



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

Caracterización de moléculas moduladoras de la
agregación del péptido beta-amiloide.

TESIS QUE PRESENTA

M. en C. MARIPAZ MÁRQUEZ QUIROZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

DIRECTORES DE LA TESIS:

DRA. LILIANA QUINTANAR VERA.

DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ.

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2014.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a:

- Conacyt proyectos 128255 y 221234 y la beca otorgada a M.M.
- ICyTDF proyecto PIFUTP08-161.
- Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.
- Biol. Lourdes Rojas por su apoyo técnico para coleccionar las microscopías de TEM, Unidad de Microscopía, Cinvestav-Zacatenco.
- Dr. Luis Blancas por la síntesis y purificación del péptido β A1-40. Laboratorio 3, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- Q.F.B. Lidia Guadalupe Trujano por donar el complejo β A1-16-Cu(II). Laboratorio 3, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- I.Q.I Esaú E. Rodríguez por donar el péptido MDV y MDVFMK. Laboratorio 3, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- Dra. Lina Rivillas y Q.I. José Antonio Domínguez por coleccionar los espectros de CD y EPR del complejo β A1-16+TP. Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- I.B.Q. Selena Martínez por su apoyo técnico en las cinéticas de agregación monitoreadas por ThT. Laboratorio 3, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- Q. Magda Carolina Sánchez por coleccionar los EPR de las fibras amiloides+Cu(II). Laboratorio 3, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.
- Dr. Luis Rojas y M. en C. Adriana Campos por su apoyo técnico e intelectual en la técnica de dispersión dinámica de luz. Departamento de Física, Cinvestav-Zacatenco.
- M. en C. Carlos Z. Gómez, por colaborar con la portada Metallomics Diciembre 2014, Departamento de Química, Cinvestav-Zacatenco.

“No creas lo que tus ojos te dicen. Sólo muestran limitaciones. Mira con tu entendimiento, descubre lo que ya sabes, y hallarás la manera de volar.”

- Richard Bach

“Así que la nada se transformó en todo, necesitaba un pegamento que mantuviese las piezas unidas y que les recordase donde van colocadas. Ese pegamento se llama amor.”

- Deepak Chopra

A mi familia.

Gracias por enseñarme la ciencia de la alegría.

“Los grandes profesores son siempre maestros en su materia, y orientan, entrenan, guían y estimulan a jóvenes aprendices para que logren la excelencia propia.”

-Tim Morris

A la Dra. Liliana Quintanar, al Dr. Gilberto, al Dr. Carlos Cerda, al Dr. Carlos Hoyo, al Dr. Ranier Gutiérrez y al Dr. Édgar Vázquez.

Gracias por ser grandes profesores.

“La gratitud por la abundancia que has recibido es la mejor forma de asegurarte de que la abundancia continúe.”

- Mahoma

Gracias a todos los que formaron parte de esta alegría.

“La imaginación es el inicio de la creación. Imaginas lo que deseas, deseas con todas tus fuerzas lo que imaginas, y por último creas lo que tanto has deseado.”

- George Bernard Shaw

CON CARÍÑO
MARIPAZ

CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	15
1.1. La enfermedad de Alzheimer y su fundamento molecular.	15
1.2. El péptido beta-amiloide (β A).....	18
1.3. La enfermedad de Alzheimer y los iones metálicos.	28
1.4. Terapia actual para Alzheimer.	42
1.5. Estrategias terapéuticas para disminuir la agregación de β A.....	44
1.5.1. Inhibidores de la producción de β A.....	45
1.5.2. Estrategias para aumentar la remoción de β A.	45
1.5.3. Inhibidores de la agregación de β A.....	48

1.6.	Una nueva estrategia terapéutica para Alzheimer: moléculas bifuncionales.	
	58	
1.7.	Diseño de la molécula bifuncional TP.....	63
1.8.	Justificación.....	68
1.9.	Hipótesis.....	69
1.10.	Objetivo general.	69
1.11.	Objetivos particulares.....	69
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA PARA LA EXPERIMENTACIÓN.....		70
2.1.	Síntesis y purificación de los péptidos β A1-40, DP y TP.....	70
2.2.	Preparación de la muestra.....	70
2.3.	Ensayos de agregación de β A monitoreados con espectroscopía de fluorescencia de ThT.....	71
2.4.	Monitoreo del tamaño de partícula de la agregación de β A a tiempos tempranos con dispersión dinámica de luz (DLS).	71
2.5.	Observación de la morfología de fibras amiloides utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	71
2.6.	Titulación del complejo β A-Cu(II) con TP monitoreada por dicroísmo circular electrónico (CD).	72
2.7.	Caracterización de la coordinación del ion Cu(II) por TP, MDVFMK y fibras amiloides utilizando resonancia paramagnética electrónica (EPR).	72
2.8.	Análisis estadístico de datos.....	73
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....		73
3.1.	Síntesis y purificación de péptidos.....	73
3.2.	Evaluación de la capacidad del TP para quelar Cu(II).....	73
3.3.	Ensayos para la agregación de β A monitoreados con espectroscopía de fluorescencia de ThT.....	78
3.4.	Monitoreo del tamaño de partícula de la agregación de β A a tiempos tempranos utilizando dispersión dinámica de luz (DLS).....	80

3.5. Evaluación de la morfología de las fibras amiloides utilizando microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	81
3.6. Efecto del ión Cu(II) en la agregación de β A.....	83
3.7. Efecto del DP y el TP en la agregación de β A en presencia del ión Cu(II). 85	
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	89
CONCLUSIONES.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
ARTÍCULO.....	94
REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Cerebro que representa en su hemisferio izquierdo a un individuo sano y en el derecho a un paciente con Alzheimer. Se resalta la identificación de depósitos amiloides. Figura adaptada de la referencia [22].....	17
Figura 2. Representación de la familia de proteínas APP. Figura tomada de la referencia [37].	20
Figura 3. Representación de los sitios de corte de las secretasas en APP. Secuencia primaria de APP (numeración superior) y de β A (numeración inferior). Figura tomada de la referencia [34]. .	21
Figura 4. Diagrama de cintas de los residuos 9-40 de la β A1-40 que muestra la estructura de hoja- β cruzada. El eje largo de la fibrilla se extiende fuera de la página. Figura tomada de la referencia [50].....	23
Figura 5. Modelo de la fibra formada por β A1-40 obtenida por resonancia magnética nuclear. A) representación de la estructura de hoja beta por los residuos 12-24 (color anaranjado) y 30-40 (azul). B) β A1-40, los residuos hidrofóbicos en color verde, los polares en morado, positivos en azul y negativos en rojo. Figura tomada de la referencia [51].	24
Figura 6. Mecanismo propuesto del proceso de agregación de proteínas para la formación de las fibras. Figura modificada de la referencia [53].....	25
Figura 7. Modelos de la estructura tridimensional de β A. Figura adaptada de las referencias del <i>Protein Data Bank</i> (PDB): 2BEG [66], 1BA6 [67], 1AML [67], 2BA4 [67], 2LMN [68], 2LFM [61].....	28
Figura 8. Representación de la interacción de zinc y cobre con β A durante la sinapsis. Figura adaptada de la referencia [13].....	32

Figura 9. Esquema de los modos de coordinación propuestos para β A con A) Cu(II), B) Fe(II) y C) Zn(II). Figura tomada de la referencia [49].	35
Figura 10. Algunos compuestos β -breakers citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: ThT [144], carbazol-cianina [123], [Nle ³⁵ ,D-Pro ³⁷]A β ₄₂ [124], D-Trp-Aib [65], KLVFF [131], iAB5 [138].	52
Figura 11. Algunos compuestos quelantes citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: clioquinol [156], PBT2 [156], gtsm [166], VK28 [155], M-30 [155] y HLA-20 [155].	59
Figura 12. Esquema de una molécula bifuncional. Figura adaptada de la referencia [81].	59
Figura 13. Algunos compuestos base utilizados para crear moléculas bifuncionales. Figura adaptada de la referencia [171].	60
Figura 14. Algunos ejemplos de moléculas bifuncionales citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: L2-b [172], L2-NO [174], HBX [144], L1 ó L2 [175], XH1 [178], hidroxipiridinonas glicosiladas [180] y FC-1 [179].	62
Figura 15. Representación del complejo Cu(II)-MDVFMK. Figura tomada de la referencia [183].	67
Figura 16. Diseño original de la molécula bifuncional TP.	68
Figura 17. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de MDVFMK (línea negra) y TP (línea morada) en presencia de 1 equivalente de Cu(II). Los asteriscos representan las señales de Cu(II) en solución.	74
Figura 18. Representación del modo de coordinación del Cu(II) en complejo con TP. Figura adaptada de la referencia [183].	75
Figura 19. Titulación del complejo β A1-16 con cobre a concentraciones crecientes de TP monitoreada por dicroísmo circular electrónico (CD). β A1-16 con cobre (línea azul cielo), titulación cada 0.125 equivalentes de TP (líneas azul cielo punteadas) pasando por 1 equivalente (línea azul), 1.125 a 1.375 equivalentes (líneas azules punteadas) hasta 1.5 equivalentes (línea azul),	76
Figura 20. Espectros de EPR del Cu(II) unido a β A1-16 (línea azul cielo) (A) y en el punto final de la titulación con TP monitoreada por CD en la figura 19 (línea azul) (B) .	77
Figura 21. Cinética de agregación de β A monitoreada por ThT(línea negra), y de β A con Cu(II) en ausencia (línea gris) y presencia de 2 equivalentes de TP (línea verde) o MDV (línea azul).	77
Figura 22. Cinética representativa de la agregación del péptido β A. El tiempo de nucleación (t_{lag}) es el cruce entre el ajuste de la etapa de elongación (línea roja) y el de nucleación (línea azul).	79
Figura 23. A) Cinéticas representativas de la agregación del péptido β A en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP (línea verde), seguidas por el ensayo de ThT. B) Análisis estadístico ANOVA de una vía Post-hoc Tukey de t_{lag} . Los resultados obtenidos se muestran con el error estándar asociado a β A n=9, β A+DP n=8, β A+TP n=6. * p<0.05 comparado con β A.	80
Figura 24. A) Cinéticas del cambio en el tamaño de partícula del péptido β A medidas por dispersión dinámica de luz (DLS), en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP	

(línea verde). **B)** Análisis estadístico ANOVA de una vía Post-hoc Tukey del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos se muestran con el error estándar asociado a 4 experimentos para cada condición. ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0005$ en comparación con el AUC de βA81

Figura 25. Micrografías de la cinética de formación de las fibras amiloides en ausencia **(A)** y presencia de TP **(B)**, colectadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).82

Figura 26. Cinéticas del cambio en el tamaño de partícula de βA en ausencia (línea negra) y presencia de 0.4 equivalentes de cobre (línea azul), monitoreadas por dispersión dinámica de luz (DLS). Los asteriscos azules indican que el radio hidrodinámico de $\beta A + Cu$ es aproximado, ya que la función de correlación en estructuras mayores a 500 nm es > 183

Figura 27. Cinéticas de agregación de βA monitoreadas por espectroscopía de fluorescencia de ThT en ausencia y presencia de 0.2, 0.4, 0.6 y 1 equivalente de Cu(II).84

Figura 28. Micrografías de las fibras de βA obtenidas en el punto final de los ensayos de agregación de βA mostrados en la figura 27, a concentraciones crecientes de cobre, utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** 0.0 Equivalentes de cobre, **B)** 0.2 Equivalentes de cobre, **C)** 0.4 Equivalentes de cobre y **D)** 0.6 Equivalentes de cobre.84

Figura 29. Espectros de EPR del Cu(II) con βA_{1-16} soluble (línea azul cielo) **(A)** y en fibras de βA_{1-40} colectadas en el punto final de los ensayos de agregación de βA monitoreados por espectroscopía de fluorescencia de ThT (línea negra) **(B)**.85

Figura 30. Cinéticas de agregación de βA con 0.4 equivalente de cobre monitoreadas por espectroscopía de fluorescencia de ThT, en ausencia (línea negra) y en presencia de DP (línea roja) o TP (línea verde).86

Figura 31. Cinética del cambio en el tamaño de partícula de βA con 0.4 equivalentes de cobre, en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP (línea verde). Los asteriscos en el trazo negro y rojo indican que el radio hidrodinámico de $\beta A + Cu$ y de $\beta A + Cu + DP$ es aproximado, ya que la función de correlación en estructuras mayores a 500 nm es > 187

Figura 32. Micrografías de la cinética de agregación de βA con 0.4 equivalentes de Cu(II) en ausencia **(A)**, y presencia de TP **(B)**.88

Figura 33. Micrografías de las fibras de βA con 2 equivalentes de DP, en ausencia **(A)** y presencia de 0.4 equivalentes de cobre **(B)**.88

Esquema 1. Modelo propuesto para la agregación de βA_{1-40} en presencia de Cu(II) y TP.90

ABREVIATURAS.

$A_{ }$	A paralelo
Aib	α -amino-isobutírico

AChE	Acetil colinesterasa
APP	Proteína Precursora Amiloide
β A	β -amiloide
BACE-1	β -secretasa-1
BAL	Dimercaprol
CD	Dicroísmo Circular
ChAT	colina-acetiltransferasa
Cu	Cobre
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHPC	1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DP	Dipéptido: D-Trp-Aib
ϵ	Coefficiente de extinción molar
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Etilen diamino tetra acetic
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
ES-MS	Espectrometría de masas
Fe	Hierro
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
g \parallel	g paralelo
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LDH	Lactato deshidrogenasa
μ M	Micromolar
MT3	Metalotioneina 3
MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NEM	N-etil morfolino
NFT	Marañas neurofibrilares
nm	Nanómetros
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PDB	Protein Data Bank

PS	Presenilina
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies de oxígeno reactivas
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TETA	Trietilentetramina
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
ThT	Tioflavina T
t_{lag}	Tiempo de nucleación
TP	Tetrapéptido: Met-Asp-D-Trp-Aib
Zn	Zinc

RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a más de 30 millones de personas en todo el mundo. La EA está asociada a la formación de placas amiloides compuestas por el péptido beta-amiloide (βA). Los iones metálicos como cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) se acumulan en dichas placas, sugiriendo que pueden jugar un papel importante en el proceso de agregación de βA . Por tal motivo, una estrategia novedosa en el diseño de fármacos modificadores del desarrollo de EA consiste en el diseño de moléculas bifuncionales capaces de quelar iones metálicos y de modular la agregación de βA . En el presente estudio, se diseñó y se evaluó el efecto de un péptido no natural y bifuncional, con secuencia Met-Asp-D-Trp-Aib (llamado TP), diseñado para modular la agregación de βA_{1-40} y para quelar Cu(II). El diseño del TP incluye a los residuos Met-Asp, motivo inspirado en la alfa sinucleína y que presenta alta afinidad por Cu(II); mientras que los residuos D-Trp-Aib (DP) son capaces de afectar la agregación de $A\beta$. El efecto del TP en la agregación del péptido $A\beta_{1-40}$ en ausencia y presencia de Cu(II) fue evaluado utilizando

espectroscopía de fluorescencia, dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Los resultados señalan que los péptidos DP y TP modifican y retrasan el proceso de agregación de β A, ya que inhiben el crecimiento inicial de los oligómeros. Por otro lado, el ión metálico Cu(II) retrasa el crecimiento de las fibras de β A promoviendo la formación de oligómeros más grandes a tiempos tempranos y favorece una vía de agregación diferente. El presente estudio demuestra que el TP es una molécula bifuncional, ya que es capaz de modular la agregación de β A y de coordinar al ión Cu(II), de tal forma que, aún en presencia de Cu(II), el TP es capaz de competir por Cu(II) frente a β A y de abatir la formación de oligómeros grandes que induce el Cu(II). Estos resultados representan una nueva visión en el diseño de compuestos con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that affects more than 30 million people worldwide. One of the hallmarks of AD is the formation of extracellular amyloid plaques, mainly composed of the peptide amyloid-beta ($A\beta$). Accumulation of metal ions such as copper (Cu), zinc (Zn) and iron (Fe) has been found in these amyloid plaques, suggesting that they may play an important role in $A\beta$ aggregation. Thus, a novel strategy in drug development for AD is the design of bifunctional molecules capable of chelating metal ions and of modulating $A\beta$ aggregation. In the present study, we designed and evaluate the effect of a non-natural and bifunctional peptide, with sequence Met-Asp-D-Trp-Aib (named TP), TP was designed to modulate the aggregation of $A\beta$ 1-40 and to chelate Cu(II). TP design includes residues Met-Asp motif inspired in alpha-synuclein because it has high affinity for Cu (II); while residues D-Trp-Aib (DP) are able to affect $A\beta$ aggregation. The effect of TP on the aggregation of $A\beta$ 1-40 peptide in the absence and presence of Cu (II) was evaluated using fluorescence

spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Results show that DP and TP peptides modify and delay the process of aggregation of A β , because they inhibit the initial growth of the oligomers. Furthermore, the metal ion Cu(II) delays the growth of A β fibers by promoting the formation of larger oligomers at early times and modified the aggregation pathway. This study demonstrates that TP is a bifunctional molecule, because it is able to modulate aggregation of A β and to coordinate Cu(II), so that, even in the presence of Cu(II), TP is capable of compete for Cu(II) vs. A β and to abate the formation of large oligomers that induces Cu(II). These results represent a new approach in the design of compounds with therapeutic potential for Alzheimer's disease.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y tiene consecuencias médicas y económicas graves [1]. La patogénesis de EA es un proceso complejo y heterogéneo cuyos distintivos neuropatológicos clásicos en el cerebro son las placas amiloides compuestas del péptido beta-amiloide (β A) y marañas neurofibrilares [2] formadas por la proteína Tau hiperfosforilada. Varias hipótesis han sido propuestas sobre el mecanismo implicado en EA, las cuales incluyen: la cascada amiloide, daño vascular, excitotoxicidad, déficit en los factores neurotróficos, disfunción mitocondrial, rastreo de elementos de neurotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo [3]. En el presente trabajo se abordará el enfoque de la hipótesis de la cascada amiloide.

Las proteínas son macromoléculas esenciales para la vida. En ocasiones las proteínas interactúan entre ellas mismas y en presencia de estímulos químicos, físicos o genéticos que modifican su plegamiento a un estado anómalo provocando enfermedades. Aunque estas enfermedades tienen una etiología, pronóstico y tratamiento variables, todas se caracterizan por depósitos de material proteínico insoluble y resistente a proteasas conocido como fibra amiloide, cuya presencia se asocia a la degeneración del tejido celular afectado [4, 5].

Algunos ejemplos de este tipo de enfermedades son las patologías neurodegenerativas como el Parkinson, las encefalopatías espongiiformes transmisibles y el Alzheimer, todas estas asociadas a proteínas amiloidogénicas, α -sinucleína, Prion, y Tau y beta-amiloide (β A) respectivamente [6, 7]. Aunque estas proteínas no tienen similitud en secuencia, estructura, ni función, las fibras amiloides formadas por estas proteínas comparten un patrón de plegamiento denominado "beta cruzado" que consiste en dos bloques de hojas- β orientadas paralelamente que se elongan perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra

[5, 8]. La agregación de proteínas en estas enfermedades está asociada a la presencia de iones metálicos [9].

El Alzheimer, al igual que el resto de las enfermedades ocasionadas por depósitos amiloides, actualmente, carece de cura. Esto hace del proceso de agregación de proteínas un blanco terapéutico clave en el desarrollo de este tipo de enfermedades. Hasta el momento, no se ha elucidado por completo el mecanismo molecular por el cual las proteínas involucradas en EA se agregan, lo que dificulta el diseño de estrategias terapéuticas [10].

Adicionalmente a la hipótesis amiloide, los pacientes con Alzheimer muestran alteración en la homeostasis de iones metálicos endógenos como son el zinc (Zn), hierro (Fe) y cobre (Cu). Si comparamos la concentración de estos metales en un tejido de cerebro sano contra la de los cerebros con Alzheimer, encontramos que las placas amiloides contienen 3 veces más concentración de zinc y hierro y 6 veces más de cobre aproximadamente. Esto sugiere que el proceso de agregación y el depósito de proteínas está influenciado por la presencia de iones metálicos [11]. Por tanto, una de las nuevas vertientes en el diseño de fármacos potenciales para el Alzheimer plantea el diseño de moléculas bifuncionales, con una parte que les confiere capacidad para unir el metal y la otra que puede intercalarse en las placas amiloides [12].

El diseñar e identificar moléculas moduladoras de la agregación de proteínas, nos permite aportar compuestos con potencial terapéutico. En el presente proyecto se estudia un tetrapéptido no natural y bifuncional y se evalúa su efecto en el proceso de agregación del péptido β A1-40, en ausencia y presencia del ión Cu(II).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.

1.1. La enfermedad de Alzheimer y su fundamento molecular.

En 1911, Alois Alzheimer describió un desorden neuropsiquiátrico que afecta a los ancianos, el cual es conocido actualmente como la enfermedad de Alzheimer (EA). Los primeros estudios de los pacientes afectados con esta enfermedad demostraron, a través de tinción con plata, la presencia de las lesiones en la corteza cerebral. Esas lesiones correspondían a marañas neurofibrilares, que son estructuras histopatológicas localizadas dentro de las neuronas. En 1930, se tuvo éxito en la tinción de otra estructura patológica, las placas seniles, utilizando el colorante Rojo Congo, que se une a un componente llamado amiloide [2]. Estas placas seniles están formadas por depósitos de fibras amiloides que se localizan extracelularmente en el cerebro. Posteriormente, se mostró por microscopía electrónica que los agregados intraneuronales estaban formados por filamentos helicoidales finos de 10 nm de diámetro [2]. A mediados de la década de 1980, se identificó que la proteína que formaba los filamentos intraneuronales se trataba de la proteína microtubular Tau [2]. En 1984, se encontró que los depósitos amiloides estaban compuestos de un péptido de 4 kDa con una estructura beta, al que llamaron beta-amiloide (β A) [2].

El péptido β A es un producto de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) [2]. Estos descubrimientos representan la base para el impresionante progreso alcanzado durante la década 1990 en el conocimiento de la base molecular y genética de la enfermedad de Alzheimer. Dicha información contribuyó a establecer las bases para aclarar la patogénesis de EA y emprender acciones dirigidas a una terapia efectiva para EA y trastornos neurodegenerativos relacionados [2, 13-17].

Aproximadamente 5-10% de los pacientes presentan un modo autosómico llamado Alzheimer familiar [2]. La mayoría de los casos de EA corresponden a una forma esporádica. Por lo tanto, la elucidación de los factores que desencadenan la secuencia de los cambios en la maquinaria neuronal normal que conduce a la neurodegeneración y a los mecanismos de transducción de señales que determinan la muerte neuronal en EA es de suma importancia. El conocimiento de los aspectos moleculares y la participación de genes específicos y otros factores de riesgo han brindado información sobre la etiología de EA y también ha contribuido a la comprensión de la base patológica de la forma esporádica de esta enfermedad [2, 4, 16, 18].

El Alzheimer es la demencia más común que afecta entre 60-80% de los casos [13, 14], por encima de las demencias frontotemporales, las ocasionadas por cuerpos de Lewy y cerebrovasculares [14]. EA es un desorden neurodegenerativo progresivo hasta el momento irreversible que conduce invariablemente a la muerte por lo general dentro de los 7-10 años después del diagnóstico [13]. El Alzheimer es un enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por disfunción cognitiva, especialmente la pérdida de la memoria, la alteración en la conducta, los cambios de personalidad y la dificultad en las actividades diarias; en las etapas avanzadas los pacientes requieren de cuidados continuos por parte de algún familiar hasta la muerte [19].

La etiología exacta del Alzheimer continúa sin ser elucidada, aunque se ha asociado al péptido β A con la disfunción sináptica, disminución cognitiva y formación de depósitos proteínicos en áreas corticales del cerebro (principalmente el hipocampo, la corteza entorinal y la neocorteza) [4, 13, 16, 19, 20]. Otras características relacionadas con EA son: pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral, que involucran la memoria y la cognición, particularmente en el hipocampo; estrés oxidativo; alteración y disminución en la captación de glucosa; alteración en la homeostasis de cobre, zinc, hierro y calcio; la respuesta inflamatoria por la activación de microglías que sobreexpresan

citocinas interleucinas-1, la alteración colinérgica, la disfunción mitocondrial, el déficit de neurotransmisores, las homocisteínas elevadas y una expresión anormal de metaloproteínas homeostáticas como las metalotioneínas [13, 21-25]. La metalotioneína 3 (MT3) es altamente expresada en los cerebros normales y su expresión es disminuida en EA [26]. La pérdida de sinapsis observada en EA puede ser causada por la despolimerización de los microtúbulos intraespinales, basado en esto, se sugiere que la insuficiencia de microtúbulos intraespinales puede causar el cambio estructural y bloquear la plasticidad, lo que resulta en los déficits cognitivos en EA [27]. La agregación de β A a oligómeros y fibras está implicada como un proceso clave en la progresión de EA [18]. Se sugiere que la formación de dichos depósitos está relacionada con un déficit en el tráfico vesicular, específicamente en la fusión lisosomal [28].

La enfermedad de Alzheimer es la proteopatía cerebral de mayor prevalencia, que involucra la agregación de Tau y β A [4]. El diagnóstico definitivo se hace postmortem, identificando los cambios anatómicos en el cerebro que consisten en ventrículos más anchos de lo normal, circunvoluciones y surcos ensanchados, descenso de peso y volumen cerebral. También se identifican los depósitos proteínicos que han sido bien documentados (fig. 1). Tanto el diagnóstico temprano como una medida terapéutica en etapas tempranas para detener el progreso de la enfermedad o el revertir los síntomas en etapas tardías sigue siendo un reto para la investigación de EA.

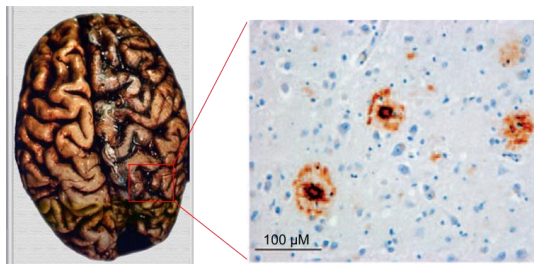


Figura 1. Cerebro que representa en su hemisferio izquierdo a un individuo sano y en el derecho a un paciente con Alzheimer. Se resalta la identificación de depósitos amiloides. Figura adaptada de la referencia [22].

La enfermedad de Alzheimer está asociada con el depósito de dos proteínas presentes en el sistema nervioso: Tau y β A. La proteína Tau se encarga de estabilizar los microtúbulos de las neuronas del sistema nervioso central; cuando hay una pérdida en el balance entre la cinasa de Tau y la fostaftasa ocurre un aumento en su fosforilación [29]. La hiperfosforilación de Tau fomenta que adopte una conformación anormal y se agregue, formando depósitos proteínicos intracelulares conocidos como marañas neurofibrilares (del inglés, NFTs). La formación de NFTs se considera como un evento tardío y no directamente responsable de las primeras disfunciones sinápticas. Modelos experimentales apuntan a pequeños agregados de Tau, llamados oligómeros o multímeros, como sinaptotóxicos en las primeras etapas de EA [30, 31].

Por otro lado, la β A es un péptido de un peso aproximado de 4 kDa, que deriva del corte de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) por la β y γ -secretasas. β A forma generalmente depósitos extracelulares conocidos como depósitos amiloides o placas seniles y se encuentra en el cerebro con Alzheimer en una concentración de 31 μ g/g (15 veces más que un cerebro sin Alzheimer) [2, 19, 32-34]. Los depósitos amiloides no son completamente extracelulares, la acumulación de β A intracelular también juega un papel en la patogénesis de EA. β A intracelular se origina del corte de APP e internalización de β A extracelular [35]. El punto exacto del corte de la γ -secretasa en la APP determina la longitud del péptido β A, que usualmente se compone de 40 o 42 residuos [20, 36, 37]. El péptido β A1-40 es considerado el más abundante, mientras que el 1-42 es considerado el más tóxico [34]. En el presente proyecto nos enfocaremos al estudio del péptido β A1-40.

