , que normalmente constituye de 80 a 90% de todos los péptidos A β . La segunda especie es el péptido A β_{42} (alrededor de 5 a 10%), y el resto se compone sobre todo de las especies más cortas, incluyendo A β_{37} y A β_{38} . Como se mencionó antes, A β_{42} forma agregados fácilmente y por lo tanto, constituye la semilla para las grandes oligómeros y fibrillas y finalmente, para las placas amiloides macroscópicas (S and E. 2007), (Bentahir, Nyabi et al. 2006).

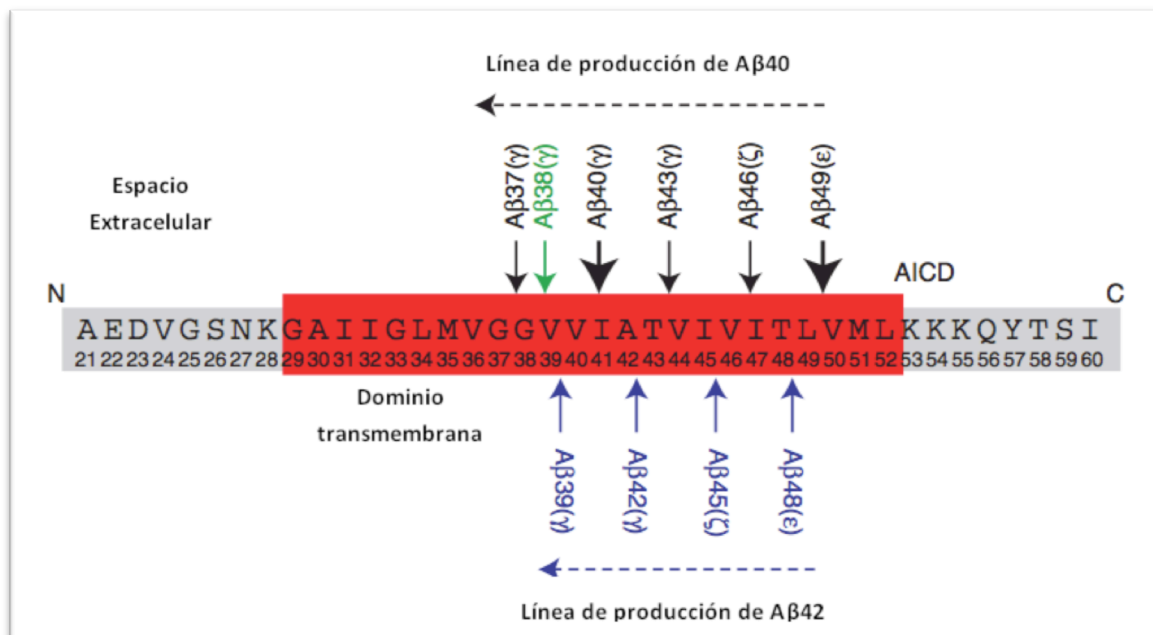


Figura 6.- Procesamiento secuencial de APP por la γ secretasa. (Haass, Kaether et al. 2012)



La formación de agregados es acompañada de una transición estructural desde una conformación de hélice α a una de hojas β . Los primeros agregados y placas pueden estar formados exclusivamente por $A\beta_{42}$, con la posterior adición de $A\beta_{40}$ en adelante cuando la concentración de los agregados amiloides alcanza un valor umbral (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009). Las especies de péptido más cortas, por ejemplo, $A\beta_{38}$, no son propensas a la agregación, y de hecho pueden interferir con este proceso (S and E. 2007).

Los monómeros del péptido $A\beta$ no son tóxicos a una concentración fisiológica. Se producen constitutivamente por el organismo como un subproducto de la proteólisis de APP o, según algunos autores, incluso puede ser una función fisiológica. En efecto, aunque parece que la producción de isoformas $A\beta$ es un proceso normal de función desconocida, en un pequeño número de individuos, un aumento en la proporción de $A\beta_{42}$ aparece ser suficiente para causar EA de inicio precoz (Goedert and Spillantini 2006, Irvine, El-Agnaf et al. 2008).

Diferentes agregados tóxicos pueden formarse *in vitro* y bajo condiciones *in vivo*, pero todavía no está claro que varios de estos agregados sean relevantes para la enfermedad y cómo se produce la toxicidad (Yankner 1996).

Los agregados de $A\beta$ pueden formar poros en las membranas celulares y, por lo tanto, alterar la homeostasis iónica. Los péptidos $A\beta$ interactúan con la célula en un número de maneras sutiles, y finalmente, la toxicidad puede ser el resultado de tales interacciones (S and E. 2007).

Después de ser procesado a partir de sus precursores de proteínas, el péptido $A\beta$ cambia su conformación para formar agregados, que finalmente, son depositados en forma de placas seniles, uno de los criterios fundamentales patológicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Una de las principales teorías de las causas de la neurodegeneración en EA, postula que la producción de los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$

provoca la activación de una cascada bioquímica que conduce a la muerte celular (Hölscher 2005).

Se ha propuesto que el estado de agregación de fragmentos de amiloide es de crucial importancia para inducir efectos tóxicos. Mientras que los agregados de bajo peso molecular muestran una baja toxicidad, algunos oligómeros parecen ser mucho más tóxicos que otros (Walsh and Selkoe 2004), pero no está claro cómo los fragmentos solubles del amiloide se agregan en el cerebro (Holscher, Gengler et al. 2007). Del mismo modo, la correlación entre la neurotoxicidad, las propiedades estructurales, y la evolución de los agregados A β a lo largo del tiempo, no han sido completamente entendidos. El A β altamente tóxico (25-35) es un péptido peculiar que difiere de todos los péptidos A β comúnmente estudiados debido a que posee propiedades de agregación muy rápidas y produce un aumento notable en la neurotoxicidad (Millucci, Raggiaschi et al. 2009).

Varios péptidos A β sintéticos forman filamentos; ensamblados de láminas β *in vitro* (Meinke and Hansmann 2007). La evidencia creciente procedente de los estudios de toxicidad *in vitro* con péptidos sintéticos A β , muestran que un estado agregado (fibra, protofibrilla, oligómero de bajo peso molecular, o ligando difusible, no fibrilar), es tóxico para las neuronas en cultivos (Baglioni, Casamenti et al. 2006, Dobson 2006, Stefani 2007, Bieschke, Siegel et al. 2008). El fenómeno de ensamblaje es dependiente del pH de las soluciones, la concentración de A β s y el tiempo de incubación en solución (Wei and Shea 2006). Se ha reportado que varios fragmentos de A β forman tales conjuntos, pero sólo A β s que incluyen una porción sustancial de la secuencia transmembranal se demostraron que son capaces de conformar agregados estables a pH 7,4 y resistentes al dodecilsulfato de sodio (SDS) (Pike, Burdick et al. 1993). En particular, las fases iniciales de montaje de A β ₂₅₋₃₅, que contienen el dominio funcional (secuencia GSNKGAIIGLM) de la proteína precursora de A β que se requiere tanto para efectos neurotróficos en

condiciones normales de los tejidos neurales y que participa en los efectos neurotóxicos que se presentan en la EA, son difíciles de controlar (Clementi, Marini et al. 2005).

1.1.4.2.2 Péptido $A\beta_{25-35}$

$A\beta_{25-35}$ es un péptido neurotóxico (Takadera, Sakura et al. 1993, Ban, Hamada et al. 2003).

Es la secuencia más corta de péptido que retiene la actividad biológica comparable con el péptido de longitud completa del $A\beta_{1-42}$ y exhibe grandes láminas β agregadas (Pike, Walencewicz-Wasserman et al. 1995). Está presente en las placas seniles y produce degeneración de las neuronas del hipocampo en el cerebro de pacientes con EA. Ciertas formas de $A\beta_{1-40}$ se pueden convertir en $A\beta_{25-35}$ por proteasas cerebrales (Kubo, Nishimura et al. 2002). $A\beta_{25-35}$ ha sido elegido a menudo como modelo de cuerpo entero de $A\beta$ en los estudios estructurales y funcionales (Clementi, Marini et al. 2005, Misiti, Sampaolese et al. 2005). Por otro lado, el estudio de las preferencias conformacionales de $A\beta_{25-35}$ en diferentes condiciones, parece ser crucial para el esclarecimiento de sus propiedades intrínsecas estructurales relacionadas con la formación de fibras de $A\beta$ (Millucci, Raggiaschi et al. 2009).

El péptido $A\beta_{25-35}$ contiene una región hidrofóbica de 7 aminoácidos en los residuos 29-35 organizados en la región de $A\beta$ (Pike, Burdick et al. 1993). Este fragmento forma rápidamente agregados solubles rápidamente. La estructura del fragmento 25-35 determina la alta toxicidad de los péptidos $A\beta$ anormales, por lo tanto, éste fragmento ($A\beta_{25-35}$) ha sido ampliamente utilizado para estudios de mecanismos relacionados con la neurotoxicidad del péptido beta amiloide (Shevtzova, Kireeva et al. 2001).

1.1.4.2.2.3 Rutas de agregación de A β hacia ensamblados neurotóxicos

La formación del A β en la EA se concibe como un complejo proceso de agregación de la proteína, con la participación del plegamiento incorrecto de A β en ensamblados solubles e insolubles (Yoshiike, Minai et al. 2008). Los monómeros de A β se componen principalmente de α -hélices y/o una estructura desordenada, mientras que los polímeros son ricos en conformación hoja β no plegada. Los cambios conformacionales que conducen a la formación de las hojas beta extendidas conducen a la formación de oligómeros de A β . Estudios cinéticos han sugerido que la forma no plegada de A β monomérico precede a la formación de oligómeros, que luego sirven como semillas o núcleos para el crecimiento fibrilar acelerado (Figura 7) (Ni, Shi et al. 2011).

Un concepto ampliamente aceptado para la formación de fibras amiloides es la nucleación dependiente de modelo de polimerización, que separa el proceso de fibrilización en una fase de nucleación y una fase de alargamiento. La nucleación requiere la auto-asociación de monómeros solubles, que es termodinámicamente desfavorable, y así se produce lentamente. En la fase de nucleación, los monómeros sufren cambios conformacionales y de auto-asociación para formar núcleos oligoméricos que son ricos en láminas beta. Una vez que el núcleo se forma, el montaje de grandes agregados y de elongación fibrilar es un proceso mucho más favorables y rápido. Como resultado, la cinética de formación de fibras amiloides está bien representada por una forma sigmoideal con una nucleación de fase/retardo seguida por una fase de crecimiento rápido, después, por una fase de saturación (figura 7) (Kumar and Walter 2011).

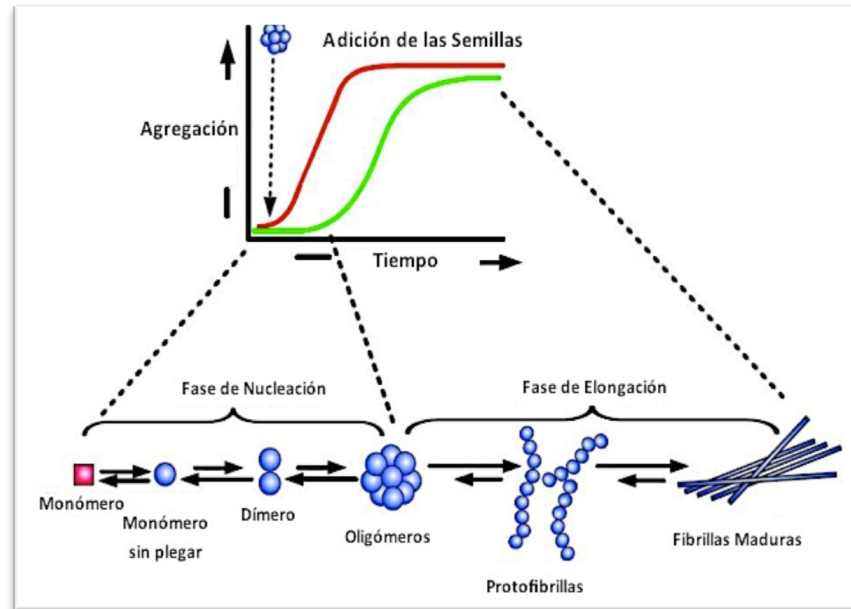


Figura 7.- Modelo de Polimerización dependiente de nucleación en la agregación amiloide (Kumar and Walter 2011)

En la EA, los monómeros solubles de $A\beta$ pueden formar conjuntos superiores de orden que van desde los oligómeros de bajo peso molecular (por ejemplo, dímeros y trímeros) a oligómeros de alto peso molecular a protofibrillas y fibrillas (Figura 8) (Larson and Lesné 2012). Sin embargo, la relación exacta de estas especies entre sí sigue siendo especulativa, sobre todo debido a su naturaleza intrínseca como intermediarios solubles globulares. A pesar de este obstáculo, varios grupos independientes han observado aparentes oligómeros de $A\beta$ endógenos en los estudios de expresión de proteínas a partir de tejido del cerebro humano post-mortem y el uso de animales y líneas celulares genéticamente modificados para producir y secretar las especies de $A\beta$ (Larson and Lesné 2012).

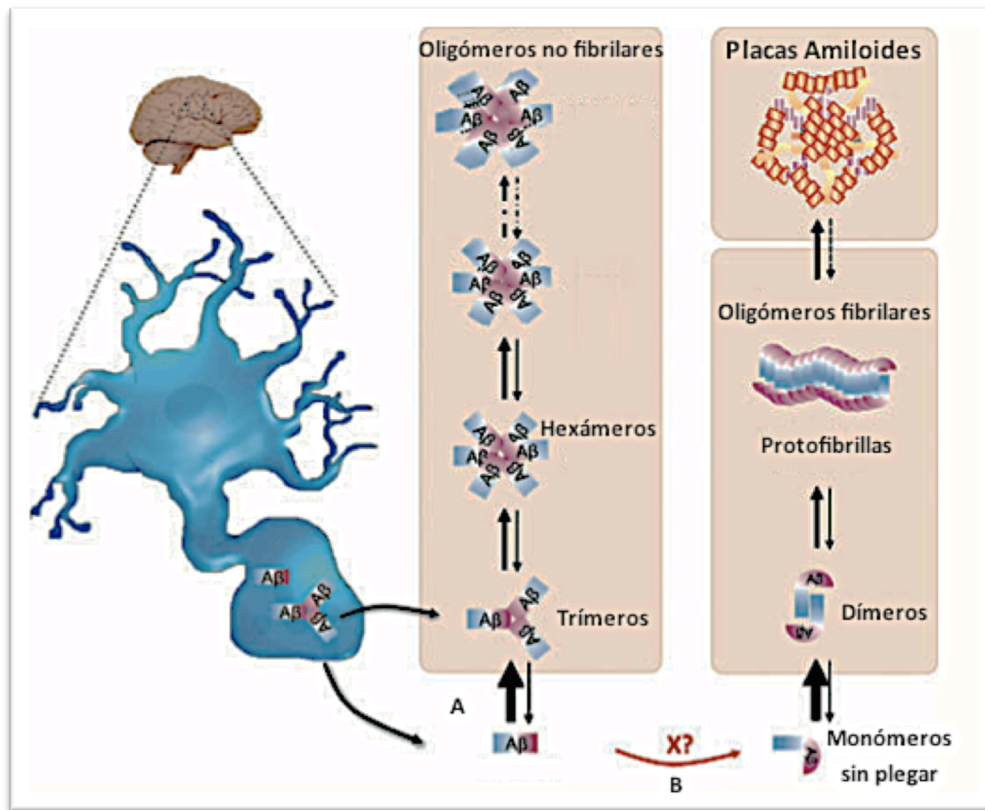


Figura 8.-Modelo propuesto de la producción oligomérica endógena de $A\beta$. Monómeros y trímeros de $A\beta$ son producidos y secretados por neuronas. Una vez en el líquido intersticial, oligómeros de $A\beta$ siguen una expansión en trímeros basada en el tamaño en condiciones fisiológicas o envejecimiento normal. Estas especies evaden la formación fibrilar. Sobre la presencia de un factor no identificado, se convierte en monómeros de $A\beta$ mal plegados que permite al péptido a entrar en la vía fibrilar, cuyo primer paso corresponde a la formación de dímeros de $A\beta$. Los dímeros pueden expandirse rápidamente para crear protofibrillas, en última instancia, contribuir a la formación de fibras de $A\beta$ como placas amiloides (Larson and Lesné 2012).

1.1.4.2.2.4 Liberación de péptido $A\beta$ y el transporte a través de la barrera hematoencefálica

El SNC tiene un estado de equilibrio constante de alto nivel con respecto al péptido $A\beta$. Sin embargo, este alto nivel de péptido $A\beta$ no conduce a la formación de agregados amiloides o placas de amiloides en individuos sanos. En cambio, los péptidos $A\beta$ recién producidos se eliminan rápidamente, y su vida media en un cerebro sano es del orden de unas pocas horas. Por lo tanto, deben existir mecanismos eficientes de remoción (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).



La primera línea de aclaramiento son proteasas de cerebro que degradan el péptido. La lista de proteasas candidatas que pueden escindir el péptido A β es larga, pero dos de ellas son fuertes candidatos: neprilisina (MME, la membrana de metalo- endopeptidasa o encefalinasa-) y la enzima que degrada la insulina (IDE, insulysin). Ambos prefieren las especies monoméricas más que la forma agregada. Mientras que las proteasas IDE se encuentran preferentemente en el interior de la célula, la neprilisina se localiza principalmente en el exterior. Por lo tanto, sus actividades pueden ser complementarias y pueden orientar al péptido A β en diferentes compartimentos (Iwata, Tsubuki et al. 2001, Shirotani, Tsubuki et al. 2001, Tanzi, Moir et al. 2004)

Es decir, la producción de A β es normalmente compensada por su eliminación a través de varios procesos, incluyendo: 1) la degradación proteolítica, 2) aclaramiento mediado por células (que puede en sí implicar la degradación proteolítica), 3) el transporte activo fuera del cerebro, y 4) en agregados insolubles (S and E. 2007)

La acumulación y agregación de los péptidos A β se cree que son centrales en la patogenia de la EA. Estudios recientes sugieren que su acumulación intracelular en lugar de acumulación extracelular de A β ₁₋₄₂ es un evento temprano en EA (Billings, Oddo et al. 2005), y que su oligomerización conduce a la disfunción neuronal y muerte celular (Walsh, Klyubin et al. 2005). Sin embargo, la causa (s) de su producción en los pacientes con EA esporádica sigue siendo desconocida (Wozniak, Itzhaki et al. 2007).

Se sabe que varias enfermedades crónicas son causadas por patógenos, incluyendo virus en varios tipos de cáncer (Lin, Shang et al. 1995). Hay una buena razón para considerar que la Enfermedad de Alzheimer también tiene una etiología infecciosa: en particular, se ha encontrado una relación con el virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1), un virus neurotrópico común que infecta a la mayoría de los seres



humanos (ver más adelante). Además, varios estudios proporcionan un fundamento para la participación de VHS-1 en la acumulación celular del péptido A β (Itzhaki and Wozniak 2008).

1.2 Herpes simplex virus

Los virus del herpes están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan una gran variedad de hospederos incluyendo vertebrados (mamíferos, aves, peces, reptiles) e invertebrados (moluscos, corales) (Vega Thurber, Barott et al. 2008, Sauvage, Pépin et al. 2009). Colectivamente, estos virus se clasifican en el orden *Herpesvirales*. Con todos los miembros comparten varias características estructurales: (1) un genoma de ADN de doble hebra lineal que es típicamente 150-175 Kpb en común, (2) una cápside icosaédrica que consta de 162 capsómeros (150 hexones, 11 pentones, y un vértice del portal), (3) una capa amorfa de proteínas denominada tegumento que rodea a la cápside, (4) una envoltura que consta de una bicapa de lípidos y las proteínas unidas a la membrana. Los *Herpesvirales* son muy diversos genéticamente, la proteína más conservada es una ATPasa que participa en el embalaje de los genomas virales en las cápsides (Davison, Eberle et al. 2009).

También hay similitudes en los aspectos clave del ciclo de infección, que incluyen: (1) entrada en la célula a través de la fusión mediada por el receptor, (2) la entrega del genoma envuelto en el núcleo, (3) establecimiento de por vida de la infección latente, (4) la replicación del ADN y ensamblaje de la cápside en el interior del núcleo, (5) salida de los genomas envueltos desde el núcleo hasta el citosol, (6) la maduración y envolvimiento de partículas virales en el citoplasma, y (7) exocitosis de partículas virales infecciosas, entre otras propiedades moleculares (Zaichick, Bohannon et al. 2011).

1.2.1 *Alphaherpesvirinae*

A pesar de que todos los virus del herpes comparten varias características biológicas importantes, que varían en gran medida en el rango de hospederos, tropismo tisular, la cinética de replicación, los síntomas clínicos y la gravedad de la enfermedad. Hay tres familias dentro del orden *Herpesvirales* de los cuales uno, el *Herpesviridae*, incluye patógenos conocidos de mamíferos. El virus del herpes se divide en tres subfamilias con nombres alfa, beta y gamma *herpesvirinae* (Roizman, Carmichael et al. 1981, Roizman and Baines 1991, Roizman and Whitley 2001). Los virus neuroinvasivos comprenden a tres miembros de los cuatro géneros de *Alphaherpesvirinae*, dos de los agentes patógenos que incluyen mamíferos y marsupiales: los virus simplex y los virus *varicella* (Figura 9) (Davison 2010). El término de neuroinvasión se aplica para referirse a la invasión de las neuronas que no fueron expuestas directamente a la inoculación (es decir, se extendió desde los tejidos no neuronales a las neuronas).

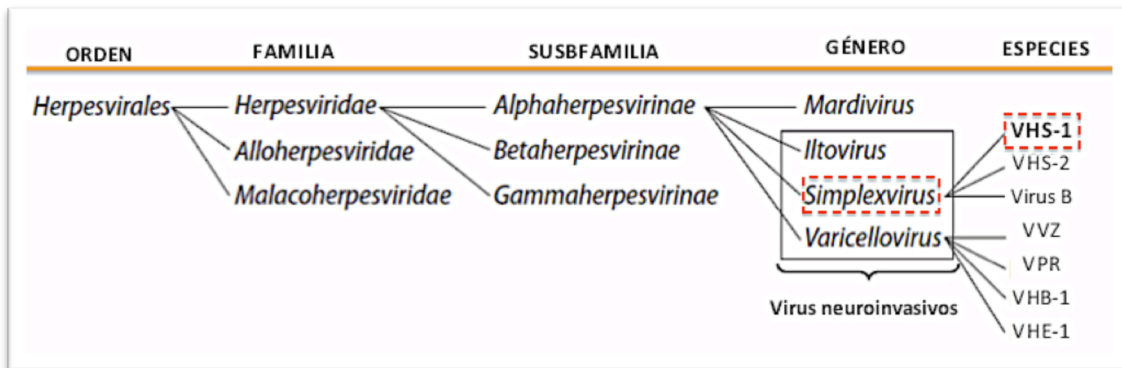


Figura 9. Taxonomía de los virus de herpes neuroinvasivos. Los virus de herpes neuroinvasivos incluyen especies de tres géneros de la subfamilia *alphaherpesvirinae*; virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2); mono virus B (virus B); varicela-zoster (VZV); virus de la pseudorrabia (VPR); herpes bovino tipo 1 (VHB-1) y herpesvirus equino tipo 1 (VHE-1) (Zaichick, Bohannon et al. 2011).