1.2. El péptido beta-amiloide (β A).

El entender las vías moleculares por las cuales ocurren las alteraciones patológicas que comprometen las funciones e integridad de las neuronas que

conducen a síntomas clínicos es uno de los objetivos en la investigación de la enfermedad de Alzheimer [38].

La hipótesis amiloide es una de las bases propuestas en la patogénesis de EA. Las características que soportan esta hipótesis con los síntomas clínicos es la identificación de pérdida de neuronas y sinapsis en las regiones corticales y subcorticales en cerebros postmortem, así como placas extracelulares compuestas por el péptido beta-amiloide (β A) e intracelulares de Tau hiperfosforilada. Aunque la función precisa de β A en la etiología de EA se mantiene en estudio, el consenso actual es que β A es una pieza muy importante en el desarrollo de la enfermedad. La hipótesis amiloide también es soportada por experimentos con ratones transgénicos, donde un buen modelo de estudio es el triple transgénico (3xTg), el cual alberga la mutación en la presenilina y la sobreexpresión de APP y Tau (PS1_{M146V}, APP_{Swe} y taUP_{301L}) [39]. Estos ratones muestran algunas de las neuropatías y comportamiento similar a los pacientes con EA, proporcionando un vínculo entre la producción anormal de β A y el desarrollo de la enfermedad [40].

El péptido β A se produce a partir de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) por las enzimas β y γ -secretasa. Desde la clonación molecular de la APP en 1987, comenzó la evidencia bioquímica y genética de la implicación de la acumulación de β A en el desarrollo de EA. La APP es una glicoproteína transmembrana tipo 1 codificada por el gen APP localizado en el cromosoma 21 [41]. Mutaciones en los genes que codifican para APP (presenilina1 y presenilina2) causan EA familiar [42]. La mutación en presenilina-1 (PS-1), presenilina-2 (PS-2) y en el gen de la proteínas precursora amiloide (APP) está asociada a Alzheimer familiar. Otros genes como los de la apolipoproteína E-4, la sintasa-3 endotelial de óxido nítrico y la alfa-2 microglobulina también han sido asociados a EA. Por lo que, los factores genéticos juegan un papel muy importante en el desarrollo de EA, contribuyendo en más del 80% a las variaciones fenotípicas de la enfermedad [15].

La APP tiene un dominio largo extracelular y otro corto citoplasmático. APP tiene expresión ubicua, particularmente es altamente expresada en las neuronas. APP es un miembro de una familia de genes conservados evolutivamente. Los miembros de la familia de genes son la APL-1, APPL, APLP1, APLP2 y APP. La familia de proteínas APP tienen regiones conservadas en el dominio extracelular, en particular el dominio E1 y E2 y en el C-terminal el dominio YENPTY intracelular muestra la mayor identidad de secuencia. Las regiones yuxtapuestas a la membrana extracelular difieren mucho en secuencia en comparación con β A, lo que hace a la proteína APP única (fig. 2). El dominio E1 se divide en el sitio de unión a heparina (HBD, por sus siglas en inglés) y en el sitio de unión a cobre o zinc (CuBD, por sus siglas en inglés). El cobre modula el metabolismo de APP por su coordinación en los residuos de histidina 149 y 151 [43]. E1 está seguido por una región ácida (Ac) y un dominio inhibidor de proteasa tipo Kunitz (KPI, por sus siglas en inglés). El dominio E2 contiene un segundo sitio de unión a heparina y un motivo RERMS implicado a funciones tróficas. A pesar de que la APP está implicada en la patogénesis de EA, su función sigue siendo tema de estudio [37], debido a los sitios específicos y saturables de unión a zinc en la región rica en cisteínas (APP 181–200) [24] y cobre (APP 135–155) se sugiere que la APP está implicada en el transporte de estos metales y/o que los metales son necesarios para la función y metabolismo de la APP [44].

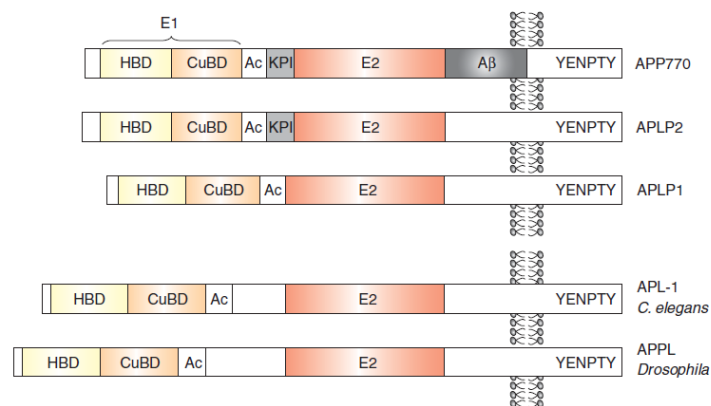


Figura 2. Representación de la familia de proteínas APP. Figura tomada de la referencia [37].

La figura 3 muestra los diferentes cortes que sufre la APP para dar origen a 2 vías: la no-amiloidogénica y la amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la APP sufre un corte por la α -secretasa entre K687 y L688, previniendo la formación de β A, dando como resultado un C-terminal de 83 aminoácidos que posteriormente es cortado por la γ -secretasa, originando un péptido corto llamado p3, que corresponde a las residuos 17-40 o 42 de la β A. En la vía amiloidogénica, el primer corte está mediado por la β -secretasa entre el residuo M671 y D672, dejando al C-terminal de 99 aminoácidos, posteriormente el corte de la γ -secretasa libera al péptido β A. El punto exacto del corte de la γ -secretasa determina la longitud de β A de 40 o 42 aminoácidos. β A1-42 es más hidrofóbico, menos abundante (5-10%) y tiene mayor tendencia a agregarse para formar fibras y placas en comparación con β A1-40 [36, 40, 45, 46].

Por lo tanto, β A es un producto natural de la proteólisis de APP, que se encuentra en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo de los humanos durante toda la vida y posiblemente tenga alguna función. β A existe en el cerebro en 3 formas: unido a membrana, agregado y soluble. La forma mayoritariamente soluble en el líquido cefalorraquídeo y sangre es la β A1-40. La forma β A1-42 es menos prevalente en fluidos biológicos y forma la base de las placas amiloides, por lo que se considera más amiloidogénica y neurotóxica [46].

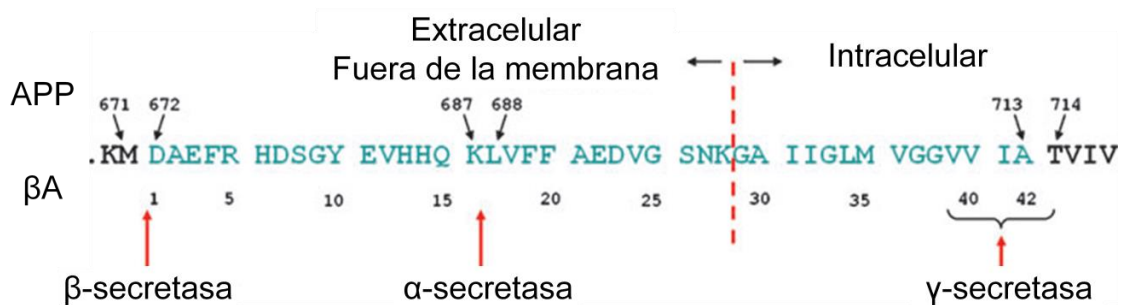


Figura 3. Representación de los sitios de corte de las secretasas en APP. Secuencia primaria de APP (numeración superior) y de β A (numeración inferior). Figura tomada de la referencia [34].

Respecto a los daños que produce la pérdida en la homeostasis de β A se encuentran la degeneración neuronal y la toxicidad que surge en el proceso de agregación desde monómero, oligómeros y fibras. Los agregados extracelulares de β A pueden interactuar con las membranas neuronales ocasionando daño en la permeabilidad de la bicapa. Los oligómeros de β A y las fibras también se pueden unir a proteínas de membrana, causando disminución o pérdida de la función [40].

Aunado a la evidencia de que β A ejerce sus efectos extracelularmente, se ha demostrado que β A intraneuronal también es importante. Algunos modelos en ratones muestran depósitos de β A dentro de las neuronas antes de la aparición de placas extracelulares. Específicamente, el modelo de ratones triple transgénico (3xTg) muestra que el nivel de β A intraneuronal se correlaciona con disfunción sináptica y deterioro en la memoria. La internalización de β A se relaciona con los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA, por sus siglas en inglés), ya que la exposición de los receptores NMDA a oligómeros de β A promueven la endocitosis de los receptores. En la corteza y el hipocampo, el cobre es liberado en el espacio sináptico en concentraciones 15-100 μ M [46]. Se ha propuesto que la liberación de Cu(II) protege de la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA [46]. En cortes de hipocampo tratados con β A y un antagonista de NMDA se observó la prevención de acumulaciones de β A en las neuronas, lo que sugiere que la activación del receptor NMDA por β A puede desencadenar la endocitosis del complejo NMDA- β A [40]. Otro factor asociado a la internalización de β A es el nivel de colesterol, ya que las balsas lipídicas formadas por colesterol albergan β A intraneuronal [40]. Adicionalmente, la presencia de APP en las membranas celulares, del aparato de Golgi, del retículo endoplásmico, mitocondrias, endosomas y lisosomas soportan fuertemente la presencia de β A intracelular [47]. A pesar de estas observaciones, el concepto de que β A intraneuronal contribuye al progreso de la enfermedad no ha sido completamente aceptado y es motivo de controversia [40].

De acuerdo a la relevancia del péptido β A como clave en el desarrollo de EA, la hipótesis de la β A postula que la sobreproducción, insuficiencia en la remoción y el aumento en la agregación de la β A, resultan en la pérdida y disfunción neuronal que desemboca en Alzheimer [4, 19].

Las fibras amiloides tienen estructura de hoja- β cruzada (del inglés, cross-beta-strand) crecidas en dirección perpendicular al eje de la fibra (fig. 4). Dicha estructura forma hojas- β , donde los puentes de hidrógeno entre H-N de una hoja- β y O=C de otra están en dirección paralela al eje de la fibra [48]. La hoja- β puede ser paralela o antiparalela. Las interacciones (hidrofóbicas, puentes salinos, entre otros) entre las cadenas laterales están en dirección perpendicular al eje de la fibra. Las estructuras amiloides de β A son polimórficas, algunos modelos estructurales se basan en datos de resonancia magnética nuclear (RMN). Uno de los modelos propone que los residuos 10-13 están en estructura de hoja- β con un giro a la mitad. El N-terminal generalmente se plantea que es flexible, aunque pudiera tener un contenido de hoja- β [49]. Se ha identificado que los aminoácidos aromáticos son cruciales para la formación y la estabilidad de las estructuras amiloides. Esto se ha elucidado por estudios estructurales de alta resolución, análisis teóricos y dinámicas moleculares. El triptófano es el que tiene el mayor potencial amiloidogénico [6]. La inhibición de la formación de la estructura amiloide representa una prometedora estrategia terapéutica [6].

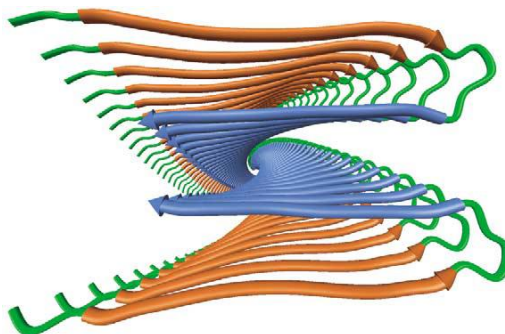


Figura 4. Diagrama de cintas de los residuos 9-40 de la β A1-40 que muestra la estructura de hoja- β cruzada. El eje largo de la fibrilla se extiende fuera de la página. Figura tomada de la referencia [50].

Específicamente, la figura 5 muestra la fibra formada por β A1-40 obtenida por resonancia magnética nuclear [51]. El núcleo de la fibra contiene dos o más hojas- β , la estructura cuaternaria está compuesta por la interacción de los residuos para formar la configuración de hoja- β cruzada [51]. Las interacciones hidrofóbicas de β A involucran a los residuos L17, F19, A21, A30, I32, L34 y V3 (en la cara interna de β A) y I31, M35, and V39 (en la cara externa de β A para interaccionar con otra β A) [52]. K28 y D23 son importantes para conferir estabilidad por medio de puentes salinos [52]. En ambientes hidrofóbicos la β A adopta una conformación estable y bien ordenada de α -hélice o de hoja- β [48]. La conformación de hoja- β se favorece en presencia de un exceso molar bajo de vesículas lipídicas cargadas negativamente usando dodecil sulfato de sodio (SDS) y 1,2-dihexanoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DHPC) por debajo de la concentración micelar crítica [48]. Por otro lado, la conformación de α -hélice se favorece en presencia de altas concentraciones de vesículas lipídicas cargadas negativamente, micelas de SDS o 40% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) [48]. La forma de β A en α -hélice en ambientes altamente hidrofóbicos no causa sorpresa, ya que β A contiene una región de la APP que es transmembranal [48].

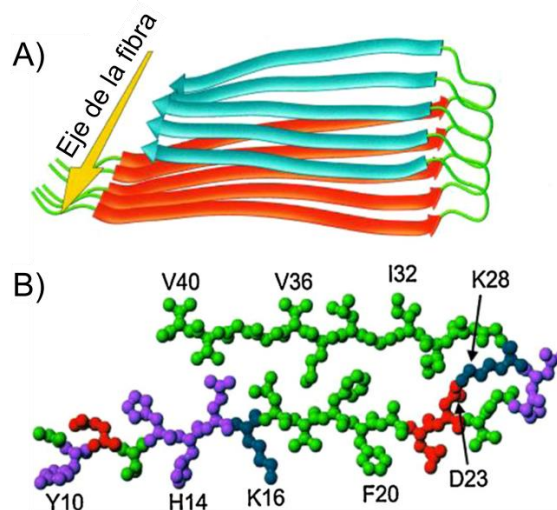


Figura 5. Modelo de la fibra formada por β A1-40 obtenida por resonancia magnética nuclear. **A)** representación de la estructura de hoja beta por los residuos 12-24 (color anaranjado) y 30-40 (azul). **B)** β A1-40, los residuos hidrofóbicos en color verde, los polares en morado, positivos en azul y negativos en rojo. Figura tomada de la referencia [51].

Entender el mecanismo de formación de fibras a partir de monómeros de β A es fundamental para proponer agentes terapéuticos. La agregación es un proceso cooperativo que comienza con la fase de nucleación llamada fase lag, donde el péptido β A da origen a una estructura rica en hojas- β para su posterior ensamble y formación de oligómeros y protofibras. Los oligómeros tempranos son de estructura y tamaño diverso (diámetro >50 nm), pueden ser dímeros, trímeros y oligómeros más complejos, por lo que se conocen como amorfos [48]. Varios mecanismos de nucleación se han propuesto, éstos difieren en el estado oligomérico en el que β A se asocia (dímeros, trímeros, entre otros.) [49]. La generación de núcleos representa el paso límite para la producción de fibras y también ocurre el cambio estructural de los oligómeros. La formación de un sólo núcleo es suficiente para que sirva como plantilla para unir otros monómeros o proteínas oligoméricas [49]. El comienzo del ensamble para formar fibras se llama fase de elongación, en la cual las protofibras comienzan a crecer hasta finalmente formar fibras maduras [33, 53, 54]. Las protofibras son agregados alargados con falta de estructura ordenada, por lo general, son más delgadas, curvilíneas y no repiten el patrón de forma a comparación de las fibras maduras [48]. La figura 6 esquematiza el proceso de agregación de proteínas para la formación de las fibras.

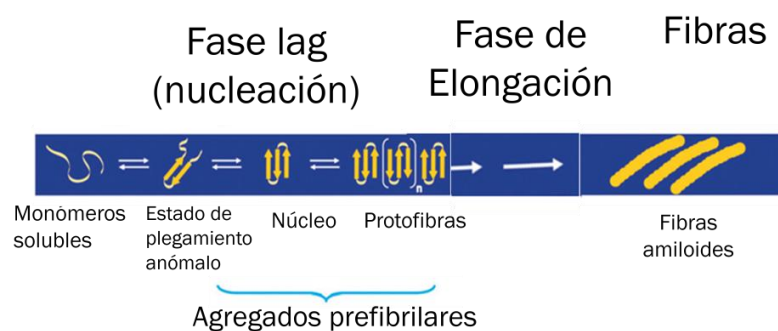


Figura 6. Mecanismo propuesto del proceso de agregación de proteínas para la formación de las fibras. Figura modificada de la referencia [53].

Un estudio *in vitro* propone dos modelos por los cuales β A forma fibras, uno es elongación por depósito monómero-monómero y el otro consiste en la

asociación protofibrilla-protofibrilla [10]. El proceso se caracterizó modificando el contenido de cloruro de sodio (NaCl). Los resultados señalan que la elongación de protofibrillas en ausencia de NaCl promueve el depósito monómero-monómero sólo en los extremos de la misma, sin aumentar su diámetro. Por otro lado, en ausencia de monómeros, las protofibrillas se asocian al colocar NaCl, dando como resultado estructuras fibrilares relativamente desordenadas [10].

Aproximadamente hace 20 años, se pensaba que las fibras maduras eran el agente patológico de los desordenes amiloidogénicos, ya que las fibras pueden matar a las neuronas en cultivos. Otra perspectiva sostiene que las fibras no son la única forma tóxica de β A, sino que los oligómeros pequeños y las protofibrillas también afectan a las neuronas pero escapan a las medidas de detección de las placas amiloides [55]. En el proceso de agregación, los oligómeros solubles confieren disminución sináptica, afectando las terminaciones hipocampales antes de matar a la neurona a concentraciones nanomolares de β A [56], mientras que los oligómeros grandes y los depósitos insolubles pueden funcionar como reservorio de los oligómeros bioactivos [22]. Las fibrillas de β A suprimen el ciclo redox del cobre y con ello la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) [57]. Por lo que se piensa que los depósitos amiloides son la consecuencia y no la causa relacionada con EA [58].

Actualmente se sugiere que las fibras podrían representar un mecanismo celular de desintoxicación de cadenas polipeptídicas dañinas [59]; mientras que los oligómeros de β A son los responsables de la citotoxicidad y la ruptura de la plasticidad sináptica [59, 60]. Específicamente, los oligómeros tempranos están involucrados en el plegamiento anómalo en el proceso de agregación y son las especies tóxicas asociadas a la muerte neuronal [61]. Se ha demostrado que los oligómeros de β A incrementan el flujo de calcio intracelular por su internalización a las membranas neuronales formando canales iónicos sensibles al catión que conlleva a excitotoxicidad, desbalance de neurotransmisores, degeneración sináptica y muerte celular [54, 62-64]. El estudio de la toxicidad *in vitro* de los

oligómeros de bajo peso molecular demuestra que los dímeros de β A son 3 veces más tóxicos que los monómeros; y los tetrámeros 13 veces más [47]. Los oligómeros dodecámeros están relacionados con la pérdida de memoria en un modelo de ratones con EA y se ha detectado la presencia de estos oligómeros en cerebros de pacientes con EA [65]. La existencia de diferentes tipos de oligómeros y prefibrillas que son semejantes en tamaño pero diferentes en sus propiedades inmunológicas y conformacionales en el cerebro con EA, indica que un amplio intervalo de ensamble de β A pueden coexistir [59].

La agregación es un proceso dinámico donde diferentes estados de agregación están intercambiándose. Por lo tanto, durante la agregación varios estados están simultáneamente presentes [49]. Oligómero es un término utilizado para cualquier intermedio entre monómero y fibra, existen diferentes tipos de oligómeros, comenzando desde dímero hasta estructuras cercanas a la fibra madura [49]. La determinación de estructuras tridimensionales de los oligómeros es un reto, ya que en la mayoría de los casos se necesitan muestras estables y homogéneas [49]. Un modelo de oligómero llamado TABFO tiene una forma de barril o poro de 8 nm de diámetro formado por 20 unidades de β A ordenadas en hoja- β ; a diferencia de la fibra amiloide, β A no tiene un giro en la región 23-28 [49].

El entender la estructura tridimensional de β A representa una clave para el diseño de fármacos, por ello se han obtenido modelos de la fibra amiloide de β A1-42 por resonancia magnética nuclear (PDB= 2BEG) [66]. De β A1-40 hay varios modelos, el primero con una metionina oxidada (PDB= 1BA6), otros dos fueron obtenidos en un ambiente agua-micelar a pH de 2.8 y 5.1 (PDB= 1AML y 1BA4, respectivamente) [67]. Otro modelo para β A1-40 consiste en su forma de dímero (PDB= 2LMN) [68] y finalmente, una forma en solución parcialmente plegada que podría representar un núcleo de agregación (PDB= 2LFM) [61] (fig.7).

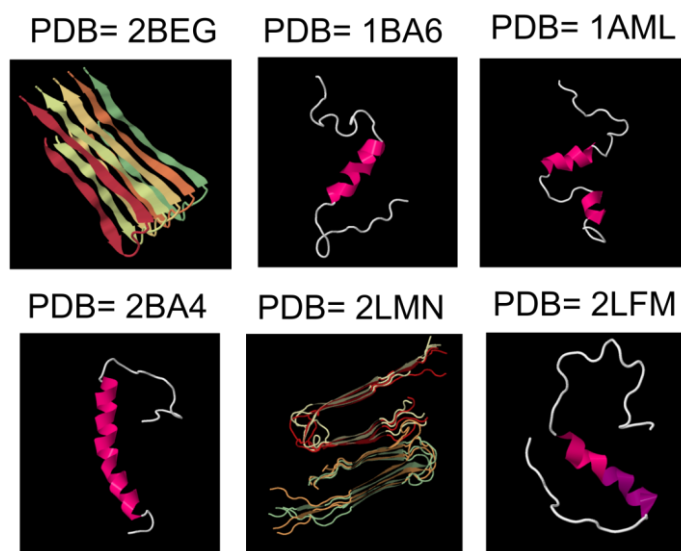


Figura 7. Modelos de la estructura tridimensional de β A. Figura adaptada de las referencias del *Protein Data Bank* (PDB): 2BEG [66], 1BA6 [67], 1AML [67], 2BA4 [67], 2LMN [68], 2LFM [61].

La oligomerización, cambios estructurales y la consecuente neurodegeneración que produce β A son puntos claves en el proceso neurodegenerativo de EA. El bloquear el ensamble de los oligómeros tóxicos, modulando el proceso de agregación de β A es un blanco terapéutico para la enfermedad de Alzheimer. Para estudiar el estado de agregación de β A y su citotoxicidad se utilizan métodos biofísicos (tinción negativa en microscopia, ensayos con tioflavina T) y ensayos celulares (reducción de MTT, liberación de LDH) [69]. Por lo tanto, enfocar la terapia de EA a la inhibición del ensamble de oligómeros tempranos parece una estrategia más prometedora que desagregar la fibra madura [65].

1.3. La enfermedad de Alzheimer y los iones metálicos.

Otro punto importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es la pérdida de la homeostasis de iones metálicos. Los metales son esenciales para la vida y juegan un papel central en muchos procesos biológicos. La homeostasis

de los iones metálicos se mantiene a través de mecanismos altamente regulados de recaptura, almacenamiento y secreción [70]. Un grupo específico de transportadores en cada compartimento celular provee un balance estricto de los iones metálicos. Sin embargo, estos transportadores pueden perder su homeostasis por disfunción genética, exposición ambiental, dieta inadecuada e interacción farmacológica [13]. La pérdida de homeostasis de los metales endógenos como cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) ha tomado importancia para investigar la etiología de diferentes enfermedades de agregación proteínica, como es el Alzheimer [70]. El Alzheimer se caracteriza por acumulación de Cu y Zn en las placas amiloides y altos niveles de Fe en el cerebro.

El Fe se acumula progresivamente en el cerebro con la edad, particularmente en las áreas afectadas con neurodegeneración, como el hipocampo y la corteza cerebral [70, 71]. La falla en las ferroxidasas, ferritinas y frataxinas está relacionada con neurodegeneración, debido a la desregulación de Fe [72]. Muy pocos reportes han descrito la relación del Fe con APP o β A, se ha demostrado que la concentración de Fe afecta la producción de APP. A pH fisiológico una coordinación directa de Fe(III)- β A no es posible [46]. El Cu(II) y el Fe (III) inducen la agregación de β A sólo en medio ácido (pH= 6.6), como es el caso de los cerebros con EA [72]. El Fe localizado en las placas amiloides se encuentra en complejo con la ferritina posiblemente debido a un proceso neurítico y no a una interacción directa con β A, como es el caso de Cu y Zn [73]. Estudios donde han solubilizado a β A de cerebros *postmortem* con EA han correlacionado la disolución de β A precipitada con Cu y Zn, pero no con Fe [73].

El Zn es el elemento más abundante en el cuerpo, después del hierro, y su contenido más alto se encuentra en el cerebro. El promedio en la concentración total de zinc en el cerebro es de aproximadamente 150 μ M. El 90% del Zn está unido a enzimas, factores de transcripción, y metaloproteínas. La concentración de Zn libre en el citosol está en el orden de picomolar y aproximadamente 500 nM en el fluido extracelular del cerebro. El complejo Zn(II)- β A con péptidos

pequeños muestran una estequiometría 1:1 y una coordinación por aspartato 1, histidina 6 e histidinas 13 y 14 [46]. Se estima que la concentración de Zn(II) en el espacio sináptico es mayor a 300 μ M. Se ha demostrado que la ausencia del transportador de Zn (ZnT3) en ratones transgénicos disminuye la acumulación de placas amiloides [46]. El nivel intracelular y extracelular de Zn aumenta a concentraciones patológicas. La mayor fuente neuropatológica de los niveles de Zn proviene de las vesículas sinápticas ricas en Zn. Las terminales presinápticas liberan al Zn y las postsinápticas lo recapturan. Una liberación incontrolada de Zn proviene de eventos patológicos como hipoxia-isquemia, traumatismo craneoencefálico, convulsiones y estrés oxidativo [44].

El Cu es un micronutriente esencial para la vida, es un metal de transición involucrado en procesos biológicos como la respiración mitocondrial, desarrollo embrionario, regulación de los niveles de hemoglobina, biosíntesis de neurotransmisores y detoxificación de radicales libres [74]. El cerebro humano adulto representa 2% en masa de todo el cuerpo, pero contiene 7.3% del cobre total, lo cual lo hace comparable con el hígado (aprox. 9%), el cual es el órgano central de la homeostasis de cobre [46]. En condiciones normales, el cobre está unido a enzimas como la citocromo c oxidasa, la ceruloplasmina y la superóxido dismutasa [75]. En el cerebro se ha visto que el nivel de cobre está elevado en las placas seniles [75]. La pérdida en la homeostasis de cobre está mediada por la expresión de APP; un modelo de ratones *knock out* de APP mostró aumento en el nivel de cobre en la corteza cerebral e hígado, mientras que la sobreexpresión de APP ocasiona una reducción significativa en el nivel de cobre en el cerebro [76]. Un estudio piloto fase 2, mostró que el grupo placebo tuvo más rápido deterioro cognitivo que el tratado con clioquinol, sugiriendo que el tratamiento con agentes quelantes (sustancia que forma complejos con iones de metales pesados) tiene un efecto benéfico [76]. Esto sugiere que el ión cobre es un blanco terapéutico importante que está involucrado en el proceso de agregación del péptido β A. Por tal motivo, la pérdida de la homeostasis de iones metálicos es uno de los puntos de intervención terapéutica.

El nivel de β A monomérico extracelular es alrededor de 5 nM, y su concentración es mayor en las placas y durante la sinapsis. El nivel de Cu(II) extracelular en el fluido cerebroespinal 100 nM hasta aproximadamente 1 μ M [77, 78]. Una afinidad picomolar por Cu(II) permite a β A competir por el metal contra las moléculas quelantes, especialmente durante la sinapsis, donde la concentración de Cu(II) puede aumentar hasta 20-250 μ M [77]. La concentración fisiológica de Zn(II) en el fluido cerebroespinal es de aproximadamente 3 μ M [78]. Durante la sinapsis la concentración de Zn(II) puede alcanzar los 300 μ M [78].