Una característica común de la *Alphaherpesvirinae* es que poseen un ciclo reproductivo rápido, seguido por la destrucción de la célula huésped en una amplia variedad de tejidos susceptibles (Whitley, Kimberlin et al. 1998). Aunque las infecciones no se



asocian a menudo con síntomas evidentes, las enfermedades graves (por ejemplo, la encefalitis) pueden surgir de la replicación activa de estos virus, junto con su capacidad de esparcimiento dentro de los circuitos neuronales. Esto está en contraste con la familia *Gamma herpesvirinae* linfotrópica que, en general, producen enfermedades severas (por ejemplo, linfomas y sarcomas) como consecuencia de latencia. El miembro prototipo del género Simplex es el virus humano herpes simplex tipo 1 (VHS-1). Otros patógenos humanos en esta familia son los herpes de humano 2 (herpes simplex tipo 2; VHS-2) y *Cercopithecine herpesvirus 1* (virus B). Aunque este último virus no es endémico en los seres humanos, la propagación zoonótica puede resultar en infecciones letales (Zaichick, Bohannon et al. 2011).

El virus de herpes simplex (VHS) forma parte de la subfamilia *alphaherpesvirus* de la familia *herpesvirus*. Hay dos tipos de VHS: Tipo-1 (VHS-1) y tipo 2-(VHS-2). Estos virus son neurotrópicos, capaces de infectar al sistema nervioso y causar enfermedades neurológicas y mantenerse en latencia (Karasneh and Shukla 2011).

1.2.2 Estructura del virus de herpes simplex

Los miembros de las familias *Herpesviridae* comparten características estructurales comunes ejemplificadas por el prototipo VHS-1, el cual se compone de cuatro subcompartimientos distintos (Figura 10 A):

- 1) El núcleo del virión contiene un *genoma de ADN* lineal de doble hebra de 152 Kpb que codifica ~ 80-85 genes virales que están dispuestos en segmentos: único largo (UL) y único corto (US) (Figura 10 B). UL comprende el 82% y US el 18%. Estas regiones a su vez están flanqueadas por secuencias repetidas invertidas (designadas como ac, b'a ', ac, c'a') (Perry and McGeoch 1988), y contienen las secuencias necesarias para la escisión/empaquetado del genoma de VHS-1, que se denominan sitios "a" (Deiss, Chou et al. 1986). Adicionalmente, el genoma alberga tres orígenes de

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1

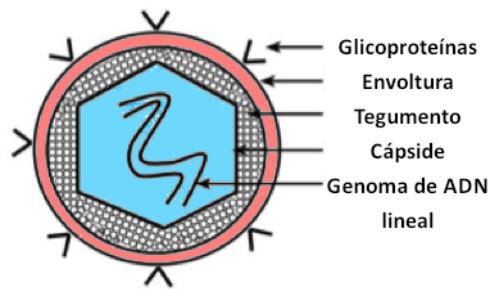


replicación lítica, dos situados dentro de la región única corta (*oriS*) y uno en el segmento único largo (*oriL*) (Vlazny and Frenkel 1981). Como consecuencia de la recombinación a través de las secuencias *a*, el genoma de VHS-1 existe como una mezcla equimolar de cuatro formas isoméricas generadas por la inversión de la región UL y las secuencias de US respecto a la otra (Lehman and Boehmer 1999). Se ha demostrado que aproximadamente la mitad de los genes virales son prescindibles para la replicación del virus en células cultivadas, y por lo tanto, pueden ser sustituidos por material genético exógeno (Kriskey, Wolfe et al. 1998).

- 2) Una *cápside* icosaédrica donde se encuentra el genoma viral, la cual consta de 162 capsómeros formados por cuatro proteínas de la cápside: VP5, VP26, VP23 y VP19C. La encapsidación y liberación del ADN viral se produce a través de un portal situado dentro de la cápside, que está formada por un dodecámero de la proteína pUL6 (Newcomb, Juhas et al. 2001, Cardone, Winkler et al. 2007).
- 3) El *tegumento*, que es una capa proteínica alrededor de la cápside (Cardone, Winkler et al. 2007), contiene principalmente proteínas codificadas por el virus que están implicadas en la regulación transcripcional de los genes virales inmediatos tempranos (IE) (por ejemplo, VP16), y en la regulación de la transcripción de la célula huésped (*vhs*: virion-hostshut-off proteins). El tegumento también contiene a la proteína VP22, que ha sido implicada en la estabilización de ciertas proteínas víricas, tales como gE, gD y ICP0 (Duffy, Mbong et al. 2009), y proteínas implicadas en la propagación viral durante la infección lítica (de Silva and Bowers 2009).
- 4) Por último, una *envoltura* externa que contiene 16 proteínas de membrana, entre ellas 12 proteínas diferentes que contienen cadenas de oligosacáridos (glicoproteínas). Estas glicoproteínas son de particular importancia, ya que sus interacciones con las proteínas de superficie de la célula huésped median la entrada del VHS en la célula. Estas glicoproteínas son: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, y gN

(Grünewald, Desai et al. 2003).

A.- Virión de VHS-1



B.- Genoma de VHS-1

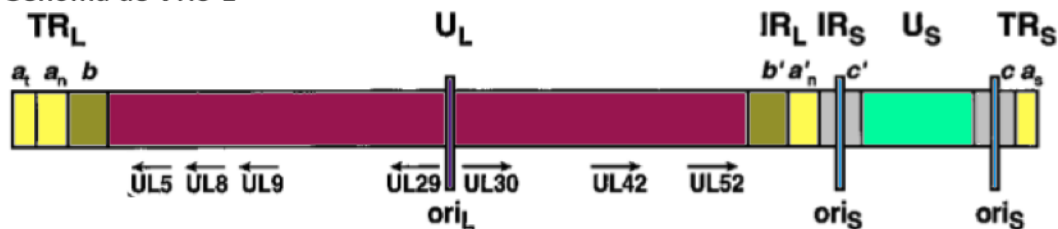


Figura 10. Representación esquemática del virión de VHS-1 y su organización genómica (A) El virión de VHS-1 se compone de 4 subcompartimientos: envoltura, tegumento, cápside y el genoma de doble hebra de ADN lineal de 150-Kb (de Silva and Bowers 2009). (B) El genoma de ADN codifica aproximadamente de 80 a 85 genes virales, que están situados en la región única larga (UL) y única corta (US.) dentro del genoma. Las posiciones de las regiones repetidas a, b y c dentro de las regiones terminales repetidas (TR_L y TR_S), y los orígenes de replicación (ori_L y ori_S). La posición y transcripción de los siete genes esenciales para la replicación del ADN se indican con flechas (Lehman and Boehmer 1999).

1.2.2.1 Ciclo de replicación viral

La entrada del VHS en la célula huésped es un proceso de múltiples pasos que es resultado de la fusión entre la envoltura viral y una membrana de la célula huésped. Es mediada y modulada por la acción de siete glicoproteínas virales junto con sus interacciones con sus receptores afines. Estas proteínas son las glicoproteínas gB, gC, gD, gH, gK, gL, y gM. Sin embargo, sólo cuatro de estas glicoproteínas (gB, gD, gH, y gL) son necesarias y suficientes para permitir la fusión del virus con la membrana plasmática de la célula huésped (Figura 11) (Karasneh and Shukla 2011).

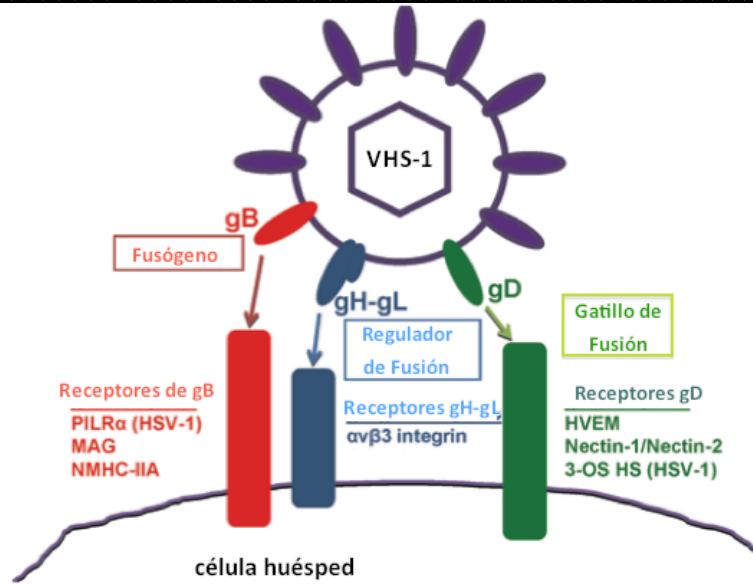


Figura 11.- Glicoproteínas de VHS-1 necesarias para la entrada viral y sus receptores. La entrada de VHS-1 requiere de las glicoproteínas gB, gD y del heterodímero gH-gL. Alguno de los receptores son exclusivos de VHS-1, incluyendo a PILR α y 3-OH HS (Karasneh and Shukla 2011).

El primer paso en la entrada de VHS es la unión del virus a través de las glicoproteínas de envoltura (gB y/o gC) a los proteoglicanos como heparán sulfato (HSPG) que se encuentran en la superficie de la célula huésped (Spear 2004). Se cree que el propósito de esta interacción es trabar el virus a las células con el fin de concentrar el virus en la superficie celular (Connolly, Jackson et al. 2011).

El siguiente paso en la entrada es la interacción específica entre gD de VHS y un receptor de gD (Shukla and Spear 2001). Esta interacción permite el anclaje de la partícula (virión) a la membrana plasmática de la célula huésped, acercando ambas membranas (Campadelli-Fiume, Cocchi et al. 2000). Se cree que la interacción de gD con uno de sus receptores desencadena una cascada de acontecimientos que conducen a la fusión de membranas. La fusión requiere la formación de un complejo multiproteico (un complejo de fusión) compuesto de gD, gB, y gH / gL (Atanasiu, Whitbeck et al. 2007, Subramanian and Geraghty 2007).

1.2.2.2 Replicación del ADN viral de VHS-1

En 0,5 horas y después de la infección en ausencia de síntesis de proteínas, el ADN viral se acumula en el núcleo y adopta una configuración "infinita" cuya estructura es coherente con la circularización. Aunque el mecanismo de circularización del genoma no ha sido establecido, puede implicar un evento de recombinación a través de las secuencias terminales repetidas (Roizman 1979). Una clara ventaja de esta interrelación mediata es que elimina la necesidad de un mecanismo especializado para replicar los extremos. En los últimos tiempos, durante la replicación del ADN viral, los productos consisten en redes ramificadas de concatameros que puedan derivarse de recombinación y la invasión de las horquillas de replicación del ADN.

El genoma de VHS-1 contiene tres elementos de acción *cis*-, que funcionan como orígenes de replicación del ADN: una copia de la *oriL*, que se encuentra entre las divergentes UL29 y UL30 los genes dentro de UL, y dos copias de *oriS* que están ubicados dentro de las secuencias *c*, mencionados con anterioridad (Figura 10 B).

1.2.2.3 Genes esenciales para la replicación del ADN de VHS-1

Los siete genes de VHS-1 situados dentro del segmento de UL del genoma que son necesarios y suficientes para el origen específico de la replicación del ADN son: UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42 y UL52 los cuales se muestran en la figura (Figura 10 B) (McGeoch, Dalrymple et al. 1988).

Es importante mencionar que los productos de los genes UL5, UL8 y UL52, conforman el complejo helicasa-primasa (McGeoch, Dalrymple et al. 1988). Este complejo es una holoenzima que consta de una asociación 1:1:1 de los productos de los tres genes antes mencionados, con una masa molecular nativa de 270 KDa. Un subconjunto que consta de las subunidades UL5 y UL52 conserva actividades como ATPasa

dependiente de ADN, helicasa y primasa; por lo tanto, constituye el núcleo de la enzima (Dodson and Lehman 1991, Sherman, Gottlieb et al. 1992). En contraste, la proteína UL8 carece de actividad enzimática de unión al ADN.

1.2.2.4 Ciclos de replicación viral de VHS-1: Ciclo lítico y Ciclo de latencia

Un aspecto interesante pero mal entendido del ciclo de VHS-1 es la capacidad para entrar en latencia, un estado en el que no se produce progenie infecciosa y se transcribe un número limitado de genes virales. Tras la presentación del estímulo apropiado, las células infectadas de forma latente entran en una fase lítica con la producción resultante de partículas virales infecciosas.

En la fase lítica, después de la adhesión y penetración del núcleo, inicia un programa temporalmente regulado de expresión de genes virales mediado por la ARN polimerasa II. Una proteína del virión, VP16, actúa en trans, junto con el octámero celular, oct-1 (proteína de unión al ADN), para inducir los genes alfa tempranos o inmediatos que son el primer conjunto de genes de VHS-1 que deben expresarse. Estos sirven como transactivadores de la expresión de los genes beta o genes de expresión temprana. Sus picos de síntesis son de 2-4 h postinfección. Se requieren proteínas alfa funcionales para la síntesis de todas las proteínas codificadas por el virus. La síntesis de la clase de proteínas beta alcanza sus niveles más elevados de 5-7 horas y es detectable en las primeras 3 h después de la infección. Las proteínas beta incluyen a las enzimas que se requieren para la replicación del genoma viral: una ADN polimerasa, una proteína de unión a una sola hebra de ADN, un primosoma o helicasa-primasa, una proteína de unión al origen, y un conjunto de enzimas implicadas en la reparación del ADN, y de-oxinucléotidos del metabolismo. Se encuentran en prácticamente todos los herpesvirus homólogos de estas proteínas (Roizman 1979).

La síntesis de ADN viral comienza poco después de la aparición de las proteínas beta y es detectable a las 3 horas, y continúa hasta las 15 horas post infección, con el grueso del ADN sintetizado durante la última parte del período. El programa temporal de la expresión de genes virales termina con la aparición de las proteínas gamma o

Estudio del efecto del péptido beta amiloide ($A\beta$) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



tardías, que constituyen a las proteínas estructurales del virus (Lehman and Boehmer 1999).

Después de la unión, el virus entra en la célula a través de la fusión con la membrana celular, aunque estudios recientes han puesto de manifiesto que en algunos tipos de células, VHS-1 entra por endocitosis (Nicola, McEvoy et al. 2003). Una vez dentro de la célula, los componentes de la cápside y del tegumento están disponibles para causar estragos a la maquinaria celular. La función de muchas de las proteínas de tegumento sigue sin estar clara, las funciones mejor descritas son las de las proteínas denominadas *vhs* (o de inhibición de la síntesis de proteínas del huésped), las cuales degradan moléculas de ARNm de la célula (Kwong and Frenkel 1987). La cápside, por su parte, se desplaza al núcleo, donde se desarma, liberando el ADN viral. Posteriormente, se circulariza el genoma viral y la expresión génica viral es iniciada por un complejo de proteínas que consta de dos proteínas del huésped y una proteína del tegumento VHS-1.

Hay tres clases de genes temporales: inmediato temprano, temprano y tardío. Los genes inmediato temprano codifican proteínas que interfieren con la presentación de antígenos, interrupción de la síntesis de proteínas y control de la expresión de las otras dos clases de genes de VHS-1. Los genes temprano son los principales implicados en la síntesis de ADN, mientras que muchos de los genes tardío codifican para las proteínas estructurales. Una vez que hay suficientes proteínas virales, se monta la cápside y se empaqueta el ADN viral. Las proteínas de tegumento se unen después a la cápside, y las partículas virales adquieren una envoltura por gemación en la membrana nuclear interna. La salida posterior de la célula implica la fusión de las partículas víricas con la envoltura dentro del espacio perinuclear con la membrana nuclear externa, y las cápsides desnudas producidas adquieren su envoltura lipídica, ya sea desde la membrana plasmática o de organelos tales como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ER) antes de ser transportados a la superficie celular (Saksena, Wakisaka et al. 2006). La infección por VSH-1 causa graves cambios estructurales y bioquímicos que

Estudio del efecto del péptido beta amiloide ($A\beta$) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



conducen finalmente a la muerte celular. Tales cambios incluyen alteraciones en el nucleolo, daños a sitio específicos en el cromosoma, anomalías del citoesqueleto y la matriz, y modificaciones en el plasma y las membranas de los organelos (Figura 12) (Mettenleiter 2004).

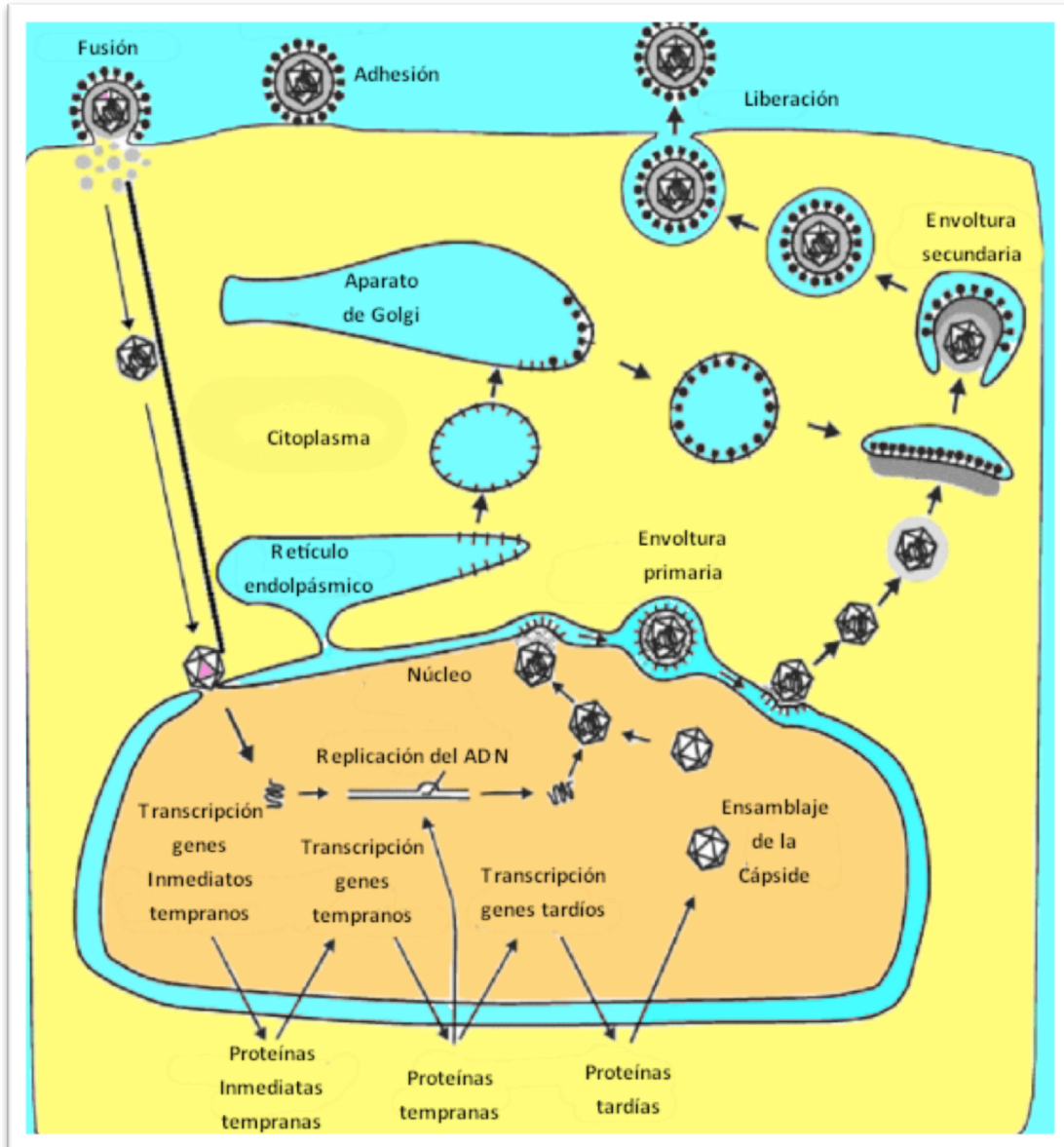


Figura 12. Ciclo de replicación del VHS-1. Representación del ciclo de replicación, incluyendo entrada y disociación del tegumento, transporte y entrada de la cápside a través del poro nuclear y liberación del ADN viral al núcleo donde ocurre la transcripción de genes en forma secuencial (Inmediatos tempranos, tempranos y tardíos) así como la replicación del ADN viral. Los pasos subsiguientes son la formación de la cápside, el empaquetamiento del ADN, y al final la liberación de partículas virales, ocasionando la lisis celular (Mettenleiter 2004)



Además del ciclo productivo descrito anteriormente, el virus puede someterse a estado de latencia. En estado latente, el genoma viral está presente, pero no se producen partículas virales; aunque la exposición a ciertos estímulos pueden hacer que el virus deje su estado latente, y entre en un ciclo de vida productivo (lítico). La expresión génica viral durante la latencia se limita a un locus del gen que codifica la transcripción asociada a la latencia (LAT). LAT expresa abundantemente moléculas de ARNm, que no parecen ser traducidas. La función precisa de LAT es desconocida. Se cree que puede estar implicado en la reactivación del virus. La transcripción del gen asociado a latencia (LAT) se expresa abundantemente en las neuronas infectadas, y se ha demostrado que es necesaria para promover el establecimiento y el mantenimiento de la latencia, en parte debido a las funciones anti-apoptosis de LAT, y la capacidad de los micro-ARN y otros ARNs pequeños no codificantes para interferir con la infección productiva (Perng and Jones 2010).

VHS-1 establece latencia en neuronas supervivientes, convirtiéndolas en un depósito permanente de infección recurrente, que se produce en respuesta a diversos estímulos que causan estrés neuronal (Perng and Jones 2010). La capacidad de cambiar de forma rápida de una infección lítica en los epitelios a una infección no productiva o latente en las neuronas sensoriales, es fundamental para el ciclo de vida del virus.

Aunque es crucial la comprensión de los eventos que se desencadenan en última instancia durante la infección de los *alphaherpes virus*, el establecimiento de la infección latente en neuronas no se entiende por completo. La entrada selectiva de VHS-1 en los axones distales de las neuronas del trigémino favorece fuertemente el establecimiento de una infección no productiva, latente, mientras que la infección no selectiva de neuronas permite a VHS-1 inducir la expresión del gen lítico. El sitio de entrada es un determinante importante de la decisión

lítico/latente en la neurona infectada. La infección productiva de la neurona se produce cuando entran partículas directamente en el soma de la neurona. En la infección lítica, VP16 forma un complejo tripartito con las proteínas celulares HCF-1 y Oct 1-, que se une a los elementos TAATGARAT presentes en los promotores de genes inmediatos tempranos (IE) de VHS, y actúa como un potente activador transcripcional de la expresión génica de los genes inmediatos tempranos. El dominio de activación transcripcional de VP16 de VHS-1 (VP16AD) interactúa con un gran número de factores celulares que están implicados en la activación de genes (Hirai, Tani et al. 2010). Aunque no es esencial para la expresión génica IE, coactivadores reclutados por la VP16AD VHS-1 contribuyen a niveles relativamente bajos de las histonas en el genoma viral durante la infección lítica (Kutluay and Triezenberg 2009). La proteína VP16 es esencial para la reactivación *in vitro* inducida por estrés en VHS-1 (Penkert and Kalejta 2011). El estado de latencia de VHS-1 y la reactivación *in vivo* son el resultado de una interacción compleja entre el virus y su huésped. Se supone que inmediatamente después de la entrada del virus en la célula huésped, la proteína del tegumento VP16 juega un papel esencial en el circuito combinatorio regulador que controla la decisión lítico/latente. Si la transactivación de los genes IE por el complejo VP16 inducida es insuficiente, esto puede disminuir la expresión del gen lítico en la neurona infectada y favorecer el establecimiento de la latencia (Hafezi, Lorentzen et al. 2012).