La estimación de la concentración de los metales en las placas amiloides es subestequiométrica, por lo tanto, basándose en la literatura los estudios deben considerar una estequiometría metal- β A ≤ 1 [49]. Simulando las condiciones fisiológicas, β A se encuentra en concentraciones nM (por ejemplo, en el líquido cefalorraquídeo) y los metales en la sinapsis se enriquecen hasta μ M, pero hay que considerar que hay ligandos biológicos en el medio, disminuyendo la disponibilidad de los metales libres [49]. Los iones Cu(II) y Zn(II) modifican la cinética de agregación de β A. Por otro lado, los iones Cu(II) y el Fe(II) libres promueven neurotoxicidad por su actividad redox. En condiciones normales, el Cu y el Fe están unidos a metaloproteínas como la ceruloplasmina y la transferrina, respectivamente [70]. Más del 95% de cobre en plasma está unido a la ceruloplasmina, el resto está unido a albúmina o a residuos de histidinas de otras proteínas [74, 76].

La liberación conjunta de β A, Zn y Cu en la sinapsis glutamatérgica, promueve la formación de oligómeros de β A que modulan la actividad de los receptores NMDA. La acumulación excesiva de los oligómeros de β A en el espacio sináptico afecta la neurotransmisión. Con base en lo anterior, se ha postulado la hipótesis de los iones metálicos en la enfermedad de Alzheimer, la cual estipula que los efectos neuropatogénicos de β A son regulados por las interacciones con el metal [72].

En la figura 8 se muestra cómo en el cerebro el Cu(II) y el Zn(II) se encuentran en vesículas sinápticas y son liberados al espacio sináptico durante la neurotransmisión [36]. El Zn es liberado de las terminales presinápticas glutamatergicas [24]. El cobre también regula la función sináptica y su liberación post-sináptica es seguida por la activación de receptores NMDA [13]. El péptido β A se encuentra en el espacio sináptico, lugar donde interactúa con el Zn y el Cu. En el espacio sináptico también hay proteínas que regulan la concentración de metales, estas metaloproteínas son liberadas por los astrocitos, como es el caso de la metalotioneína-3 (MT-3), que tiene la capacidad de disminuir las interacciones β A-metal. En el Alzheimer los niveles de MT-3 están disminuidos, reduciendo la recaptura de Zn y Cu [36, 72].

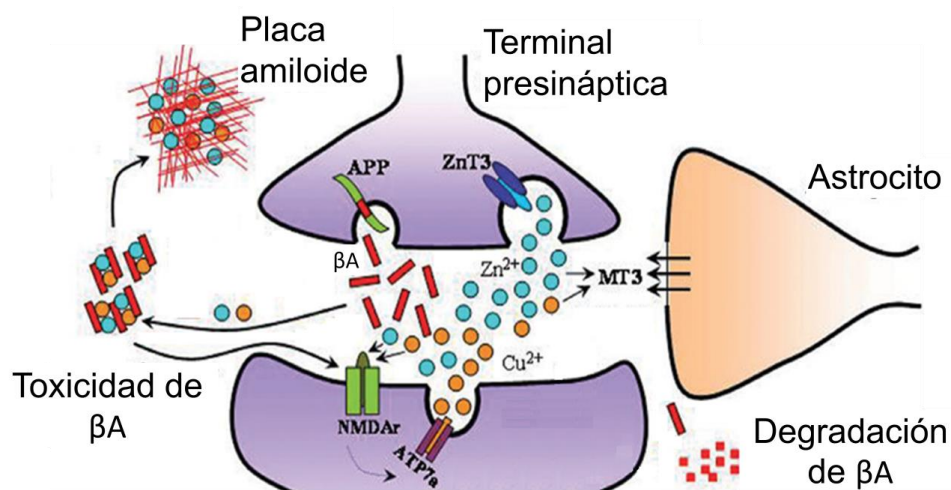


Figura 8. Representación de la interacción de zinc y cobre con β A durante la sinapsis. Figura adaptada de la referencia [13].

Se ha propuesto que el proceso de plegamiento anómalo de la β A y su proceso de agregación está altamente influenciado por los iones metálicos [79]. También se ha propuesto que los efectos neuropatogénicos de la β A están asociados a las interacciones β A-metal [72, 80, 81]. Estudios realizados en cerebros de pacientes con Alzheimer demostraron que el nivel de Zn en las placas seniles es de 1055 μ M, el de Fe es de 940 μ M y el de Cu es de 393 μ M,

mientras que en cerebros control es de 346, 338 y 69 μM , respectivamente [11, 13, 73].

βA tiene sitios de unión de baja y alta afinidad mediados por histidinas. El sitio de unión de alta afinidad a zinc tiene una $K_d=107$ nM con una estequiometría 1:1 y el de baja afinidad es de $K_d=5.2$ μM , 2:1 (Zn: βA) [24]. La constante de disociación aparente para Zn- βA en varios buffer está en el intervalo de 1-20 μM [82]. El sitio de unión de Zn en $\beta\text{A1-40}$ que parece tiene un efecto crucial en la agregación de βA mediada por este metal es el residuo 13 [24]. βA también tiene un sitio de alta y baja afinidad de unión a Cu de 7×10^{-18} M y 5 nM [83], respectivamente. Se han reportado otras K_d de Cu(II) por $\beta\text{A1-40}$ como 5×10^{-11} . $\beta\text{A1-42}$ tiene alta afinidad por Cu(II) ($\log K_{\text{app}}= 17.2$) que modula su precipitación y la tendencia a agregarse en soluciones acuosas con cobre 0.1 μM [75, 84]. $\beta\text{A1-40}$ tiene menor afinidad por Cu(II) ($\log K_{\text{app}}= 10.3$) [75, 84]. Estos resultados explican por qué $\beta\text{A1-40}$ es menos amiloidogénico que $\beta\text{A1-42}$ [75, 84]. La constante de unión de Cu(II) a βA monomérica a pH 7.4 es $K_d= 57 \pm 5$ nM [85]. La constante de disociación condicional del complejo Cu- βA es de 10 pM a 100 nM, preferentemente entre 100 pM a 1 nM [82]. La determinación de K_d provee una idea general de la afinidad de unión entre el cobre y βA en término de una relación sin contemplar la estequiometría de las especies o la presencia de una mezcla de ellas [60]. Aunque los datos de K_d varían, el consenso consiste en que las cantidades μM liberadas de Zn y Cu durante la sinapsis, son suficientes para inducir la agregación de βA [60, 72].

Las interacciones metal-proteína dependen de la electrostática y las interacciones de coordinación entre el catión metálico y ciertos residuos de la proteína [46]. Cuando el Cu(II) se une a la βA , pueden coexistir diferentes modos de coordinación, algunos modos propuestos para Cu(II)- βA dependen del pH. A bajos pH el Cu(II) es coordinado por dos histidinas y el aspartato 1, mientras que a altos pH el complejo consiste en tres histidinas y los nitrógenos del aspartato 1 y alanina 2 [36, 46]. Utilizando resonancia paramagnética electrónica (EPR, por

sus siglas en inglés) se encontró que la esfera de coordinación del Cu(II) a altos pH es de los átomos de nitrógeno provenientes de His6, 13 y 14 y un átomo de oxígeno del carboxilo de la cadena lateral de Asp1 , y sólo dos histidinas a bajos pH [36]. A pH fisiológico, experimentos con resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo, absorción de rayos X y espectrometría de masas indican que β A forma un complejo mononuclear con Cu formando una esfera de coordinación de 3 histidinas de la cadena lateral (His6, 13 y 14) o 2 histidinas y el N-terminal [36]. En general, el consenso indica que el Cu(II) forma un complejo 1:1 con β A [46]. Las afinidades reportadas para β A por Cu(II) varían de attomolar a micromolar, debido a las diferentes técnicas usadas (potenciometría, calorimetría, fluorescencia) y las diferentes condiciones experimentales [46].

Los iones metálicos inducen desprotonación y enlaces de coordinación de los grupos amida de los péptidos para formar complejos estables [86]. Átomos donadores ubicados en las cadenas laterales de los residuos especialmente los nitrógenos del imidazol de la histidina, el azufre en el tiol de la cisteína y el oxígeno del carboxilato de la cadena lateral del aspartato y glutamato representan los mejores sitios de unión a metales, y se demuestra en las metaloenzimas [86]. Los modos de coordinación de cobre dependen altamente del pH [87].

En la figura 9 se muestran los modos de coordinación más aceptados para Cu(II), Zn(II) y Fe(II). A pH 7.4 coexisten 2 componentes de Cu(II); en el componente I participa el NH₂ del amino terminal, el CO del enlace peptídico entre Asp1-Ala2, el anillo imidazol de la His 6 y otro de la His13 o 14, en la posición apical se ha propuesto la presencia de un carboxilato o una molécula de agua [9, 79, 88-90]. A diferencia del componente I, en el componente II, hay una desprotonación del enlace peptídico entre Asp1-Ala2, donde el Cu(II) tiene enlaces ecuatoriales con el -NH₂ del amino terminal, la amida desprotonada de Asp1-Ala2, el CO del enlace peptídico de Ala2-Glu3 y un anillo imidazol de His6 o 13 o 14 [79, 88, 90]. Para el Fe(II) hay un único reporte parecido al componente I

del Cu(II), el anillo imidazol de la His6 y otro de la His13 o 14, el NH₂ del amino terminal, el grupo CO adyacente perteneciente a Ala2, el CO de la His6, y axial un carboxilato preferentemente de la Asp1 o Glu3 [49]. Para el caso del Zn, en la coordinación participan 3 histidinas y la Asp1, ésta última puede estar coordinada por el carboxilato o el N-terminal, otros ligandos pueden ser posibles, por ejemplo, Glu11 o agua [49, 82]. Otro parámetro importante es la afinidad metal-βA, el Cu es más afín que Zn por βA, 10¹⁰ M⁻¹ y 10⁶ M⁻¹, respectivamente. Estos valores se tomaron a pH 7.4, 0.1 M de sal en ausencia de competencia del buffer por los metales y βA monomérico [49].

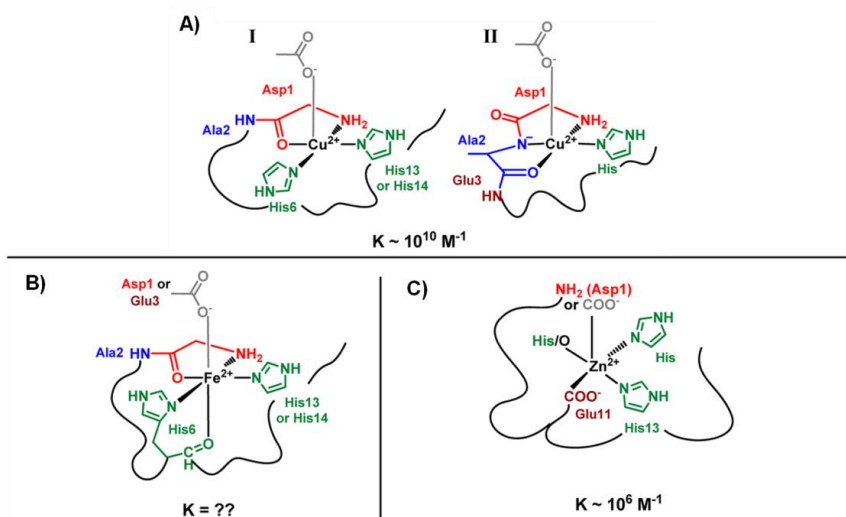


Figura 9. Esquema de los modos de coordinación propuestos para βA con **A)** Cu(II), **B)** Fe(II) y **C)** Zn(II). Figura tomada de la referencia [49].

El cobre tiene un efecto dual en EA. Cu(II) es un mediador de la agregación de βA y un generador de especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) [91]. El efecto del cobre en el estado conformacional de βA indica que es uno de los mayores agentes patológicos para la enfermedad de Alzheimer. Ya que, a diferencia del zinc, el cobre es activo redox, participa en reacciones como la de Fenton o Haber–Weiss y cataliza la oxidación de βA. Por lo tanto, el cobre presente en las placas amiloides participa en la generación de especies de oxígeno reactivas y en la catálisis de la formación de radicales libres, reacción que es inhibida por quelantes selectivos de cobre. Además, el cobre precipita a

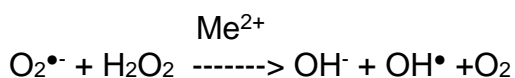
β A en medio ácido (pH 6.6), proceso que ocurre en el Alzheimer, específicamente en sitios de inflamación cerebral donde se ubican las placas amiloides [44]. El estrés oxidativo es el resultado de la pérdida en el balance de la producción y la detoxificación de ROS, que incluyen al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^\bullet) [92]. En la regulación de ROS se encuentran las enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa y tioles intracelulares como el glutatión [92]. El nivel elevado de ROS produce daño celular irreparable como degradación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [92].

La reacción de Fenton consiste en [46]:

donde Me representa al metal.



La reacción de Haber-Weiss es [46]:



El cobre y el hierro son metales con propiedades redox que contribuyen al estrés oxidativo presente en la enfermedad de Alzheimer, donde el residuo redox más activo es la Tyr10 [44, 93]. β A cataliza la generación de H_2O_2 a través de la reducción de Cu(II) y Fe(III) a Cu(I) y Fe(II), usando O_2 y agentes reductores biológicos, por ejemplo, colesterol, vitamina C y catecolaminas [44, 73, 94]. Debido a la generación de H_2O_2 , la neurotoxicidad asociada a β A en EA está mediada por la interacción con Cu(II) y Fe(III) [73]. H_2O_2 reaccionará con los metales para generar OH^\bullet , el cual genera peroxidación de la membrana lipídica, daño en el ADN y oxidación proteínica [71, 73, 75]. El Fe (al igual que el aluminio) se ha encontrado en las marañas neurofibrilares, ya que es capaz de unirse a la proteína Tau hiperfosforilada [71]. Por lo tanto, la estrategia de utilizar agentes quelantes para interrumpir la actividad oxidativa y las interacciones β A-metal parece prometedora, pero la falta de especificidad por un solo metal representa un reto en estudio [44].

El cobre parece tener un efecto bifásico en la citotoxicidad con β A en función al grado de agregación del péptido, es decir, el complejo Cu- β A puede tener un efecto tóxico (posiblemente por un mecanismo de estrés oxidativo) o protector (posiblemente al mantener una estructura no fibrilar). Yoshiike y colaboradores incubaron β A con Cu antes de exponerlos a cultivo celular y observaron que β A era menos tóxica a pesar de su estado agregado [44]. Sólo se puede especular en la forma del cobre de modular la citotoxicidad, por ejemplo, es posible que el complejo Cu- β A se resolubilice y una vez en el medio de cultivo, β A soluble y el cobre libre interactúen con moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es muy reactivo frente a metales e inducir muerte neuronal [44].

La interacción de Cu(II) con β A es dependiente de pH y se piensa que tiene efecto en la neurotoxicidad, ya que el pH ácido en el cerebro es un factor de riesgo para desarrollar EA, como es en el caso de traumatismos [95]. El Cu(II) aumenta la agregación de β A a pH ácidos (pH 6.6), aunque β A une en relación equimolar Cu(II) y Zn(II) a pH 7.4, el cobre desplaza al zinc del complejo con β A a pH 6.6 al ocupar el sitio de coordinación de histidina [44]. A pH 7.4 ambos iones compiten por su unión con β A. A pH 5.5 el Cu(II) mantiene su unión a histidinas, mientras que el Zn(II) parece perder sus interacciones específicas. El bajo pH imita la acidosis asociada al proceso inflamatorio *in vivo* [96]. Estos resultados sugieren que a condiciones no ácidas, la unión de zinc puede contribuir a la disminución en la citotoxicidad de β A catalizada por Cu(II), ya que el Zn no es activo redox [96]. A condiciones ácidas, el efecto protector del Zn(II) disminuye, ya que compite en menor grado con el Cu(II) por el sitio de unión a β A [96]. A un intervalo de pH de 7 a 4 la constante de disociación oscilan entre 3.5×10^{-8} M a 8.7×10^{-3} M [95]. A pH 5 a 6, la débil afinidad de Cu(II) por β A aumenta el estrés oxidativo [95].

De manera semejante al cobre, el zinc también presenta un efecto bifásico en la citotoxicidad, concentraciones mayores a 1 mM aumentan la toxicidad de β A, esto no es sorprendente, ya que, altos niveles de zinc son tóxicos.

Concentraciones bajas de zinc protegen de la citotoxicidad de β A. Los mecanismos exactos de estos efectos son hasta el momento desconocidos. Algunas propuestas sobre las cuales el zinc confiere citoprotección es a través del bloqueo de los canales de calcio membranales formados por β A y por el aumento en la actividad de la bomba ATPasa Na^+/K^+ que podría rescatar a las células de la toxicidad de β A [44]. Otro mecanismo propuesto es que el zinc protege a la célula al competir con el cobre (o hierro), el zinc modifica la conformación de β A impidiendo que el cobre acceda al sitio de unión [44, 97]. Incluso el exceso de Zn por encima de los complejos Cu o Fe- β A, previene la producción de H_2O_2 *in vitro* [44, 97]. Esto sugiere que el zinc induce la agregación de β A posiblemente en una forma fisiológica benéfica para EA, protegiendo a β A de interacciones oxidativas con cobre o hierro [44].

Los iones metálicos pueden tener un impacto en la agregación de dos formas: por actividad redox y por unión y subsecuente cambio estructural, sin enlaces covalentes (sólo los enlaces de coordinación) [49]. El Zn(II) y el Cu(II) se unen a β A y tienen un impacto profundo en la agregación, promoviendo su precipitación [78]. Un estudio sugiere que Cu(II) y Zn(II) a concentraciones bajas (1 μM y 4 μM , respectivamente) disminuyen la población de oligómeros y la precipitación no es afectada, lo que sugiere que las concentraciones fisiológicas de cobre y zinc pueden alterar la estabilidad de los oligómeros tóxicos de β A e influyen en el curso de la neurodegeneración [78]. Una concentración micromolar de zinc es suficiente para precipitar a β A *in vitro* [44]. El efecto inhibitorio del zinc (IC_{50} = 1.8 $\mu\text{mol/L}$) es 3 veces mayor al del cobre [98]. El entender la forma en que los iones metálicos interactúan con β A para ensamblar estructuras tóxicas y elucidar el mecanismo de toxicidad son dos preguntas de interés que continúan en estudio y que son clave para el desarrollo de fármacos efectivos que prevengan o modifiquen la agregación de β A.

La agregación de β A y su toxicidad están relacionada con los iones metálicos. La adición de agregados preformados inicia la formación de fibras acelerada de

β A. La incubación prolongada del metal con los agregados preformados también provoca la formación espontánea de fibras, que son la forma más estable de β A1-42. Las mutaciones en los residuos de histidina 13 y 14 por alanina (H13A y H14A) reducen el efecto inhibitorio de los iones metálicos. Mientras que, H6A no tiene efecto significativo. Estos resultados sugieren que la unión del metal en la H13 y H14 previene la formación de la estructura β -cruzada. Los agregados de β A1-42 con Cu(II) son tóxicos a los cultivos neuronales en presencia de ascorbato, mientras que los monómeros y los agregados β A-Zn no lo son [98].

El estado de agregación y la estructura de β A pueden variar en el tiempo y el espacio por la influencia de su concentración, el pH y la concentración de iones zinc, cobre o hierro. La toxicidad de β A depende de su estado conformacional y de su longitud (40 o 42 residuos). β A en su conformación sin estructura repetitiva (del inglés, random coil) y no fibrilar es soluble y con efectos citotóxicos mínimos; por otro lado, la estructura ordenada de β A en hoja- β es insoluble, fibrilar y altamente tóxica [44]. La agregación de β A ocurre por un cambio conformacional de α -hélice o random coil a hoja- β en un proceso dependiente del tiempo, indicando que la formación de hojas- β son la clave para que el péptido se agregue [99]. Sin embargo β A aún en su forma de α -hélice, es capaz de generar estrés oxidativo en presencia de cobre [99].

El zinc induce agregados de β A a pH fisiológico (pH 7.4) diferentes a los inducidos por cobre en términos de su densidad y solubilidad; los agregados con zinc son más densos y menos solubles que los de cobre. Una concentración ≥ 1 μ M precipita a la β A1-40 sintética. El zinc mantiene a β A1-40 en conformación de α -hélice y el complejo es completamente reversible al usar agentes quelantes [44]. Aunque el Zn(II) es el único metal que a pH fisiológico precipita a β A y fomenta la formación de estructuras no fibrilares [97], el Cu(II) y Fe(III) inducen una agregación limitada de β A, la cual aumenta a pH ácidos [73]. Los agregados de Cu- β A son altamente estructurados y solubles, semejantes a los de Zn [44]. En 1997, Cuajungco y Less establecieron la hipótesis de que el zinc está ligado a EA no sólo por precipitar a β A. La hipótesis consiste en que niveles intracelulares

patológicos de zinc son liberados por la sinapsis que precipita a β A y compromete las funciones neuronales. En consecuencia, se producen respuesta inmunológica e inflamatoria, se forman los depósitos de β A-Zn y hay un desbalance en la homeostasis de Zn [44].

El Cu(II) está relacionado con promover agregados amorfos. En contraste con esta información, la presencia subestequiométrica del nivel de Cu(II) duplica la cantidad de fibras amiloides acelerando la nucleación y la elongación de las fibras [77]. Sugiriendo que la unión de Cu(II) a β A a pH fisiológico promueve que β A se acerque a su punto isoeléctrico, induciendo la asociación entre ella misma y la posterior formación de fibras [77]. El Cu(II) unido a β A es más tóxico a las neuronas que β A en ausencia de Cu(II), mientras que Cu(II) en ausencia de β A no es citotóxico [77]. El efecto parece ser específico de Cu(II), ya que Zn(II) inhibe la formación de fibras [77]. El papel que juega el Cu(II) al acelerar la cinética de agregación y promover la muerte neuronal, sugiere que la pérdida en la homeostasis de Cu(II) es un factor de riesgo en EA [77]. Otro estudio indica que concentraciones subestequiométricas de Cu(II) inhibe la formación de fibras [94]. En particular, se ha planteado que las concentraciones de Cu(II) sub y supra-estequiométrica actúan en sentido contrario, acelerando y previniendo la formación amiloide de β A1-42, respectivamente [100]. Utilizando condiciones cercanas a las fisiológicas se demostró por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y ensayos con tioflavina T (ThT) que concentraciones sub y supra-estequiométricas de Cu(II) previenen el ensamble de β A1-42 [100]. Se ha visto que el Cu(II) modifica la formación de agregados fibrilares en morfología y cinética [101]. El efecto del Cu(II) en el proceso de agregación de β A continúa en controversia, ya que se ha visto que el Cu(II) puede acelerar o inhibir la agregación de acuerdo a las condiciones experimentales [94].

En Cu(II) y el Zn(II) a concentraciones micromolares supra-estequiométricas en comparación con β A tienden a formar agregados amorfos (precipitación) y

fibras amiloides por auto-ensamblaje, estos iones metálicos tienen su mayor efecto en la etapa de nucleación de la cinética de agregación, el impacto es específico del metal, afectando la concentración y el tipo de las estructuras intermedias de la agregación, la unión del metal cambia la estructura y la concentración de β A, por último, la disminución de pH (< 7.4) favorece la agregación en forma de precipitación y no en forma de fibras, los cambios estructurales parecen ser relevantes en la formación amiloide de la β A [49].

El efecto del pH también modifica la cinética de agregación de β A. A bajo pH el Cu(II) acelera la formación de fibras, mientras que el Zn(II) la inhibe [96]. A pH neutro y diferentes concentraciones Cu(II)- β A la vía de agregación de β A se modifica [96]. Estudios del efecto de cobre y zinc en la agregación de β A son controversiales, por ejemplo, se ha reportado que el Zn(II) puede inhibir pero también acelerar la formación de fibras. En el caso de fibras obtenidas de cerebros *postmortem*, la quelación de zinc aumenta la solubilidad de β A. El Cu(II) sufre la misma polémica, se ha sugerido que bajas concentraciones de cobre desestabiliza los oligómeros de β A e inhibe la formación de fibras [94].

Los iones metálicos aumentan la forma polimórfica de los oligómeros amiloides. La naturaleza polimórfica se explica por la presencia de dos posibles escenarios de interacción β A-metales, el primero consiste en la unión del metal a un monómero de β A con subsecuente ensamble para formar oligómeros a partir de un monómero con metal; y la segunda contempla la unión del metal a un núcleo preformado de β A [94]. La unión de los metales a β A podrían tener un impacto en la nucleación, la elongación y por lo tanto la fibrilización. En la fase de elongación, se ha reportado una reducción por Cu(II) y Zn(II) sobre β A1-42. El mayor impacto de Cu(II) y Zn(II) ha sido reportado en la fase de nucleación y la inhibición de la formación de fibras amiloides. Por lo tanto, Cu(II) y Zn(II) inducen un rápido ensamble hacia agregados amorfos y fomentan una lenta formación de fibras, indicando que las fibras son el estado termodinámicamente más estable

[49]. La vía exacta por la que el metal afecta la nucleación y la elongación es hasta el momento desconocida [49].

1.4. Terapia actual para Alzheimer.

En el desarrollo de fármacos para la enfermedad de Alzheimer existen los de primera y de segunda generación [16]. Los fármacos de primera generación se enfocan en disminuir los síntomas pero no modifican la progresión de la enfermedad (tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina y memantina) [16, 102-106]. Los fármacos de segunda generación buscan modificar la evolución de la enfermedad (ver sección 1.5), considerando como blancos terapéuticos aquellas vías responsables de los síntomas clínicos como es el proceso de formación de los depósitos de β A, las marañas neurofibrilares, la pérdida de la homeostasis de iones metálicos, el estrés oxidativo, la inflamación y el metabolismo del colesterol [17]; por lo que muchos de ellos siguen en investigación.

Los inhibidores de la acetil colinesterasa (AChE) son fármacos muy utilizados en el tratamiento sintomático para EA. La enzima colina-acetiltransferasa (ChAT) se encarga de la síntesis presináptica del neurotransmisor, acetil colina. En los cerebros de pacientes con EA, la actividad de esta enzima está disminuida. La reducción de la actividad de ChAT y de acetil colina se relaciona fuertemente con el déficit cognitivo presente en los pacientes con EA [64, 107]. Entre los inhibidores de la AChE se encuentran, Tacrina (tetrahydroaminoacridina), Donepezil (aricept, E2D2D), Galantamina, Rivastigmina, Exelon R y Metrifonato [64, 107, 108]. Dichos medicamentos incrementan la concentración y la duración de la acetilcolina en la sinapsis [107]. Los efectos adversos incluyen confusión, alucinaciones, cambios de comportamiento, náuseas y dolor estomacal [64]. La interacción de β A con AChE favorece la agregación de β A y la toxicidad [64]. La siguiente generación de fármacos basados en la interacción con AChE aún en estudio, involucra el enfoque dual de moléculas que contengan la inhibición con AChE en combinación con anti-agregantes de β A o inhibidores de la β -secretasa

o antioxidantes o antagonistas de los canales de calcio o inhibidores de las monoamino oxidasas o quelantes de iones metálicos [64, 109, 110]. Tomando en cuenta el papel que juega el calcio en la muerte celular por apoptosis en EA, un fármaco de uso común es el antagonista de los receptores NMDA, llamado memantina, que al igual que el donepezil muestra beneficios cognitivos en pacientes con EA moderada o severa [64, 102, 105, 111].

En EUA, Europa, Australia, Nueva Zelanda, Japón y muchos países de Asia, los medicamentos aprobados para la venta consisten en: 5 inhibidores de colinesterasa, memantina, el extracto de *Ginkgo biloba* (EGb 761) y cerebrolisina [102]. El antipsicótico respiridona fue aprobado en Reino Unido, España y Canadá para el tratamiento de la agitación, la psicosis, la demencia y la alteración en la conducta provocados por EA [102].

El uso de estrógenos en EA incrementa la densidad de botones sinápticos, el flujo sanguíneo, interactúa con el factor de crecimiento nervioso, actuando en el sistema colinérgico y previniendo la muerte celular. A pesar del efecto neuroprotector de los estrógenos, su uso para EA es limitado por los efectos adversos, por ejemplo, el carcinoma uterino y la feminización en hombres, entre otros [107]. Para regular el desbalance en la formación de radicales libres ocasionada en EA, se utilizan antioxidantes naturales como la vitamina E, ya que son capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, oponiéndose al proceso de envejecimiento y neurodegeneración progresiva [107].

Dentro de los tratamientos utilizados para aminorar las manifestaciones conductuales se encuentran los antipsicóticos como la tioridazina, el haloperidol, la clorpromacina, la clozapina y la risperidona [107]. Las benzodiacepinas pueden tener mayores efectos colaterales y menor efecto en aliviar la agitación, la ansiedad, el insomnio, la agresividad y la confusión que los antipsicóticos. Sin embargo, son de ayuda para controlar la agitación sólo en aquellos pacientes donde la ansiedad es prominente [107]. Otros agentes recomendados incluyen la

carbamazepina, la trazadona, la buspirona, los inhibidores de la recaptación de serotonina y los betabloqueadores como el propranolol [107].

Los antidepresivos se utilizan para mejorar la calidad de vida del paciente, su apatía y su estado cognitivo. El tratamiento inicial por elección son los inhibidores en la recaptura de serotonina, como la fluoxetina, la paroxetina y la sertralina [107].

En el 2012 se reportaron 75 fármacos en estudios clínicos y 200 moléculas o más están en desarrollo como posibles fármacos enfocados a EA [112]. También hay tratamientos no farmacológicos para EA. Para tratar el trastorno del sueño que tienen los pacientes con EA se recomienda fomentar las actividades físicas y mentales durante el día y evitar la ingesta de líquidos por la noche, en caso de que no sea suficiente, se recomienda tratamiento con hidrato de cloral, zolpidem, antipsicóticos a bajas dosis y con menos resultados, benzodiacepinas [107]. Las alternativas no invasivas consisten en la estimulación magnética transcranial que continúa en estudio de fase 2 en pacientes con EA como tratamiento sintomático para mejorar la memoria y la estimulación transcranial directa a las áreas corticales [112, 113].

1.5. Estrategias terapéuticas para disminuir la agregación de β A.

En base a la hipótesis amiloide, han surgido diferentes alternativas terapéuticas, conocidas como fármacos de segunda generación. Dichos fármacos atacan diferentes puntos de la cascada de formación amiloide: producción, acumulación, remoción y toxicidad asociada a β A [103, 104]. Por ejemplo, para disminuir la producción de β A se usan inhibidores de la producción de APP y de secretasas, para reducir la acumulación de β A se utilizan inhibidores de agregación amiloide (del inglés, *β -breakers*) o se aumenta la remoción del péptido β A como es el caso en la inmunoterapia [13, 16, 114-117]. También se

ha abordado el enfoque de la hipótesis de β A y los iones metálicos, donde se utilizan moléculas quelantes para disminuir la interacción β A-metales.

1.5.1. Inhibidores de la producción de β A.

El corte de APP por la β -secretasa (BACE-1) es el primer paso para producir a β A, ratones *knock out* de BACE-1 se desarrollaron normalmente y no presentaron producción de β A [103, 108]. El inhibidor selectivo de BACE-1, llamado GSK188909, redujo el nivel secretado e intracelular de β A1-40 y 42 *in vitro* e *in vivo* [103]. El inhibidor KMI-429 en administración hipocampal en modelo de ratones transgénicos de APP, mostró disminución en la producción de β A [108]. Los inhibidores de β -secretasa continúan en estudio y hasta el momento no hay estudios clínicos de su efecto [103]. La inhibición de la γ -secretasa reduce la producción de β A, pero al tener otros sustratos, los estudios preclínicos indicaron anomalías en el tracto gastrointestinal, timo y bazo [103]. El inhibidor de la γ -secretasa, Semagacestat (LY450139 dihidratado), utilizado en pacientes con EA mostró una disminución significativa en los niveles de β A en plasma, pero no en líquido cefalorraquídeo [15], el inhibidor GSI-953 tuvo el mismo efecto dosis dependiente [17, 103]. R-flurbuprofeno no tuvo beneficios debido a que la concentración que llegaba al cerebro no era suficiente [15, 118]. Tarenflurbil (Flurizan) otro inhibidor de la γ -secretasa ni Latrepirdin (Dimebon) tuvieron éxito en fase 3 [15, 105]. El desarrollo de inhibidores de β y γ secretasas está basado en la hipótesis de que los depósitos de β A es por la sobreproducción de APP, sin embargo, esta hipótesis sólo aplica en casos de EA familiar causada por mutaciones genéticas [106].

1.5.2. Estrategias para aumentar la remoción de β A.

Una alternativa al uso de inhibidores de secretasas que no interfiere con los procesos proteolíticos fisiológicos es inhibir la agregación de β A. El tramiprosato (Alzamed) es un glicosaminoglicano mimético que se une a β A e inhibe la formación de la placa amiloide por inhibición de los oligómeros [15, 105], estudios preclínicos muestran que el tramiprosato reduce los niveles de β A en plasma y en el cerebro; en fase 2 mostró un perfil seguro, bien tolerado y reduce el nivel de β A1-42 en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA. La fase 3 de tramiprosato no fue exitosa en EUA (datos no publicados) y en Europa se suspendió su uso [17, 103]. El colistrinin es un polipéptido rico en prolinas (ReGen Therapeutics) que inhibe la agregación de β A y la neurotoxicidad *in vitro* e incrementa la cognición en modelos animales [17]. En un estudio con pacientes que duró 3 semanas se demostró que colistrinin es bien tolerado [17]. En otro estudio de fase 2 de 15 meses mostró ligero beneficio en la memoria de los pacientes con EA, sin embargo, este ligero beneficio no se mantuvo durante otros 15 meses [17].

Con la finalidad de aumentar la remoción de β A, se han identificado enzimas que degradan a β A, por ejemplo, la neprilisina, la degradadora de insulina, la plasmina, la convertidora endotelial y la convertidora de angiotensina [108]. La inhibición de neprilisina o *knock out* en ratones mostró decremento en la remoción de β A y en la cognición; mientras que su sobreexpresión resultó en una mejora de la memoria y en la remoción de β A [108]. Otra alternativa para la remoción de β A es la inmunoterapia. La inmunoterapia ha demostrado tener efecto en la remoción de β A, incluso en placas [19, 118]. La inmunoterapia puede ser pasiva o activa, la pasiva se refiere a la administración de anticuerpos monoclonales anti- β A; la activa involucra la administración de β A o de fragmentos de β A para activar el sistema inmune del paciente y él mismo produce los anticuerpos anti- β A [19, 119]. El β A completo o los fragmentos pueden ser acompañados de algún adyuvante con la intención de estimular la respuesta inmune [119]. La concentración y la naturaleza de los anticuerpos varía en cada paciente, y algunos no generan los títulos suficientes para detectar algún efecto [119]. En

1999, Schenk y colaboradores demostraron que la administración de β A1-42 a ratones transgénicos que sobre expresan APP (PDAPP) previene la formación de placas amiloides y disminuye la distrofia neurítica y astrogliosis [119]. El mismo grupo de investigación demostró que la "vacuna" o inmunoterapia activa, protege a los ratones doble transgénico (APP+PS1) de desarrollar el déficit de aprendizaje y memoria [119]. Estudios preclínicos con inmunoterapia activa mostraron que el anti- β A administrado periféricamente, entra al sistema nervioso central y se une a las placas de β A, disminuyendo la placa en un 86% en comparación con los controles [119]. En un estudio clínico fase 2 con inmunoterapia activa, se utilizó un péptido sintético de β A, llamado AN1792, mostró una disminución en el deterioro funcional, pero no tuvo éxito en disminuir las especies tóxicas de β A [114] y los efectos adversos consistieron en mareo severo, desorientación y meningoencefalitis [15, 103, 114, 119]. Otros anticuerpos para inmunoterapia activa son ACC-001 (BA1-7), AD02 (BA1-6), CAD106 (BA1-6) y V950 (BA multivalente), los cuales han llegado a estudios de fase 1 y 2 [119]. La capacidad de los anticuerpos endógenos y exógenos para neutralizar los oligómeros de β A es una estrategia que sigue en estudio [120].

Por otro lado, la inmunoterapia pasiva se ha evaluado en estudios clínicos fase 1, 2 y 3. Algunos anticuerpos son: bapineuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado que identifica la región N-terminal de β A), IVIG (inmunoglobulina intravenosa que contiene anti- β A), solanezumab (anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce la región media de β A), gantenerumab (anti- β A monoclonal), ponezumab (anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce los residuos 33-40 de β A1-40) y BAN2401 (anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce selectivamente y elimina las protofibras de β A) [15, 119]. El hecho de que la inmunoterapia pasiva esté en fase 3 es alentador, sin embargo, el número de pacientes que muestran beneficios es limitado [118]. La inmunoterapia demuestra que se puede reducir la cantidad de carga amiloide, pero cuando se administra a finales de la enfermedad, no es una cura eficaz [118].

1.5.3. Inhibidores de la agregación de β A.

El uso de elementos β -breaker es una forma de inhibir la formación amiloide [65]. Los péptidos β -breakers tienen la capacidad de interactuar específicamente con β A e interferir la formación de hojas- β , por lo que se consideran una herramienta para inhibir la formación de depósitos amiloides [121, 122]. La hipótesis alrededor del mecanismo de acción de los β -breakers consiste en dos eventos moleculares: primero por la unión entre el β -breaker y β A; segundo desestabiliza la conformación de hoja- β [122]. El reconocimiento de unión puede estar mediado y estabilizado por interacciones hidrofóbicas entre el β -breaker y β A [122]. Por ejemplo, el fluoróforo llamado tioflavina T (ThT) y los derivados de carbazol-cianina son considerados β -breaker por su alto reconocimiento hacia β A. Los derivados de carbazol-cianina inhiben la agregación de oligómeros de β A1-40, protegen de la neurotoxicidad, no son tóxicos y son permeables a la barrera hematoencefálica [123]. Uno de los enfoques en el diseño de fármacos para EA es bloquear la oligomerización de β A a tiempos tempranos [122]. Para predecir el efecto de la molécula hacia β A se utilizan herramientas *in silico*. Una molécula que inició por diseño de simulación dinámica es la [Nle³⁵,D-Pro³⁷]A β ₄₂, la cual forma una estructura estable que facilita su estudio por resonancia magnética nuclear y otros estudios *in vitro*. [Nle³⁵,D-Pro³⁷]A β ₄₂ estabiliza los trímeros de β A1-42 y previene la formación de fibras maduras [124].

Un estudio piloto de Soto y colaboradores mostró el potencial que tiene el aminoácido natural: prolina, como β -breaker en el diseño de inhibidores pentapeptídicos del ensamble de β A [65]. Estos inhibidores fueron efectivos *in vitro* e *in vivo*, pero su potencial como fármacos fue limitado por su tamaño, naturaleza peptídica y falta de biodisponibilidad al ser administrado por vía oral [65]. A pesar de que la estrategia de β -breaker fue sugerida para la inhibición de la formación de fibras maduras, también es válida para la formación de oligómeros tempranos por su alto contenido de hoja- β [65]. Los inhibidores del

formación amiloide deben tener reconocimiento aromático y un β -breaker en el C-terminal [65].

Los péptidos representan una poderosa herramienta terapéutica, sin embargo, el uso de fármacos peptídicos tiene la limitante de su pobre biodisponibilidad al cerebro debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, a que son fácilmente metabolizados por las enzimas y son altamente removidos por el hígado. Múltiples estrategias han sido estudiadas para contrarrestar estas desventajas, por ejemplo, el uso de glicosilaciones, aminoácidos no naturales (con estereoequímica D, α -metilado, entre otros), conjugación a grupos voluminosos como PEG, metilaciones para disminuir los puentes de hidrógeno y el uso de vectores que fomenten la endocitosis. Por ejemplo, se han empleado liposomas, nanopartículas y anticuerpos monoclonales que son reconocidos por transportadores en la barrera hematoencefálica [125]. Se ha demostrado que modificaciones químicas en los péptidos incrementan sus propiedades farmacológicas [122].

Algunos inhibidores de la agregación amiloide son péptidos o peptidomiméticos, generalmente basados en la región amiloidogénica de β A, los residuos del 16 al 20 de β A (KLVFF) [106, 117, 126-132]. La formación amiloide puede ser inhibida utilizando péptidos homólogos a β A (residuos 17-21, secuencia LVFFA) [122, 133-136] con un grado similar de hidrofobicidad pero con poca tendencia a adoptar una conformación de hoja- β incorporando residuos de prolina como β -breaker y aminoácidos con estereoequímica D para conferir resistencia proteolítica [134]. Otra región de β A que ha sido probada para interferir con la formación de fibras es la región del C-terminal (residuos 29-42, VVIA) y su derivado el peptapéptido RVVIA [133]. Un tetrámero de KLVFF llamado K₄ mostró ser efectivo en la inhibición de la agregación de β A1-42 en su forma de oligómeros y protofibras en una manera dependiente de la concentración [127]. El acople del péptido KLVFF con el quelante cicleno permite la coordinación de Cu(II) mostrando que el complejo interfiere con la agregación

de β A, previene la formación de H_2O_2 y disminuye la toxicidad en cultivos neuronales. Por lo tanto las moléculas que interactúan con β A y unen al Cu(II) son prometedoras para regular la agregación de β A [137]. Los resultados prometedores en el uso de la región KLVFF produjo el diseño de péptidos basados en esta secuencia pero modificados mediante la adición de grupos voluminosos, secuencias cargadas o polietilenglicol a sus extremos, o por N-metilación, sustitución de una amida de la cadena principal por un éster, y mediante la sustitución de algún residuo con prolina [126].

El péptido β -breaker de 5 residuos llamado iAB5 (LPFFD) previene la fibrillogénesis y neurotoxicidad de β A en estudios *in vitro*, celulares y modelos de animales [122, 138]. KLVFF y LPFFD se unen fuertemente a β A1-40, pero KLVFF tiene menor afinidad de unión que LPFFD [52, 128, 139], sin embargo muestra una pobre estabilidad *in vivo* [122]. Si iAB5 está unido covalentemente a polietilén glicol (PEG), el péptido conserva la capacidad de unirse a β A y por lo tanto, de inhibir la formación amiloide, además de prevenir apoptosis [140]. Otra variante del iAB5 es el péptido iAB5p (acetilado-LPFFD-amidado) que se diseñó para ser resistente a la degradación proteolítica y tener una buena permeabilidad para cruzar la barrera hematoencefálica [121, 136]. El efecto protector de iAB5p con administración intraperitoneal, fue estudiado en un modelo de rata con déficit en el comportamiento inducido por inyección intrahipocámpal de fibras de β A [121]. El tratamiento con iAB5p mostró una protección de los daños inducidos por los depósitos de β A en el hipocampo dorsal y una dramática disminución de los depósitos amiloides en dos modelos transgénicos diferentes, además de tener baja toxicidad, baja inmunogenicidad y alta solubilidad, pero una baja vida media *in vivo* [121, 141, 142]. Con el objetivo de aumentar la estabilidad, mantener o mejorar la potencia, el cruce por la barrera hematoencefálica, la solubilidad y la baja toxicidad de iAB5p, se sintetizaron péptidos modificados con metilación en los nitrógenos de las amidas y en el carbono- α , protección de N-terminal, modificación en las cadenas laterales de la prolina o la fenilalanina; dando como resultado que el perfil farmacológico de los péptidos β -breakers puede ser

mejorado produciendo compuestos que contengan las propiedades de un fármaco [141]. Por lo tanto, es posible que un tratamiento no invasivo con péptidos β -breakers tenga potencial farmacológico [121].

Un peptidomimético que involucra β -aminoácidos es el heptapéptido $\beta\beta$ KLVFF (donde los residuos de alanina son β -aminoácidos) mostró capacidad de unión a β A1-42, modificando su fibrilización [117]. El uso de aminoácidos no naturales como los β o γ -aminoácidos y el Aib es efectivo para modular la agregación de proteínas, no solo de β A sino también de la α -sinucleína. También se ha demostrado que ayudan a aumentar la resistencia proteolítica y conferir estabilidad a la molécula [117], como es el caso del dipéptido no natural D-Trp-Aib [65].

Algunos ejemplos de péptidos que han sido efectivos en estudios *in vivo* y en humanos consisten en: los derivados de KLVFF: iAB5 (LPFFD), iAB5p (acetilado-LPFFD-amidado), LPYFD-amidado, metil-LVFF, LVFFL [52], GVVIA-amidado y RVVIA-amidado [128], LPFFD y DPFFL [143]; el dipéptido: D-Trp-Aib [65]; los bloqueadores de la interacción de β A: acetilado-VHHQKLPFFAEDVGSNK-amidado; el compuesto antiinflamatorio y antioxidante acetilado-DWFKAFYDKVAEKFEAF-amidado; y una combinación de las librerías de péptidos RPRTRLHTHRNR [116], RGTWEGKW [52].

Algunos ejemplos de compuestos β -breakers se muestran en la figura 10. Entre otras moléculas que se han reportado que retardan la formación de fibras amiloides *in vivo* e *in vitro* se encuentran la nicotina, ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), ácido rosmarínico (RA), rifampicina (RIF), ácido tánico, curcumina, ácido acetilsalicílico, melatonina, α -cristalina Hsp20, surfactantes di-C6-PC (1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina y di-C7-PC (1,2-diheptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina) [144], benzofuranos [145] y nanogeles [146].

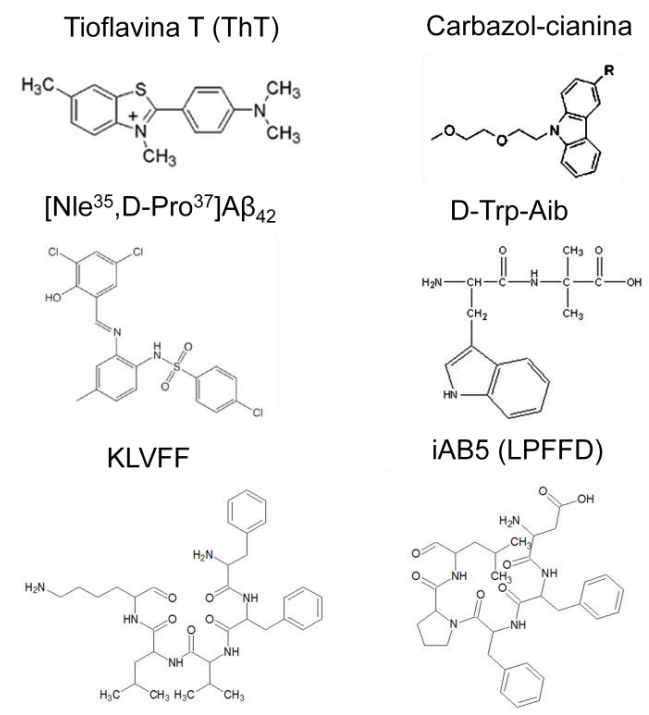


Figura 10. Algunos compuestos β -breakers citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: ThT [147], carbazol-cianina [123], [Nle³⁵,D-Pro³⁷]Aβ₄₂ [124], D-Trp-Aib [65], KLVFF [131], iAB5 [138].

El uso de polifenoles naturales como el té verde, el vino (por su contenido de resveratrol), la fresa, la curcumina, la vitamina A, C y E, la coenzima Q, el selenio y los ácidos grasos poliinsaturados (omega 3 o DHA) representa una alternativa terapéutica para EA. Estos compuestos han sido bien caracterizados como antiinflamatorios, antioxidantes y agentes quelantes de hierro y cobre y se ha demostrado que tienen actividad neuroprotectora [71, 103]. Los mecanismos moleculares y celulares por los que los polifenoles ejercen su actividad neuroprotectora contemplan a PKC, ERK1/2, NK-kB y Akt [71]. Muchos polifenoles han demostrado que poseen efectos anti-amiloidogénicos, protegen a las células de la neurotoxicidad inducida por βA y regulan la producción de βA en cultivo celular e *in vivo* [71]. El polifenol llamado galato de epigallocatequina (EGCG) que se encuentra en el té verde, inhibe eficientemente la fibrillogénesis de la proteína α-sinucleína y βA y promueve la formación de oligómeros amorfos

por su unión directa a los polipéptidos en su forma naturalmente desplegada y previene su conversión a la forma tóxica, lo que sugiere que modifica el proceso de agregación [7, 148]. Por lo tanto, estos compuestos continúan en estudio ya que pueden ser considerados como quelantes naturales, agentes que permean al cerebro y actúan sobre múltiples blancos para prevenir o retrasar la muerte neuronal [71].

1.5.4. Inhibidores de la interacción metal- β A.

Las dos enfermedades relacionadas con aumento en el nivel de cobre son la degeneración de los ganglios basales en la enfermedad de Wilson y la neurodegeneración cortical en Alzheimer [149]. Una hipótesis alrededor de la presencia de cobre consiste en que la neurodegeneración es causada por la acumulación de Cu en el cerebro. En la enfermedad de Wilson se utilizan los agentes quelantes BAL, trietilentetramina (TETA) y penicilamina para liberar al cobre de los reservorios y aumentar su excreción vía urinaria [150]. Basándose en la experiencia con el tratamiento utilizado en la enfermedad de Wilson, se sabe que el cobre libre en plasma es la forma más tóxica del metal [149]. El cobre libre cataliza la formación amiloide, genera estrés oxidativo, radicales libres y degeneración de las neuronas corticales [149].

En un estudio de 47 pacientes con EA, 24 con demencia vascular y 44 individuos sanos como controles, se midió la concentración de cobre en suero. El promedio de la concentración de cobre en los pacientes con EA fue significativamente mayor que el resto de los grupos. Lo que sugiere que la concentración de cobre libre está involucrada en la neurodegeneración presente en EA [149]. En otro estudio doble ciego, 17 pacientes con AD se sometieron a 600 mg/día de penicilamina y 17 individuos sanos con placebo durante 6 meses. Los pacientes no presentaban envenenamiento por cobre libre y el tratamiento se enfocó en la acumulación de cobre, teniendo como objetivo aumentar la excreción de cobre vía renal, reducir el estrés oxidativo y disminuir la progresión

del deterioro cognitivo. Sólo 9 pacientes de cada grupo completaron el estudio. De los pacientes tratados con penicilamina, 1 murió de infarto cardiaco y 4 tuvieron serios efectos adversos. El estudio piloto fue detenido por el comité de ética [149]. Esta evidencia señala la importancia de realizar estudios cuidadosos basados en la terapia con agentes quelantes. Por ejemplo, el cobre es un metal esencial para la vida, donde su deficiencia puede comprometer el buen funcionamiento de enzimas, disminuyendo su actividad catalítica [151].

El principio de una molécula terapéutica cuyo blanco es un sitio de unión a metal en una proteína es actualmente descrito en farmacología. Algunos antibióticos, anticonvulsivos, antitumorales y antiinflamatorios ejercen sus efectos farmacológicos mediante la interacción con Cu, Zn o Fe. Por ejemplo, disulfiram bloquea la actividad enzimática al quelar el zinc del sitio activo de alcohol deshidrogenasa. Antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina, diflunisal, ibuprofeno, naproxen sódico, indometacina, d-penicilamina, entre otros, bloquean el sitio catalítico homo-Fe en la vía ciclooxigenasa/ácido araquidónico [83].

Se han diseñado moléculas peptídicas de origen natural para quelar cobre. Dos quelantes de Cu(II) que se encuentran en el suero humano y en el líquido cefalorraquídeo son los péptidos DAHK y GHK [151]. DAHK corresponde a la secuencia en el N-terminal del sitio de unión a metales, principalmente Cu(II) de la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés). GHK es la unión a cobre de un factor de crecimiento en el plasma. El Cu(II) se coordina a DAHK en una geometría ligeramente distorsionada de cuadrado plano por 4 átomos de nitrógeno, correspondientes a la amina del N-terminal, al enlace peptídico entre Asp-Ala y Ala-His y al del anillo imidazol de la histidina [151]. El Cu(II) se coordina a GHK en el grupo amino del N-terminal de la glicina, al nitrógeno del enlace peptídico entre Gly-His y al nitrógeno del anillo imidazol de la histidina [151]. El tripéptido GHK incrementa la viabilidad celular y compite con β A por el Cu(II), por lo tanto, es un neuroprotector. DAHK y GHK unen Cu(II) en una estequiometría

1:1 a pH 7.4 con constantes de disociación de $2.6 \pm 0.4 \times 10^{-14}$ M y $7.0 \pm 1.0 \times 10^{-14}$ M, respectivamente [151]

La presencia de los iones metálicos cobre, hierro y zinc en las placas amiloides son clave en la modulación de la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Fármacos con potencial para unir a los metales (quelantes) podrían desagregar los depósitos de placas amiloides o modificar el proceso de agregación. El interés en el desarrollo de fármacos con propiedades quelantes ha ido en aumento, debido a que representan una alternativa para atenuar las interacciones anormales β A-metales sin causar alteración sistémica de los metales esenciales [72].

La investigación sobre las moléculas pequeñas dirigidas a las interacciones β A-metales actualmente ha tenido gran avance llegando a ensayos clínicos, sugiriendo que el desarrollo de fármacos al rededor de la hipótesis de metales en el desarrollo de EA podría ser una estrategia terapéutica prometedora [72]. Aunque existen fármacos quelantes para enfermedades como Wilson y la artritis reumatoide, el riesgo de una terapia quelante consiste en remover metales esenciales a niveles patológicos, por ejemplo, el déficit de Fe ocasiona anemia [72]. Por lo tanto, el diseño de moléculas con propiedades sofisticadas como especificidad ante los metales y cruce a través de la barrera hematoencefálica continúa en estudio [72].

El diseño racional de agentes quelantes requiere el estudio de la estructura electrónica y molecular del complejo metal-ligando [152]. Estudios teóricos de quelantes de Cu(II) utilizando cálculos de estructura electrónica usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT, del inglés, density functional theory), se han enfocado en el reconocimiento aromático. Los ligandos que se han considerado para sitios de unión a cobre tienen coordinación con átomos de nitrógeno de un heterociclo y un oxígeno de un OH desprotonado por el Cu(II) [152].

La inhibición en la acumulación amiloide puede ser un punto de intervención terapéutica. Agentes quelantes de cobre o zinc solubilizan las placas amiloides *in vitro* [153]. Algunos ejemplos de moléculas atenuadoras de la interacción metal-proteína, son los quelantes XH1, DP-109 disminuyen la patología de β A en ratones transgénicos de APP, mostrando mejoría cognitiva y disminución en el nivel plasmático de β A1-42 [103, 108]. La terapia quelante con el ácido etil-diamino-tetra acético (EDTA, por sus siglas en inglés) ha mostrado que interrumpe la estabilidad de los agregados de β A con los iones metálicos [154] e induce mejoría en pacientes con EA [155].