1.2.3 Infección por VHS-1

El VHS-1 es una infección común en los países desarrollados, donde las tasas de seropositividad por lo general superan el 50%. En los seres humanos y animales experimentales, la infección primaria en piel o mucosa resulta en la replicación local del virus, infección de las terminaciones nerviosas sensoriales y su propagación a través del transporte axonal retrógrado de los ganglios del sistema



nervioso periférico (SNP), donde sobreviene una infección productiva de neuronas (Whitley and Roizman 2001). A diferencia de muchos virus de herpes, VHS cuenta con baja especificidad de especie y un amplio rango de hospederos. Tiene la capacidad sin precedente para infectar a las células humanas y no humanas por igual (Cabrera, Wohlenberg et al. 1980, Kastrukoff, Lau et al. 2012) .

Los síntomas del VHS-1 suelen limitarse a las lesiones epidérmicas alrededor de la boca (herpes labial). Con menor frecuencia, el VHS-1 infecta el ojo y produce queratitis, que es la principal causa de ceguera infecciosa en los países desarrollados (Liesegang 2001). Cada una de estas formas de enfermedad puede ocurrir de nuevo debido a la infección latente que se establece en las neuronas de los ganglios periféricos que inervan a los tejidos respectivos (típicamente el ganglio trigémino para VHS-1) (Sanjuan and Lascano 1986, Bustos and Atherton 2002).

1.2.3.1 Infección lítica y latente de VHS-1

Una vez que su genoma se encuentra en el núcleo de la célula huésped, VHS-1 puede iniciar una fase lítica, lo que conduce a la infección productiva o a establecer latencia en los núcleos de las neuronas sensoriales sobre el transporte retrógrado del virus. Los determinantes moleculares y virales que determinan en qué fase se va a introducir el virus, aún están bajo investigación. Durante la infección lítica los genes virales se expresan en una forma estrictamente regulada (de Silva and Bowers 2009).

Esta cascada tan precisa en el tiempo de la expresión de genes virales resulta en la producción de partículas infecciosas de virus VHS-1, que pueden transportarse de forma anterógrada a las terminales del axón en el que se fusionan con la membrana celular y se liberan en el espacio extracelular. Por el contrario, el genoma del VHS-1 puede establecer latencia, momento en el que los únicos genes que se transcriben son los transcritos virales asociados a latencia (LAT), cuyas

funciones aún no se han aclarado por completo (Nsiah and Rapp 1991). Estudios recientes han demostrado que las proteínas LAT no codificantes juegan un papel en la regulación del ensamble de la heterocromatina facultativa de los promotores de genes líticos, lo que induce la represión de la transcripción (Cliffe, Garber et al. 2009). Las alteraciones en las interacciones virus-huésped pueden conducir a la "reactivación" del genoma latente de VHS-1 resultando en una infección productiva (de Silva and Bowers 2009) (Figura 13).

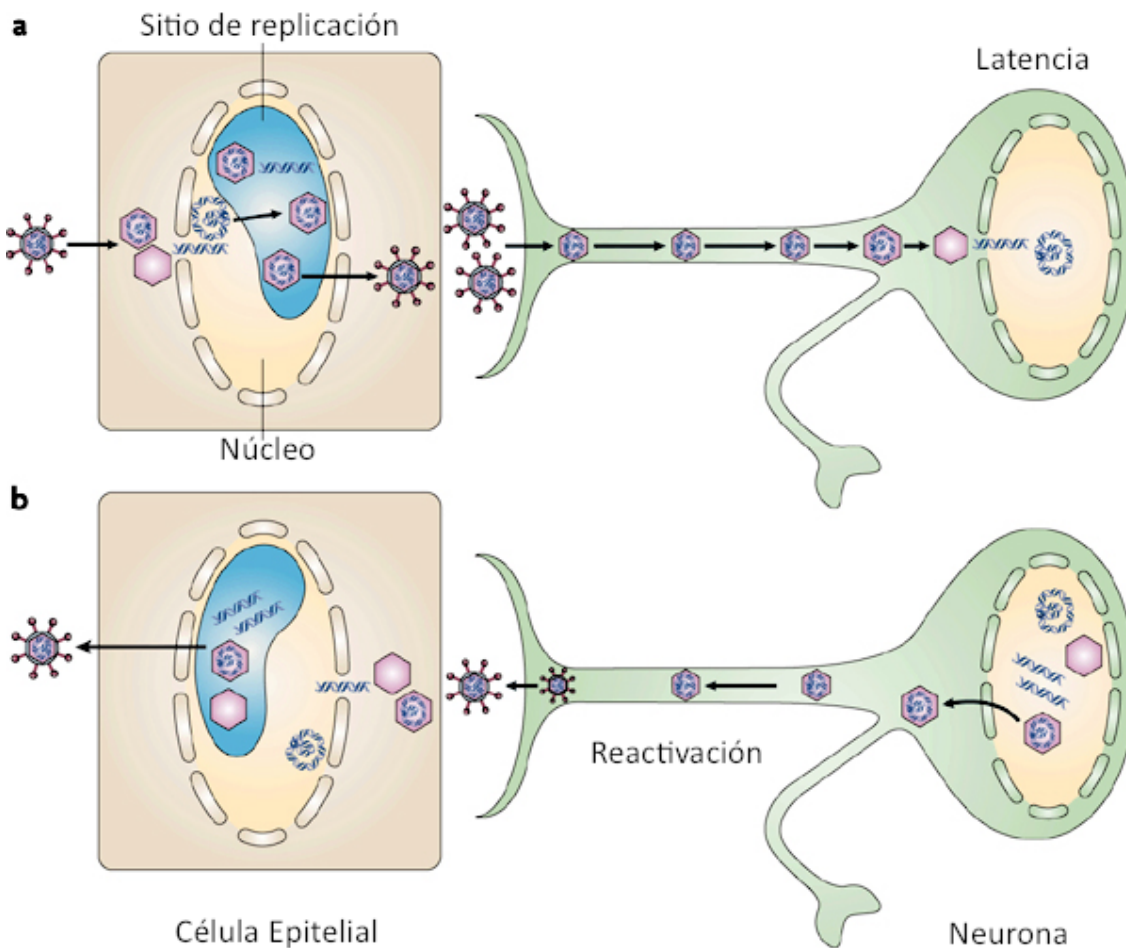


Figura 13. Infección lítica y latente de VHS-1. a. La infección de células epiteliales en la superficie de la mucosa da lugar a la replicación productiva, lo que resulta en la producción de viriones, que pueden propagarse e infectar otras células epiteliales. El virus entra en las neuronas sensoriales y se transporta al cuerpo celular neuronal. El ADN viral se libera en el núcleo neuronal y circulariza; así es como persiste en el núcleo de la célula neuronal, y se mantiene en estado latente. b. Tras la reactivación, se inicia la expresión de genes virales líticos, y las cápsidas recién formadas son transportadas a las terminales de las neuronas. Las partículas virales infecciosas se liberan desde el axón e infectan a células epiteliales, lo que resulta en una infección recurrente. Modificado de (Knipe and Cliffe 2008).

El VHS se traduce en una infección de por vida mediante el establecimiento del estado de latencia en neuronas sensoriales, y receptores de replicación en las células epiteliales durante la infección primaria y reactivación. El virus se contagia y se transmite entre humanos a través del contacto físico y, por lo general, causa lesiones mucocutáneas localizadas (Whitley, Kimberlin et al. 1998). Las lesiones bucales y oculares son causadas principalmente por el VHS-1. Estos virus son capaces de causar enfermedades más graves, como ceguera, meningitis meningocócica, y la encefalitis (Baringer 1975).

1.2.3.2 Encefalitis herpética

La infección en el sistema nervioso central por VHS-1 es más compleja cuando el virus se transmite a través de las sinapsis durante la infección primaria y evoluciona a la infección latente, tanto en cerebro de seres humanos (Baringer 1976, Sequiera, Jennings *et al.* 1979, Fraser, Lawrence *et al.* 1981) como en animales de experimentación (Cabrera, Wohlenberg *et al.* 1980, Rock and Fraser 1983). La transmisión de VHS-1 en el sistema nervioso periférico al cerebro puede producir encefalitis potencialmente mortal (Zaichick, Bohannon *et al.* 2011).

La encefalitis por herpes es generalmente esporádica y poco frecuente, no hay evidencia de una predisposición genética a esta forma grave de la enfermedad (Townsend 1981). La encefalitis por herpes es más frecuente en los recién nacidos infectados durante el parto, y las infecciones también pueden producirse en múltiples órganos ocasionando una enfermedad diseminada, lo cual está asociado con una alta mortalidad y morbilidad (Townsend 1981). Los adultos con sistemas inmunológicos comprometidos (incluyendo pacientes con SIDA, cáncer y pacientes trasplantados) pueden sufrir infecciones diseminadas que se vuelven resistentes a Aciclovir (Itoyama, Sekizawa *et al.* 1991).

La encefalitis herpética (EH) es un desorden cerebral severo causada por VHS-1, es extremadamente rara, que afecta a 1-3 personas por cada millón, con tasas de mortalidad que pueden llegar a un 20-30% a pesar del tratamiento (Kennedy 2005). Las regiones del cerebro que son principalmente afectadas en esta enfermedad son las cortezas frontal y temporal, que son las regiones cerebrales que presentan el mayor daño en la EA (Itzhaki and Wozniak 2008).

1.3 Antecedentes de la relación entre VHS-1 y EA

A continuación se mencionan las razones que fundamentan la relación, y apuntan al VHS-1 como un posible agente causal de la EA.

En primer lugar, durante la infección aguda en el cerebro por VHS-1, las regiones del cerebro que están afectadas son las mismas que las que exhiben las características neuropatológicas de la EA. Otra evidencia circunstancial también implica al VHS-1 y las rutas anatómicas de difusión viral en el lóbulo temporal y el sistema límbico, los sitios principales de patología de la EA, desde el ganglio del trigémino o bulbo olfatorio. Además, los sobrevivientes de la enfermedad cerebral aguda presentan efectos a largo plazo que incluyen la pérdida de memoria. Una razón adicional por la cual VHS-1 podría estar implicado en la EA es que el virus es ubicuo - infectando aproximadamente al 90% de la población adulta - una característica necesaria, en vista de la alta prevalencia de la EA. Por último, la capacidad del virus para permanecer en una forma latente (y reactivarse) en el sistema nervioso periférico (SNP) a lo largo de la vida, después de la infección temprana, podría explicar por qué los síntomas de la EA se manifiestan en las personas mayores (Itzhaki and Wozniak 2008).

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Jamieson *et al.* descubrieron en 1991 que el ADN de VHS-1 se encontraba presente en una alta proporción de cerebros de las personas de edad avanzada, incluyendo pacientes con EA (Jamieson, Maitland *et al* 1991). El ADN viral se encontró en las cortezas



frontal y temporal, pero estaba ausente en la corteza occipital, la cual se ve menos afectada en EA. El virus también estaba ausente en el cerebro de la mayoría de los jóvenes probados, lo que sugiere que el virus llega al cerebro en la edad avanzada conforme el sistema inmunológico disminuye (Jamieson, Maitland *et al* 1992). Varios grupos han confirmado desde entonces que el ADN de VHS-1 está presente en el tejido cerebral humano, algunos de ellos también demuestran que el ADN viral está presente en pacientes con EA (Jamieson, Maitland *et al* 1991, Jamieson, Maitland *et al.* 1992, Itzhaki and Wozniak 2008, Wozniak, Mee *et al.* 2009).

Se ha utilizado también la técnica de PCR *in situ* para confirmar que cerebros de pacientes con EA y controles de la misma edad contienen ADN viral; y para demostrar que el virus está presente en las neuronas. Cabe mencionar que la PCR *in situ* detecta ADN viral tanto en la infección productiva y como en la latente debido a su alta sensibilidad. Los resultados de Wozniak, *et al* en el 2009, permitieron descubrir la localización del ADN del virus de herpes simplex tipo 1 dentro de las placas: 90% de las placas en cerebros de pacientes con EA contenía ADN viral, mientras que en el grupo control, se encontró solamente el 80% del ADN viral. En EA, el 72% del ADN viral fue asociado a placa amiloide, comparado con el 24% en el grupo control. Por lo tanto, la localización dentro de las placas amiloides refleja una asociación específica entre el virus y la EA (Figura 14) (Wozniak, Mee *et al.* 2009).

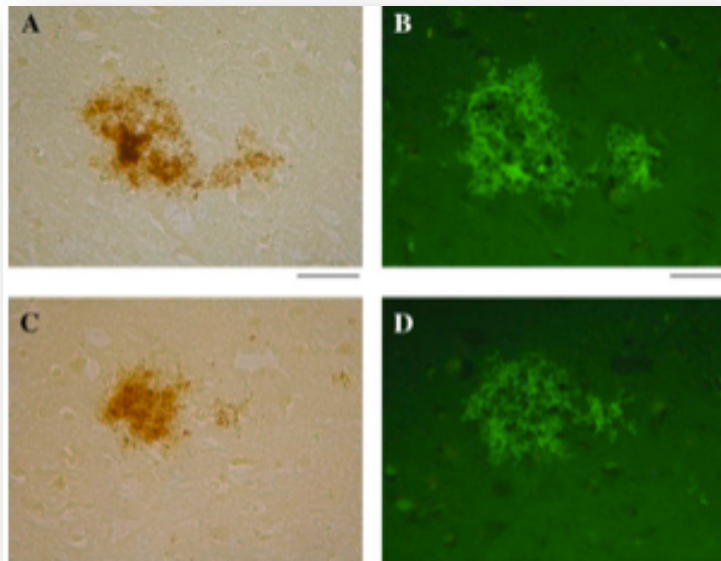


Figura 14.- Co-localización del ADN de VHS-1 (PCR *in situ*) y placas amiloides (Tinción con tioflavina S) en la misma sección de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Escala: 50 μ M (Wozniak, Mee *et al.* 2009)

Otras de las razones por las que se cree que existe una relación entre el virus y la EA son las que a continuación se enlistan:

a) **Homología de la glicoproteína B del virus con un segmento del péptido $A\beta$.**

La gB de VHS-1 contiene una secuencia transmembranal que es significativamente homóloga con el extremo N-terminal de APP con la que comparte un 33% de identidad y 64% de similitud en una secuencia de 42 aminoácidos a partir del aa 1 al 42 (LeVine 1993), esto es específicamente en la región carboxilo-terminal de $A\beta$ (Figura 15) (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000). Cribbs *et al.* reportaron que los péptidos sintéticos derivados de esta región homóloga de la gB aceleran la formación de fibrillas de $A\beta$ *in vitro*, además de que las fibrillas que forma la gB que son estructuralmente indistinguibles a las formadas por el péptido $A\beta$ (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000). Éstas son neurotóxicas a dosis similares a la presentada por el péptido $A\beta$ y es precisamente en esta región donde residen tanto la nucleación como los

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



dominios de montaje de A β (Bohrmann, Tjernberg *et al.* 1999). Por lo tanto, los autores sugirieron que VHS-1 podría actuar como una "semilla" para la formación de placas, sugiriendo un posible papel del virus en la fisiopatología de los casos esporádicos de AD, donde el mecanismo pudiera ser la auto-agregación de la gB asociada a la reactivación del virus (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000)

	1	19	42
A β	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA--EDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		
	• • • • • •	: : :: :: :	
VHS-1 - gB	DTVIKADAHAAALFAGLYSFFEGLGDVGRAVGKVVVMGIVGGVVSA		

Figura 15.- Homología de secuencia entre A β y la glicoproteína B (gB) de VHS-1. La secuencia de aminoácidos (código de una letra) de los péptidos A β y gB se muestran en la alineación, con líneas verticales y dos puntos, que indican los aminoácidos idénticos y relacionados respectivamente. La conservación en los codones se indica con un solo punto. La región en la que reside el mayor grado de homología (residuos 22-42) se agrupa en la región de A β que ejerce la neurotoxicidad y el auto-ensamblaje en fibrillas (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000).

En tres experimentos separados, se encontró que el péptido gB era más neurotóxico que A β . Estos resultados demuestran que el péptido gB se auto-ensambla, que el péptido ensamblado es tóxico, y que la toxicidad está asociada con la forma ensamblada y es extremadamente potente (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000).

a) Asociación de VHS-1 y APP durante el transporte axonal en neuronas.-

APP, que es una glicoproteína transmembranal, se transporta a la superficie celular y a las terminales sinápticas en las neuronas (Koo, Sisodia *et al.* 1990) asociándose a vesículas de transporte, mientras se une a las cadenas ligeras de las proteínas motoras (cinesinas) en los microtúbulos (Kamal, Stokin *et al.* 2000).

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



Satpute-Krishnan *et al.* mostraron en el 2003 que APP se asocia con VHS-1 durante el transporte anterógrado del virus, un proceso que pueda afectar al procesamiento de APP y a la función sináptica. En sus experimentos, demuestran que el virus sufre un transporte axonal rápido cuando se inyecta en el axón gigante del calamar. El axón del calamar permitió desarrollar un nuevo ensayo funcional que pone a prueba cualquier partícula exógena, en este caso VHS, por su capacidad para obtener las proteínas motoras y de transporte. Los autores demostraron que APP desempeña un papel en el transporte anterógrado de VHS desde su lugar de síntesis en el cuerpo celular hasta las terminales neuronales (Satpute-Krishnan, DeGiorgis *et al.* 2003) (Figura 16) (Cheng, Ferland *et al.* 2011).

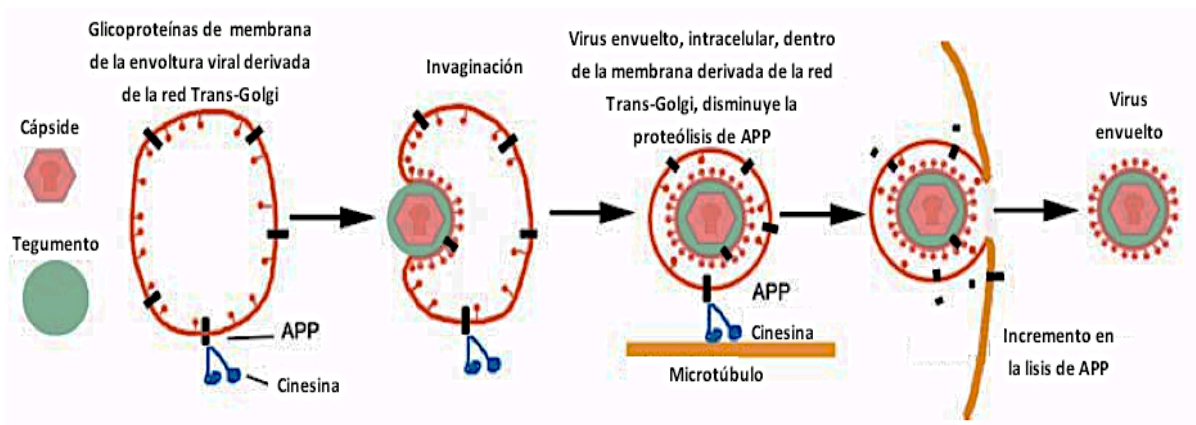


Figura 16. Diagrama que muestra la interacción de APP con VHS-1 durante el transporte intracelular a través de cinesinas. La cápside viral en el núcleo se une al tegumento en el citoplasma. Las glicoproteínas virales son sintetizadas en los compartimentos de la membrana celular, y llegan al aparato de Golgi, donde también se concentra APP. El tegumento viral y la cápside se unen, luego son invaginados al lumen del aparato de Golgi en vesículas secretoras, logrando adquirir la envoltura viral durante este proceso. APP puede ser pasiva o activamente reclutada activamente en la envoltura viral, así como permanecer en la membrana de la vesícula secretora donde expone su C-terminal hacia el citoplasma. Durante el tránsito, el VHS puede proteger de la proteólisis a APP. A su salida, el virus deja de proteger a APP y comienza su proteólisis; dando como resultado una mayor acumulación de APP en la periferia (Cheng, Ferland *et al.* 2011).



b) Alteración del procesamiento de APP y las enzimas involucradas por parte de VHS-

1.-

VHS-1 altera el procesamiento de APP, las células neuronales infectadas muestran una disminución en los niveles de APP en cultivo y un aumento de un fragmento de APP de 55 KDa (Shiple, Parkin *et al.* 2005), y además un gran aumento en los niveles intracelulares de A β (que no es atribuible a una reacción con la secuencia homóloga de la glicoproteína B viral) (Wozniak, Itzhaki *et al.* 2007).

Los resultados de Shiple *et al.*, revelan que VHS-1 afecta el procesamiento de APP en células de neuroblastoma humano SHSY5Y, mediante ensayos de Western blot y más recientemente mediante inmunocitoquímica. Demostrando que los niveles de APP disminuyen durante la infección (un efecto esperado del virus, ya que causa una disminución general en la síntesis de proteínas de la célula huésped), y hay un gran aumento del fragmento C-terminal de 55 KDa, que incluye la secuencia de A β . Además, se encontró que la infección con VHS-1 conduce a la acumulación de A β en las células, y de manera consistente, las enzimas que son responsables de la producción de A β se incrementan en células infectadas con VHS-1 (Shiple, Parkin *et al.* 2005).

El aumento de la cantidad del fragmento de 55 KDa de APP en las células infectadas demuestra que el procesamiento de APP, así como su síntesis, se ve afectado por el virus, esto ocurre dentro de las 6 h de la infección, y el nivel aumenta con el tiempo después de la infección hasta al menos 9 h. Según los resultados, una mayor producción de este fragmento puede ser una respuesta general a la infección (Shiple, Parkin *et al.* 2005).

La alteración en el procesamiento de APP también es reportada por Dobson, *et al.*, en 2007 demostrando que la infección por VHS-1 en la misma línea celular (SHSY5Y)

ocasiona una disminución en APP y un aumento en los péptidos A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ intracelulares. Además de un aumento en los niveles de las proteínas que procesan a APP, tales como BACE y nicastrin (Wozniak, Itzhaki *et al.* 2007).

c) Alteración en el proceso de autofagia.-

La vía de la autofagia-lisosoma es el principal proceso intracelular para la eliminación de proteínas grandes, complejos de proteínas y organelos celulares (Cuervo, Bergamini *et al.* 2005, Martínez-Vicente, Sovak *et al.* 2005). La autofagia (el término generalmente abreviado de macroautofagia) tiene lugar en estructuras unidas a la doble membrana, llamadas autofagosomas o vacuolas autofágicas iniciales (AV). Estos no contienen enzimas y así la degradación del material no deseado se produce solo después de la fusión del autofagosoma con los lisosomas, que contienen hidrolasas. Recientemente, se ha revelado que la autofagia es un proceso esencial para mantener a la homeostasis y que una disminución en la eficiencia se produce durante el envejecimiento, lo que resulta en la acumulación de productos no digeridos dentro de lisosomas (Ward 2002). Se ha propuesto un papel de la autofagia en varias enfermedades neurodegenerativas, principalmente por que un defecto en éste proceso podría explicar la residencia continua de proteínas aberrantes en cerebro. El Virus Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) codifica a ICP34.5 (polipéptido de células infectadas 34.5) la cual ocasiona la interrupción de los procesos de autofagia de la célula protegiéndose contra la destrucción (Tallóczy, Jiang *et al.* 2002, Tallóczy, Virgin *et al.* 2006). Considerando que en cerebro de pacientes con EA, se ha observado la acumulación de autofagosomas y vacuolas en las neuritas distróficas (Nixon, Wegiel *et al.* 2005), tanto la proteína precursora de amiloide (APP), el péptido A β , y las enzimas responsables de la formación de A β , están presentes en éstas vacuolas, se ha propuesto una relación de causa por parte del VHS-1 en la EA (Yu, Kumar *et al.* 2004).



Se ha planteado la siguiente hipótesis: VHS-1 entra en el cerebro en la edad avanzada, cuando el sistema inmunológico disminuye, ya sea desde el sistema nervioso periférico (SNP), donde, después de la infección temprana en la vida, se mantiene latente, o como una nueva infección a través de la ruta olfatoria. El virus desarrolla una infección de latencia en el cerebro pero se reactiva periódicamente en condiciones de inmunosupresión o estrés por ejemplo, durante la infección sistémica (Itzhaki, Cosby *et al.* 2008).

La relación entre el virus y el péptido A β , abordándola con respecto a cómo el péptido afecta la infección causada por el VHS-1, sólo se ha reportado en el 2010 por Hill, *et al.*, dónde atribuyen una actividad de atenuación viral al péptido A β ₁₋₄₂, utilizando células CV-1, como modelo de infección lítica *in vitro*. Evidenciando este efecto mediante ensayos de formación de placas líticas, ya que la presencia del péptido en concentraciones de 5 y 100 μ M disminuye el número de PFU por pozo y además, reduce la expresión de la ADN polimerasa viral, detectada mediante ensayos de qPCR. Por lo que concluyen que la actividad del péptido es similar a la del conocido antiviral para herpes, Aciclovir, el cual se sabe afecta directamente a la replicación viral (Lukiw, Cui *et al.* 2010).

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Se ha propuesto que la infección viral por el VHS-1, se encuentra relacionada con pacientes que presentan alteraciones neurodegenerativas, como es el caso de la Enfermedad de Alzheimer, enfermedad en la que el mecanismo molecular involucrado no se conoce por completo, sin embargo, se han definido algunas relaciones existentes importantes entre el péptido $A\beta$ y la partícula viral.

Además, se ha sugerido que el péptido $A\beta$ interactúa con las partículas virales de VHS-1 en neuronas humanas, pero se desconoce los mecanismos de interacción entre el péptido y la partícula viral.

Algunos reportes muestran que la coexistencia de VHS-1 y las placas amiloides podría dar una ventaja adaptativa para ambas, sin embargo aún es insuficiente la información al respecto.

Por lo anterior, es de gran importancia estudiar el efecto que podrían tener el péptido $A\beta$ y sus isoformas sobre el ciclo de replicación viral del VHS-1 en un modelo de infección lítica *in vitro*.

HIPÓTESIS

Es posible que exista una interacción entre el péptido beta amiloide con el Virus del Herpes Simplex Tipo I y el efecto se vea reflejado en la infección causada por el virus



CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que presentan las distintas isoformas del péptido β -amiloide sobre la infección causada por el virus del Herpes simplex tipo I.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Permitir la interacción del VHS-1 con los péptidos A β (1-40), A β (25-35) y A β anti sentido (como control), oligomerizados y sin oligomerizar.
2. Identificar los cambios en la morfología celular de los cultivos de células Vero expuestos al virus y evaluar los niveles de replicación viral mediante ensayos de PFU y PCR en tiempo real.
3. Determinar la localización del péptido A β en células infectadas por VHS-1 y analizar si existe una relación con el efecto sobre la infección.

CAPÍTULO IV

MATERIALES

4.1 Reactivos

4.1.1 Reactivos de uso general

- Alcohol etílico (Jalmek)
- SDS (Sigma Aldrich)
- Agua Estéril

4.1.2 Cultivo celular y viral

Los reactivos utilizados para cultivo son de la marca Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA):

- Aminoácidos no esenciales (10mM 100X).
- Dulbeccó's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM).
- L- Glutamina (200 mM 100X).
- Suero Fetal Bovino (FBS).
- Tripsina-EDTA (0.25%).
- Solución de antibiótico-penicilina-estreptomicina (100UI/ml de penicilina G de sodio y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina).
- PBS 1x pH= 7.4 (Gibco)
- Azul Alamar (Invitrogen)
- Azul Tripano 0.4% (Gibco)
- Colorante Giemsa (Sigma Aldrich)
- Glicerol (Sigma Aldrich)

4.1.3 Solubilización y oligomerización del péptido A β

- Agua milliQ
- NaOH (Sigma Aldrich)

4.1.4 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

- TRIzol® (Invitrogen)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Isopropanol (Fisher Scientific)
- Agua DEPC
- ARNse OUT™ (Invitrogen)
- PCR Master mix 2x universal TaqMan® (Invitrogen)
- Ensayo 20x para ARNr 18S
- SYBR® Green qPCR SuperMix (ABI PRISM®)
- Iniciadores Forward y Reverse (Invitrogen):

Producto amplificado= 143 pb del gen UL5 (NC_001806.1 región: 12,500 -15,100)

TABLA 2

Oligonucleótidos para amplificar gen ul5 de vhs-1

Oligonucleótidos	Secuencia	Posición
Forward	5'-CGTCGGTATTCGTCAAACCTC-3'	13810
Reverse	5'-CTGTTCTCCTCCCACAAAGA-3'	13952

4.1.5 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot

Reactivos para preparar Extracción de proteínas:

- EDTA (Sigma)
- DTT (Roche)
- PMSF (Sigma)



- Complete Protease Inhibitors (Roche)
- Reactivo de Bradford (Bio-Rad)

Reactivos para preparar Geles de poliacrilamida:

- Acrilamida (GibcoBRL)
- Buffer de fosfatos pH 8.8
- Buffer de fosfatos pH 6.8
- PSA (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- Protein Dual Color Standards (Bio-Rad)
- Jugo azul
- β -mercaptoetanol (Bio-Rad)

Reactivos para WB:

- Tritón (Sigma Aldrich)
- Leche descremada light Svelty
- Metanol (J.T. Baker)
- Anticuerpo IgG anti $A\beta_{25-35}$ de conejo (GenScript A00687)
- Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con HRP (Santa Cruz biotechnology, Inc.)
- Luminol para WB (Santa Cruz biotechnology, Inc.)

4.2 Materiales

4.2.1 Material de uso general

- Micropipetas automáticas (Pipet lite; Rainin) de volumen variable:
1-10 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l
- Puntillas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 0.2, 0.6, 1.5 y 2 ml.



4.2.2 Cultivo celular y viral

- Pipetas serológicas estériles de 1,2,5 y 10 ml (Corning).
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm
- Botellas de cultivo celular de 25, 75 y 150 cm² (Corning).
- Tubos cónicos de 15 y 50 ml (Corning).
- Crioviales de 1.5 ml (Corning).
- Placas de cultivo de 6 y 12 pozos (Corning).

4.2.3 PCR en tiempo real

- Tira de 8 tubos Eppendorf MicroAmp (Applied Biosystems)
- Tapas ópticas para tubos MicroAmp (Applied Biosystems)
- Kimwipes (Kimtech Science)

4.2.4 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot

- Raspador de goma (Corning)
- Placas de 96 pozos transparentes de fondo plano (Costar)
- Cámara de electroforesis vertical y para electrotransferencia en condiciones húmedas (Bio-Rad).
- Membranas de PVDF de 0.45 μ (General Electric)

4.2.5 Material Biológico

- Línea celular Vero, fibroblasto de riñón de mono verde africano (ATCC: CCL-81™) Donada por el Dr. Miguel A. Déctor Carrillo, del departamento de Genética, Facultad de Medicina, UANL.
- Cepa viral VHS-1 de referencia (KOS) de la ATCC: VR-1493; GenBank: JQ780693.1.

- Péptidos:

Tabla 3

Lista de péptidos $A\beta$ y secuencia de aminoácidos

Péptido beta amiloide	Secuencia de aminoácidos	Nº de Catálogo	Marca
$A\beta_{35-25}$	MLGIIAGKNSG	RP20185-0.5	GenScript (Piscataway, NJ, USA)
$A\beta_{25-35}$	GSNKGAIIGLM	RP10008-1	GenScript (Piscataway, NJ, USA)
$A\beta_{1-40}$	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGVV	RP10004-1	GenScript (Piscataway, NJ, USA)

4.3 Equipos

4.3.1 Equipo de uso general

- Vórtex Genie 2
- Thermomixer (Eppendorf)
- Centrifuga refrigerada Biofuge primor (Heraeus)
- Centrifuga Centrifuge 54150 (Eppendorf)
- Centrifuga IECL30R (Thermo electron corporation)
- Fuente de poder, Pover Pack1000 (Bio-Rad)
- Plancha con agitación (CIMAREC)

4.3.2 Cultivo celular y viral

- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuaire)
- Incubadora con agitación MaxQ4000 (Thermo Scientific)
- Incubadora de CO_2 (Nuaire)



- Microscopio óptico invertido olympus CKX41
- Baño de agua Precision180

4.3.3 Solubilización y oligomerización del péptido $A\beta$

- Sonicador ultrasonic processor

4.3.4 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

- Termociclador para PCR en tiempo real Real Time PCR system7500 (Applied Biosystems)
- Termociclador GeneAmp PCR system9700 (Applied Biosystems)
- Nanodrop 2000 (ThermoScientific)

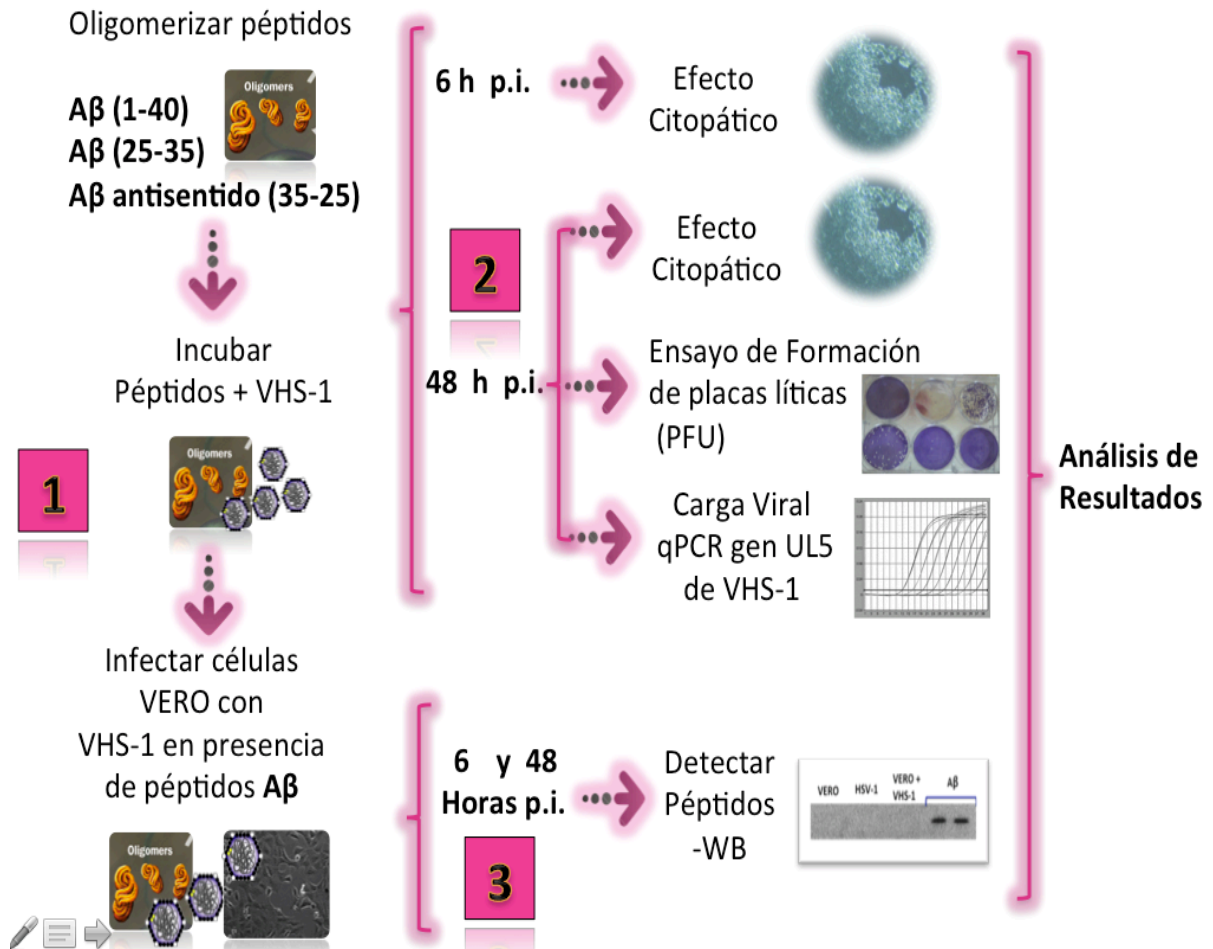
4.3.5 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot

- Lector de ELISA Biotek ELX800
- ChemiDoc™ (Bio-Rad)

CAPÍTULO V

MÉTODOS

ESTRATEGIA GENERAL



*Células Vero (ATCC: CCL-81™)

*Cepa de referencia de VHS-1 (KOS) de la ATCC: VR-1493.

5.1 Cultivo de células vero

5.1.1 Células Vero

1. Se descongeló a temperatura ambiente un vial con células Vero almacenadas a -80°C .
2. Se adicionó 1 ml del vial de células Vero a una botella de 25 cm^2 conteniendo 3 ml de medio DMEM advanced con 2% SBF y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 . Al obtener una confluencia celular del 85 al 90%, posteriormente se realizó un subcultivo a una botella de 75 cm^2 y finalmente una escala del cultivo a una botella de 150 cm^2 .
3. Se recuperaron todas las células de las botellas 150 cm^2 utilizando una solución de tripsina 1x (para despegarlas de la base de la botella de cultivo) por 5 minutos y se neutralizó la reacción con DMEM-FBS al 2%. Las células se cuantificaron con azul tripano en cámara de Neubauer. Posteriormente se ajustó el número de células a 1.5×10^6 células por ml con medio que contiene DMSO al 5% y se almacenaron en crioviales de 1.5 ml a -80°C .

5.1.2 Subcultivo de células Vero

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm^2 a un 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración.
2. Se realizó un lavado con 3 ml de PBS (el volumen que se utiliza depende del tamaño de botella que se emplea, ver tabla en anexos).
3. Se desechó el PBS por aspiración, y adicionó 1 ml de tripsina 1x e incubó durante 10 min a 37°C , 5% de CO_2 .
4. Después se agregó 1 ml de medio DMEM advanced con 2% SBF (para inactivar a la tripsina) y se pasó el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 ml.
5. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min a 4°C .
6. Finalmente, se retiró el medio y resuspendió con puntilla azul las células en 1 ml de medio nuevo.

7. **Conteo celular:**

- 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 μ l de medio más 10 μ l de células.
- Después, se agregó 10 μ l de azul de tripano al 0.4 %, mezcló y colocó el volumen necesario en cámara de Neubauer para realizar el conteo celular.
- Se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas, se sacó un promedio del número de células contadas en los cuadrantes, y multiplicó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de Células/ml} = \text{Promedio de células} \times 8 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$

8. Finalmente, se pasó la cantidad de células Vero que se requería por mililitro a otra botella o a pozos de placas de cultivo, con la cantidad de medio necesario, y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂.

5.2 Cultivo viral de VHS-1 cepa KOS

5.2.1 Producción a escala de VHS-1 cepa KOS

1. Se descongeló en frío (a 4 °C) un vial de VHS-1 (KOS) el cual se encontraba almacenado a -80 °C.
2. Posteriormente, se infectó un cultivo de células Vero a 90% de confluencia de una botella de 25cm² (3x10⁶ células Vero) con 0.5 ml del vial de KOS y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂.
3. Cuando el cultivo se encontraba a un 80% de infección (2-3 días dependiendo del título viral del vial) se recuperó todo el contenido de la botella e infectó con 1ml, 4 botellas de 75 cm² a 95% de confluencia (6x10⁶ células Vero) e incubó a 37 °C y 5 % CO₂.



4. Cuando el cultivo se encontraba a un 80% de infección (el tiempo depende de la carga viral del vial) se recuperó todo el contenido de las botellas con raspadores de plástico y se pasó a 2 tubos cónicos de 50ml. Después se sonicó durante 3 minutos a 30 pulsos por 30 segundos, manteniendo los tubos en hielo.
5. Posteriormente, se homogenizó el contenido de cada tubo, y se hicieron alícuotas de 0.6 ml, las cuales se almacenaron en crioviales de 1.5 ml.
6. Los viales con el concentrado viral se congelaron gradualmente de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para titular el concentrado viral de VHS-1 (KOS) se utilizó la técnica de PFU de acuerdo al siguiente protocolo:

5.3 Ensayo de infectividad viral: formación de placas líticas o Unidades Formadoras de Placa (PFU)

5.3.1 Titulación viral por la técnica de Formación de Placas Líticas o Unidades Formadoras de Placa.

1. Se partió de un cultivo de 24 h de células Vero en placa de 6 pozos con 5×10^5 células por pozo.
2. Se realizaron diluciones seriadas del concentrado viral de VHS-1 (KOS) en PBS glucosado al 1 %. Diluciones de 1:10, 1:100, etc., hasta llegar a $1:10^{10}$ (10 diluciones en total). Para hacer las diluciones se adicionó a cada tubo 4.5 ml de PBS glucosado y 0.5 ml de la dilución previa (ver Figura 17)



Figura 17. Esquema de diluciones seriadas de VHS-1 cepa KOS en PBS glucosado al 1 %.

- Se procedió a retirar el medio de la placa de 6 pozos y se agregó 1 ml de la solución viral a cada pozo (ver **Figura 18**), después se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación a 60rpm.

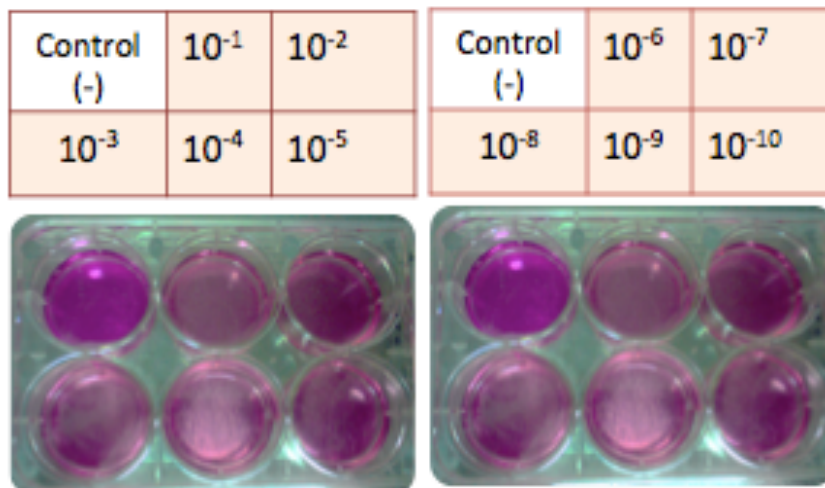


Figura 18.- Distribución de soluciones virales en placa de 6 pozos con células Vero. Placas con 5×10^5 células Vero por pozo, con medio DMEM advanced al 2% SBF.

4. Después de la hora de incubación se retiró la solución viral de los pozos y agregó medio DMEM advanced con IgG al 0.32 % e incubó a 37 °C, 5 % CO₂ durante 4 días.
5. Al cuarto día se realizó tinción con colorante Giemsa:
 - Primero se retiró el medio en cada pozo y adicionó metanol absoluto durante 5 min para fijar las células.
 - Después se retiró el metanol y se adicionó colorante Giemsa, incubando durante 10 minutos.
 - Se lavaron cada uno de los pozos con agua y se dejaron secar, después se contó el número de PFU en cada pozo para determinar el título viral en PFU/ml.
 - El título del concentrado que se está evaluando será igual al número de PFU contadas en la mayor dilución a la cual se logran observar placas de lisis.

5.4 Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y condiciones generales de infección

1. Se partió de un cultivo de 24 h de células Vero en placa de 12 pozos con 2.5×10^5 células por pozo.
2. Se hicieron diluciones seriadas del concentrado viral de VHS-1 (KOS) en medio aDMEM al 2 % SBF en frío. Hasta obtener diferentes valores de MOI: 0.04, 0.03, 0.02, 0.015, 0.01, 0.005. Para calcular la MOI se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{(\text{PFU})(\text{Volumen de Infección})}{\# \text{ de células a infectar}}$$

*Ver Anexos con ejemplo de cálculos.

3. Después, se infectaron las células con 0.8 ml de solución viral por pozo.



4. Se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación a 60rpm para permitir la infección viral y una mayor superficie de contacto de las partículas virales con las células en el pozo.
5. Se incubó 5 h a 37 °C y 5 % CO₂ sin agitación, para permitir la internalización del péptido A β por parte de las células Vero (Total de horas de infección: 6 horas).
6. Después de las 6 horas de incubación se retiró la solución viral y se hizo un lavado con PBS (hasta este paso se consideró cómo condiciones generales de infección, para posteriores menciones en otros protocolos)
7. Debido a que se determinaron las PFU por pozo: se adicionó Medio aDMEM con IgG al 0.32 % e incubó a 37 °C y 5 % CO₂ durante 48 horas.
8. Después se retiró el medio y se realizó la tinción con el colorante Giemsa para contar el número de PFU en cada pozo. Se seleccionó la MOI que nos permitió contar aproximadamente 100 PFU por pozo y con ella se llevaron a cabo las infecciones posteriores.

5.5 Solubilización y oligomerización del péptido beta amiloide (A β)

5.5.1 Solubilización del péptido A β

1. En campana de flujo laminar, a un vial con 1 mg del péptido liofilizado, se le adicionó con jeringa de insulina 200 μ l de NaOH 2 mM.
2. Se sonicó en baño de agua durante 20 minutos. Después se adicionaron 800 μ l de agua milliQ.
3. Se cuantificó la concentración final del péptido utilizando un espectrofotómetro y a una longitud de onda de 280 nm.
4. Finalmente se hicieron alícuotas de 100 μ l en tubos Eppendorf de 0.2 ml; se etiquetaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso.