El clioquinol (5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolina) o PBT1 es un quelante de Cu/Zn que promueve la disolución de las placas de β A [103, 156]. El clioquinol tiene un efecto dual en presencia de cobre o zinc pero no de hierro, es decir, es capaz de desagregar a las fibras de β A1-40 inducidas por la presencia del metal por quelación y retardar la formación de fibras en presencia de cobre o zinc [157]. El clioquinol ha demostrado la reducción de placas amiloides corticales (49%) en un modelo *in vivo* de ratón transgénico (Tg2576), con tratamiento oral durante 9 semanas. Los resultados indican un aumento en la β A soluble (1.45%) y presencia de mejoría general comparado con los controles [72, 73, 153]. El clioquinol es hidrofóbico, capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y tiene afinidad nanomolar por el cobre y el zinc, que es suficiente para facilitar la disociación de estos metales en el sitio de unión de baja afinidad de β A [72]. Por lo tanto, el mecanismo de acción del clioquinol consiste en unir al Cu y Zn de la placa amiloide, promoviendo la disolución de la misma. Un mecanismo alternativo, consiste en modular los niveles de los iones metálicos, imitando la función de la metaloproteasa, es decir, el clioquinol une al Cu y lo internaliza, favoreciendo la degradación de β A [72]. Un estudio piloto en fase 2 mostró que el clioquinol administrado por vía oral en pacientes con EA moderadamente severo disminuyó la pérdida en la cognición y redujo el nivel de β A1-42 en plasma, en comparación con los controles [72, 103, 158]. El clioquinol a pesar de haber sido originalmente desarrollado como antibiótico, tiene la capacidad de cruzar la barrera

hematoencefálica, disolver las placas amiloides, reducir el nivel de β A1-42 en plasma y el deterioro cognitivo [155, 159]. Por lo tanto, el uso de compuestos que modulan la interacción metal-proteína y su relocalización a sitios benéficos representan una estrategia terapéutica prometedora. Sin embargo, en 1960 se reportó que el clioquinol disminuye el nivel de vitamina B₁₂ hasta niveles patológicos [159]. Los derivados de 8-hidroxiquinolinas han sido evaluados como compuestos multifuncionales para tratamiento de EA, mostrando selectividad hacia Cu(II), baja toxicidad y permeabilidad a la membrana hematoencefálica [160].

La segunda generación del clioquinol consiste en la molécula llamada PBT2 (Prana Biotechnology, Ltd.) [161]. PBT2 cruza de la barrera hematoencefálica, reduce significativamente el nivel de β A y las placas amiloides en un modelo de ratón transgénico Tg2576 y APP/PS1 [12, 72, 105]. Prana Biotechnology completó el primer estudio fase 2 de doble ciego y placebo como control utilizando 78 pacientes de EA. Los resultados revelaron que PBT2 es seguro y bien tolerado en dosis de 50 y 250 mg al día durante 12 semanas; y que el nivel de β A en líquido cefalorraquídeo fue significativamente menores con dosis de 250 mg en la semana 12. Además, los estudios neuropsicológicos indicaron que hubo mejoras en la cognición y en la fluidez verbal [72, 103, 105, 162-164]. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que PBT2 podría usarse en la clínica como tratamiento para EA [156].

A partir de la 8-hidroxiquinolina se desarrollaron moléculas no tóxicas, permeables a la barrera hematoencefálica y quelantes de Fe. Por ejemplo, el derivado del 8-hidroxiquinolina llamado VK28, se unió con el grupo N-propargilo que tiene la capacidad neuroprotectora del fármaco anti-Parkinsoniano rasagilina y seleginil (deprenil) [110, 155]. Entre estos compuestos se encuentran: M30 (5-[N-metil-N-propargilaminometil]-8-hidroxiquinolina; PM= 299.3) y HLA-20 (5-[4-propargilpiperazin-1-ilmethyl]-8-hidroxiquinolina; PM= 390.9). Estos últimos

compuestos fueron los más eficaces, potentes en quelar el Fe, eliminar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica de membranas [155, 165].

Una terapia alterna a la quelación enfocada a disminuir los efectos tóxicos del cobre, es la administración oral de Zn, con dosis 50 mg/día en suplementos alimenticios [149]. Una estrategia similar para normalizar los niveles de cobre en el uso de la molécula gtsm que contiene Cu(II) [glioalbis(N (4)-metiltiosemicarbazonato)CuII] para inhibir a la cinasa sintasa de glucógeno 3B (GSK3B). La inhibición *in vitro* de GSK3B, aumenta la expresión de la proteasas que degradan a β A y también GSK3B es capaz de fosforilar Tau. Por lo tanto, la acumulación de β A y la fosforilación de Tau pueden ser prevenidas *in vivo* por inhibición de GSK3B, al utilizar un agente que incremente la biodisponibilidad intracelular de cobre. El gtsm es capaz de disminuir los trímeros de β A y la fosforilación de Tau *in vivo*, el tratamiento con gtsm revirtió el déficit cognitivo de ratones transgénicos APP/PS1 [166, 167]. El gtsm es capaz de entregar cobre al interior de la célula y a diferencia del clioquinol, el gtsm no es capaz de competir por iones metálicos contra β A [167]. La figura 11 muestra algunos de los compuestos quelantes mencionados en el texto.

1.6. Una nueva estrategia terapéutica para Alzheimer: moléculas bifuncionales.

Las interacciones anormales entre iones metálicos y β A están asociadas a la patogénesis de EA. Modificar la interacción β A-metal usando agentes quelantes es una estrategia terapéutica prometedora para EA. Una de las nuevas vertientes en el diseño de fármacos modificadores de la enfermedad de Alzheimer plantea el diseño de moléculas bifuncionales. Una molécula bifuncional contiene en su estructura química una parte que tiene la función de quelar el metal y la otra que puede intercalarse en las placas amiloides [12] (fig. 12).

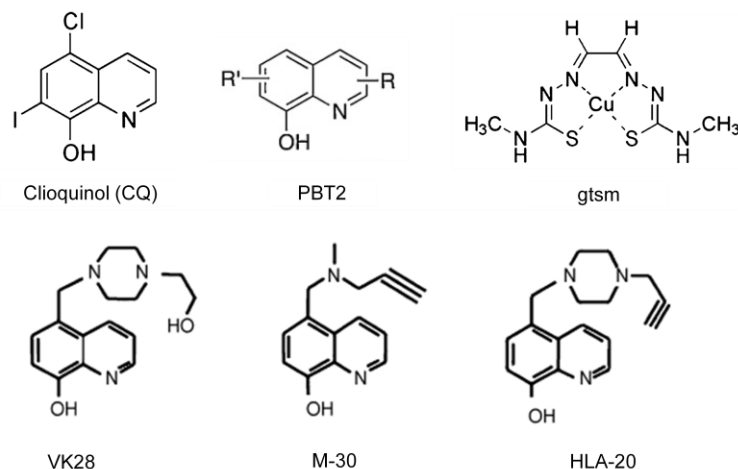


Figura 11. Algunos compuestos quelantes citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: clioquinol [156], PBT2 [156], gtsm [166], VK28 [155], M-30 [155] y HLA-20 [155].

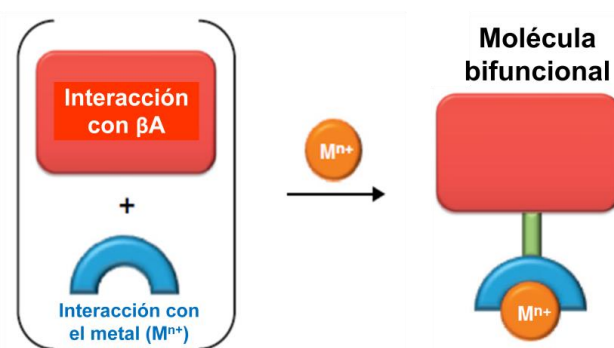


Figura 12. Esquema de una molécula bifuncional. Figura adaptada de la referencia [81].

Las estructuras base para la parte quelante son compuestos insaturados cíclicos ricos en hidroxilos y aminas desprotonadas, por ejemplo, el EDTA (ácido etiléndiaminotetraacético), el clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) y el ciclono (1,4,7,10-tetraazaciclododecano) [137, 158]. Dentro de las estructuras base para la parte de interacción con la β A sobresalen los compuestos insaturados ricos en anillos aromáticos e hidroxilos, por ejemplo, la tioflavina T (ThT, 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3,6-dimetilbenzotiazolio), la curcumina (((1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), el estilbeno (*N,N*-

dimetil-4-[(1*E*)-2-(4-iodofenil)etenil]benzenamina), algunos péptidos como el KLVFF que es una parte de la secuencia de β A y el IMPY (4-(7-iodoimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-*N,N*-dimetilnilina) [80, 117, 168-170] (fig. 13).

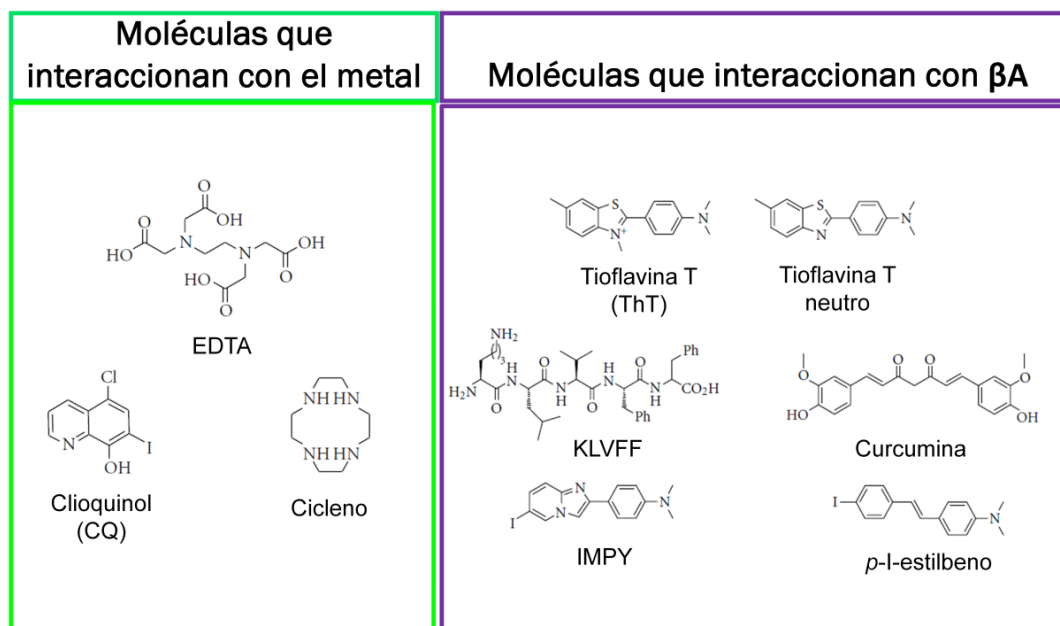


Figura 13. Algunos compuestos base utilizados para crear moléculas bifuncionales. Figura adaptada de la referencia [171].

Algunos ejemplos de moléculas bifuncionales reportadas son: L1-a (*N*-(piridin-2-ilmetil)anilina), L1-b (*N*1,*N*1-dimetil-*N*4-(piridin-2-ilmetil)-benzeno-1,4-diamina), L2-a (*N*-(piridin-2-ilmetil)anilina) y L2-b (*N*1,*N*1-dimetil-*N*4-(piridin-2-ilmetil)benzeno-1,4-diamina) cuya parte quelante está inspirada en el clioquinol y la interacción con β A sucede con la región aromática del estilbeno [80, 172, 173]. Otras moléculas bifuncionales reportadas combinan la propiedad intercalante con la β A de la tioflavina T (ThT) con la capacidad quelante del clioquinol, obteniéndose la molécula HBX [147]. La molécula MPY ha sido reportada como modulador de la agregación amiloide inducida por cobre, L2-b como un agente que desensambla los agregados de β A inducidos por cobre o zinc y HBX como un biomarcador potencial de la agregación amiloide [158]. La molécula bifuncional L2-NO (2-((4-(dimetilamino)benzil)amino)fenol) tiene una modificación

en la estructura química del L2-b, con la cual L2-NO es más reactivo ante cobre que zinc [174].

Las moléculas llamadas L1 y L2, combinan al N-(2-piridilmetil)amina como agente quelante con la estructura química de la tioflavina T (ThT) y de la o-vanilina para interactuar con β A. L1 y L2 tienen altas constantes de estabilidad con Cu(II) y Zn(II), por lo que se consideran buenos agentes quelantes para estos metales. También mostraron alta afinidad por β A1-42. Ambos compuestos son inhibidores eficientes en la agregación mediada por metales y promueven la desagregación de las fibras amiloides. La formación de oligómeros de β A1-42, en presencia del metal y de L1 o L2, aumenta la toxicidad en células, sugiriendo que la estrategia de fomentar la desagregación de las fibras amiloides, no es el camino terapéutico correcto, ya que conlleva a la formación de oligómeros tóxicos [175].

Un grupo de moléculas modificadas y funcionalizadas de la hidroxipiridinona interactúa con los iones metálicos modulando el estrés oxidativo. Estas moléculas pueden o no estar glicosiladas, el grupo glicosilado está diseñado para cruzar a la membrana hematoencefálica y posteriormente por acción de las enzimas se libera la parte glicosilada y deja funcional la parte que regula el exceso de los iones metálicos en el cerebro y protege a las neuronas de las especies de oxígeno reactivas. Los resultados *in vitro* mostraron que las moléculas tienen poder antioxidante y disminuyen la agregación de β A1-40 [176]. Una molécula bifuncional pequeña puede adquirir acceso a compartimentos relevantes farmacológicamente uniéndola a una chaperona, y de este modo obtiene un volumen necesario para interrumpir una interacción proteína-proteína como *β -breaker*. Las chaperonas son ideales para este propósito ya que se unen a proteínas plegadas o desplegadas a través de superficies hidrofóbicas expuestas sin modificar la interacción amiloide de la molécula bifuncional [106, 177].

XH1 es una molécula lipofílica con propiedad bifuncional de unión amiloide e iones metálicos unida covalentemente por enlaces amida que interacciona con β A de acuerdo a estudios con acoplamiento molecular (*docking*, en inglés). La molécula XH1 reduce la agregación de β A1-40 inducida por Zn(II) *in vitro* determinada por ensayos de turbidez, no es neurotóxica a concentraciones micromolares ni administrado de forma aguda a ratones transgénicos PS1/APP y es permeable a la barrera hemoencefálica [178]. FC-1 fue diseñado con la combinación de una unidad quelante y la unión de β A del ThT [179]. FC-1 es permeable a la membrana celular con una habilidad moderada de quelar al Cu(II) y Zn(II) y se puede unir a los oligómeros de β A-metal, sin embargo, al fomentar la formación de oligómeros, la toxicidad aumentó [179]. La figura 14 muestra algunos ejemplos de moléculas bifuncionales citadas en el texto.

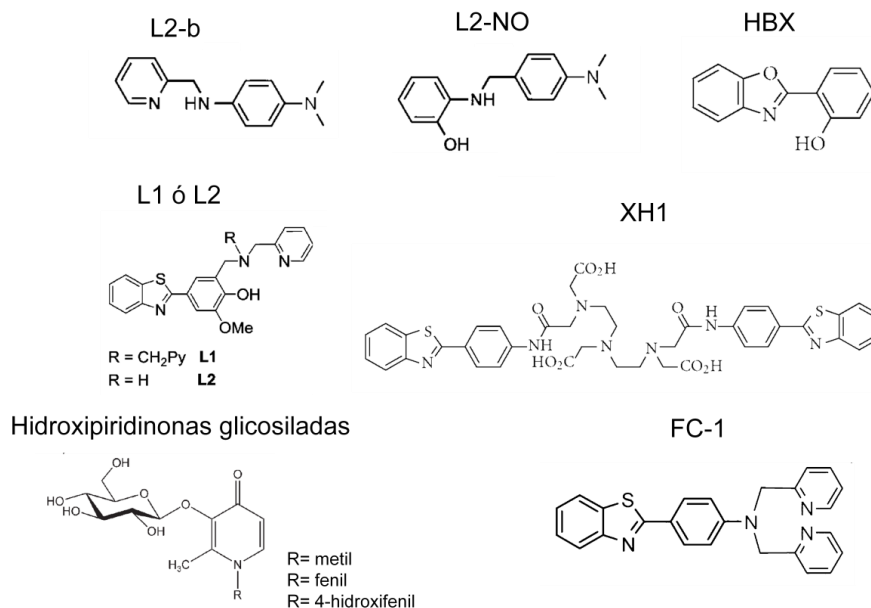


Figura 14. Algunos ejemplos de moléculas bifuncionales citados en el texto. Figura adaptada de las referencias: L2-b [172], L2-NO [174], HBX [147], L1 ó L2 [175], XH1 [178], hidroxipiridinonas glicosiladas [180] y FC-1 [179].

Para construir moléculas bifuncionales o multifuncionales con potencial farmacológico enfocado a enfermedades neurodegenerativas con agentes quelantes es necesario considerar ciertas propiedades que el ligando debe tener,

por ejemplo, afinidad al metal de interés, bajo peso molecular, lipofilidad para cruzar la membrana hematoencefálica y baja toxicidad [156]. Con excepción de la afinidad a metales y la toxicidad, el resto de las consideraciones están contempladas en las reglas de Lipinski o también conocidas como las reglas de los 5 [147, 181]:

- 1.- Peso molecular menor a 500.
- 2.- El logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (CLogP) menor a 5.
- 3.- El número de hidrógenos donadores menor a 5.
- 4.- El número de hidrógenos aceptores menores a 10.

Tomando en cuenta estas características, reconocer la molécula con mejor potencial para ser un fármaco no es una tarea fácil, por esta razón se buscan estructuras químicas similares a las ya conocidas como fármacos y propiedades fisicoquímicas similares [156]. Por lo tanto, el diseño de fármacos no se reduce a sintetizar y realizar pruebas de estructura-función, para ello se utilizan técnicas *in silico* para identificar mejores compuestos que puedan continuar con el diseño y desarrollo de fármacos [156]. Bloquear las etapas iniciales de la agregación del péptido β A con moléculas pequeñas se considera un punto prometedor para el desarrollo de fármacos para EA [106].

1.7. Diseño de la molécula bifuncional TP.

En el año 2009 se reportó un agente inhibidor de la oligomerización de β A: el dipéptido $\text{NH}_2\text{-D-Trp-Aib-OH}$ ($\text{D}^{\text{W}}\text{-Aib}$) [65]. El mecanismo de acción del $\text{D}^{\text{W}}\text{-Aib}$ se basa en el reconocimiento de los grupos aromáticos hacia β A en combinación con la estrategia *β -breaker* del carbono α -metilado del Aib. El grupo indol del triptofano puede unirse a los anillos aromáticos de la β A, mientras que el ácido α -aminoisobutírico (Aib) funciona intercalándose entre las hojas- β demostrando un potencial de *β -breaker* mayor que la prolina y la estereoquímica “D” del triptofano le proporciona resistencia a la degradación enzimática. $\text{D}^{\text{W}}\text{-Aib}$ interactúa en el

ensamble de intermediarios tempranos de β A e inhibe la formación de oligómeros tóxicos. El dipéptido administrado por vía oral mostró una reducción en la cantidad de los depósitos amiloides en cerebros de ratones con EA. El tratamiento con Δ W-Aib muestra la recuperación cognitiva en un modelo de ratones transgénicos [65].

El dipéptido Δ W-Aib es una molécula pequeña de 289 Da, tiene estabilidad en el plasma, biodisponibilidad después de administración vía oral, baja toxicidad, alta solubilidad y estabilidad química en solución. El Δ W-Aib también tiene efecto inhibitorio de la formación de oligómeros tóxicos, se incubó β A1-42 en presencia de Δ W-Aib en relación molar ascendente y se examinó por electroforesis. Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente de Δ W-Aib en la capacidad de inhibir el crecimiento de oligómeros tempranos (18 kDa) a oligómeros tóxicos (56 kDa). El efecto inhibitorio de Δ W-Aib fue observado desde una relación 1:1 (β A: dipéptido), sin embargo, el perfil de inhibición no es lineal. La afinidad de Δ W-Aib por β A1-42 es aproximadamente de 300 nM. Δ W-Aib en relación 1:2 (β A: dipéptido) modifica la morfología de las fibras maduras haciéndolas más delgadas, pequeñas y escasas que aquellas que no tienen el dipéptido, estos resultados demuestran que Δ W-Aib actúa a niveles tempranos de fibrilización, previniendo el ensamble de los oligómeros tóxicos a partir de los oligómeros tempranos [65].

El efecto de Δ W-Aib en la toxicidad de los oligómeros tempranos de β A1-42 se estudió por ensayos de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido). Δ W-Aib inhibe significativamente el efecto tóxico de los oligómeros tempranos de β A1-42 en un modelo celular PC12 a una dosis de 10 excesos. Las células tratadas con β A1-42 y Δ W-Aib (40 excesos) presentaron una alta viabilidad y poca apoptosis. Estos resultados son consistentes con los de MTT y revelan el efecto protector de Δ W-Aib hacia la toxicidad de los oligómeros tempranos. La interacción Δ W-Aib- β A también fue estudiada por resonancia magnética nuclear β A12-28 y 4 excesos de Δ W-Aib, dando como resultado una

interacción hidrofóbica principalmente por el reconocimiento aromático de la Phe19, Phe20 y del Δ W [65].

Adicionalmente estudios *in vivo* muestran que el Δ W-Aib disminuyó los depósitos amiloides en un modelo de ratones transgénicos e incrementó la capacidad cognitiva significativamente. El efecto de Δ W-Aib se estudió en un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresaban la hAPP (23 ratones de 4.5 meses de edad). Los animales fueron tratados 120 días, con administración intraperitoneal 3 veces al día y una dosis de Δ W-Aib igual a 1 mg/kg/ratón/día. Los resultados se observaron desde el día 3 y 4 donde el grupo tratado con Δ W-Aib tenía mejoras en comportamiento con respecto al grupo control utilizando la prueba de Morris. Los ratones transgénicos tratados con Δ W-Aib recuperaron un perfil cognitivo similar al del grupo de ratones no transgénicos. El tratamiento con Δ W-Aib también mostró un notable decremento en la concentración de β A en el cerebro del grupo transgénico y el tamaño de las placas amiloides en la corteza fueron más pequeñas que el grupo administrado con vehículo [65].

La seguridad y la biodisponibilidad de Δ W-Aib fueron medidas para determinar el potencial del dipéptido como posible fármaco. Δ W-Aib no es tóxico a cultivo celular a una dosis de 50 mM. Una única dosis intravenosa de Δ W-Aib en los ratones transgénicos mostró que la dosis máxima tolerada es entre 750 y 1000 mg/Kg, en la mayoría de los casos no se presentaron efectos adversos. Se determinaron los perfiles de estabilidad y farmacocinética de Δ W-Aib. Δ W-Aib mostró ser estable en suero de ratones y humano durante 24 h, estos resultados eran esperados debido a la presencia del aminoácido con estereoquímica "D". También se evaluó la biodisponibilidad oral y la habilidad de cruzar la barrera hemoencefálica. Δ W-Aib se administró vía oral y nasal, mostrando una biodisponibilidad del 39% y del 55%, respectivamente. A pesar de su excelente absorción por el tracto digestivo, el compuesto muestra un perfil soluble en agua en concentraciones tan altas como 100 mg/mL de agua o solución salina. El porcentaje de cruce de la barrera hematoencefálica es 4-8% dependiendo de la

vía de administración [65]. El dipéptido D^{W} -Aib representa una excelente opción como inhibidor del proceso de agregación del péptido βA especialmente en etapas tempranas, lo que representa una estrategia prometedora como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer [65].

Para el diseño de una molécula bifuncional, en este trabajo se propone combinar las propiedades del dipéptido D^{W} -Aib con un agente quelante del ión Cu(II) de naturaleza peptídica. En este estudio, se ha elegido a un sitio de unión a cobre de la proteína α -sinucleína como agente quelante de este ión. La agregación de la proteína α -sinucleína está asociada a la etiología de la enfermedad de Parkinson. La interacción metal-proteína es un paso crítico para la agregación de α -sinucleína y puede ser la clave para entender el rol en la agregación, el estrés oxidativo y el proceso patológico. La α -sinucleína une específicamente Cu(II) y fomenta su agregación en condiciones relevantes al desarrollo de la enfermedad. La α -sinucleína tiene dos sitios de unión a Cu(II) independientes con diferente afinidad al metal, el primero y de mayor afinidad está ubicado en el N-terminal, mientras que el segundo está en la H50; otro sitio de unión a Cu(II) está ubicado en el C-terminal el cual se considera el de más baja afinidad y no específico, aunque continúa en estudio [182, 183].

El principal sitio de unión de Cu(II) en la α -sinucleína está ubicado en el extremo N-terminal con $K_d \approx 10^{-7}$ (10^{-9}) M [184]. En un estudio espectroscópico detallado de la α -sinucleína, se determinó que los primeros seis aminoácidos de la secuencia: MDVFMK constituyen el sitio de mayor afinidad por cobre en el N-terminal de la proteína [182, 183]. También se determinó que el ión Cu(II) se une específicamente al $\alpha\text{-NH}_2$ de la Met1 favoreciendo la desprotonación de la amida del segundo residuo, y formando un quelato muy estable de cobre con el aspartato. Por lo tanto, la esfera de coordinación del Cu(II) está formada por el $\alpha\text{-NH}_2$ de la Met1, el nitrógeno de la amida desprotonada de Asp2, el carboxilato de la cadena lateral de Asp2 y el oxígeno de una molécula de agua (fig. 15). A partir de este modelo de coordinación se puede inferir que la secuencia mínima para

lograr la quelación del metal con alta afinidad constituye de dos aminoácidos: MD [183].

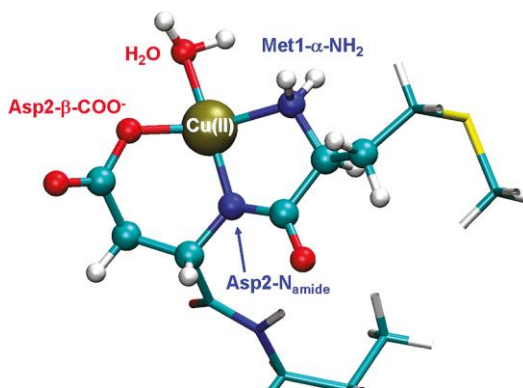


Figura 15. Representación del complejo Cu(II)-MDVFMK. Figura tomada de la referencia [183].

En el presente proyecto se estudia la molécula bifuncional NH₂-Met-Asp-D-Trp-Aib-NH₂ (TP), y se compara con la molécula control NH₂-D-Trp-Aib-NH₂ (DP). Las propiedades del tetrapéptido TP están constituidas por la parte quelante del ión Cu(II) que corresponde a los residuos de metionina y aspartato en la posición 1-2 de la proteína α -sinucleína, y a la propiedad de intercalarse entre la β A del dipéptido DP (fig. 16).

Los péptidos DP y TP se evaluaron como agentes moduladores de la agregación de β A1-40 en ausencia y presencia del ión Cu(II) por ensayos de espectroscopía de fluorescencia de tioflavina T (ThT), dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). También se caracterizó el poder de quelación de TP hacia Cu(II) por dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés) y resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés). Con los resultados obtenidos se comprobó la capacidad bifuncional de TP.

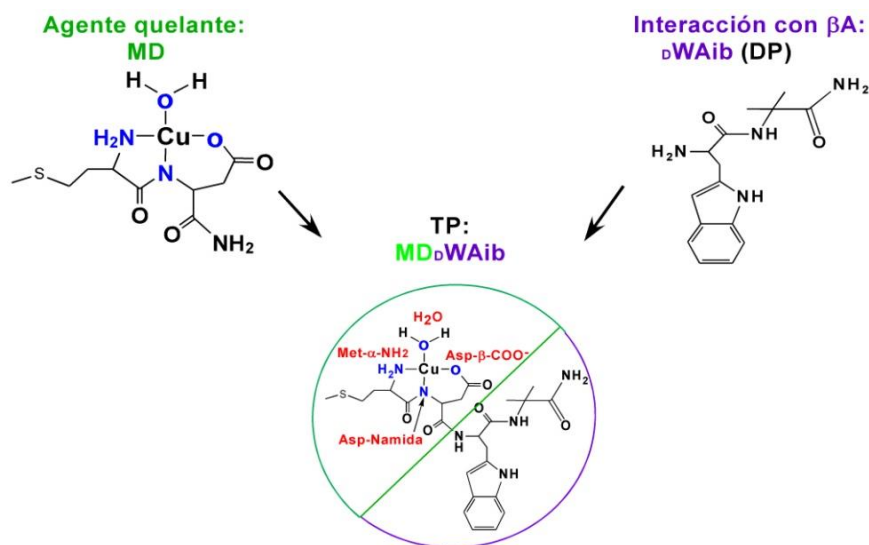


Figura 16. Diseño original de la molécula bifuncional TP.