5.5.2 Oligomerización del péptido $A\beta$

1. Se colocó en un tubo Eppendorf la cantidad necesaria de péptido a utilizar para los ensayos posteriores, calculando una concentración final de 5 μ M en los pozos de las placas de cultivo.
2. Se incubaron a 37 °C a 60 rpm durante 48 h. Pasado este tiempo se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.6 Ensayo de citotoxicidad del péptido $A\beta$ en células Vero

1. Se sembraron 7,000 células Vero por pozo en placas de 96 pozos y se les adicionaron 150 μ l de medio DMEM advanced al 2% de SBF.
2. Se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % CO_2 .
3. Después,, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 200 μ l medio con o sin péptido $A\beta$ a una concentración final de 5 μ M y de forma independiente NaOH 2 mM, albúmina 10 μ M, DMSO 8 %. Esto se realizó por triplicado.
4. Se incubó durante 24 h a 37 °C y 5 % CO_2 .
5. Después, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 μ l de medio DMEM advanced al 2% de SBF con 10 μ l del reactivo de azul alamar (proporción 1:10).
6. Se incubó durante 3 h a 37 °C y 5% CO_2 hasta que se observó un viraje en el color de un azul a un rosa intenso.
7. Se realizó la lectura de Absorbancia a λ 570 y 600 nm.
8. El blanco de la reacción fue medio sin azul alamar.
9. Se graficaron los resultados obtenidos en Excel y en la gráfica se colocó en el eje de las x (abscisas) el compuesto a evaluar y en el eje de las y (ordenadas) el porcentaje de viabilidad en una escala de 1 a 100 %.
10. Un valor por encima de 80 % es aceptable e indica que el compuesto no compromete la viabilidad celular y puede ser utilizado en experimentos posteriores.

5.7 Infección de células vero con VHS-1 (KOS) y péptido beta amiloide

1. Se realizaron diluciones seriadas del concentrado viral en medio de cultivo, a la dilución con MOI 0.01, se le adicionó el volumen necesario de péptido $A\beta$ para tenerlo a una concentración final de $5 \mu\text{M}$ por pozo.
2. Se incubaron a 37°C las soluciones virales con el péptido y los respectivos controles: VHS-1 en medio y péptido sin VHS-1 en medio aDMEM.
3. Posteriormente, se infectaron 2.5×10^5 células Vero por pozo en placas de 12 pozos con 0.8 ml de solución viral a una MOI de 0.01 (ver Figura 19).

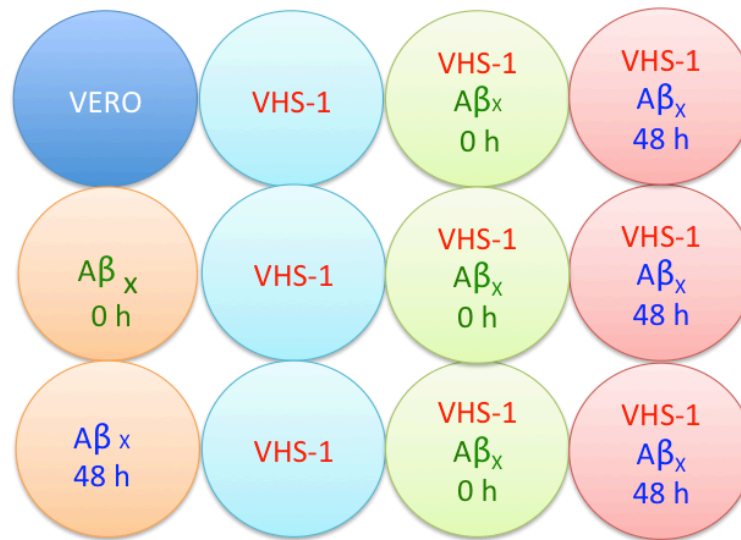


Figura 19.- Esquema de distribución de diluciones virales en placas de 12 pozos con células Vero, con y sin péptido $A\beta$, controles de infección y de péptido.

4. Las placas se incubaron 1 h a 37°C en agitación a 60rpm y 5 h a 37°C y 5 % CO_2 sin agitación.
5. Después, se realizó un lavado con PBS y se incubaron 48 h a 37°C y 5 % CO_2 .

5.8 Extracción de ARN por el método de TRIzol®

1. Después de infectar 2.5×10^5 células Vero por pozo en placas de 12 pozos con 0.8 ml de solución viral a una MOI de 0.01 según condiciones generales de infección antes mencionadas.
2. Se incubaron durante 48 h a 37°C y 5 % CO_2 .
3. Se retiró mediante aspiración el medio de cultivo de cada pozo sin hacer lavado con PBS.
4. Fase de Homogenización:
 - Se adicionaron 350 μl de TRIzol a cada pozo, para lisar las células, esto se realizó a 4°C .
5. Fase de separación:
 - Se incubaron durante 5 min a TA y después se transfirió la mezcla de TRIzol a un tubo Eppendorf de 2 ml.
 - Se adicionaron 40 μl de cloroformo frío por cada 200 μl de TRIzol empleados, en éste caso 70 μl por pozo. Se mezcló por inversión durante 15 seg.
 - Se incubó el tubo en hielo durante 2 a 3 min.
 - Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C .
6. Fase de precipitación:
 - Después, se recuperó sólo la fase acuosa y se adicionaron 250 μl de isopropanol
 - Se incubaron a -80°C toda la noche o 1 hora.
 - Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C .
7. Fase de lavado:
 - Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol y se mezcló con vórtex.
 - Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C .

8. Fase de resuspensión:

- Se retiró el etanol sin tocar la pastilla. Se centrifugó durante 2 segundos a TA y para eliminar los restos de etanol en el tubo, se utilizó una puntilla de 10 μ l.
- Finalmente, se resuspendió la pastilla en 19 μ l de agua DEPC con 1 μ l de ARNse OUT (inhibidor de ARNsas)

5.9 Retrotranscripción mediante M-MLV (RT-PCR M-MLV)

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se mezclaron los siguientes reactivos (1x):

TABLA 4

Reactivos mezcla 1 para RT-PCR MMLV

Reactivos	Volumen
Random primer	1 μ l
ARN [x]	5 μ l
Agua DEPC	C.b.p. 11.5 μ l
Vol. Final	11.5 μ l

2. Se dejó incubar 10 min a 72 °C en termociclador.
3. Se pausó el termociclador, se enfriaron los tubos a 4 °C en hielo 3 minutos (No exceder tiempo)
4. Se agregaron 8.5 μ l de la mezcla 2 (1x)

TABLA 5

Reactivos mezcla 2 para RT-PCR MMLV

Reactivos	Volumen
Buffer 5x	4 μ l
DTT	2 μ l
ARNse out	0.5 μ l
DNTP's	1 μ l
MMLV	1 μ l
Volumen Final	8.5 μ l

5. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones:

TABLA 6
Condiciones de RT-PCR

	Tiempo	Temperatura
1	10 min	25 °C
2	1 hora	37 °C
3	5 min	94 °C
4	10 min	4 °C

5.10 PCR en tiempo real:

5.10.1 Gen ARNr 18S

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

TABLA 7
Reactivos para preparar mezcla para qPCR para amplificar ARNr 18S

Reactivos	Volumen
Master mix 2x	10 μ l
Agua DEPC estéril	c.b.p. 20 μ l
Ensayo* 20x	1 μ l
cADN**	250 ng/rx
Vol. Final	20 μ l

*Ensayo: Contiene los iniciadores y la sonda fluorescente; la sonda tiene como reportero el fluoróforo VIC y como inhibidor MGB. Debido a que es sensible a la luz, se trabajó en oscuridad.

2. Después en tubos para qPCR (0.2 ml) se adicionó la mezcla anterior y por último el volumen de ADNc para tener 250 ng en cada tubo**. El blanco fue un tubo que en lugar de ADNc se le adicionó Agua milliQ. El volumen final fue de 20 μ l por tubo.
3. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones:

TABLA 8
Condiciones generales para qPCR

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
1	2 min	50 °C	
2	10 min	95 °C	
3	15 seg	95 °C	40
4	1 min	60 °C	

5.10.2 Gen UL5:

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

TABLA 9
Reactivos para qPCR del gen UL5

Reactivos	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2x	10 μ l
Forward 10 μ M	0.4 μ l
Reverse 10 μ M	0.4 μ l
Agua DEPC estéril	c.b.p. 20 μ l
ADNc +100ng/rx	250 ng/rx
Vol. Final	20 μ l



2. Después en tubos para qPCR (0.2 ml) se adicionó la mezcla anterior y por último el volumen de ADNc para tener 250ng en cada tubo. El blanco fue un tubo que en lugar de ADNc se le adicionó Agua milliQ. El volumen final fue de 20 μ l por tubo.
3. Se programó termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de ARNr 18S. Sólo se indicó en el programa que se usó Syber Green y se debía obtener también la curva de disociación.

5.11 Extracción y cuantificación de proteínas totales

5.11.1 Extracción de proteínas totales

De una placa de 12 pozos infectada durante 6 o 48 horas:

Se retiró todo el medio de cultivo con micropipeta (almacenar) y se colocó la placa sobre hielo.

1. Se añadieron 75 μ l de la solución de raspado (PBS/EDTA) a cada pozo.
2. Con un raspador de goma se realizó el raspado de arriba hacia abajo aplicando presión sólo en una dirección (al regresar el raspador, no se raspó de abajo hacia arriba), por último, se rasparon las orillas de la caja (se rotó la caja de 3-4 veces 90°).
3. Se repitió el proceso girando 90 °.
4. Con una micropipeta se recuperó la suspensión de células y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, dejando el tubo en hielo.
5. Se adicionaron 50 μ l de la solución de raspado para realizar el último raspado del pozo.



6. Se pasó la suspensión al tubo del paso 5. Se centrifugó durante dos segundos a 14,000 rpm. Después se desechó todo el sobrenadante con micropipeta y se centrifugó durante dos segundos más, y se retiró el sobrenadante que quedó.
7. Se agregó 10 μ l de Buffer de lisis y se mezcló por inversión (vórtex hasta disolver la pastilla de células).
8. Se incubó en hielo durante 20 minutos.
9. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
10. Se retiró el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo (aquí es donde se encuentran las proteínas).
11. Finalmente, el tubo con proteínas se almacenó a -20 °C.

5.11.2 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

1. Primero, se elaboró una curva de calibración para cuantificación de proteínas por método de Bradford (ver Anexos).
2. En una placa de 96 pozos, se adicionaron 159 μ l de agua destilada, 1 μ l de la muestra de proteínas y 40 μ l del reactivo de Bradford por pozo.
3. Se cuantificó la absorbancia a λ 600 nm.
4. A partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración, se calculó la concentración de proteínas de cada tubo.
5. Si la absorbancia excedía el valor de la dilución con mayor concentración, se hicieron diluciones 1:3 en agua destilada y se cuantificó de nuevo la concentración.

5.12 SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas

5.12.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

1. Se prepararon mini geles de poliacrilamida al 12% de un grosor de 1mm (ver anexos).
2. Se adicionó en cada pozo del gel 30 ng/ μ l de proteínas con $\frac{1}{4}$ de volumen de buffer de muestra.
3. Se realizó el corrimiento electroforético del gel a 60 V durante 30 min y después a 90 V durante 1 h 20 min.

5.12.2 Electrotransferencia en condiciones húmedas

1. Se recortó la membrana Hybond-P PVDF (General Electric) con dimensiones 6 cm ancho x 8 cm de largo y se sumergió en Metanol al 100% 5 min.
2. Se lavó la membrana con agua milliQ 5 min y se equilibró con buffer de transferencia. Se humedecieron 2 piezas de papel filtro y 2 esponjas en una charola grande.
3. Después de la electroforesis se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se desechó el gel concentrador.
4. Se colocó sobre el gel una pieza de papel filtro, después la membrana activada sobre el gel y sobre ésta 2 piezas de papel filtro.
5. Se colocaron en forma de sándwich de tal forma que la membrana quedara de cara al lado claro (Ver anexos).
6. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 100 V a 4 °C y en agitación.
7. Finalmente, se lavó la membrana con PBS 1x con 0.5% de Tritón X-100 durante 5 minutos.

5.13 Ensayo de Western blot

1. Se incubó la membrana con las proteínas en buffer de bloqueo a 4 °C durante toda la noche en agitación.
2. Después, se realizaron 3 lavados con PBS 1x con 0.5% de Tritón x-100 durante 5 minutos por cada lavado, a temperatura ambiente en agitación.
3. Se incubó la membrana con el Anticuerpo primario (IgG de conejo anti $A\beta_{25-35}$) durante 2 horas a 4 °C en agitación.
4. Se lavó la membrana 3 veces con PBS 1x con 0.5% de Tritón x-100 durante 5 minutos por cada lavado a TA en agitación.
5. Posteriormente la membrana se incubó con el Anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con HRP) durante 2 horas a 4 °C en agitación.
6. La membrana se lavó 3 veces con PBS 1x con 0.5% de Tritón x-100 durante 10 minutos por cada lavado a TA en agitación.
7. Por último, se llevó a cabo el ensayo de quimioluminiscencia (ECL: Enhanced Chemiluminescence):
 - Primero se secó el excedente de PBS y se humedeció la membrana en la soluciones de luminol para revelar.
 - Se mezcló durante 2 min y se reveló en el ChemiDoc™ (Bio-Rad).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Cultivo de células Vero y titulación de la partícula viral de referencia VHS-1 (KOS) mediante ensayo de unidades formadoras de placa (PFU)

Las células Vero sin infectar e infectadas con la cepa de referencia de VHS-1 (cepa KOS) se observaron a diferentes tiempos post infección 0, 6 y 48 horas, para identificar cambios en la morfología.

Las células sin infección mantuvieron su morfología epitelial, es decir, alargadas ya que el medio de cultivo no contenía partículas virales (PV). A diferencia de las células que fueron infectadas, éstas se observaron redondas, demostrando un evidente daño debido a la infección por VHS-1, denominado efecto citopático. El cambio morfológico no se observó a las 0 h, pero a las 6 h p.i., el cambio era evidente, debido a que las células se observaron redondas.

Posteriormente, a las 48 h se observó la lisis celular, evidenciada por la ausencia de células adheridas a la base de las placas de cultivo, las cuales se lisaron y dieron paso a lo que se denomina placa de lisis celular. Esta es delimitada gracias al uso de la presencia de un anticuerpo no específico, como es la IgG en el medio de cultivo, el cual evita la diseminación de la PV permitiendo delimitar los focos de lisis en la monocapa celular.

A continuación se presentan fotografías de las células infectadas y sin infectar, a los tres diferentes tiempos antes mencionados (0,6 y 48 h p.i.) las células se observaron al microscopio invertido a un aumento de 10x (Figura 20).

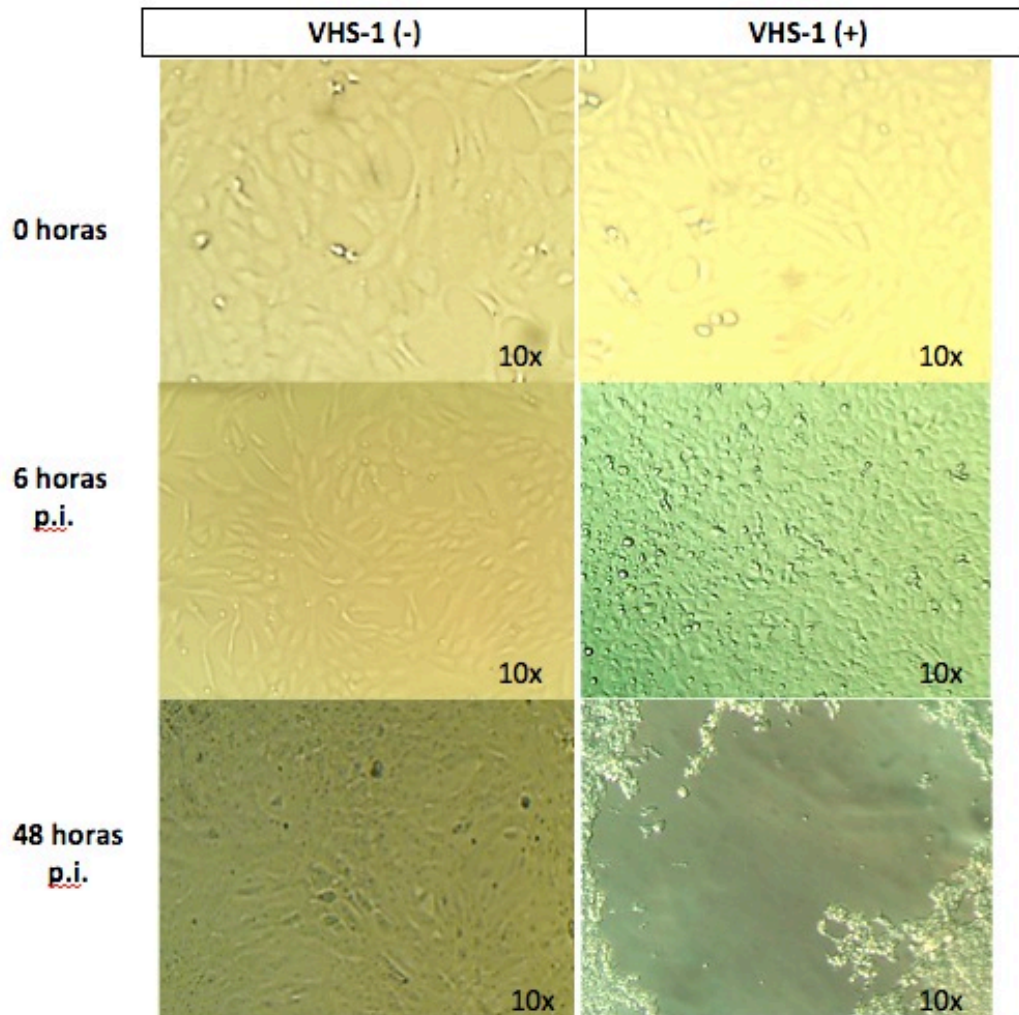


Figura 20. Células Vero con y sin infección por VHS-1 (cepa KOS) a 0, 6 y 48 horas p.i. 2.5×10^5 células/pozo. Aumento 10x.

La titulación del concentrado viral se realizó en placas de 6 pozos, infectando 5×10^5 células/pozo e incubando durante 4 días. A continuación se muestra una imagen de la placa teñida con Giemsa donde en el control negativo (sin VHS-1) no se observan placas de lisis, en la dilución viral 10^{-5} hubo lisis total de las células, en la 10^{-6} el número de PFU fue incontable y en la dilución 10^{-8} se observaron 7 placas de lisis, lo que determina el título viral del concentrado de VHS-1 (Figura 21).

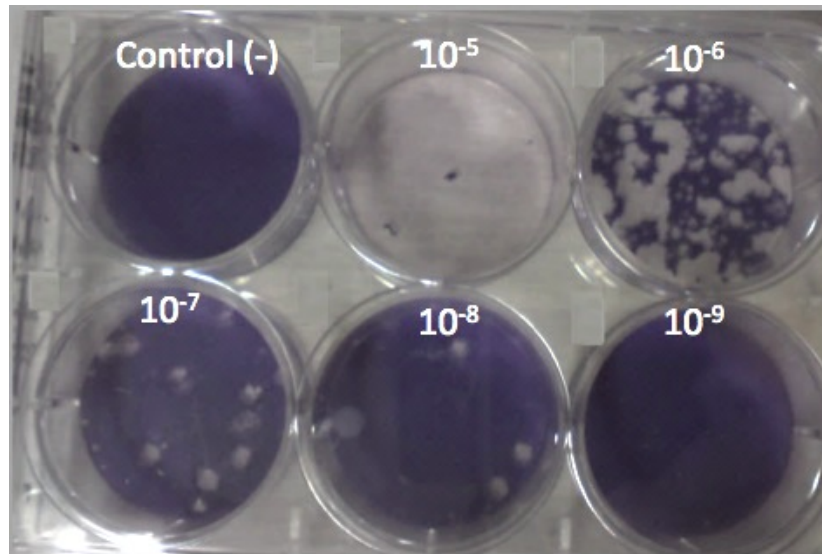


Figura 21.- Titulación viral del concentrado de VHS-1 (KOS) mediante PFU. Placa de 6 pozos con células Vero, teñida con Giemsa 48 horas p.i., sólo se pueden contar PFU hasta el pozo de la dilución número 8 (10^{-8})

El título del concentrado viral fue 7×10^8 PFU/ml, ya que se contaron 7 PFU en el pozo de la dilución número 8 (10^{-8}) y se infectó con 1 ml de solución viral. Se obtuvieron 64 crioviales con 0.6ml de medio con partículas virales, las cuales se almacenaron a -80 °C.

No se muestra la placa con los resultados de las diluciones 10^{-1} a la dilución 10^{-4} debido a que la lisis de las células fue total, tal como se observa en la figura 18 en el pozo con la dilución 10^{-5} .

6.2 Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y condiciones generales de infección

La MOI a la que se infectaron las células se determinó en placas de 12 pozos con 2.5×10^5 células Vero/pozo mediante ensayo de placas líticas, se incubó durante 6 horas sin péptido $A\beta$ (1 h a 37°C a 60 rpm y 5 h a 37°C y 5 % CO_2) y después de 48 horas de infección se realizó la tinción con Giemsa y el conteo del número de PFU por pozo.

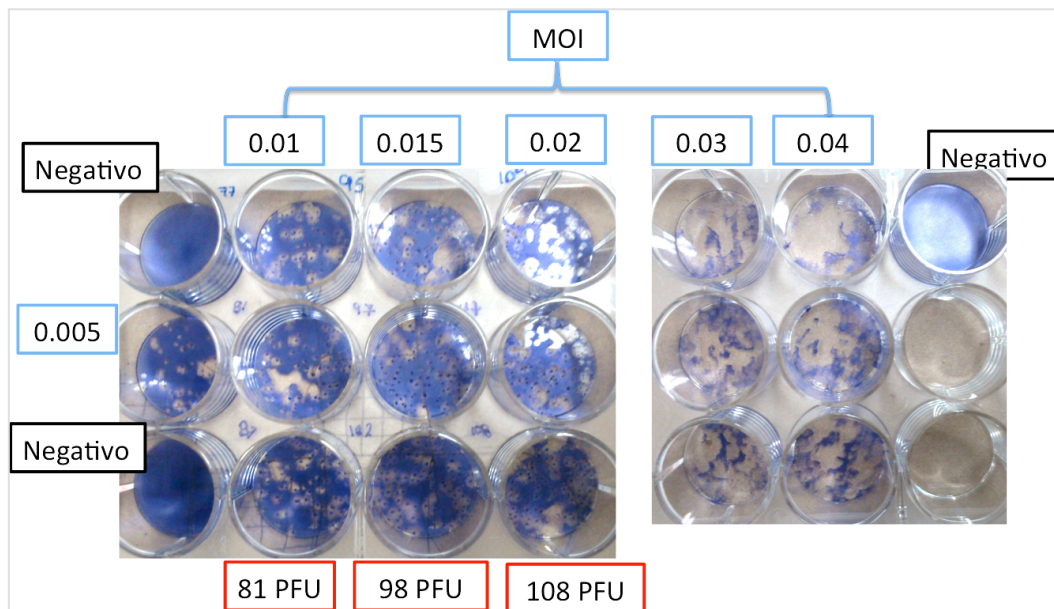


Figura 22. Resultados del ensayo de PFU para determinar la MOI. Placas de 12 pozos con 2.5×10^5 células Vero/pozo. Se utilizaron diferentes valores de MOI, desde 0.005 hasta 0.04. Tinción con Giemsa 48 horas p.i.

Debido a los resultados obtenidos en la infección (sin el péptido $A\beta$), se optó por utilizar 1 hora de infección con agitación (60 rpm) y 5 horas sin agitación para evitar el desprendimiento de la monocapa de células Vero. Las 5 h sin agitación se establecieron para permitir la interacción de los péptidos $A\beta$ con las células; en las infecciones posteriores, sí se utilizó el péptido $A\beta$. Con respecto al número de PFU que se contaron por pozo dependiendo de la MOI utilizada para infectar las células,

se consideró a 0.01 como la MOI óptima para permitir contar aproximadamente 100 PFU/pozo.

6.3 Ensayo de citotoxicidad del péptido A β en células Vero

Después de reconstituir los distintos péptidos A β se realizaron ensayos de citotoxicidad en células Vero, para asegurar que el efecto citotóxico en experimentos posteriores, tales como la lisis celular, fuera debido a la infección por VHS-1 y no a la presencia del péptido.

En la siguiente gráfica se muestran los resultados que se obtuvieron con los péptidos oligomerizados y sin oligomerizar a una concentración de 5 μ M, después de 24 horas de exposición a células Vero. Utilizando como blanco (sin A β), medio DMEM advanced 2% SBF. Se observa que ninguno de los péptidos afecta la viabilidad celular, ya que ningún valor de porcentaje de viabilidad fue menor al 80%.

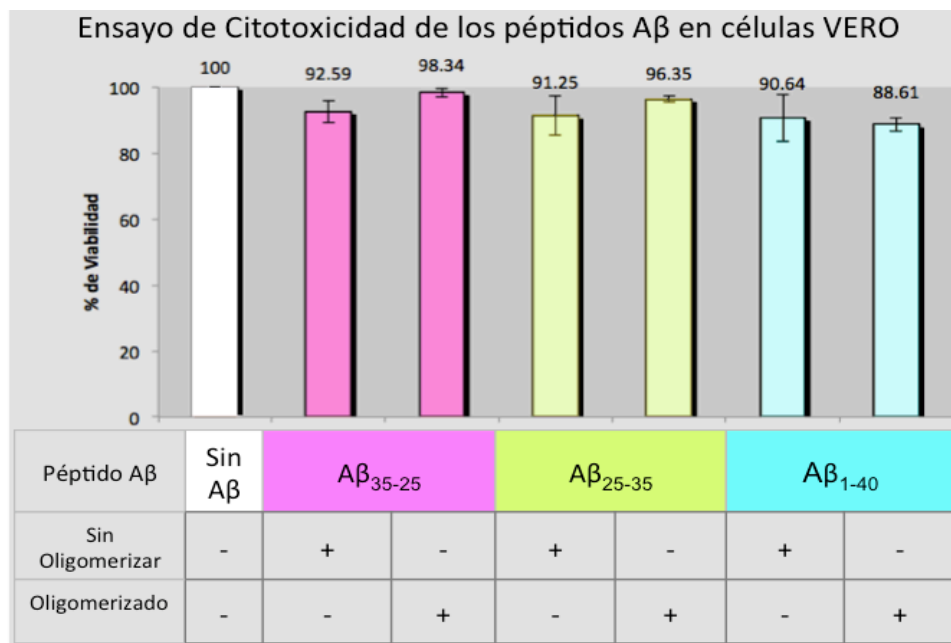


Figura 23.- Resultados de los ensayos de citotoxicidad de los péptidos A β oligomerizados y sin oligomerizar sobre células Vero. Se utilizó el reactivo azul alamar para medir viabilidad celular. El tratamiento fue de 24 horas y se utilizaron los péptidos a una concentración final de 5 μ M en placa de 96 pozos con 7×10^3 células/pozo.

6.4 Infección de células Vero con VHS-1(KOS) y péptido beta amiloide.

Después de realizar las infecciones de placas de 12 pozos con VHS-1 y los distintos péptidos se realizaron ensayos de PFU, qPCR y WB.

6.4.1 Ensayo de formación de placas líticas o unidades formadoras de placa (PFU)

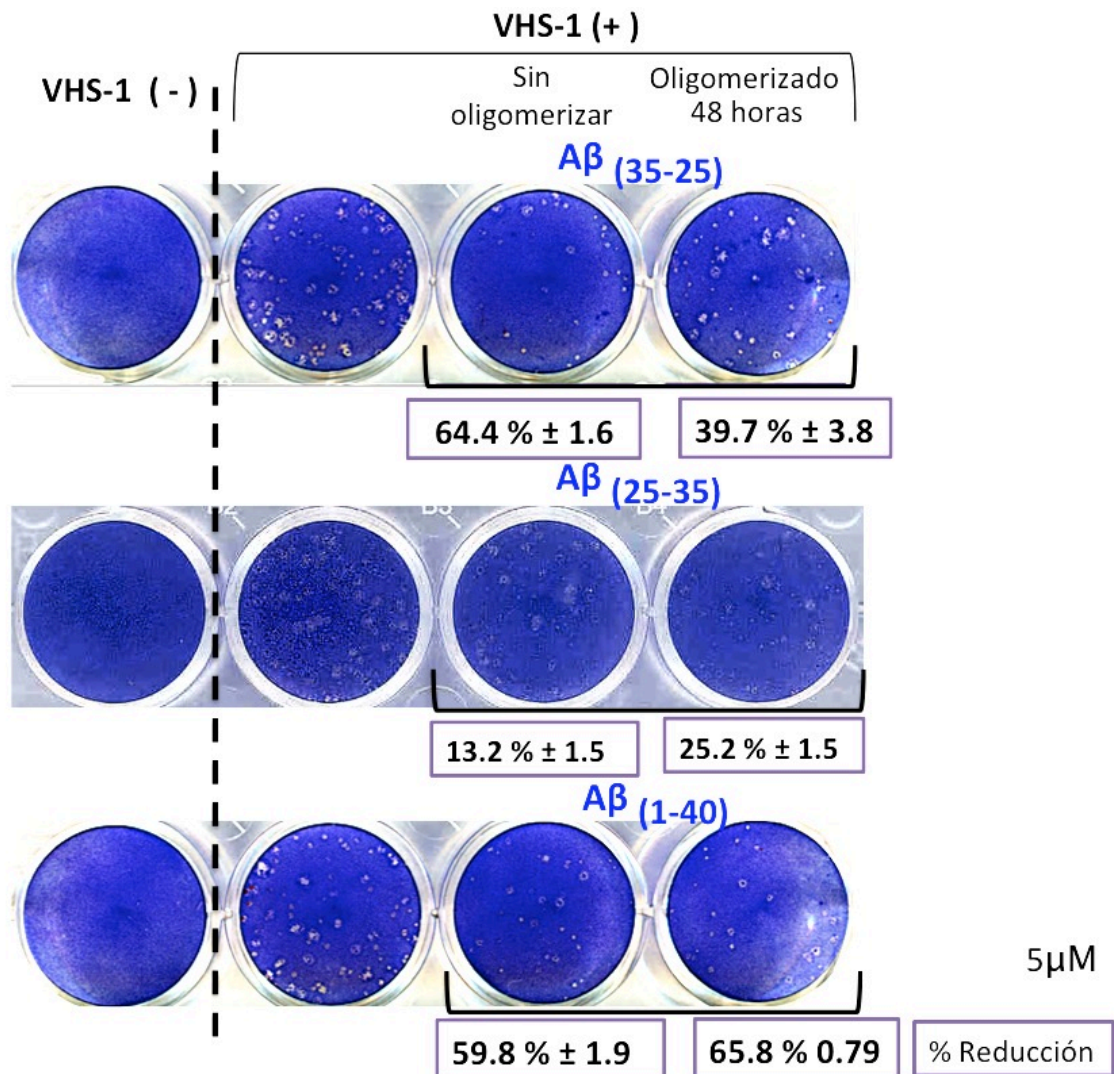


Figura 24.- Resultados del ensayo de formación de placas líticas (PFU) utilizando los diferentes péptidos A β oligomerizados y sin oligomerizar. Se muestra el porcentaje de reducción en el número de PFU con respecto al control de infección sin péptido.

Analizando los resultados del número de PFU contadas por cada pozo mediante la prueba estadística t de student ($p < 0.05$), se observa que la reducción en el número de PFU con los tres péptidos oligomerizados y sin oligomerizar presentan diferencia significativa comparado con los pozos que se infectaron con VHS-1 sin péptido $A\beta$.

Los resultados del ensayo de PFU se muestran en las siguientes gráficas, en la primera se representa el porcentaje en el número de PFU por pozo con respecto al control de infección sin péptido $A\beta$:

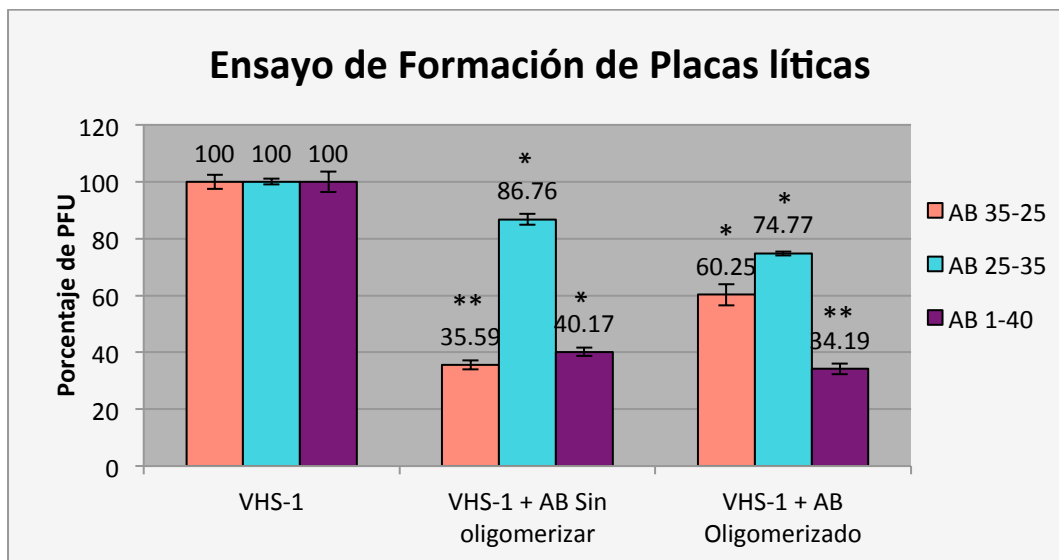


Figura 25.- Gráfica del porcentaje de PFU de los péptidos $A\beta_{35-25}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$ comparado con el control de infección sin péptido (al cual le corresponde el 100% de PFU contadas por pozo). *Diferencia estadísticamente significativa; ** Mayor diferencia estadísticamente significativa. Prueba t de student ($p < 0.05$).

En la siguiente gráfica se representan los resultados del número de PFU pero en porcentaje de reducción ocasionado por cada uno de los péptidos $A\beta$ en su estado oligomerizado y sin oligomerizar a una concentración final de $5 \mu\text{M}$ comparado con su respectivo control de infección sin péptido (no se muestra en la gráfica):

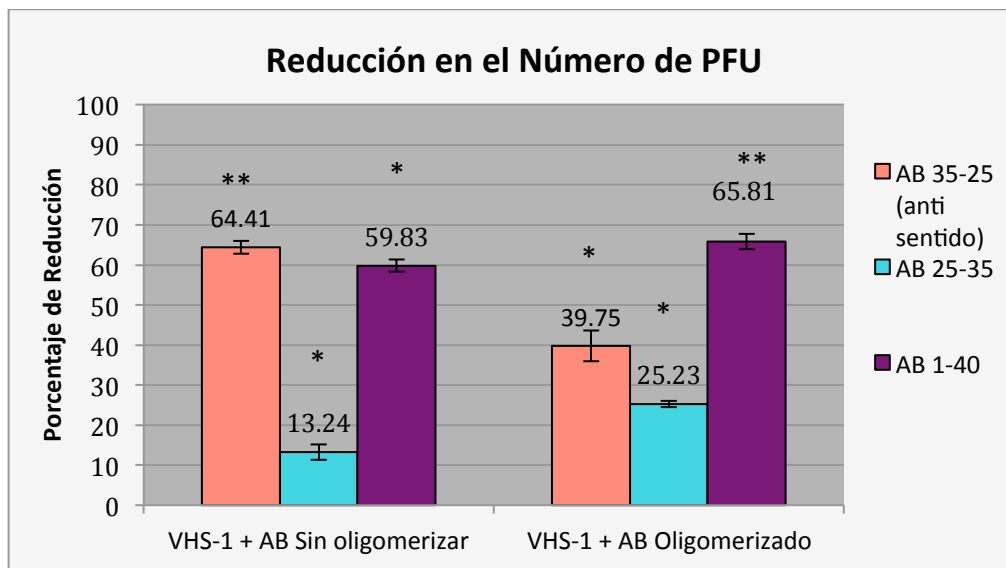


Figura 26.- Gráfica del porcentaje de reducción en el número de PFU de los péptidos $A\beta_{35-25}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$ oligomerizados y sin oligomerizar. *Diferencia estadísticamente significativa; ** Mayor diferencia estadísticamente significativa. Prueba t de student ($p < 0.05$).

La diferencia del porcentaje de reducción de número de PFU es estadísticamente significativa con las tres isoformas del péptidos $A\beta$ (t de student, $p < 0.05$).

6.4.2 PCR en tiempo real para genes ARNr 18S y UL5

Después de 48 horas de incubación, se extrajo ARN de las células, se realizó RT-PCR y PCR en tiempo real para amplificar los genes ARNr 18S y UL5, los resultados se analizaron utilizando la cuantificación relativa por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

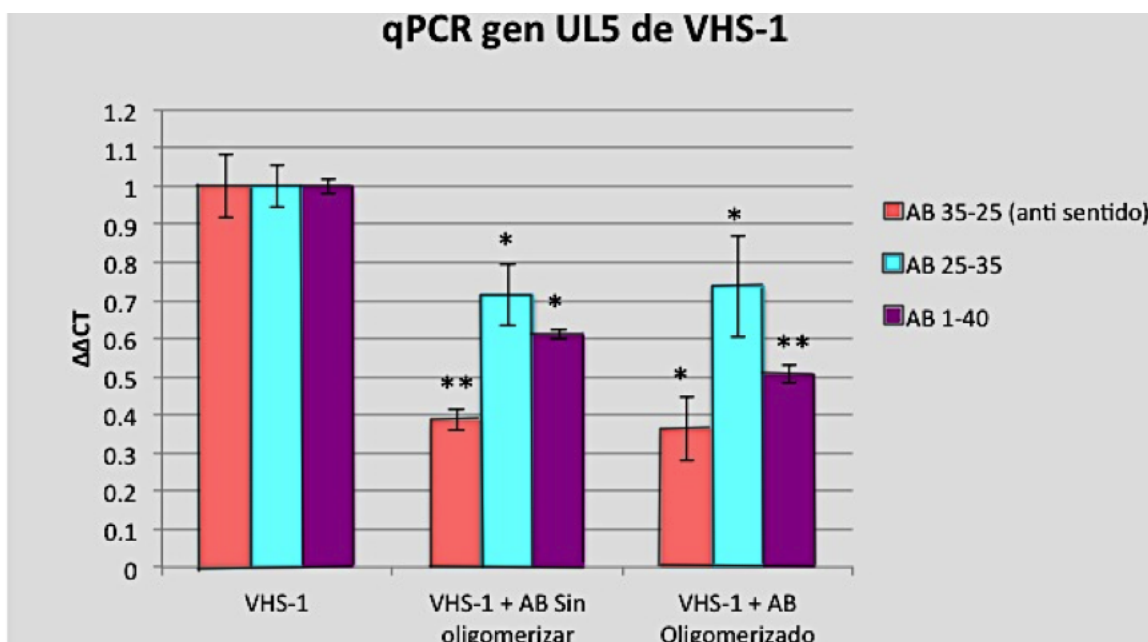


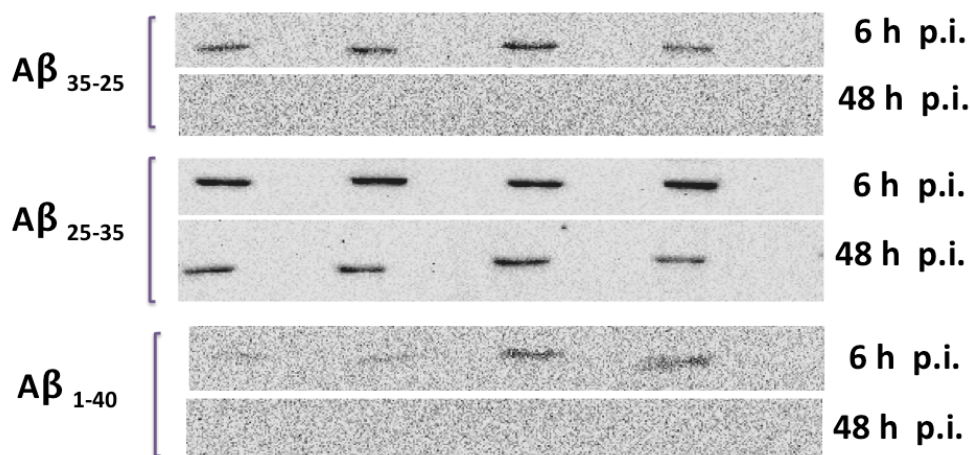
Figura 27.- Gráfica de resultados de PCR en tiempo real para el gen UL5 de VHS-1, en muestras de células Vero infectadas con VHS-1, con y sin péptido $A\beta$ oligomerizado y sin oligomerizar. *Diferencia estadísticamente significativa; ** Mayor diferencia estadísticamente significativa. Prueba t de student ($p < 0.05$).

Como se observa en la gráfica, los tres péptidos disminuyeron la expresión del gen UL5. El análisis de los resultados por medio de la prueba estadística t de student (valor de $p < 0.05$) nos indica que la expresión del gen UL5 en VHS-1 comparada con los péptidos $A\beta_{35-25}$ oligomerizado ($p=0.0017^{**}$) y sin oligomerizar ($p=0.002$); $A\beta_{25-35}$ oligomerizado ($p=0.019$) y sin oligomerizar ($p=0.024$) y $A\beta_{1-40}$ oligomerizado ($p=0.001^{**}$) y sin oligomerizar ($p=0.002$) presenta diferencias estadísticamente significativas. Comparando cada uno los péptidos entre ellos según su estado de oligomerización, sólo el péptido $A\beta_{1-40}$ presenta una diferencia significativa ($p=0.015$).

6.4.3 Ensayo de Western blot

Después de 48 h p.i., con y sin el péptido, oligomerizado y sin oligomerizar, se realizó extracción de proteínas tanto del sobrenadante como del lisado de células Vero. Las proteínas totales se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia, previo corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF y se incubó con un primer anticuerpo IgG Anti A β_{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 la siguiente figura.

Se realizó extracción de proteínas totales de células y sobrenadantes a 6 y 48 horas p.i., con el VHS-1, los WB de las muestras extraídas correspondientes a cada péptido A β son los siguientes:



Células VERO	+	-	+	-	+	-	+	-
Sobrenadante	-	+	-	+	-	+	-	+
Péptido Oligomerizado	-	-	-	-	+	+	+	+
VHS-1	-	-	+	+	-	-	+	+

Figura 28.- Western Blot de lisado celular y sobrenadantes después de 6 y 48 horas de infección con VHS-1 y cada uno de los péptidos A β .

Además se realizó WB de controles de infección y de péptido $A\beta$, los resultados se muestran a continuación:



Figura 29.- Resultados de Western blot de los controles de infección y de péptido $A\beta$. Membrana de PVDF revelada por quimioluminiscencia utilizando como anticuerpo primario IgG anti $A\beta_{25-35}$ de conejo



CAPÍTULO VII

DISCUSIONES

Varios factores de riesgo ambiental se han tomado en cuenta para contribuir al padecimiento de la Enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo metales pesados como el zinc (Bush, Pettingell *et al.* 1994), eventos traumáticos como lesiones en la cabeza (Mayeux, Ottman *et al.* 1993, Fleminger, Oliver *et al.* 2003), y agentes infecciosos convencionales y no convencionales (Haase, Lewis *et al.* 1986).

La vinculación de un agente viral con la patogénesis de la EA puede ser difícil debido a la incertidumbre que se presenta al tratar de establecer el momento exacto en el tiempo cuando un agente infeccioso puede estar implicado. Un virus puede actuar durante las primeras etapas del proceso de la enfermedad o bien su participación puede ser evidente durante las etapas terminales (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000).

Diversos agentes infecciosos, y virus en particular, se han propuesto como posibles causas de la enfermedad de Alzheimer. El Virus del Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) es uno de los candidatos más fuertes debido a que es neurotrópico, ubicuo en la población general, y es capaz de establecer latencia durante toda la vida en el huésped (Itzhaki and Wozniak 2008).

La evidencia del papel de VHS-1 en la enfermedad de Alzheimer es polémica pero los argumentos a favor surgen debido a su presencia en las regiones del cerebro afectadas por la enfermedad de Alzheimer (Itzhaki 2004). La reactivación periódica del VHS da lugar a la producción de virus infeccioso a partir de las neuronas infectadas de forma latente con o sin la aparición de los síntomas clínicos, o a la formación de la lesión por herpes (Posavad, Koelle *et al.* 1998). Previamente se ha demostrado que el virus del herpes se puede reactivar en neuronas "estresadas"



(Blondeau, Aoki *et al.* 1993), y una situación similar puede existir en el cerebro de pacientes con EA.

En el presente proyecto se utilizó un modelo de infección lítica de VHS-1, utilizando células Vero. Este virus presenta dos ciclos de replicación (un lítico y otro de latencia) y a pesar de que la forma en que el virus se encuentra con los péptidos en el cerebro es mientras éste se encuentra en estado latente, es importante establecer la relación que el péptido pudiera tener en un modelo *in vitro* de infección lítica, ya que sólo éste permite evaluar el efecto, debido a que el virus al llevar el ciclo completo de replicación ocasiona la lisis de las células y esto puede evaluarse mediante ensayos de formación de placas líticas.