1.8. Justificación.

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común (60 al 80%) [185]. La demencia es un síndrome que afecta la memoria, el pensamiento, la conducta y la habilidad de desarrollar las actividades cotidianas. En el año 2010 se reportó que hay 35.6 millones de personas que padecen demencia en todo el mundo, incrementando a 65.7 millones para el 2030 y 115.4 millones para el 2050 [1]. La demencia tiene un costo mundial total estimado en el 2010 de \$604 millones de USD [1]. [186, 187]. En México, el Alzheimer es un problema de salud pública que afecta al 10% de los 15 millones de adultos mayores (>65 años), de acuerdo al INEGI [188]. Sin embargo, en México no hay una epidemiología detallada sobre el padecimiento y la atención especializada; las estadísticas obtenidas están basadas en registros hospitalarios [189]. Otros problemas en México son la carencia de estancias, infraestructura, personal, presupuesto y de un programa específico de ayuda multidisciplinaria del sector salud [190].

Hasta el momento, la enfermedad de Alzheimer no tiene cura. La terapia utilizada para EA se enfoca en disminuir la progresión de los síntomas pero no ataca los blancos moleculares que producen la enfermedad. Por lo tanto, existe

una necesidad social y económica en el desarrollo de agentes terapéuticos que prevengan, detengan o curen dicha enfermedad.

Atendiendo a esta necesidad, en el presente proyecto se propone el estudio de la molécula bifuncional TP, de naturaleza peptídica no natural como molécula moduladora de la agregación del péptido β A1-40 y quelante de cobre. Se espera que este estudio sirva como antecedente para proponer nuevos agentes terapéuticos enfocados a los blancos moleculares que desarrollan la enfermedad de Alzheimer.

1.9. Hipótesis.

La molécula bifuncional TP es un péptido no natural que podría ser capaz de quelar cobre y de interferir en el proceso de agregación del péptido β A1-40.

1.10. Objetivo general.

Evaluar el efecto del péptido no natural bifuncional TP en el proceso de agregación del péptido β A *in vitro* en ausencia y presencia de cobre.

1.11. Objetivos particulares.

- Evaluar la capacidad del TP para quelar al ión Cu(II), usando espectroscopía de dicroísmo circular electrónico y resonancia paramagnética electrónica.
- Caracterizar el efecto del TP en el proceso de agregación del péptido β A por las técnicas de espectroscopía de fluorescencia, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM); y compararlo contra la molécula control DP.
- Evaluar el efecto del ión Cu(II) en el proceso de agregación del péptido β A.
- Caracterizar el efecto del TP en el proceso de agregación del péptido β A en presencia del ión Cu(II); y compararlo contra la molécula control DP.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA PARA LA EXPERIMENTACIÓN.

2.1. Síntesis y purificación de los péptidos β A1-40, DP y TP.

Los péptidos β A1-40, DP y TP se sintetizaron usando síntesis de péptidos en fase sólida con química Fmoc [191]. Para la síntesis de β A se utilizó 10% de anisol en los disolventes para síntesis basándose en la referencia [192]. Para la purificación de β A se utilizó una columna Superdex 75 preparativa, modo isocrático flujo 0.3 mL/min y fase móvil 1% NH_4OH (pH > 10). Los péptidos DP y TP se purificaron por cromatografía líquida de alta presión, fase reversa (HPLC, por sus siglas en inglés), gradiente acetonitrilo/agua, utilizando una columna C18 Waters microBondapack. Todos los péptidos se caracterizaron por espectrometría de masas de electro-spray (ES-MS, por sus siglas en inglés). DP y TP se almacenan en desecador a temperatura ambiente; β A1-40 se almacena en desecador en refrigeración (4-8 °C).

2.2. Preparación de la muestra.

El péptido β A1-40 (1 mg) fue solubilizado en hidróxido de sodio (1 mL), NaOH 400 μM fue adicionado hasta alcanzar un $\text{pH} \geq 10.9$, se sonicó 3 ciclos de 5 min con intervalo de 2 min de descanso, se centrifugó 10 min a 14,500 rpm, se filtró con filtro de poro de 0.1 μm membrana PVDF y se cuantificó por espectroscopía de absorción de electrónica a 280 nm ($\epsilon=1,490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los péptidos DP y TP liofilizados se disolvieron en agua, se filtraron con filtro de poro de 0.1 μm membrana PVDF y se cuantificaron por absorción electrónica a 280 nm ($\epsilon=3.33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon=3.77 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente). Las soluciones de DP y TP se guardaron en refrigeración (4-8 °C). Para los experimentos se disolvieron β A1-40 (20 μM) y DP o TP (40 μM) en buffer NEM 20 mM y NaCl 10mM pH=7.4. Para los

experimentos en presencia de cobre se utilizaron 0.4 equivalentes de Cu(II) a partir de una solución acuosa 25 mM de CuCl₂.

2.3. Ensayos de agregación de β A monitoreados con espectroscopía de fluorescencia de ThT.

El ensayo consiste en disolver el péptido β A en concentración 20 μ M en el buffer NEM 20 mM y NaCl 10 mM pH=7.4 previamente filtrado y ThT 20 μ M. Se monitoreó el espectro de emisión de fluorescencia de 460 a 550 nm con una λ de excitación= 450 nm. Los ensayos en presencia de DP o TP se realizaron a una concentración de 40 μ M. El experimento se realizó en celda de plástico de paso óptico 1 cm, a 37 °C y agitación constante con un agitador magnético. El equipo utilizado fue un fluorómetro Varian, Cary Eclipse.

2.4. Monitoreo del tamaño de partícula de la agregación de β A a tiempos tempranos con dispersión dinámica de luz (DLS).

El péptido β A en concentración 20 μ M fue preparado con buffer NEM 20 mM y NaCl 10 mM pH=7.4 previamente filtrado. Para los experimentos con DP o TP, estos fueron añadidos a una concentración de 40 μ M. El experimento se realizó en celda de cuarzo grado Spectrosil de paso óptico 1 cm, a 37 °C, sin agitación. El equipo utilizado fue un Zetasizer Nano series ZS90, Malvern. Los datos analizados mostraron una función de correlación ≤ 1 .

2.5. Observación de la morfología de fibras amiloides utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las fibras de β A generadas en el ensayo de agregación monitoreado por ThT en ausencia y presencia de DP o TP con o sin cobre se colocaron en rejillas de cobre durante 2 min y se secó con papel filtro, se tiñeron con acetato de uranilo al

2% durante 30 seg y se secó con papel filtro; después se agregó la solución de uranilo durante 2 min y se secó; por último se llevó a cabo otro ciclo con la solución de uranilo durante 30 seg y se secó con papel filtro. El tratamiento fue el mismo para las muestras con oligómeros y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. El microscopio utilizado fue un JEOL-JEM 1400 EX.

2.6. Titulación del complejo β A-Cu(II) con TP monitoreada por dicroísmo circular electrónico (CD).

La titulación de TP monitoreada por dicroísmo circular se realizó usando el complejo β A1-16 (0.3mM) con 1 equivalente de Cu(II), previamente preparado a pH 7.4. Posteriormente se agregó TP cada 0.12 equivalentes hasta 1.5 equivalentes. Se midió el espectro de dicroísmo circular electrónico en la región UV-Visible de 300 a 800 nm cada 2 nm con una velocidad de barrido de 100 nm/min y un ancho de banda de 5 nm. El equipo utilizado fue un espectrómetro de dicroísmo circular, Jasco J-815 y se usó una celda de cuarzo grado Spectrosil con paso óptico de 1 cm.

2.7. Caracterización de la coordinación del ion Cu(II) por TP, MDVFMK y fibras amiloides utilizando resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Se caracterizó el modo de coordinación del Cu(II) con TP y con el péptido MDVFMK. Se obtuvieron los espectros de EPR de MDVFMK y de TP, ambos 0.3 mM con 1 equivalente de Cu(II). También se realizaron experimentos con fibras de β A1-40 producidas con cobre en presencia de DP o TP obtenidas en los ensayos de ThT. Se utilizaron tubos de cuarzo de 4mm, 150 K, microondas 10 mW, modulación de amplitud 8 G, modulación de frecuencia 100 kHz, tiempo constante 327 ms y 12 scans. El espectrómetro utilizado fue un EPR Bruker EMX Plus banda X.

2.8. Análisis estadístico de datos.

Los datos de DLS y espectroscopía de fluorescencia sin cobre se analizaron por ANOVA de una vía Pos-hoc seguida por Tukey. El área bajo la curva también se analizó por ANOVA de una vía Pos-hoc seguida por Tukey. Los datos están expresados como el promedio \pm el error estándar, todos los experimentos se realizaron mínimo por triplicado (β A n=9, β A+DP n=8, β A+TP n=6).

CAPÍTULO III. RESULTADOS.

3.1. Síntesis y purificación de péptidos.

En la síntesis y purificación de péptidos se obtuvieron liofilizados de β A1-40, DP y TP. Los cromatogramas de DP y TP muestran un tiempo de retención de 3 y 18 minutos, respectivamente. Se caracterizaron los péptidos por ES-MS obteniendo una masa exacta de β A1-40= 4,328.82, DP=288.26 y TP=534.23 Da.

3.2. Evaluación de la capacidad del TP para quelar Cu(II).

Con la finalidad de caracterizar el modo de coordinación del Cu(II) con TP, se colectó el espectro de EPR del TP con 1 equivalente de Cu(II) (fig. 17, línea morada) y comparado con el complejo de Cu(II) y el péptido MDVFMK (línea negra), esta secuencia contiene a la metionina y al aspartato que coordina cobre específicamente [183]. En la figura 17 se observa que los espectros son muy similares, con señales asociadas a los valores $g_{||}=2.5$ y $A_{||}= 189 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ para ambos complejos. Cabe mencionar que, en el caso del TP se observa un par de señales (marcadas con asterisco en la fig. 17) que están asociadas a una

pequeña cantidad de cobre en solución. Estos resultados indican que el TP es capaz de quelar al Cu(II), de acuerdo a su diseño químico.

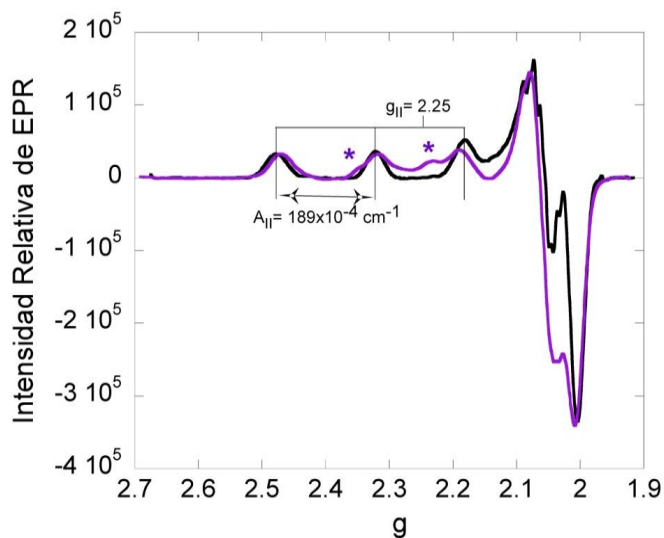


Figura 17. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de MDVFMK (línea negra) y TP (línea morada) en presencia de 1 equivalente de Cu(II). Los asteriscos representan las señales de Cu(II) en solución.

Los valores de $g_{||}$ y $A_{||}$ asociados a los complejos Cu(II)-MDVFMK y Cu(II)-TP indican un modo de coordinación de 2 nitrógenos y 2 oxígenos (2N2O). La figura 18 muestra el modo de coordinación propuesto por Binolfi y colaboradores para MDVFMK [183]. En la esfera de coordinación de Cu(II) los dos átomos de nitrógeno provienen del extremo del amino terminal de la metionina 1 y de una amida desprotonada de la cadena peptídica del aspartato 2, mientras que los átomos de oxígeno proceden del carboxilo de la cadena lateral del aspartato 2 y de una molécula de agua.

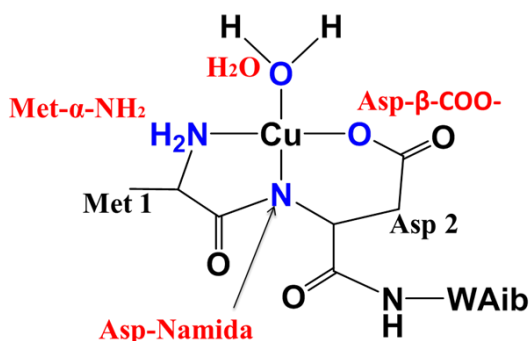


Figura 18. Representación del modo de coordinación del Cu(II) en complejo con TP. Figura adaptada de la referencia [183].

Con la finalidad de evaluar la capacidad de TP de competir por el ión Cu(II) contra β A, se realizó una titulación monitoreada por dicroísmo circular electrónico (CD, por sus siglas en inglés). El dicroísmo circular electrónico (CD) es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la estructura secundaria de una proteína. También, se usa para caracterizar transiciones electrónicas en la región UV-visible de un complejo metálico [193].

La figura 19 muestra el espectro de β A1-16 con Cu(II) (línea azul cielo); posteriormente se agregó TP cada 0.12 equivalentes (líneas punteadas) hasta 1.5 equivalente (línea azul). A manera que las bandas características del complejo β A1-16 con Cu(II) desaparecen desde 0.2 equivalentes de TP, mientras que las bandas propias del complejo TP-Cu(II) aparecen; mostrando que el complejo TP-Cu(II) tiene una banda positiva d-d a $15,900\text{ cm}^{-1}$ y una banda negativa de transferencia de carga del ligando al metal a $33,000\text{ cm}^{-1}$. A partir de 1 equivalente de TP (línea azul) las bandas características de β A1-16 con Cu(II) desaparecen completamente. Lo que sugiere que TP es capaz de competir por el Cu(II) frente a β A1-16 y tiene la capacidad de desprenderlo de β A1-16.

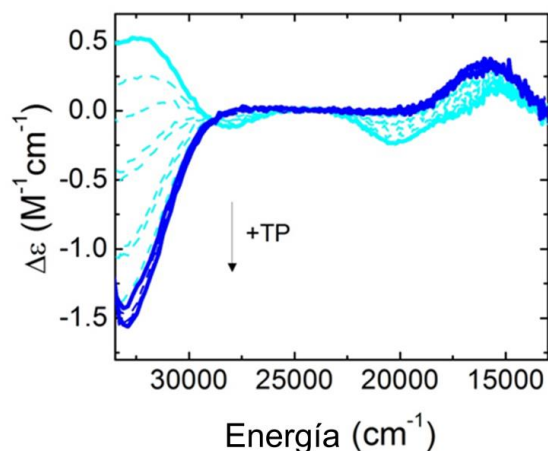


Figura 19. Titulación del complejo β A1-16 con cobre a concentraciones crecientes de TP monitoreada por dicroísmo circular electrónico (CD). β A1-16 con cobre (línea azul cielo), titulación cada 0.12 equivalentes de TP (líneas azul cielo punteadas) pasando por 1 equivalente (línea azul), 1.12 a 1.36 equivalentes (líneas azules punteadas) hasta 1.5 equivalentes (línea azul).

Consistentemente, al obtener los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) se observó que el Cu(II) está coordinado al β A1-16 al inicio de la titulación monitoreada por CD (fig. 20A) y al final (fig. 20B) ya está unido al TP. La EPR es una técnica espectroscópica que permite estudiar moléculas con electrones desapareados. Varios iones de metales de transición son paramagnéticos y por lo tanto el complejo metal-proteína puede ser estudiado por EPR [193]. En el punto final de la titulación seguida por CD, donde el cobre está unido a TP, se obtuvieron los valores de $g_{||}=2.5$ y $A_{||}= 189 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Mientras que los valores de $g_{||}=2.27$ y $A_{||}= 180 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ están asociadas al complejo Cu- β A1-16.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la parte quelante del TP en el proceso de agregación de β A. Se obtuvo la cinética de agregación de β A monitoreada por ThT en presencia del péptido MDV (fig. 21). Los resultados muestran que MDV es un agente quelante de Cu(II) pero no modifica la cinética de agregación de β A.

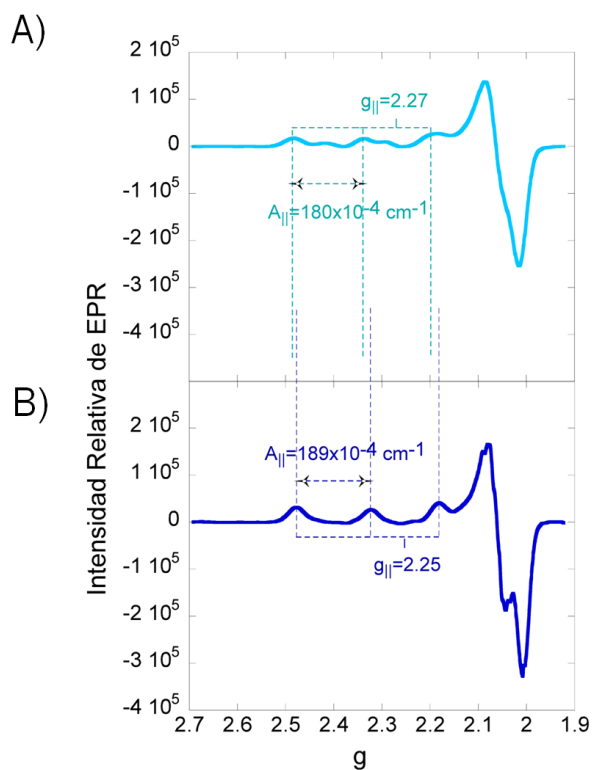


Figura 20. Espectros de EPR del Cu(II) unido a β A1-16 (línea azul cielo) **(A)** y en el punto final de la titulación con TP monitoreada por CD en la figura 19 (línea azul) **(B)**.

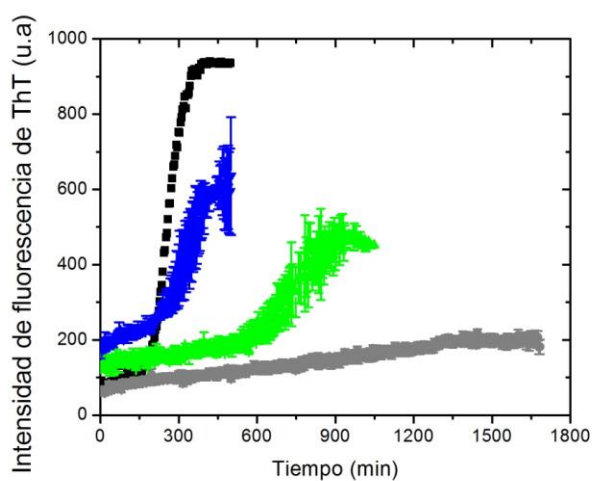


Figura 21. Cinética de agregación de β A monitoreada por ThT (línea negra), y de β A con Cu(II) en ausencia (línea gris) y presencia de 2 equivalentes de TP (línea verde) o MDV (línea azul).

3.3. Ensayos para la agregación de β A monitoreados con espectroscopía de fluorescencia de ThT.

Una herramienta para detectar y analizar la cinética de agregación de las fibras amiloides es el ensayo monitoreado por el colorante fluorescente tioflavina T (ThT). En 1959, se describió por primera vez el uso de ThT como estándar de oro para la detección de fibras amiloides [194]. El ThT es un benzotiol ampliamente utilizado por su sensibilidad y su selectividad al teñir *in vitro* o *in vivo* a las fibras amiloides. La ThT se une a diversas fibras amiloides, es decir, su reconocimiento es independiente de la proteína que forma las fibras [195, 196]. El reconocimiento de la ThT hacia las fibras amiloides se basa en la estructura de hoja- β y no en la secuencia de aminoácidos. La fase de elongación representa la etapa de mayor enriquecimiento de hojas- β , que se puede monitorear por la unión del colorante fluorescente ThT [49]. El aumento de fluorescencia del ThT al unirse a las fibras ocurre cuando el enlace carbono-carbono que une la parte de benzilamina con la de los anillos de benzotiazol que conforman a la molécula de ThT se mantiene sin rotar. Adicionalmente, el ThT no tiñe a materiales en etapas iniciales de polimerización, ya que, los monómeros y los oligómeros tienen un bajo contenido de hoja- β . Por otro lado, en la fase de elongación ocurre el enriquecimiento de contenido de hojas- β promoviendo la unión ThT- β A hasta obtener la fibra amiloide como producto final [49]. Entonces, la ThT es una molécula utilizada para monitorear el proceso de fibrilización de proteínas, comenzando desde cero de fluorescencia en la etapa de nucleación, pasa por la etapa de elongación de las protofibras aumentando la intensidad de fluorescencia hasta obtener la fibra madura que se detecta por una meseta del máximo de fluorescencia, dando como resultado un fenómeno sigmoide [194].

El ensayo de agregación del péptido β A monitoreado por espectroscopía de fluorescencia de ThT sirve para caracterizar la cinética de formación de fibras. Con este ensayo se obtiene una sigmoide que da la información del tiempo que tarda el monómero en agregarse hasta la elongación de la fibra, conocido como

t_{lag} o tiempo de nucleación. La figura 22 muestra la cinética de agregación de βA donde el tiempo de nucleación (t_{lag}) es el cruce entre el ajuste en la etapa de elongación (línea roja) y de nucleación (línea azul), por lo tanto el t_{lag} de βA es de 214 ± 19 min.

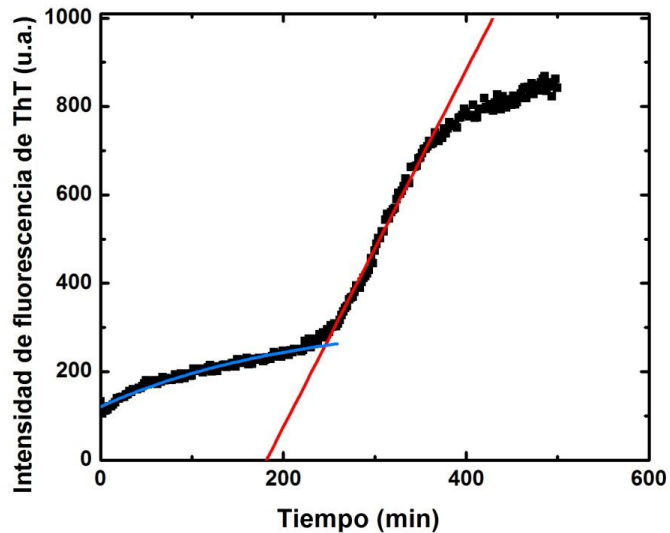


Figura 22. Cinética representativa de la agregación del péptido βA . El tiempo de nucleación (t_{lag}) es el cruce entre el ajuste de la etapa de elongación (línea roja) y el de nucleación (línea azul).

La figura 23 muestra las cinéticas de agregación de βA en ausencia y presencia DP y TP. En la figura 23A se observa un desplazamiento en el tiempo de nucleación cuando hay DP (269 ± 35 min) y el desplazamiento es más pronunciado con TP (328 ± 48 min). Al realizar el análisis estadístico, se observa que sólo el t_{lag} de βA con TP es significativamente mayor que el t_{lag} de βA en ausencia de TP (fig. 23B). Esto sugiere que TP retrasa el tiempo de nucleación y por lo tanto, la formación de fibras de βA .

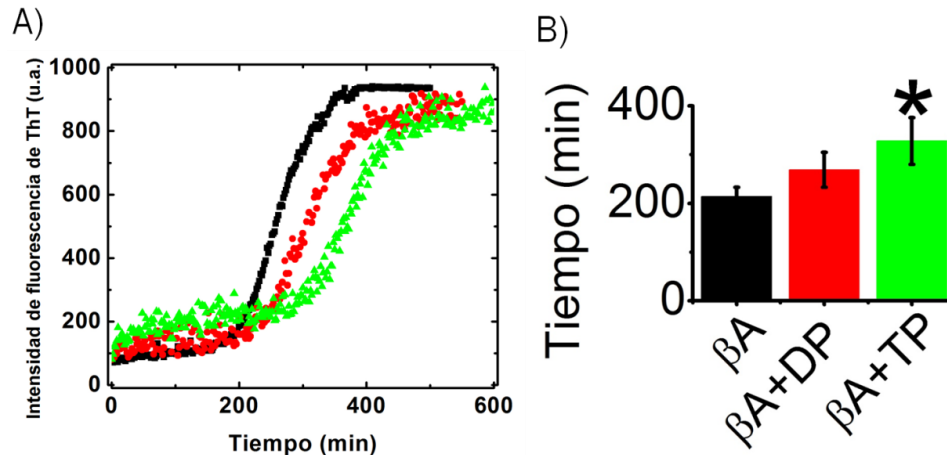


Figura 23. **A)** Cinéticas representativas de la agregación del péptido βA en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP (línea verde), seguidas por el ensayo de ThT. **B)** Análisis estadístico ANOVA de una vía Post-hoc Tukey de t_{lag} . Los resultados obtenidos se muestran con el error estándar asociado a βA $n=9$, $\beta A+DP$ $n=8$, $\beta A+TP$ $n=6$. * $p<0.05$ comparado con βA .

3.4. Monitoreo del tamaño de partícula de la agregación de βA a tiempos tempranos utilizando dispersión dinámica de luz (DLS).

Debido a que el ensayo de fluorescencia monitoreado por ThT no brinda información en la etapa inicial de la agregación de proteínas, ya que en esta etapa no hay estructuras suficientemente rígidas para que la ThT emita fluorescencia. Esta espectroscopía se basa en el movimiento browniano de las partículas en solución, arrojando una función de correlación que permite comparar el punto inicial del proceso con el punto final en función del tiempo para finalmente poder calcular el tamaño de partícula [197].

Con la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) se pueden determinar tamaños de partícula en un intervalo de 0.3 a 3000 nm de radio, lo que hace esta técnica ideal para caracterizar el proceso inicial de nucleación. La cinética de agregación de βA seguida por DLS brinda la información de un tamaño de partícula promedio (Z-Average) y la función de correlación. La figura

24A muestra la cinética de tamaño de partícula de β A en ausencia y presencia de DP o TP de 0 a 600 min. Los resultados muestran que el área bajo la curva (AUC) es significativamente menor en presencia de DP o TP en comparación con la β A en ausencia de DP o TP. El tamaño de partícula no cambia significativamente entre el tiempo inicial y el final en presencia de TP (fig. 24B), lo que sugiere que el TP mantiene el tamaño de partícula a tiempos tempranos de agregación del péptido β A. Estos resultados sugieren que el DP y el TP son capaces de retrasar el proceso de oligomerización del péptido β A.

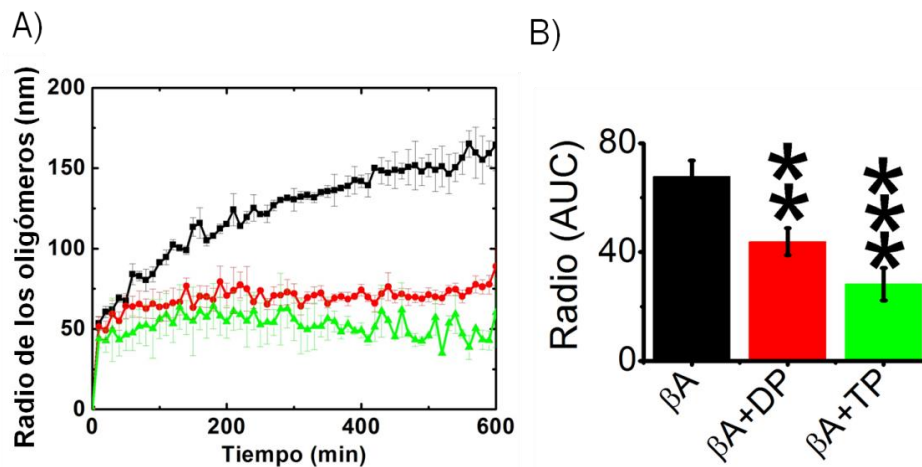


Figura 24. **A)** Cinéticas del cambio en el tamaño de partícula del péptido β A medidas por dispersión dinámica de luz (DLS), en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP (línea verde). **B)** Análisis estadístico ANOVA de una vía Post-hoc Tukey del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés).

Los resultados obtenidos se muestran con el error estándar asociado a 4 experimentos para cada condición. ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0005$ en comparación con el AUC de β A.

3.5. Evaluación de la morfología de las fibras amiloides utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Con la finalidad de observar la morfología de las especies que se forman durante el proceso de agregación de β A, hasta la formación de las fibras

amiloides obtenidas por el ensayo de agregación de β A monitoreado por espectroscopía de fluorescencia de ThT, se usa la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés); la cual utiliza un haz de electrones que bombardean la muestra para dar una imagen [198].

La cinética de agregación de β A monitoreada por TEM reveló que las estructuras iniciales de β A (fig. 25A, t=0 min) están más agrupadas que cuando hay presencia de TP (fig. 25B, t=0 min). En función del tiempo, las especies de β A se agregan para formar oligómeros (fig. 25, t=40 min) hasta obtener las fibras maduras en el punto final de la cinética (fig. 25, t=1600 min). Las fibras de β A forman una red bien definida de hilos estructuralmente estables (fig. 25A, t=1600min). La microscopía muestra que al adicionar TP, la morfología de las fibras de β A cambia, siendo más delgadas y menos entrecruzadas que β A en ausencia de TP (fig. 25B, t=1600min).

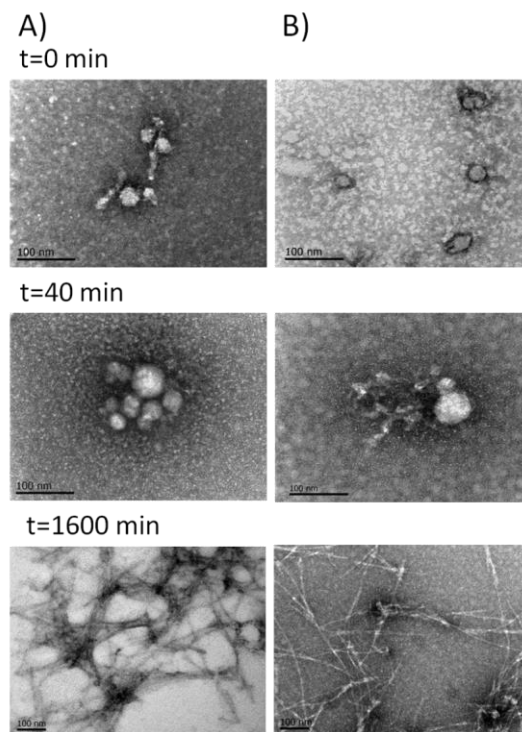


Figura 25. Micrografías de la cinética de formación de las fibras amiloides en ausencia **(A)** y presencia de TP **(B)**, colectadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

3.6. Efecto del ión Cu(II) en la agregación de β A.

Una vez caracterizado el efecto de DP y TP en el proceso de agregación de β A. Se procede con el estudio del mismo fenómeno en presencia del ión Cu(II). La figura 26 muestra que desde el punto inicial de la cinética de β A monitoreada por DLS, el radio de los oligómeros aumenta inmediatamente en presencia de Cu(II). Estos resultados indican que el Cu(II) induce una oligomerización inmediata de β A. El tamaño de los oligómeros de β A-Cu(II) es tan grande que en la presente tesis se reporta una aproximación del radio, ya que no se puede calcular un radio exacto por dispersión dinámica de luz (DLS).

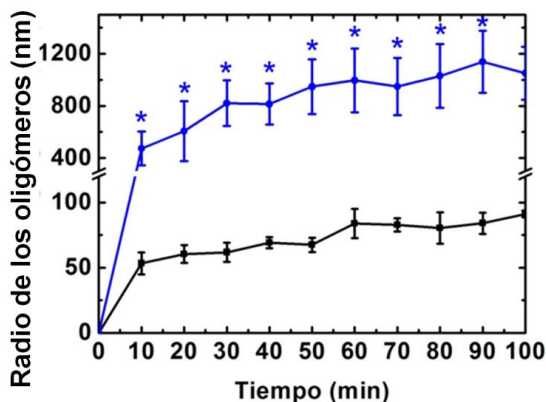


Figura 26. Cinéticas del cambio en el tamaño de partícula de β A en ausencia (línea negra) y presencia de 0.4 equivalentes de cobre (línea azul), monitoreadas por dispersión dinámica de luz (DLS). Los asteriscos azules indican que el radio hidrodinámico de β A+Cu es aproximado, ya que la función de correlación en estructuras mayores a 500 nm es >1 .

El tamaño de los oligómeros de β A es mayor en presencia de Cu(II) que en su ausencia, además las cinéticas de agregación monitoreadas por espectroscopía de fluorescencia de ThT a concentraciones crecientes de cobre indican que la presencia del ión Cu(II) apaga la fluorescencia y retrasa la cinética de formación de fibras de β A (fig. 27). Con la finalidad de evaluar el efecto de DP y TP ubicando la fase de nucleación, elongación y meseta en la cinética de agregación de β A se continuó con la concentración de 0.4 equivalentes de cobre.

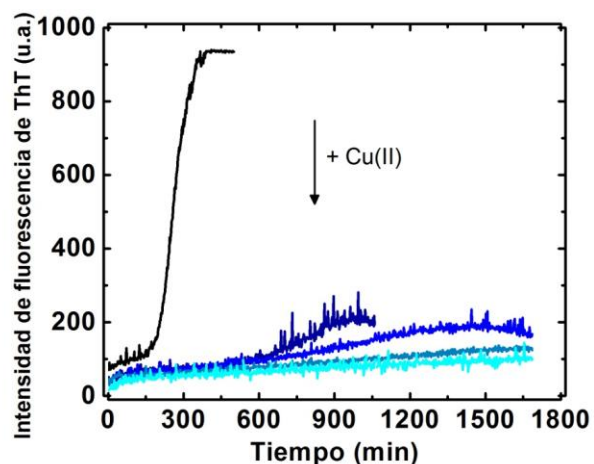


Figura 27. Cinéticas de agregación de β A monitoreadas por espectroscopía de fluorescencia de ThT en ausencia y presencia de 0.2, 0.4, 0.6 y 1 equivalente de Cu(II).

La figura 28 muestra las micrografías de β A obtenidas por tinción negativa en el punto final de la cinética de agregación monitoreada por ThT a concentraciones crecientes de Cu(II). La presencia de Cu(II) en concentraciones sub-estequiométricas (de 0.2 a 0.6 equivalentes) ocasiona que las fibras se observen más cortas y menos ordenadas conforme aumenta la concentración de cobre.

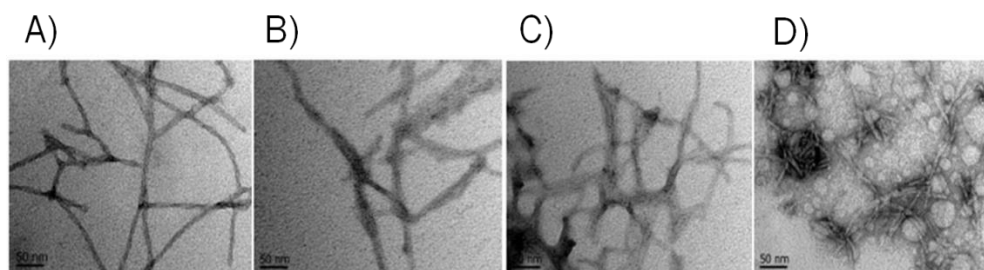


Figura 28. Micrografías de las fibras de β A obtenidas en el punto final de los ensayos de agregación de β A mostrados en la figura 27, a concentraciones crecientes de cobre, utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** 0.0 Equivalentes de cobre, **B)** 0.2 Equivalentes de cobre, **C)** 0.4 Equivalentes de cobre y **D)** 0.6 Equivalentes de cobre.

Con la finalidad de evaluar el modo de coordinación del Cu(II) en las fibras amiloides obtenidas en el ensayo de ThT, se obtuvieron los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) en la forma

soluble de β A1-16 y la fibrilar (β A1-40). Los espectros de EPR en la figura 29 muestran el valor de $g_{\parallel}=2.27$ y $A_{\parallel}=180 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ para la β A soluble (fig. 29A) y la fibrilar (fig. 29B). Estos resultados sugieren que el cobre está coordinado al β A en el punto final de la cinética de agregación.

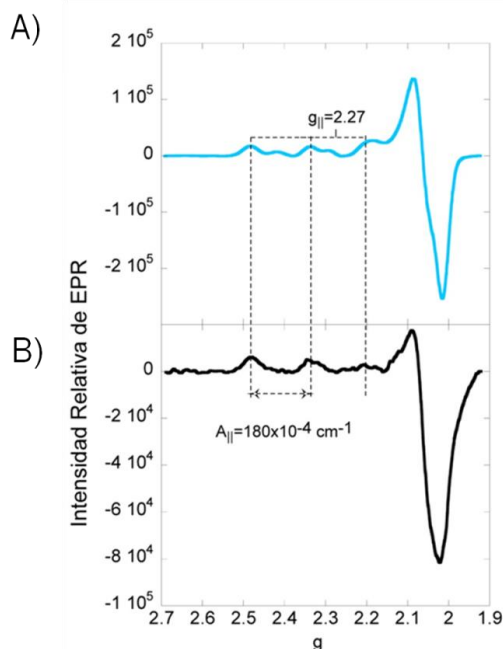


Figura 29. Espectros de EPR del Cu(II) con β A1-16 soluble (línea azul cielo) (A) y en fibras de β A1-40 colectadas en el punto final de los ensayos de agregación de β A monitoreados por espectroscopía de fluorescencia de ThT (línea negra) (B).

3.7. Efecto del DP y el TP en la agregación de β A en presencia del ión Cu(II).

Posterior a la caracterización del proceso de agregación de β A en presencia de Cu(II), se continuó con la evaluación del efecto del TP en la agregación de β A en presencia de Cu(II). En la figura 30 se aprecian las cinéticas de agregación de β A en presencia de 0.4 equivalentes de Cu(II) y 2 equivalentes de DP o TP. La agregación de β A con Cu(II) en ausencia y presencia de DP no muestran un cambio en el patrón de la cinética (fig. 30, línea negra y roja, respectivamente).

Este resultado refleja el hecho de que el DP no posee la propiedad de quelar al Cu(II), de tal forma que no afecta la agregación de β A con cobre. En contraste, el TP tiene un efecto importante en la cinética de agregación de β A en presencia de Cu(II) (fig. 30, línea verde), ya que, es capaz de recuperar parcialmente el efecto sigmoidal en la agregación de β A, característico de la agregación del péptido en ausencia del metal (fig. 27, línea negra). Estos resultados confirman que el TP está quelando al Cu(II) durante el proceso de agregación de β A.

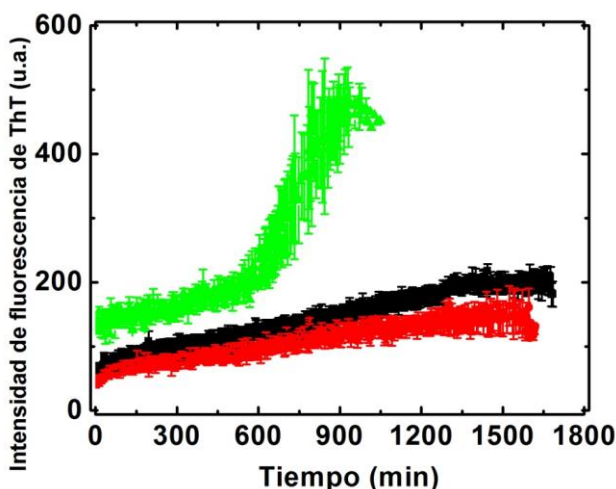


Figura 30. Cinéticas de agregación de β A con 0.4 equivalente de cobre monitoreadas por espectroscopía de fluorescencia de ThT, en ausencia (línea negra) y en presencia de DP (línea roja) o TP (línea verde).

Al monitorear el tamaño de partícula del proceso de agregación de β A en presencia de Cu(II) se observa un aumento inmediato en el radio (fig. 26 y 31). Por otro lado, la presencia de TP abate parcialmente el crecimiento del radio de los oligómeros de β A en presencia de 0.4 equivalentes de Cu(II), permitiendo monitorear la cinética hasta 100 min (fig. 31). Estos resultados indican que el TP es capaz de abatir parcialmente la oligomerización inducida por el Cu(II).

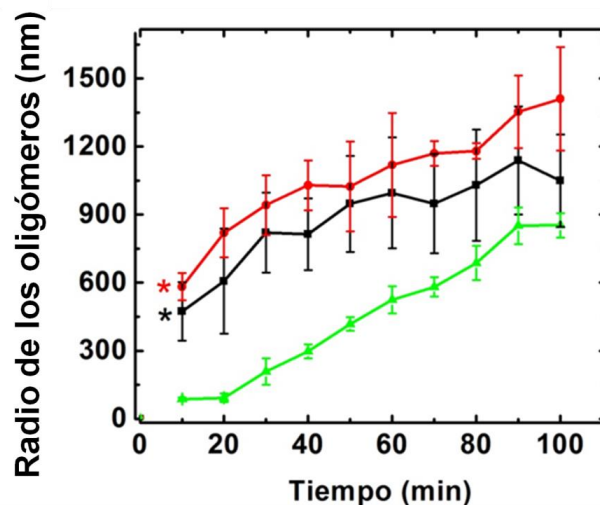


Figura 31. Cinética del cambio en el tamaño de partícula de β A con 0.4 equivalentes de cobre, en ausencia (línea negra) y presencia de DP (línea roja) y TP (línea verde). Los asteriscos en el trazo negro y rojo indican que el radio hidrodinámico de β A+Cu y de β A+Cu+DP es aproximado, ya que la función de correlación en estructuras mayores a 500 nm es >1 .

En la figura 32 se observan las micrografías de la cinética de agregación de β A con Cu(II), en ausencia (fig. 32A) y presencia de TP (fig. 32B). En el tiempo inicial se observan oligómeros de β A+Cu(II) de mayor tamaño que en ausencia de Cu(II). Consistente con los resultados reportados por dispersión dinámica de luz (ver fig. 26), en presencia de TP, los oligómeros que se forman de β A en presencia de Cu(II) son de menor tamaño. Con el paso del tiempo, se observa que los oligómeros de β A en presencia de Cu(II) son amorfos a los 40 min. Por otro lado, con TP, se observan oligómeros estructurados (fig. 32, $t=40$ min). El arreglo diferente de los oligómeros resulta que en presencia de TP, la morfología de las fibras de β A con Cu(II) se modifica, obteniendo fibras bien definidas, gruesas y ordenadas (fig. 32B, $t=1600$ min).

En el punto final de la cinética de agregación de β A también se obtuvieron las micrografías de las fibras amiloides en presencia de DP (fig. 33). La microscopía muestra que al adicionar el DP, la morfología de la fibra de β A cambia: las fibras se tornan cortas, escasas y débiles, así como lo describieron Frydman-Marom en

el 2009 [65]. En presencia de Cu(II) se observa que las fibras se conservan tenues y cortas.

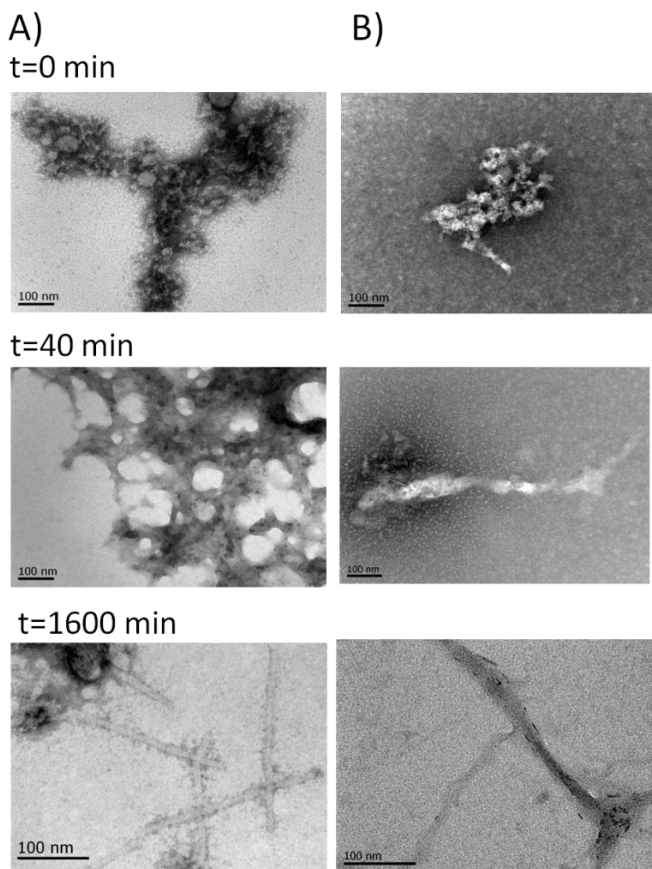


Figura 32. Micrografías de la cinética de agregación de β A con 0.4 equivalentes de Cu(II) en ausencia **A)**, y presencia de TP **B)**.

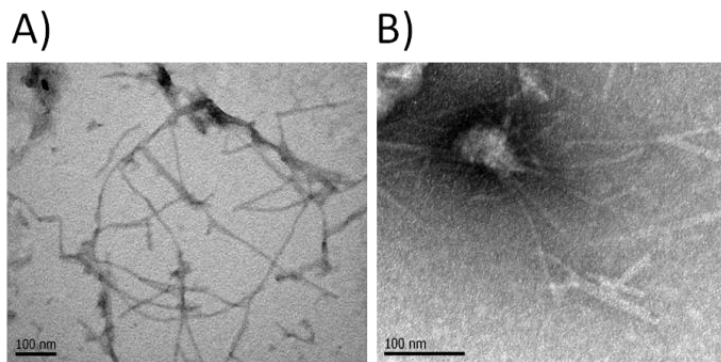


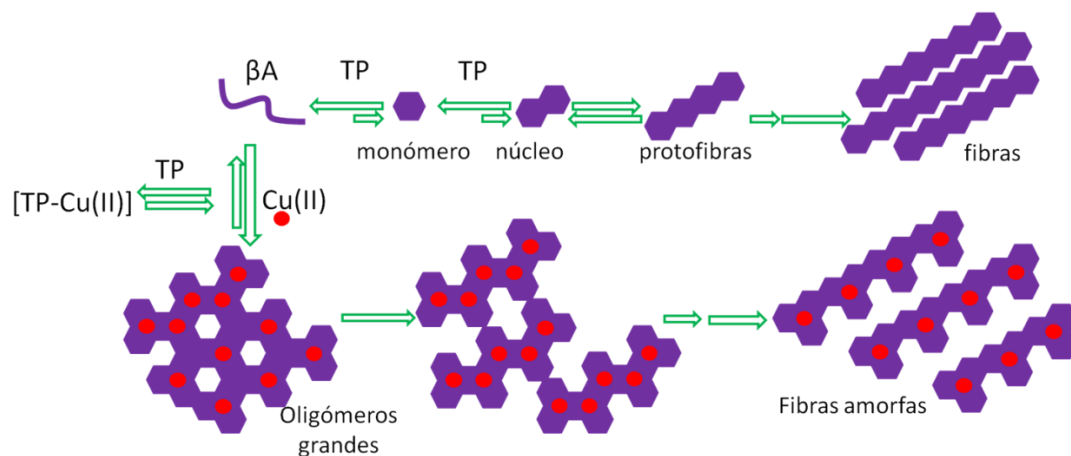
Figura 33. Micrografías de las fibras de β A con 2 equivalentes de DP, en ausencia **(A)** y presencia de 0.4 equivalentes de cobre **(B)**.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se presenta el diseño y caracterización de un péptido no natural y bifuncional, Met-Asp-D-Trp-Aib (TP). El diseño original del TP incluye al quelante específico de Cu(II): Met-Asp, que corresponde a la secuencia de la proteína α -sinucleína; y a la interacción con el péptido β -amiloide (β A): D-Trp-Aib. Por lo tanto, se espera que el TP sea capaz de quelar Cu(II) y de modular el proceso de agregación de β A1-40 aún en presencia del ión Cu(II). Nuestros resultados indican que así es.

La estructura química de la región D-Trp-Aib del TP disminuye el crecimiento inicial de los oligómeros de β A y retarda la formación de fibras (esquema 1). Al mismo tiempo, TP puede competir por Cu(II) frente a las especies solubles de β A, debido a su interacción con los residuos Met-Asp. Por lo tanto, TP sienta las bases para continuar el diseño de péptidos no naturales con propiedad bifuncional, usando como parte quelante de Cu(II) a los residuos Met-Asp.

TP expande la biblioteca de moléculas peptídicas no naturales con propiedad bifuncional y se ha demostrado que es una herramienta útil para elucidar el rol del Cu(II) en el proceso de agregación de β A, asociado a la enfermedad de Alzheimer. Los resultados sugieren que el Cu(II) no acelera ni retrasa el proceso de agregación de β A, simplemente, modifica la vía de agregación de β A que involucra la formación de fibras cortas y desordenadas, morfología consistente con reportes previos [199, 200]. En este trabajo demostramos que las fibras crecidas con Cu(II) se forman a partir de oligómeros grandes inducidos por la presencia del metal. La vía de agregación de β A con Cu(II) es abatida por la presencia de TP, obteniendo como producto final fibras largas y bien definidas; lo que sugiere que, aún en presencia de Cu(II), TP promueve parcialmente la vía de agregación como si no hubiera cobre (esquema 1).



Esquema 1. Modelo propuesto para la agregación de β A1-40 en presencia de Cu(II) y TP.

En la literatura se ha descrito que las especies tóxicas de β A son los oligómeros, sin embargo, los oligómeros generados por la presencia de Cu(II) en el proceso de agregación de β A son aún más tóxicos, posiblemente por la generación de especies de oxígeno reactivas. Por lo tanto, la bifuncionalidad del TP podría prevenir la formación de especies tóxicas promovida por el Cu(II). El efecto de TP en la neurotoxicidad de β A en presencia de Cu(II) tendría que ser evaluado. Aunque, la especificidad del TP por Cu(II) es un diseño prometedor para elucidar el efecto del Cu(II) involucrado en la neurotoxicidad del proceso de agregación de β A.

El presente trabajo brinda información sobre el papel del Cu(II) en el proceso de agregación de β A y en el diseño de compuestos con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

Al evaluar la capacidad de TP de competir por el Cu(II) contra β A, se concluyó que es necesario 1 equivalente de TP para desprender al cobre de β A. Y el complejo TP-Cu(II) tiene el mismo modo de coordinación que el péptido MDVFMK, por lo tanto TP se comporta conforme al diseño químico.

En este trabajo se diseñó y se comprobó la propiedad bifuncional de la molécula TP, ya que es capaz de:

- Retrasar el tiempo de nucleación de β A.
- Retrasar el aumento en el tamaño de los oligómeros a tiempos tempranos.
- Modificar la morfología de las fibras amiloides.
- Coordinar al ión Cu(II) y de competir por él.

Se espera que este estudio sirva como antecedente para elucidar el mecanismo de agregación de β A y continuar el diseño de compuestos con propiedades farmacológicas modificadoras del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES.

La molécula peptídica no natural llamada TP es bifuncional. El diseño original de su parte quelante con los residuos Met-Asp y su interacción con el péptido β -amiloide (β A) de los residuos D-Trp-Aib fueron exitosos en la evaluación *in vitro*.

El estudio de la molécula bifuncional TP permitió aportar información sobre el rol que tiene el Cu(II) en el proceso de agregación de β A. El Cu(II) promueve la formación inmediata de oligómeros grandes de β A que promueven la formación de estructuras cortas y desordenadas como producto final del proceso de agregación de β A. La vía de agregación de β A con Cu(II) cambia en presencia de TP, modificando el equilibrio a oligómeros no amorfos que conllevan a fibras ordenadas. La molécula control DP, demostró ser un agente que interacciona con la β A, se comportó conforme a lo reportado por Frydman-Marom y colaboradores en el 2009 [65]. DP hace las fibras amiloides más delgadas, pequeñas y delgadas que aquellas que no tienen DP.

El TP retrasa el proceso de agregación de β A en etapas tempranas, compite por Cu(II) frente a β A y promueve la vía de agregación similar a la de β A sin cobre aún en presencia del metal. Estas características lo hacen un excelente candidato como fármaco modificador del proceso de agregación de β A en presencia de Cu(II) en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Además, la caracterización de la interacción de β A con Cu(II) brinda información para entender la neuroquímica asociada a la enfermedad de Alzheimer.

PERSPECTIVAS.

El TP es una molécula bifuncional que ha demostrado tener propiedades *in vitro* interesantes para continuar su estudio como posible fármaco que ataca blancos terapéuticos involucrados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. En el proceso de descubrimiento farmacéutico, la optimización del fármaco líder (en este caso el TP) es la etapa siguiente. Por lo tanto, el proyecto continuará con el escalamiento en la producción de TP para su posterior evaluación en estudios preclínicos y toxicológicos. La etapa preclínica es parte del desarrollo farmacéutico, como perspectiva se evaluará el efecto de TP en un modelo *in vivo* de ratones triple transgénico, con las mutaciones en APP, Tau y presenilina 1. Estas modificaciones genéticas correlacionan las alteraciones moleculares de la enfermedad de Alzheimer con los síntomas clínicos, siendo un excelente modelo de estudio *in vivo*. Además, se evaluarán las propiedades farmacocinéticas del TP por administración intraperitoneal. Con la información farmacocinética, se conocerá la absorción, distribución, metabolismo y excreción del TP, también se sabrá si llega al sitio de acción y si lleva a cabo el mecanismo conforme al diseño químico original.

A partir de las observaciones obtenidas en este trabajo, se propone el uso de moléculas bifuncionales como fármacos prometedores modificadores de la agregación de β A, ya que permite abordar la estrategia terapéutica de

modulación de la agregación de β A y su disminución en el contacto con los iones metálicos. Atacar el proceso de agregación de β A en las etapas tempranas de EA con moléculas bifuncionales se considera clave para el tratamiento de esta enfermedad. Tanto en la literatura como en la presente tesis, las moléculas bifuncionales han demostrado ser excelentes candidatas como fármacos moduladores del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, sería interesante evaluar el efecto del TP en otras enfermedades amiloidogénicas. Por lo tanto, el TP se evaluará en otros modelos de enfermedades amiloidogénicas como las enfermedades priónicas y la diabetes tipo 2.

El descubrimiento y desarrollo de fármacos para la enfermedad de Alzheimer es un campo amplio para explorar, ya que, actualmente esta enfermedad no tiene cura. Otra perspectiva es realizar una amplia biblioteca de moléculas bifuncionales de naturaleza peptídica no natural como es el caso del TP. La estructura quelante puede mantenerse en los residuos MD ya que se ha demostrado por Binolfi y colaboradores [184] y en este trabajo su alta afinidad por cobre, también se podrían explorar quelantes de hierro para disminuir la actividad redox en la enfermedad. Mientras que la parte de interacción con la proteína podría ser algún derivado de la secuencia KLVFF, la cual en la literatura ha demostrado buenos resultados intercalantes con β A. El diseño de fármacos está apoyado por las herramientas *in silico*, por lo que, antes de realizar la síntesis de péptidos se sugiere utilizar herramientas para conocer los mejores candidatos en base a la interacción fármaco-proteína como docking y cálculos de estructura electrónica usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT); para calcular los parámetros de las reglas de Lipinski en el diseño de fármacos se propone el uso de www.molsoft.com y para predecir la información farmacocinética www.organic-chemistry.org.

Es claro que las perspectivas en torno al diseño de fármacos que ataquen los puntos claves en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer son infinitas hasta encontrar la forma de aliviar esta enfermedad.

ARTÍCULO.

La presente tesis doctoral dió como resultado el artículo:
Márquez M, Blancas-Mejía LM, Campos A, Rojas L, Castañeda-Hernández G, Quintanar L. *Metallomics*. 2014 Dec 20;6(12):2189-92. doi: 10.1039/c4mt00257a. Epub 2014 Oct 28.