Por ello, el primer ensayo para observar el efecto de las isoformas del péptido fue el ensayo de formación de placas líticas (PFU). Se trató de evaluar la actividad biológica donde una unidad de PFU equivale a una PV infecciosa, donde una PV infecta la monocapa y a las células vecinas generando una placa de lisis o PFU (Patrick R. Murray 2009); así es cómo se evaluó el efecto sobre la replicación viral. Este ensayo ha sido utilizado por Lukiw *et al.*, en 2010 para evaluar el efecto del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la infección causada por VHS-1 en células CV-1 (fibroblastos de riñón de mono verde africano), observando una disminución en el número de PFU al adicionar el péptido a soluciones virales con VHS-1 y después infectar las células, utilizaron el péptido a dos concentraciones, las cuales fueron 5 y 100 μM . Observaron que el efecto era similar al utilizar el antiviral clásico, Aciclovir, por ello sugirieron una actividad de atenuación viral por parte del péptido (Lukiw, Cui *et al.* 2010). Nuestros resultados utilizando los péptidos $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{35-25}$, oligomerizados durante 48 horas y sin oligomerizar; también muestran un efecto tal como el observado por Lukiw *et al.* Utilizando el péptido a una concentración de 5 μM , se observó una reducción en el número de PFU de $64.4\% \pm 1.6$ (péptido sin oligomerizar) y $39.7\% \pm 3.8$ (oligomerizado) para el péptido $A\beta_{35-25}$; $13.2\% \pm 1.5$



(sin oligomerizar) y 25.3% \pm 1.5 (oligomerizado) utilizando el péptido A β ₂₅₋₃₅ y 59.8% \pm 1.9 (sin oligomerizar) 65.8% \pm 0.79 (oligomerizado) con el péptido A β ₁₋₄₀. Demostrando que las tres isoformas del péptido A β disminuyen la generación de partículas virales infecciosas, pero nosotros observamos que lo hacen en diferente porcentaje, según el péptido y así como el estado del mismo, ya sea oligomerizado o sin oligomerizar, algo que no fue observado por Lukiw *et al.*, debido a que ellos utilizaron el péptido sin oligomerizar.

Mediante los ensayos de PFU se demostró que la presencia de las isoformas del péptido A β , ocasionan una disminución en el número de partículas virales (PV) infectivas, algo importante en el caso de VHS-1, ya que éste virus genera PV no infecciosas con respecto a PV infecciosas en una relación 20:1 (Gibson 1996).

Dentro de las posibles explicaciones del efecto de atenuación viral que expone Lukiw *et al.*, utilizando la línea celular HNG (células neuronal-gliales humanas), se encuentran que los aminoácidos de los péptidos A β (A β ₁₋₄₂) son intensamente hidrófobos y pueden simplemente adsorber a VHS-1, y por lo tanto, secuestrar a la partícula viral, para efectivamente "inmovilizar" al virus, o bien el péptido puede destruir el virus a través de efectos de desestabilización de la membrana. También que éste péptido soluble (A β ₁₋₄₂) podría adsorberse en la superficie de las células HNG he inhibir a la glicoproteína viral que media la unión y entrada, o puede ser una combinación de ambos eventos biofísicos (Lukiw, Cui *et al.* 2010). Nosotros no podemos sugerir una actividad de ese tipo por parte de las isoformas probadas en este proyecto, debido a que no se realizaron ensayos para evaluar la localización del virus después de la hora de incubación con el péptido A β .

Además existe la posibilidad de que las adaptaciones evolutivas, de inmunidad innata o inflamatorias, e incorporadas por las células del cerebro humano para evadir con

éxito el ataque por parte del VHS-1, en parte a través de la regulación del péptido A β ₁₋₄₂, también podría desencadenar procesos que conducen a las enfermedades crónicas neurodegenerativas (Lukiw, Cui *et al.* 2010).

Para establecer las condiciones generales de infección en los ensayos, se tomó en cuenta que la agitación del péptido durante las 48 horas, modifica su conformación espacial, y por ende, era necesario definir el tiempo que se permitiría el contacto del péptido con las células Vero. Hasta la fecha no encontramos reportes del tiempo que se requiere para que ésta línea celular internalice el péptido. El único reporte que relaciona el tiempo de internalización del péptido y su grado de agregación, debido a que utilizan un modelo de endocitosis, es el publicado por Bateman y Chakrabartty en el 2011, en el cuál utilizan las células PC12 (feocrocitoma adrenal de rata) y los péptidos A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ oligomerizados a diferentes tiempos (3, 24 y 90 h), ellos realizaron incubaciones de los péptidos durante 1, 6 y 24 horas, posteriormente evaluaron el porcentaje de péptido internalizado. Ellos observaron que el 90 % del péptido A β ₁₋₄₀ (oligomerizado 24 h) es internalizado durante las primeras 6 horas de incubación; también reportan que oligómeros de 90 h no son internalizados con la misma eficiencia. Esto demuestra que el tiempo de exposición y el grado de agregación del péptido es determinante para la internalización del péptido (Bateman and Chakrabartty 2011), en nuestros experimentos teníamos la limitante de la cantidad de las isoformas del péptido, por ello decidimos sólo utilizar un tiempo de oligomerización, que fue de 48 horas.

Por lo anterior, se estableció que el tiempo de incubación del péptido con las células Vero y VHS-1 sería de 6 horas, de las cuales, 1 hora fue a 37 °C con agitación (60 rpm) para facilitar una distribución homogénea de las PV, y 5 horas a 37 °C con 5% CO₂ sin agitación, para permitir la entrada del péptido a las células, lo cual sólo podíamos suponer al inicio del ensayo.



De acuerdo a nuestros resultados del ensayo de WB en sobrenadante y lisado de células, después de 6 y 48 horas de infección, los 3 péptidos se encontraron presentes en el lisado celular; demostrándose que el péptido fue internalizado en algún momento de las 6 horas de incubación. En el caso de los ensayos realizados después de 48 h de infección, los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{35-25}$ no fueron detectados en el lisado celular o sobrenadante. Sólo en el caso del péptido $A\beta_{25-35}$ se observó su presencia en lisado celular después de 48 h, un resultado interesante considerando que éste fragmento es considerado la sección más neurotóxica del péptido $A\beta$, y que es considerada la secuencia más corta de péptido que retiene la actividad biológica y que forma agregados insolubles (Millucci, Raggiaschi *et al.* 2009). Quizá las propiedades antes mencionadas de éste fragmento, con respecto a los agregados formados por el péptido, le confirieron una mayor resistencia a la degradación por parte de las células Vero, a diferencia de los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{35-25}$, los cuales no se pudieron detectar después de 48 horas de infección.

Es importante aclarar que en los ensayo de WB se utilizó un anticuerpo anti fragmento $A\beta_{25-35}$, y que las bandas se deben a la detección de la presencia del péptido y no a una glicoproteína viral, ya que se ha demostrado que el péptido comparte un alto grado de homología con la glicoproteína gB de VHS-1 (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000). Los WB de los controles demuestran que tanto las células Vero, concentrado viral de VHS-1, y células infectadas, no dan bandas positivas, descartando un falso positivo; sí se observan bandas en el caso del control de péptido, en dónde se utilizó el de mayor longitud el $A\beta_{1-40}$ en su estado oligomerizado y sin oligomerizar. Diversos estudios han demostrado que el péptido sintético de gB es amiloidogénico *in vitro* y exhibe propiedades biológicas similares a las de $A\beta$ (Cribbs, Azizeh *et al.* 2000).

Después, se realizó la evaluación de los niveles de replicación viral mediante qPCR para detectar una región de 143pb del gen UL5 de VHS-1, gen indispensable para la replicación viral (Lehman and Boehmer 1999). Se realizó la extracción de ARN total de las células infectadas con y sin las isoformas del péptido A β . Después, se llevó a cabo una RT-PCR para obtener el DNAc y a partir de éste realizar los ensayos de qPCR para el gen UL5. Los resultados de qPCR obtenidos se calcularon utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cuantificación relativa). Estos demuestran que la presencia de las tres isoformas del péptido ocasionan una disminución en los niveles de expresión del gen UL5. En los fragmentos A β_{25-35} y A β_{35-25} , no se observó diferencia en la disminución con respecto al estado de oligomerización de los mismos. Por otra parte, en el caso del A β_{1-40} el péptido oligomerizado ocasionó una mayor reducción en la expresión del gen (diferencia aproximada de 10%, comparado con el péptido sin oligomerizar), resultado que coincide con lo obtenido en el ensayo de PFU, en donde el péptido oligomerizado ocasionó una disminución mayor en el número de PFUs comparado con los respectivos controles.

Lukiw *et al.*, también evaluaron el efecto del péptido mediante ensayos de qPCR de lisados de células HNG, pero a diferencia de nuestro trabajo, ellos utilizaron el gen de la ADN polimerasa viral, para corroborar la infección, además de medir carga viral mediante un método de cuantificación absoluta y así demostrar que el péptido afectaba directamente a la replicación viral. Observaron que la presencia del péptido no permitió la detección de ninguna copia del gen, resultado observado también con el tratamiento con Aciclovir. Ellos utilizaron Aciclovir debido al mecanismo de acción del mismo, ya que éste antiviral actúa directamente sobre la replicación del ADN viral, por lo tanto, deseaban comparar si el efecto ocasionado por el péptido A β_{1-40} era igual que el observado con Aciclovir, el cual sirvió como control positivo de inhibición de la replicación viral (Lukiw, Cui *et al.* 2010).



La relación del VHS-1 y la enfermedad de Alzheimer ha permitido considerar como una alternativa de tratamiento a los antivirales, debido a los estudios que demuestran que el virus pudiera tener un papel importante en la aparición de la enfermedad. Wozniak *et al.*, en el 2011, publica que el uso de antivirales ocasiona la reducción de las moléculas clave de la EA, Tau fosforilada y péptido A β . Demuestran que solo la fosforilación de Tau es dependiente de la replicación viral, utiliza 3 antivirales (Aciclovir, Penciclovir y Foscarnet) de los cuales los que mostraron un mejor efecto antiviral fueron Aciclovir y Penciclovir. Ellos utilizaron virus recombinantes que permitían evaluar la etapa del ciclo viral en dónde se veía el mayor efecto y demostraron que los genes inmediatos tempranos del virus no están involucrados en la generación de dichas moléculas. Proponen el uso de antivirales como un tratamiento para prevenir la reactivación del virus en múltiples ocasiones a lo largo de la vida y como consecuencia, evitar la aparición de la EA. Estableciendo que el blanco de las terapias debe ser el VHS-1 y no del péptido A β o la generación de dicho péptido, además de que los antivirales muestran como principal mecanismo de acción inhibir la transcripción de genes virales tempranos y tardíos (Wozniak, Frost *et al.* 2011).



CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

- La presencia de las isoformas $A\beta_{35-25}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$ oligomerizados a 48 horas y sin oligomerizar disminuyen la infección del VHS-1 en células Vero.
- Existe diferencia en el efecto de las isoformas del péptido $A\beta$ ($A\beta_{35-25}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$) sobre la infección ocasionada por VHS-1 en células Vero, en su estado sin oligomerizar y oligomerizado (48 horas) a una concentración de $5\mu\text{M}$
- Las tres isoformas del péptido $A\beta$ ($A\beta_{35-25}$, $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-40}$) en su estado oligomerizado y sin oligomerizar fueron internalizados por las células Vero, en presencia o ausencia de VHS-1, durante las seis horas de incubación.
- Los péptidos $A\beta_{1-40}$ (oligomerizado) y el péptido $A\beta_{35-25}$ (sin oligomerizar) a una concentración de $5\mu\text{M}$, ocasionaron una mayor disminución en la replicación viral del VHS-1 en células Vero.
- Los datos obtenidos al finalizar el presente proyecto, nos sugieren que el grado de interferencia en la infección de VHS-1 en células Vero, por parte del péptido $A\beta$ depende de la longitud, secuencia y orden de los aminoácidos así como de su plegamiento en el espacio con respecto al tiempo.



CAPÍTULO IX
PERSPECTIVAS

1. Permitir la interacción del VHS-1 con los péptidos A β en diferentes etapas del ciclo de replicación viral, en la infección de células Vero.
2. Utilizar como control un péptido similar a los estudiados y que no tenga ninguna relación con EA o A β .
3. Utilizar otros genes para evaluar el efecto del péptido sobre la infección, genes de cada uno de los 3 grupos que se expresan durante el ciclo viral: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos.
4. Determinar la localización del péptido A β en células infectadas por VHS-1 a diferentes tiempos de exposición para establecer el tiempo exacto en el que es internalizado.
5. Ampliar los tiempos de oligomerización y de post infección, para establecer cinéticas de interacción entre cada una de las isoformas del péptido A β y el ciclo de replicación del VHS-1 en células Vero.
6. Utilizar una línea de células neuronales para analizar si el efecto de atenuación viral también se presenta en éste tipo de células.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, A. C., B. Li, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2008). "Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies." Curr Alzheimer Res **5**(4): 375-384.
2. Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, T. M. Cairns, B. Reilly, G. H. Cohen and R. J. Eisenberg (2007). "Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18718-18723.
3. Avila, J. (2008). "Tau kinases and phosphatases." J Cell Mol Med **12**(1): 258-259.
4. Baglioni, S., F. Casamenti, M. Bucciantini, L. M. Luheshi, N. Taddei, F. Chiti, C. M. Dobson and M. Stefani (2006). "Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms." J Neurosci **26**(31): 8160-8167.
5. Ban, T., D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki and Y. Goto (2003). "Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence." J Biol Chem **278**(19): 16462-16465.
6. Baringer, J. R. (1975). "Herpes simplex virus infection of nervous tissue in animals and man." Prog Med Virol **20**: 1-26.
7. Baringer, J. R. (1976). "The biology of herpes simplex virus infection in humans." Surv Ophthalmol **21**(2): 171-174.
8. Bateman, D. A. and A. Chakrabarty (2011). "Cell surface binding and internalization of A β modulated by degree of aggregation." Int J Alzheimers Dis **2011**: 962352.
9. Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird and D. W. Tsuang (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.
10. Bentahir, M., O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horr , J. Wiltfang, H. Esselmann and B. De Strooper (2006). "Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms." J Neurochem **96**(3): 732-742.
11. Bertram, L. and R. E. Tanzi (2004). "Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?" Hum Mol Genet **13 Spec No 1**: R135-141.



12. Bieschke, J., S. J. Siegel, Y. Fu and J. W. Kelly (2008). "Alzheimer's A β peptides containing an isostructural backbone mutation afford distinct aggregate morphologies but analogous cytotoxicity. Evidence for a common low-abundance toxic structure(s)?" *Biochemistry* **47**(1): 50-59.
13. Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McLaugh and F. M. LaFerla (2005). "Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." *Neuron* **45**(5): 675-688.
14. Blondeau, J. M., F. Y. Aoki and G. B. Glavin (1993). "Stress-induced reactivation of latent herpes simplex virus infection in rat lumbar dorsal root ganglia." *J Psychosom Res* **37**(8): 843-849.
15. Bohrmann, B., L. Tjernberg, P. Kuner, S. Poli, B. Levet-Trafit, J. Näslund, G. Richards, W. Huber, H. Döbeli and C. Nordstedt (1999). "Endogenous proteins controlling amyloid beta-peptide polymerization. Possible implications for beta-amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues." *J Biol Chem* **274**(23): 15990-15995.
16. Brunden, K. R., J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2009). "Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies." *Nat Rev Drug Discov* **8**(10): 783-793.
17. Bush, A. I., W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters and R. E. Tanzi (1994). "Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc." *Science* **265**(5177): 1464-1467.
18. Bustos, D. E. and S. S. Atherton (2002). "Detection of herpes simplex virus type 1 in human ciliary ganglia." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(7): 2244-2249.
19. Cabrera, C. V., C. Wohlenberg, H. Openshaw, M. Rey-Mendez, A. Puga and A. L. Notkins (1980). "Herpes simplex virus DNA sequences in the CNS of latently infected mice." *Nature* **288**(5788): 288-290.
20. Campadelli-Fiume, G., F. Cocchi, L. Menotti and M. Lopez (2000). "The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells." *Rev Med Virol* **10**(5): 305-319.
21. Cardone, G., D. C. Winkler, B. L. Trus, N. Cheng, J. E. Heuser, W. W. Newcomb, J. C. Brown and A. C. Steven (2007). "Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography." *Virology* **361**(2): 426-434.



22. Carter, C. J. (2011). "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* **58**(3): 301-320.
23. Cheng, S. B., P. Ferland, P. Webster and E. L. Bearer (2011). "Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell." *PLoS One* **6**(3): e17966.
24. Clementi, M. E., S. Marini, M. Coletta, F. Orsini, B. Giardina and F. Misiti (2005). "A β (31-35) and A β (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35." *FEBS Lett* **579**(13): 2913-2918.
25. Cliffe, A. R., D. A. Garber and D. M. Knipe (2009). "Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters." *J Virol* **83**(16): 8182-8190.
26. Connolly, S. A., J. O. Jackson, T. S. Jardetzky and R. Longnecker (2011). "Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery." *Nat Rev Microbiol* **9**(5): 369-381.
27. Coon, K. D., A. J. Myers, D. W. Craig, J. A. Webster, J. V. Pearson, D. H. Lince, V. L. Zismann, T. G. Beach, D. Leung, L. Bryden, R. F. Halperin, L. Marlowe, M. Kaleem, D. G. Walker, R. Ravid, C. B. Heward, J. Rogers, A. Papassotiropoulos, E. M. Reiman, J. Hardy and D. A. Stephan (2007). "A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease." *J Clin Psychiatry* **68**(4): 613-618.
28. Cribbs, D. H., B. Y. Azizeh, C. W. Cotman and F. M. LaFerla (2000). "Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide." *Biochemistry* **39**(20): 5988-5994.
29. Cuervo, A. M., E. Bergamini, U. T. Brunk, W. Dörge, M. Ffrench and A. Terman (2005). "Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells." *Autophagy* **1**(3): 131-140.
30. Davison, A. J. (2010). "Herpesvirus systematics." *Vet Microbiol* **143**(1): 52-69.
31. Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert and E. Thiry (2009). "The order Herpesvirales." *Arch Virol* **154**(1): 171-177.

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



32. de Silva, S. and W. J. Bowers (2009). "Herpes Virus Amplicon Vectors." *Viruses* **1**(3): 594-629.
33. Deiss, L. P., J. Chou and N. Frenkel (1986). "Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA." *J Virol* **59**(3): 605-618.
34. Di Paola, M., E. Macaluso, G. A. Carlesimo, F. Tomaiuolo, K. J. Worsley, L. Fadda and C. Caltagirone (2007). "Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study." *J Neurol* **254**(6): 774-781.
35. Dobson, C. M. (2006). "Protein aggregation and its consequences for human disease." *Protein Pept Lett* **13**(3): 219-227.
36. Dodson, M. S. and I. R. Lehman (1991). "Association of DNA helicase and primase activities with a subassembly of the herpes simplex virus 1 helicase-primase composed of the UL5 and UL52 gene products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4): 1105-1109.
37. Duffy, C., E. F. Mbong and J. D. Baines (2009). "VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection." *J Virol* **83**(2): 1009-1017.
38. Fleminger, S., D. L. Oliver, S. Lovestone, S. Rabe-Hesketh and A. Giora (2003). "Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**(7): 857-862.
39. Fraser, N. W., W. C. Lawrence, Z. Wroblewska, D. H. Gilden and H. Koprowski (1981). "Herpes simplex type 1 DNA in human brain tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10): 6461-6465.
40. Gibson, W. (1996). "Structure and assembly of the virion." *Intervirology* **39**(5-6): 389-400.
41. Goedert, M. and M. G. Spillantini (2006). "A century of Alzheimer's disease." *Science* **314**(5800): 777-781.
42. Grünewald, K., P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister and A. C. Steven (2003). "Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography." *Science* **302**(5649): 1396-1398.
43. Haase, A. T., E. Lewis, S. Wietgreffe, M. Zupancic, J. Diedrich, H. Minnigan and M. J. Ball (1986). "Speculations on the role of transmissible agents in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Can J Neurol Sci* **13**(4 Suppl): 449-451.

44. Haass, C., A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, T. Oltersdorf, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1993). "Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules." Ann N Y Acad Sci **695**: 109-116.
45. Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran and S. Sisodia (2012). "Trafficking and Proteolytic Processing of APP." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a006270.
46. Hafezi, W., E. U. Lorentzen, B. R. Eing, M. Müller, N. J. King, B. Klupp, T. C. Mettenleiter and J. E. Kühn (2012). "Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection." PLoS Pathog **8**(5): e1002679.
47. Hirai, H., T. Tani and N. Kikyo (2010). "Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA." Int J Dev Biol **54**(11-12): 1589-1596.
48. Holscher, C., S. Gengler, V. A. Gault, P. Harriott and H. A. Mallot (2007). "Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning." Eur J Pharmacol **561**(1-3): 85-90.
49. Hölscher, C. (2005). "Development of beta-amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies." Rev Neurosci **16**(3): 181-212.
50. Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal (2008). "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention." J Cell Mol Med **12**(1): 38-55.
51. Irvine, G. B., O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar and D. M. Walsh (2008). "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases." Mol Med **14**(7-8): 451-464.
52. Ishino, H. and S. Otsuki (1975). "Distribution of Alzheimer's neurofibrillary tangles in the basal ganglia and brain stem of progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease." Folia Psychiatr Neurol Jpn **29**(2): 179-187.
53. Itoyama, Y., T. Sekizawa, H. Openshaw, K. Kogure and I. Goto (1991). "Early loss of astrocytes in herpes simplex virus-induced central nervous system demyelination." Ann Neurol **29**(3): 285-292.
54. Itzhaki, R. (2004). "Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease." Herpes **11 Suppl 2**: 77A-82A.

55. Itzhaki, R. F., S. L. Cosby and M. A. Wozniak (2008). "Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: the autophagy connection." *J Neurovirol* **14**(1): 1-4.
56. Itzhaki, R. F. and M. A. Wozniak (2008). "Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within." *J Alzheimers Dis* **13**(4): 393-405.
57. Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. J. Lee and T. C. Saido (2001). "Metabolic regulation of brain A β by neprilysin." *Science* **292**(5521): 1550-1552.
58. Jakob-Roetne, R. and H. Jacobsen (2009). "Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches." *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(17): 3030-3059.
59. Jamieson, G. A., N. J. Maitland, G. K. Wilcock, J. Craske and R. F. Itzhaki (1991). "Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains." *J Med Virol* **33**(4): 224-227.
60. Jamieson, G. A., N. J. Maitland, G. K. Wilcock, C. M. Yates and R. F. Itzhaki (1992). "Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type." *J Pathol* **167**(4): 365-368.
61. Jobst, K. A., A. D. Smith, M. Szatmari, M. M. Esiri, A. Jaskowski, N. Hindley, B. McDonald and A. J. Molyneux (1994). "Rapidly progressing atrophy of medial temporal lobe in Alzheimer's disease." *The Lancet* **343**(8901): 2.
62. Kamal, A., G. B. Stokin, Z. Yang, C. H. Xia and L. S. Goldstein (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." *Neuron* **28**(2): 449-459.
63. Karasneh, G. A. and D. Shukla (2011). "Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success." *Virology* **8**: 481.
64. Kastrukoff, L. F., A. S. Lau and E. E. Thomas (2012). "The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS)." *Herpesviridae* **3**: 4.
65. Kennedy, P. G. (2005). "Viral encephalitis." *J Neurol* **252**(3): 268-272.
66. Knipe, D. M. and A. Cliffe (2008). "Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection." *Nat Rev Microbiol* **6**(3): 211-221.
67. Kolarova, M., F. García-Sierra, A. Bartos, J. Ricny and D. Ripova (2012). "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease." *Int J Alzheimers Dis* **2012**: 731526.