Metallomics



COMMUNICATION

[View Article Online](#)
[View Journal](#)



Cite this: DOI: 10.1039/c4mt00257a

Received 1st October 2014,
Accepted 20th October 2014

DOI: 10.1039/c4mt00257a

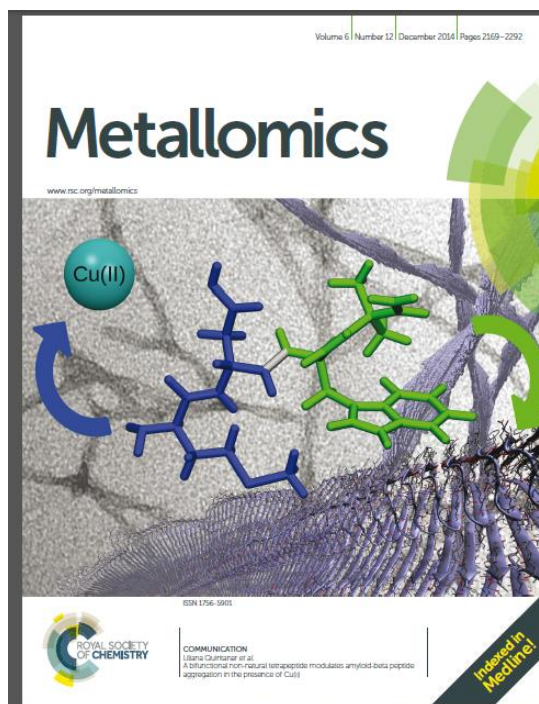
www.rsc.org/metallomics

A bifunctional non-natural tetrapeptide modulates amyloid-beta peptide aggregation in the presence of Cu(II)[†]

Maripaz Márquez,^{ab} Luis M. Blancas-Mejía,^d Adriana Campos,^c Luis Rojas,^c Gilberto Castañeda-Hernández^a and Liliána Quintanar^{*bd}

Amyloid-beta peptide (A β) aggregation is one of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD), and metal ions such as Cu(II) have been modulating A β aggregation,⁶⁻⁸ with the aim of developing chemical tools that would help understand the role of metal

Nuestro artículo fue la portada de la revista *Metallomics* Diciembre 2014.



REFERENCIAS.

1. Abbott, A., *Dementia: a problem for our age*. Nature, 2011. **475**(7355): p. S2-4.
2. Maccioni, R.B., J.P. Munoz, and L. Barbeito, *The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders*. Arch Med Res, 2001. **32**(5): p. 367-81.
3. Gella, A. and I. Bolea. *Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Pathogenesis, Biomarkers and Therapy*. [cited 2013; Available from: www.intechopen.com].
4. Jucker, M. and L.C. Walker, *Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders*. Ann Neurol, 2011. **70**(4): p. 532-40.
5. Del Pozo Yauner, L., S.L. Rodríguez Ambriz, and B. Becerril, *Las amiloidosis humanas: cuando las proteínas muestran su lado oscuro*. Mensaje bioquímico, 2008 **XXXII**: p. 79-94.
6. Scherzer-Attali, R., et al., *Generic inhibition of amyloidogenic proteins by two naphthoquinone-tryptophan hybrid molecules*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2012. **80**(8): p. 1962-1973.
7. Jiang, L., et al., *Structure-based discovery of fiber-binding compounds that reduce the cytotoxicity of amyloid beta*. eLife, 2013. **1**: p. 1-27.
8. Nelson, R., et al., *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 773-8.
9. Telpoukhovskaia, M.A. and C. Orvig, *Werner coordination chemistry and neurodegeneration*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(4): p. 1836-46.
10. Nichols, M.R., et al., *Growth of beta-amyloid(1-40) protofibrils by monomer elongation and lateral association. Characterization of distinct products by light scattering and atomic force microscopy*. Biochemistry, 2002. **41**(19): p. 6115-27.
11. Zatta, P., et al., *Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(7): p. 346-55.
12. Adlard, P.A., et al., *Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta*. Neuron, 2008. **59**(1): p. 43-55.
13. Kenche, V.B. and K.J. Barnham, *Alzheimer's disease & metals: therapeutic opportunities*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(2): p. 211-9.
14. Niedowicz, D.M., P.T. Nelson, and M.P. Murphy, *Alzheimer's disease: pathological mechanisms and recent insights*. Curr Neuropharmacol, 2011. **9**(4): p. 674-84.
15. Mullane, K. and M. Williams, *Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond?* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(3): p. 289-305.
16. Jakob-Roetne, R. and H. Jacobsen, *Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(17): p. 3030-59.
17. Galimberti, D. and E. Scarpini, *Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease*. Ther Adv Neurol Disord, 2011. **4**(4): p. 203-16.
18. Hamley, I.W., *The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization*. Chem Rev, 2012. **112**(10): p. 5147-92.
19. Fu, H.J., et al., *Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010. **9**(2): p. 197-206.
20. Cavallucci, V., M. D'Amelio, and F. Cecconi, *Abeta toxicity in Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2012. **45**(2): p. 366-78.

21. Kepp, K.P., *Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease*. Chem Rev, 2012. **112**(10): p. 5193-239.
22. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 101-12.
23. Mrak, R.E., *Microglia in Alzheimer brain: a neuropathological perspective*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 165021.
24. Frederickson, C.J., J.Y. Koh, and A.I. Bush, *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 449-62.
25. Takata, K. and Y. Kitamura, *Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid-beta, and microglia in Alzheimer's disease*. J Pharmacol Sci, 2012. **118**(3): p. 331-7.
26. Luo, Y., et al., *The molecular mechanism for human metallothionein-3 to protect against the neuronal cytotoxicity of Abeta(1-42) with Cu ions*. J Biol Inorg Chem, 2013. **18**(1): p. 39-47.
27. Mitsuyama, F., et al., *Stimulation-dependent intraspinal microtubules and synaptic failure in Alzheimer's disease: a review*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 519682.
28. Funk, K.E. and J. Kuret, *Lysosomal fusion dysfunction as a unifying hypothesis for Alzheimer's disease pathology*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 752894.
29. Martin, L., et al., *Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(1): p. 289-309.
30. Crespo-Biel, N., C. Theunis, and F. Van Leuven, *Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 251426.
31. Kolarova, M., et al., *Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 731526.
32. Gotz, J., A. Ittner, and L.M. Ittner, *Tau-targeted treatment strategies in Alzheimer's disease*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(5): p. 1246-59.
33. Roychaudhuri, R., et al., *Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 4749-53.
34. Rauk, A., *The chemistry of Alzheimer's disease*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(9): p. 2698-715.
35. Mohamed, A. and E. Posse de Chaves, *Abeta internalization by neurons and glia*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 127984.
36. Tougu, V., A. Tiiman, and P. Palumaa, *Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity*. Metallomics, 2011. **3**(3): p. 250-61.
37. Muller, U.C. and H. Zheng, *Physiological functions of APP family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a006288.
38. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
39. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
40. Lai, A.Y. and J. McLaurin, *Mechanisms of Amyloid-Beta Peptide Uptake by Neurons: The Role of Lipid Rafts and Lipid Raft-Associated Proteins*. International Journal of Alzheimer's Disease, 2011. **2011**: p. 1-11.
41. Sian, A.K., et al., *Oligomerization of beta-amyloid of the Alzheimer's and the Dutch-cerebral-haemorrhage types*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 1): p. 299-308.
42. Molina, J.A., et al., *Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease*. J Neural Transm, 1998. **105**(4-5): p. 479-88.

43. Spoenri, L., et al., *The amyloid precursor protein copper binding domain histidine residues 149 and 151 mediate APP stability and metabolism*. J Biol Chem, 2012. **287**(32): p. 26840-53.
44. Cuajungco, M.P. and K.Y. Faget, *Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease*. Brain Res Brain Res Rev, 2003. **41**(1): p. 44-56.
45. Zetterberg, H., K. Blennow, and E. Hanse, *Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease*. Exp Gerontol, 2010. **45**(1): p. 23-9.
46. Tiiman, A., P. Palumaa, and V. Tougu, *The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease - metal ions*. Neurochem Int, 2013. **62**(4): p. 367-78.
47. Sakono, M. and T. Zako, *Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers*. FEBS J, 2010. **277**(6): p. 1348-58.
48. Morgado, I. and M. Fandrich, *Assembly of Alzheimer's A beta peptide into nanostructured amyloid fibrils*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2011. **16**(6): p. 508-514.
49. Faller, P., C. Hureau, and O. Berthoumieu, *Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer's Amyloid-beta Peptide*. Inorg Chem, 2013.
50. Tycko, R., *Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(1): p. 96-103.
51. Valensin, D., C. Gabbiani, and L. Messori, *Metal compounds as inhibitors of beta-amyloid aggregation. Perspectives for an innovative metallotherapeutics on Alzheimer's disease*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19-20): p. 2357-2366.
52. Stains, C.I., K. Mondal, and I. Ghosh, *Molecules that target beta-amyloid*. ChemMedChem, 2007. **2**(12): p. 1674-92.
53. DeToma, A.S., et al., *Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(2): p. 608-21.
54. Fandrich, M., *Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity*. J Mol Biol, 2012. **421**(4-5): p. 427-40.
55. Klein, W.L., G.A. Krafft, and C.E. Finch, *Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends Neurosci, 2001. **24**(4): p. 219-24.
56. Lafaye, P., et al., *Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation*. Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 695-704.
57. Gunderson, W.A., et al., *Local structure and global patterning of Cu²⁺ binding in fibrillar amyloid-beta [Abeta(1-40)] protein*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(44): p. 18330-7.
58. Mondragon-Rodriguez, S., et al., *Amyloid Beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: rethinking the current strategy*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 630182.
59. Bolognin, S., et al., *Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-Abeta(1-42) aggregation and toxicity*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(6): p. 877-85.
60. Arena, G., et al., *Copper(II) interaction with amyloid-beta: Affinity and speciation*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(1-2): p. 3-12.
61. Ramamoorthy, A. and M.H. Lim, *Structural characterization and inhibition of toxic amyloid-beta oligomeric intermediates*. Biophys J, 2013. **105**(2): p. 287-8.
62. Cizas, P., et al., *Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers*. Arch Biochem Biophys, 2010. **496**(2): p. 84-92.
63. Kawahara, M., et al., *Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's beta-Amyloid Protein*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 304583.

64. Leon, R., A.G. Garcia, and J. Marco-Contelles, *Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease*. *Med Res Rev*, 2013. **33**(1): p. 139-89.
65. Frydman-Marom, A., et al., *Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. **48**(11): p. 1981-6.
66. Chini, M.G., et al., *Fibril aggregation inhibitory activity of the beta-sheet breaker peptides: a molecular docking approach*. *J Pept Sci*, 2009. **15**(3): p. 229-34.
67. Zhao, D.S., et al., *Exploring the binding mechanism of thioflavin-T to the beta-amyloid peptide by blind docking method*. *Science China-Chemistry*, 2012. **55**(1): p. 112-117.
68. Rao, P.P., T. Mohamed, and W. Osman, *Investigating the binding interactions of galantamine with beta-amyloid peptide*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. **23**(1): p. 239-43.
69. Sigurdsson, E.M., ed. *Amyloid Proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. ed. S.S.B. Media. Vol. 849. 2012.
70. Salvador, G.A., R.M. Uranga, and N.M. Giusto, *Iron and mechanisms of neurotoxicity*. *Int J Alzheimers Dis*, 2010. **2011**: p. 720658.
71. Mandel, S., et al., *Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents*. *Prog Neurobiol*, 2007. **82**(6): p. 348-60.
72. Bush, A.I. and R.E. Tanzi, *Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis*. *Neurotherapeutics*, 2008. **5**(3): p. 421-32.
73. Bush, A.I., *The metallobiology of Alzheimer's disease*. *Trends Neurosci*, 2003. **26**(4): p. 207-14.
74. Krupanidhi, S., A. Sreekumar, and C.B. Sanjeevi, *Copper & biological health*. *Indian J Med Res*, 2008. **128**(4): p. 448-61.
75. Lovell, M.A., et al., *Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques*. *J Neurol Sci*, 1998. **158**(1): p. 47-52.
76. Kaden, D., et al., *Disturbed copper bioavailability in Alzheimer's disease*. *Int J Alzheimers Dis*, 2011. **2011**: p. 345614.
77. Sarell, C.J., S.R. Wilkinson, and J.H. Viles, *Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer disease*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(53): p. 41533-40.
78. Garai, K., et al., *Selective destabilization of soluble amyloid beta oligomers by divalent metal ions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(1): p. 210-5.
79. Hureau, C., *Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-beta peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2012. **256**(19-20): p. 2164-2174.
80. Braymer, J.J., et al., *Development of bifunctional stilbene derivatives for targeting and modulating metal-amyloid-beta species*. *Inorg Chem*, 2011. **50**(21): p. 10724-34.
81. Pithadia, A.S. and M.H. Lim, *Metal-associated amyloid-beta species in Alzheimer's disease*. *Curr Opin Chem Biol*, 2012. **16**(1-2): p. 67-73.
82. Faller, P. and C. Hureau, *Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide*. *Dalton Trans*, 2009(7): p. 1080-94.
83. Bush, A.I., *Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2002. **23**(6): p. 1031-8.

84. Atwood, C.S., et al., *Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1219-33.
85. Zawisza, I., M. Rozga, and W. Bal, *Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A beta, APP, alpha-synuclein, PrP)*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19-20): p. 2297-2307.
86. Sovago, I., C. Kallay, and K. Varnagy, *Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19-20): p. 2225-2233.
87. Syme, C.D., et al., *Copper binding to the amyloid-beta (Abeta) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of Abeta-(1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18169-77.
88. Hureau, C. and P. Dorlet, *Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-beta peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A beta sequences*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19-20): p. 2175-2187.
89. Streltsov, V.A., et al., *The structure of the amyloid-beta peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease*. Biophys J, 2008. **95**(7): p. 3447-56.
90. Azimi, S. and A. Rauk, *On the involvement of copper binding to the N-terminus of the amyloid Beta Peptide of Alzheimer's disease: a computational study on model systems*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 539762.
91. Garcia, S., et al., *Dual role of Cu(2)(+) ions on the aggregation and degradation of soluble Abeta oligomers and protofibrils investigated by fluorescence spectroscopy and AFM*. J Inorg Biochem, 2012. **116**: p. 26-36.
92. Hyman, L.M. and K.J. Franz, *Probing oxidative stress: Small molecule fluorescent sensors of metal ions, reactive oxygen species, and thiols*. Coord Chem Rev, 2012. **256**(19-20): p. 2333-2356.
93. Pramanik, D., et al., *Interaction of amyloid beta peptides with redox active heme cofactor: Relevance to Alzheimer's disease*. Coordination Chemistry Reviews, 2013. **257**(1): p. 81-92.
94. Miller, Y., B. Ma, and R. Nussinov, *Metal binding sites in amyloid oligomers: Complexes and mechanisms*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**: p. 2245– 2252.
95. Bin, Y., S. Chen, and J. Xiang, *pH-dependent kinetics of copper ions binding to amyloid-beta peptide*. J Inorg Biochem, 2013. **119**: p. 21-7.
96. Ghalebani, L., et al., *pH-dependence of the specific binding of Cu(II) and Zn(II) ions to the amyloid-beta peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **421**(3): p. 554-60.
97. Tougu, V. and P. Palumaa, *Coordination of zinc ions to the key proteins of neurodegenerative diseases: A beta, APP, alpha-synuclein and PrP*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19-20): p. 2219-2224.
98. Tougu, V., et al., *Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid-beta (1-42) peptide are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1784-95.
99. Yang, C.A., et al., *Correlation of copper interaction, copper-driven aggregation, and copper-driven h(2)o(2) formation with abeta40 conformation*. Int J Alzheimers Dis, 2010. **2011**: p. 607861.
100. Mold, M., et al., *Copper prevents amyloid-beta(1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1256.

101. Shimanouchi, T., et al., *Copper-mediated growth of amyloid beta fibrils in the presence of oxidized and negatively charged liposomes*. J Biosci Bioeng, 2011. **112**(6): p. 611-5.
102. Aisen, P.S., J. Cummings, and L.S. Schneider, *Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(3): p. a006395.
103. Piau, A., et al., *Progress in the development of new drugs in Alzheimer's disease*. J Nutr Health Aging, 2011. **15**(1): p. 45-57.
104. Salomone, S., et al., *New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs*. Br J Clin Pharmacol, 2012. **73**(4): p. 504-17.
105. Adlard, P.A. and A.I. Bush, *Metal chaperones: a holistic approach to the treatment of Alzheimer's disease*. Front Psychiatry, 2012. **3**: p. 15.
106. Nie, Q., X.G. Du, and M.Y. Geng, *Small molecule inhibitors of amyloid beta peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(5): p. 545-51.
107. Libre Rodríguez, J.J. and M.A. Guerra Hernández, *Enfermedad de Alzheimer: situación actual y estrategias terapéuticas*. Rev Cubana Med, 1999. **38**(2): p. 134-142.
108. Hong-Qi, Y., S. Zhi-Kun, and C. Sheng-Di, *Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Abeta and tau*. Transl Neurodegener, 2012. **1**(1): p. 21.
109. Mohamed, T., et al., *Development and evaluation of multifunctional agents for potential treatment of Alzheimer's disease: application to a pyrimidine-2,4-diamine template*. Bioorg Med Chem Lett, 2012. **22**(14): p. 4707-12.
110. Bolognesi, M.L., et al., *Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(3): p. 303-8.
111. Howard, R., et al., *Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 893-903.
112. Sabbagh, M., et al., *Novel therapeutics in Alzheimer's disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 207969.
113. Cotelli, M., et al., *Non-pharmacological intervention for memory decline*. Front Hum Neurosci, 2012. **6**: p. 46.
114. Tabira, T., *Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies*. Tohoku J Exp Med, 2010. **220**(2): p. 95-106.
115. Galimberti, D. and E. Scarpini, *Alzheimer's disease: from pathogenesis to disease-modifying approaches*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011. **10**(2): p. 163-74.
116. Sun, N., S.A. Funke, and D. Willbold, *A Survey of Peptides with Effective Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease Rodent Models or in Human Clinical Studies*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2012. **12**(5): p. 388-398.
117. Castelletto, V., G. Cheng, and I.W. Hamley, *Amyloid peptides incorporating a core sequence from the amyloid beta peptide and gamma amino acids: relating bioactivity to self-assembly*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(46): p. 12470-2.
118. Hardy, J., *The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal*. J Neurochem, 2009. **110**(4): p. 1129-34.
119. Lobello, K., et al., *Targeting Beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 628070.
120. Klyubin, I., et al., *Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo*. Nature Medicine, 2005. **11**(5): p. 556-61.

121. Chacon, M.A., et al., *Beta-sheet breaker peptide prevents A β -induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(10): p. 953-61.
122. Adessi, C. and C. Soto, *Beta-sheet breaker strategy for the treatment of Alzheimer's disease*. Drug Development Research, 2002. **56**(2): p. 184-193.
123. Yang, W.G., et al., *Inhibition of Beta-Amyloid Peptide Aggregation by Multifunctional Carbazole-Based Fluorophores*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(8): p. 1804-1810.
124. Novick, P.A., et al., *Design of beta-amyloid aggregation inhibitors from a predicted structural motif*. J Med Chem, 2012. **55**(7): p. 3002-10.
125. Egleton, R.D. and T.P. Davis, *Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 44-53.
126. Doig, A.J., *Peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2007. **10**(5): p. 533-9.
127. Chafekar, S.M., et al., *Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of beta-amyloid aggregation*. Chembiochem, 2007. **8**(15): p. 1857-1864.
128. Hetenyi, C., et al., *Pentapeptide amides interfere with the aggregation of beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(4): p. 931-6.
129. Estrada, L.D. and C. Soto, *Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer disease treatment*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2007. **7**(1): p. 115-126.
130. Jensen, M., et al., *Inhibition of Cu-amyloid-beta by using bifunctional peptides with beta-sheet breaker and chelator moieties*. Chemistry, 2012. **18**(16): p. 4836-9.
131. Tjernberg, L.O., et al., *Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8545-8.
132. Tjernberg, L.O., et al., *Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands (vol 272, pg 12601, 1997)*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(28): p. 17894-17894.
133. Veloso, A.J. and K. Kerman, *Modulation of fibril formation by a beta-sheet breaker peptide ligand: an electrochemical approach*. Bioelectrochemistry, 2012. **84**: p. 49-52.
134. Soto, C., et al., *Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(3): p. 672-80.
135. Neddenriep, B., et al., *Short Peptides as Inhibitors of Amyloid Aggregation*. The Open Biotechnology Journal 2011. **5**(39-46).
136. Giordano, C., et al., *New β -sheet breakers related to the 17-21 fragment of A β 1-40*. Biophysics & Bioeng. Letters, 2012. **5** (2): p. 2-20.
137. Wu, W.H., et al., *Sequestration of copper from beta-amyloid promotes selective lysis by cyclen-hybrid cleavage agents*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31657-64.
138. Soto, C., et al., *beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy*. Nature Medicine, 1998. **4**(7): p. 822-826.
139. Viet, M.H., et al., *Inhibition of aggregation of amyloid peptides by beta-sheet breaker peptides and their binding affinity*. J Phys Chem B, 2011. **115**(22): p. 7433-46.
140. Rocha, S., et al., *Design and biological activity of beta-sheet breaker peptide conjugates*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **380**(2): p. 397-401.
141. Adessi, C., et al., *Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13905-11.

142. Permanne, B., et al., *Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide*. *Faseb Journal*, 2002. **16**(8): p. 860-2.
143. Chen, Z., G. Krause, and B. Reif, *Structure and orientation of peptide inhibitors bound to beta-amyloid fibrils*. *J Mol Biol*, 2005. **354**(4): p. 760-76.
144. Wang, S.S., Y.T. Chen, and S.W. Chou, *Inhibition of amyloid fibril formation of beta-amyloid peptides via the amphiphilic surfactants*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1741**(3): p. 307-13.
145. Howlett, D.R., et al., *Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a novel series of benzofurans*. *Biochem J*, 1999. **340 (Pt 1)**: p. 283-9.
146. Ikeda, K., et al., *Inhibition of the formation of amyloid beta-protein fibrils using biocompatible nanogels as artificial chaperones*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(28-29): p. 6587-95.
147. Rodriguez-Rodriguez, C., et al., *Design, selection, and characterization of thioflavin-based intercalation compounds with metal chelating properties for application in Alzheimer's disease*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(4): p. 1436-51.
148. Ehrnhoefer, D.E., et al., *EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(6): p. 558-66.
149. Hoogenraad, T.U., *Paradigm shift in treatment of Alzheimer's disease: zinc therapy now a conscientious choice for care of individual patients*. *Int J Alzheimers Dis*, 2011. **2011**: p. 492686.
150. Cooper, G.J.S., *Therapeutic Potential of Copper Chelation with Triethylenetetramine in Managing Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease*. *Drugs*, 2011. **71**(10): p. 1281-1320.
151. Trapaidze, A., et al., *Thermodynamic study of Cu²⁺ binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine*. *J Biol Inorg Chem*, 2012. **17**(1): p. 37-47.
152. Rimola, A., et al., *Ab Initio Design of Chelating Ligands Relevant to Alzheimer's Disease: Influence of Metalloaromaticity*. *Journal of Physical Chemistry A*, 2011. **115**(45): p. 12659-12666.
153. Cherny, R.A., et al., *Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice*. *Neuron*, 2001. **30**(3): p. 665-76.
154. Hu, W.P., et al., *Kinetic analysis of beta-amyloid peptide aggregation induced by metal ions based on surface plasmon resonance biosensing*. *J Neurosci Methods*, 2006. **154**(1-2): p. 190-7.
155. Amit, T., et al., *Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators*. *Faseb Journal*, 2008. **22**(5): p. 1296-305.
156. Rodriguez-Rodriguez, C., M. Telpoukhovskaia, and C. Orvig, *The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2012. **256**(19-20): p. 2308-2332.
157. Raman, B., et al., *Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid {beta} peptide*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(16): p. 16157-62.
158. Xu, L., et al., *Combining conformational sampling and selection to identify the binding mode of zinc-bound amyloid peptides with bifunctional molecules*. *J Comput Aided Mol Des*, 2012. **26**(8): p. 963-76.
159. Budimir, A., et al., *Hydroxyquinoline based binders: promising ligands for chelation therapy?* *J Inorg Biochem*, 2011. **105**(3): p. 490-6.

160. Fernandez-Bachiller, M.I., et al., *Novel Tacrine-8-Hydroxyquinoline Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease, with Neuroprotective, Cholinergic, Antioxidant, and Copper-Complexing Properties*. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **53**(13): p. 4927-4937.
161. Prana, B. *Prana Biotechnology firms PBT2 as Alzheimer's disease treatment*. 2013 [cited 2013; Available from: www.proactiveinvestors.com.au].
162. Faux, N.G., et al., *PBT2 Rapidly Improves Cognition in Alzheimer's Disease: Additional Phase II Analyses*. Journal of Alzheimers Disease, 2010. **20**(2): p. 509-516.
163. Lannfelt, L., et al., *Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A beta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet Neurology, 2008. **7**(9): p. 779-786.
164. Relkin, N.R., *Testing the mettle of PBT2 for Alzheimer's disease*. Lancet Neurology, 2008. **7**(9): p. 762-763.
165. Zheng, H., et al., *Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(3): p. 773-83.
166. Crouch, P.J., et al., *Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 381-6.
167. Crouch, P.J. and K.J. Barnham, *Therapeutic redistribution of metal ions to treat Alzheimer's disease*. Acc Chem Res, 2012. **45**(9): p. 1604-11.
168. Choi, J.S., et al., *Synthesis and characterization of IMPY derivatives that regulate metal-induced amyloid-beta aggregation*. Metallomics, 2011. **3**(3): p. 284-91.
169. Di Vaira, M., et al., *Clioquinol, a drug for Alzheimer's disease specifically interfering with brain metal metabolism: structural characterization of its zinc(II) and copper(II) complexes*. Inorg Chem, 2004. **43**(13): p. 3795-7.
170. Mancino, A.M., et al., *Effects of clioquinol on metal-triggered amyloid-beta aggregation revisited*. Inorg Chem, 2009. **48**(20): p. 9596-8.
171. Braymer, J.J., et al., *Recent Development of Bifunctional Small Molecules to Study Metal-Amyloid-beta Species in Alzheimer's Disease*. Int J Alzheimers Dis, 2010. **2011**: p. 623051.
172. Choi, J.S., et al., *Design of small molecules that target metal-A{beta} species and regulate metal-induced A{beta} aggregation and neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(51): p. 21990-5.
173. Hindo, S.S., et al., *Small molecule modulators of copper-induced Abeta aggregation*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(46): p. 16663-5.
174. Savelieff, M.G., et al., *A small molecule that displays marked reactivity toward copper-versus zinc-amyloid-beta implicated in Alzheimer's disease*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(40): p. 5301-3.
175. Sharma, A.K., et al., *Bifunctional compounds for controlling metal-mediated aggregation of the abeta42 peptide*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(15): p. 6625-36.
176. Schugar, H., et al., *Combating Alzheimer's disease with multifunctional molecules designed for metal passivation*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(10): p. 1716-1718.
177. Gestwicki, J.E., G.R. Crabtree, and I.A. Graef, *Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation*. Science, 2004. **306**(5697): p. 865-9.
178. Dedeoglu, A., et al., *Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis*. Exp Gerontol, 2004. **39**(11-12): p. 1641-9.
179. Zhang, Y., et al., *The chelation targeting metal-Abeta40 aggregates may lead to formation of Abeta40 oligomers*. Dalton Trans, 2011. **40**(18): p. 4830-3.

180. Schugar, H., et al., *Combating Alzheimer's disease with multifunctional molecules designed for metal passivation*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(10): p. 1716-8.
181. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
182. Binolfi, A., et al., *Site-specific interactions of Cu(II) with alpha and beta-synuclein: bridging the molecular gap between metal binding and aggregation*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(35): p. 11801-12.
183. Binolfi, A., et al., *Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein*. *Inorg Chem*, 2010. **49**(22): p. 10668-79.
184. Binolfi, A., et al., *Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2012. **256**(19-20): p. 2188-2201.
185. Association, A.s., *2012 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's & Dementia*, 2012. **8**: p. 131-168.
186. Wimo, A. and M. Prince, *World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