68. Koo, E. H., S. S. Sisodia, D. R. Archer, L. J. Martin, A. Weidemann, K. Beyreuther, P. Fischer, C. L. Masters and D. L. Price (1990). "Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1561-1565.
69. Koo, E. H., S. L. Squazzo, D. J. Selkoe and C. H. Koo (1996). "Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody." J Cell Sci **109 (Pt 5)**: 991-998.
70. Krisky, D. M., D. Wolfe, W. F. Goins, P. C. Marconi, R. Ramakrishnan, M. Mata, R. J. Rouse, D. J. Fink and J. C. Glorioso (1998). "Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons." Gene Ther **5**(12): 1593-1603.
71. Kubo, T., S. Nishimura, Y. Kumagai and I. Kaneko (2002). "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 **70**(3): 474-483.
72. Kumar, S. and J. Walter (2011). "Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease." Aging (Albany NY) **3**(8): 803-812.
73. Kutluay, S. B. and S. J. Triezenberg (2009). "Regulation of histone deposition on the herpes simplex virus type 1 genome during lytic infection." J Virol **83**(11): 5835-5845.
74. Kwong, A. D. and N. Frenkel (1987). "Herpes simplex virus-infected cells contain a function(s) that destabilizes both host and viral mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(7): 1926-1930.
75. Larson, M. E. and S. E. Lesné (2012). "Soluble A β oligomer production and toxicity." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.
76. Lehman, I. R. and P. E. Boehmer (1999). "Replication of herpes simplex virus DNA." J Biol Chem **274**(40): 28059-28062.
77. LeVine, H. (1993). "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution." Protein Sci **2**(3): 404-410.
78. Liesegang, T. J. (2001). "Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance." Cornea **20**(1): 1-13.
79. Lin, W. R., D. Shang, G. K. Wilcock and R. F. Itzhaki (1995). "Alzheimer's disease, herpes simplex virus type 1, cold sores and apolipoprotein E4." Biochem Soc Trans **23**(4): 594S.



80. Liu, F., K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, S. Rossie and C. X. Gong (2005). "Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease." J Biol Chem **280**(3): 1790-1796.
81. Lukiw, W. J., J. G. Cui, L. Y. Yuan, P. S. Bhattacharjee, M. Corkern, C. Clement, E. M. Kammerman, M. J. Ball, Y. Zhao, P. M. Sullivan and J. M. Hill (2010). "Acyclovir or Abeta42 peptides attenuate HSV-1-induced miRNA-146a levels in human primary brain cells." Neuroreport **21**(14): 922-927.
82. Martinez-Vicente, M., G. Sovak and A. M. Cuervo (2005). "Protein degradation and aging." Exp Gerontol **40**(8-9): 622-633.
83. Marx, A., A. Hoenger and E. Mandelkow (2009). "Structures of kinesin motor proteins." Cell Motil Cytoskeleton **66**(11): 958-966.
84. Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.
85. Mayeux, R., R. Ottman, M. X. Tang, L. Noboa-Bauza, K. Marder, B. Gurland and Y. Stern (1993). "Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives." Ann Neurol **33**(5): 494-501.
86. McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. Dolan, D. McNab, L. J. Perry, P. Taylor and M. D. Challberg (1988). "Structures of herpes simplex virus type 1 genes required for replication of virus DNA." J Virol **62**(2): 444-453.
87. Meinke, J. H. and U. H. Hansmann (2007). "Aggregation of beta-amyloid fragments." J Chem Phys **126**(1): 014706.
88. Mettenleiter, T. C. (2004). "Budding events in herpesvirus morphogenesis." Virus Res **106**(2): 167-180.
89. Millucci, L., R. Raggiaschi, D. Franceschini, G. Terstappen and A. Santucci (2009). "Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A beta (25-35) peptide." J Biosci **34**(2): 293-303.
90. Misiti, F., B. Sampaiolese, M. Pezzotti, S. Marini, M. Coletta, L. Ceccarelli, B. Giardina and M. E. Clementi (2005). "Abeta(31-35) peptide induce apoptosis in PC 12 cells: contrast with Abeta(25-35) peptide and examination of underlying mechanisms." Neurochem Int **46**(7): 575-583.

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



91. Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller and J. C. Brown (2001). "The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid." *J Virol* **75**(22): 10923-10932.
92. Ni, C. L., H. P. Shi, H. M. Yu, Y. C. Chang and Y. R. Chen (2011). "Folding stability of amyloid-beta 40 monomer is an important determinant of the nucleation kinetics in fibrillization." *FASEB J* **25**(4): 1390-1401.
93. Nicola, A. V., A. M. McEvoy and S. E. Straus (2003). "Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells." *J Virol* **77**(9): 5324-5332.
94. Nikaido, T., J. Austin, L. Trueb, J. Hutchison, R. Rinehart, H. Stuckenbrok and B. Miles (1970). "Isolation and preliminary characterization of Alzheimer plaques from presenile and senile dementia." *Trans Am Neurol Assoc* **95**: 47-50.
95. Nixon, R. A., J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(2): 113-122.
96. Nsiah, Y. A. and F. Rapp (1991). "Role of latency-associated transcript in herpes simplex virus infection." *Intervirology* **32**(2): 101-115.
97. Patrick R. Murray, P., Ken S. Rosenthal, PhD and Michael A. Pfaller, MD (2009). *Medical Microbiology*, Mosby.
98. Penkert, R. R. and R. F. Kalejta (2011). "Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation." *Herpesviridae* **2**(1): 3.
99. Perl, D. P. (2010). "Neuropathology of Alzheimer's disease." *Mt Sinai J Med* **77**(1): 32-42.
100. Perng, G. C. and C. Jones (2010). "Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle." *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2010**: 262415.
101. Perry, L. J. and D. J. McGeoch (1988). "The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1." *J Gen Virol* **69 (Pt 11)**: 2831-2846.
102. Pike, C. J., D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe and C. W. Cotman (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." *J Neurosci* **13**(4): 1676-1687.

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



103. Pike, C. J., A. J. Walencewicz-Wasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe and C. W. Cotman (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." J Neurochem **64**(1): 253-265.
104. Pike, K. E., G. Savage, V. L. Villemagne, S. Ng, S. A. Moss, P. Maruff, C. A. Mathis, W. E. Klunk, C. L. Masters and C. C. Rowe (2007). "Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease." Brain **130**(Pt 11): 2837-2844.
105. Posavad, C. M., D. M. Koelle and L. Corey (1998). "Tipping the scales of herpes simplex virus reactivation: the important responses are local." Nat Med **4**(4): 381-382.
106. Ridha, B. H., J. Barnes, L. A. van de Pol, J. M. Schott, R. G. Boyes, M. M. Siddique, M. N. Rossor, P. Scheltens and N. C. Fox (2007). "Application of automated medial temporal lobe atrophy scale to Alzheimer disease." Arch Neurol **64**(6): 849-854.
107. Rock, D. L. and N. W. Fraser (1983). "Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice." Nature **302**(5908): 523-525.
108. Roizman, B. (1979). "The organization of the herpes simplex virus genomes." Annu Rev Genet **13**: 25-57.
109. Roizman, B. and J. Baines (1991). "The diversity and unity of Herpesviridae." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **14**(2): 63-79.
110. Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi and K. Wolf (1981). "Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses." Intervirology **16**(4): 201-217.
111. Roizman, B. and R. J. Whitley (2001). "The nine ages of herpes simplex virus." Herpes **8**(1): 23-27.
112. S, S. S. and T. R. E. (2007). Alzheimer's Disease Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology. New York, Springer.
113. Saksena, M. M., H. Wakisaka, B. Tijono, R. A. Boadle, F. Rixon, H. Takahashi and A. L. Cunningham (2006). "Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons." J Virol **80**(7): 3592-3606.
114. Sanjuan, N. A. and E. F. Lascano (1986). "Autonomic nervous system involvement in experimental genital infection by herpes simplex virus type 2." Arch Virol **91**(3-4): 329-339.



115. Satpute-Krishnan, P., J. A. DeGiorgis and E. L. Bearer (2003). "Fast anterograde transport of herpes simplex virus: role for the amyloid precursor protein of alzheimer's disease." *Aging Cell* **2**(6): 305-318.
116. Sauvage, C., J. F. Pépin, S. Lapègue, P. Boudry and T. Renault (2009). "Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR." *Virus Res* **142**(1-2): 181-187.
117. Selkoe, D. J. (1998). "The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease." *Trends Cell Biol* **8**(11): 447-453.
118. Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**(2): 741-766.
119. Sequiera, L. W., L. C. Jennings, L. H. Carrasco, M. A. Lord, A. Curry and R. N. Sutton (1979). "Detection of herpes-simplex viral genome in brain tissue." *Lancet* **2**(8143): 609-612.
120. Sherman, G., J. Gottlieb and M. D. Challberg (1992). "The UL8 subunit of the herpes simplex virus helicase-primase complex is required for efficient primer utilization." *J Virol* **66**(8): 4884-4892.
121. Shevtzova, E. F., E. G. Kireeva and S. O. Bachurin (2001). "Effect of beta-Amyloid Peptide Fragment 25-35 on Nonselective Permeability of Mitochondria." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **132**(6): 1173-1176.
122. Shipley, S. J., E. T. Parkin, R. F. Itzhaki and C. B. Dobson (2005). "Herpes simplex virus interferes with amyloid precursor protein processing." *BMC Microbiol* **5**: 48.
123. Shirotani, K., S. Tsubuki, N. Iwata, Y. Takaki, W. Harigaya, K. Maruyama, S. Kiryu-Seo, H. Kiyama, H. Iwata, T. Tomita, T. Iwatsubo and T. C. Saido (2001). "Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases." *J Biol Chem* **276**(24): 21895-21901.
124. Shukla, D. and P. G. Spear (2001). "Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry." *J Clin Invest* **108**(4): 503-510.
125. Sims, N. R., D. M. Bowen, C. C. Smith, R. H. Flack, A. N. Davison, J. S. Snowden and D. Neary (1980). "Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer's disease." *Lancet* **1**(8164): 333-336.



126. Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6075-6079.
127. Sjöbeck, M., M. Haglund and E. Englund (2005). "Decreasing myelin density reflected increasing white matter pathology in Alzheimer's disease--a neuropathological study." Int J Geriatr Psychiatry **20**(10): 919-926.
128. Small, G. W., S. Y. Bookheimer, P. M. Thompson, G. M. Cole, S. C. Huang, V. Kepe and J. R. Barrio (2008). "Current and future uses of neuroimaging for cognitively impaired patients." Lancet Neurol **7**(2): 161-172.
129. Smith, A. D. and K. A. Jobst (1996). "Use of structural imaging to study the progression of Alzheimer's disease." Br Med Bull **52**(3): 575-586.
130. Spear, P. G. (2004). "Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry." Cell Microbiol **6**(5): 401-410.
131. Stefani, M. (2007). "Generic cell dysfunction in neurodegenerative disorders: role of surfaces in early protein misfolding, aggregation, and aggregate cytotoxicity." Neuroscientist **13**(5): 519-531.
132. Subramanian, R. P. and R. J. Geraghty (2007). "Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2903-2908.
133. Takadera, T., N. Sakura, T. Mohri and T. Hashimoto (1993). "Toxic effect of a beta-amyloid peptide (beta 22-35) on the hippocampal neuron and its prevention." Neurosci Lett **161**(1): 41-44.
134. Tallóczy, Z., W. Jiang, H. W. Virgin, D. A. Leib, D. Scheuner, R. J. Kaufman, E. L. Eskelinen and B. Levine (2002). "Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 190-195.
135. Tallóczy, Z., H. W. Virgin and B. Levine (2006). "PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1." Autophagy **2**(1): 24-29.
136. Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.
137. Tanzi, R. E., R. D. Moir and S. L. Wagner (2004). "Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition." Neuron **43**(5): 605-608.



138. Thies, W., L. Bleiler and A. s. Association (2011). "2011 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **7**(2): 208-244.
139. Townsend, J. J. (1981). "The demyelinating effect of corneal HSV infections in normal and nude (athymic) mice." J Neurol Sci **50**(3): 435-441.
140. Townsend, J. J. (1981). "The relationship of astrocytes and macrophages to CNS demyelination after experimental herpes simplex virus infection." J Neuropathol Exp Neurol **40**(4): 369-379.
141. Uotani, C., K. Sugimori and K. Kobayashi (2006). "Association of minimal thickness of the medial temporal lobe with hippocampal volume, maximal and minimal hippocampal length: volumetric approach with horizontal magnetic resonance imaging scans for evaluation of a diagnostic marker for neuroimaging of Alzheimer's disease." Psychiatry Clin Neurosci **60**(3): 319-326.
142. Vega Thurber, R. L., K. L. Barott, D. Hall, H. Liu, B. Rodriguez-Mueller, C. Desnues, R. A. Edwards, M. Haynes, F. E. Angly, L. Wegley and F. L. Rohwer (2008). "Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(47): 18413-18418.
143. Vlazny, D. A. and N. Frenkel (1981). "Replication of herpes simplex virus DNA: localization of replication recognition signals within defective virus genomes." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 742-746.
144. Walsh, D. M., I. Klyubin, G. M. Shankar, M. Townsend, J. V. Fadeeva, V. Betts, M. B. Podlisny, J. P. Cleary, K. H. Ashe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2005). "The role of cell-derived oligomers of A β in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1087-1090.
145. Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration." Protein Pept Lett **11**(3): 213-228.
146. Ward, W. F. (2002). "Protein degradation in the aging organism." Prog Mol Subcell Biol **29**: 35-42.
147. Wei, G. and J. E. Shea (2006). "Effects of solvent on the structure of the Alzheimer amyloid-beta(25-35) peptide." Biophys J **91**(5): 1638-1647.
148. Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther and G. Evin (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain



- of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." Biochemistry **41**(8): 2825-2835.
149. Whitley, R. J., D. W. Kimberlin and B. Roizman (1998). "Herpes simplex viruses." Clin Infect Dis **26**(3): 541-553; quiz 554-545.
150. Whitley, R. J. and B. Roizman (2001). "Herpes simplex virus infections." Lancet **357**(9267): 1513-1518.
151. Wozniak, M. A., A. L. Frost, C. M. Preston and R. F. Itzhaki (2011). "Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1." PLoS One **6**(10): e25152.
152. Wozniak, M. A., R. F. Itzhaki, S. J. Shipley and C. B. Dobson (2007). "Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation." Neurosci Lett **429**(2-3): 95-100.
153. Wozniak, M. A., A. P. Mee and R. F. Itzhaki (2009). "Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques." J Pathol **217**(1): 131-138.
154. Xu, H., D. Sweeney, R. Wang, G. Thinakaran, A. C. Lo, S. S. Sisodia, P. Greengard and S. Gandy (1997). "Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3748-3752.
155. Yankner, B. A. (1996). "Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease." Neuron **16**(5): 921-932.
156. Yoshiike, Y., R. Minai, Y. Matsuo, Y. R. Chen, T. Kimura and A. Takashima (2008). "Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins." PLoS One **3**(9): e3235.
157. Yu, W. H., A. Kumar, C. Peterhoff, L. Shapiro Kulnane, Y. Uchiyama, B. T. Lamb, A. M. Cuervo and R. A. Nixon (2004). "Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2531-2540.
158. Zaichick, S. V., K. P. Bohannon and G. A. Smith (2011). "Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections." Viruses **3**(7): 941-981.
159. Zhang, H., Q. Ma, Y. W. Zhang and H. Xu (2012). "Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein." J Neurochem **120** Suppl 1: 9-21.
160. Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Mol Neurodegener **1**: 5.

CAPÍTULO XI

ANEXOS

11.1 GENERALIDADES DE CULTIVO CELULAR

Componentes para suplementar Medio DMEM Advanced al 2% SBF:

Componentes	Volumen
Medio aDMEM	500 ml
Suero bovino fetal (SBF o FBS)	10 ml
Aminoácidos No esenciales	5 ml
Antibiótico (Penicilina/estreptomina)	5 ml
L-Glutamina	5 ml

Volúmenes a manejar en Cultivo celular:

Tamaño de botella	PBS (lavados) ml	Tripsina 1x, ml	Medio (aDMEM) ml
25 cm ²	3	1	3
75 cm ²	4	2	10
150 cm ²	5-7	2.5	21

Etiquetar las botellas y placas de cultivo con los siguientes datos:

Línea Celular	Vero
# de pasaje*	p33 (pasaje #)
Fecha	170912 (día-mes-año)

*máx. 55 pasajes después de descongelar un vial con células.

Cepa Viral	VHS-1 (KOS)
------------	-------------

11.2 CÁLCULOS PARA MOI A PARTIR DE PFU:

Para calcular la MOI se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{(\text{PFU})(\text{Volumen de Infección})}{\# \text{ de células a infectar}}$$

Ejemplo de cálculos:

- MOI: 0.01
- Partiendo de un concentrado viral con un título de 7×10^8 PFU/ml
- Células a infectar: 2.5×10^5 células Vero.

Primero se debe calcular el número de PFU necesarios, despejando de la fórmula anterior:

$$\text{PFU} = \frac{(0.01)(2.5 \times 10^5 \text{ células})}{0.8 \text{ ml}}$$

$$\text{PFU} = 3,125 \text{ PFU}$$

Pero si se van a preparar 3 ml:

$$3,125 \text{ PFU} \times 3 \text{ ml} = 9,375 \text{ PFU para tener } 3,125 \text{ PFU/ml.}$$

Entonces, hacer diluciones seriadas del concentrado viral, el valor de dilución más cercano al número de PFU's necesarios es 7×10^4 (7,000 PFU/ml), es decir la dilución 10^{-4} (dilución #4); si se va a preparar 3ml de dilución con una MOI: 0.01, se usa la fórmula de:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(7 \times 10^4 \text{ PFU}) V_1 = (9,375 \text{ PFU})(3 \text{ ml})$$

$$V_1 = 0.4 \text{ ml de la dilución } 10^{-4} + 2.6 \text{ ml de medio aDMEM 2\% SBF} \rightarrow \text{dilución \#5}$$

Con ésta última dilución infectar 2.5×10^5 células Vero con 0.8ml a una MOI= 0.01

11.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Soluciones:

-De raspado:

Para 50 ml

Reactivo	Concentración	Medir
PBS 1x	1x	50 ml
EDTA pH=8	100 mM	100 μ l

-Buffer 5x

Reactivo	Concentración	Medir
Tritón x-100	50 mM	5 ml
Tris-HCl pH= 7.5	1 M	5 ml
MgCl ₂	1 M	1 ml
KCl	2 M	12.5 ml

Aforar a 100 ml con agua.

Almacenar a temperatura ambiente.

-Solución de lisis*:

Para 500 μ l

Reactivo	Medir
Buffer 5x	100 μ l
DTT*	1 μ l
PMSF**	1 μ l
Agua milliQ	378 μ l
"complete"* Inhibidor de proteasas	20 μ l

- *Almacenar a -20 °C y tiene caducidad de 15 días.

** Almacenar a 4 °C. Disuelto en DMSO

11.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODO DE BRADFORD

CURVA DE CALIBRACIÓN:

Hacer un stock de ASB (albúmina sérica bovina) de 0.1 g/ml (disolver 0.1 g en 1 ml de agua milliQ estéril), después tomar 10 μ l de la solución stock y adicionar 990 μ l de agua para tener una solución a 1000 μ g/ μ l, a partir de esta segunda solución hacer una última dilución, tomar 100 μ l y adicionarle 900 μ l de agua para tener una solución de 100 μ g/ml

Realizar diluciones para los estándares de BSA:

Blanco: 160 μ l de agua milliQ + 40 μ l de Bradford

Estándar (μ g/ml)	Volumen del stock de BSA (100 μ g/ml)	Agua (μ l)	Reactivo de Bradford (μ l)	Volumen final (μ l)
0	0	160	40	200
1	2	158	40	200
5	10	150	40	200
10	20	140	40	200
15	30	130	40	200
20	40	120	40	200
25	50	110	40	200
30	60	100	40	200
35	70	90	40	200
40	80	80	40	200

Los estándares se realizan por triplicado en placa de 96 pozos. Después de mezclar bien esperar 5 minutos y leer absorbancia a 600 nm en el lector de ELISA ELX800

Estudio del efecto del péptido beta amiloide (A β) sobre la infección causada por el virus del Herpes Simplex tipo 1



Los datos fueron graficados en Excel, donde el eje de las abscisas (eje x) corresponde a la concentración y el de las ordenadas (eje y) a la absorbancia. Para cuantificar muestras se recomiendan diluciones de 1:3 hasta 1:5 y adicionar al pozo:

- 159 μ l de Agua
- 1 μ l de la muestra
- 40 μ l de Bradford.

Calcular la concentración final de las muestras a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración y después utilizar la siguiente fórmula:

$$(\text{Concentración de la muestra}) \times (\text{factor de dilución:200}) / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

11.5 PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SDS-PAGE

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

Gel Separador (12%)

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	4.02 ml
Buffer de fosfatos pH= 8.8	2.5 ml
Poliacrilamida	3.33 ml
SDS 10%	0.1 ml
TEMED	10 μ l
PSA	50 μ l
Vol. Final	10.010 ml

Gel concentrador (5%)

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	3.05 ml
Buffer de fosfatos pH= 6.8	1.25 ml
Poliacrilamida	0.65 ml
SDS 10%	0.1 ml
TEMED	10 μ l
PSA	50 μ l
Vol. Final	5.11 ml

Buffer de lisis y/o muestra 3x:

REACTIVO	VOLUMEN
Mercaptoetanol 6%	0.6 ml
SDS 12%	1.2 g
Tris-HCl 150 mM	3 ml de Tris-HCl 0.5M
Agua milliQ	10 ml
Azul de Coomassie R	5 mg

11.6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

Soluciones:

Buffer de Transferencia 5x:

Reactivo	Concentración	Pesar
Glicina	0.29 %	14.5 g
Tris Base	0.58 %	29 g
Metanol	20 %	200 ml

Para preparar 1 l de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 1 l con agua y almacenar a 4°C

PBS 10x:

Reactivo	Concentración	Pesar
NaCl	8 %	80 g
KCl	0.2 %	2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 %	14.4 g
KH ₂ PO ₄	0.24 %	2.4 g

Ajustar pH= 7.4 con HCl y aforar a 1 l con agua.

Buffer de Bloqueo:

Reactivo	Concentración	Pesar
Leche descremada en polvo	3 %	15 g
PBS 10x	1x	50 ml
Tritón x-100 (100%)	0.5 %	2.5 ml
Azida de Sodio	0.02 %	0.1 g

Para preparar 500 ml de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 500 ml con agua.

Buffer de dilución para el anticuerpo:

Reactivo	Concentración	Medir (500 mL Vf)	Medir (50 mL Vf)
Leche descremada en polvo	5 %	25 g	2.5g
PBS 10x	1x	50 ml	5 ml
Tritón x-100 (100 %)	0.5 %	2.5 ml	0.25 g

Para preparar 50 ml de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 50 ml con agua.

Para colocar el gel y la membrana antes de la electrotransferencia seguir el siguiente esquema:

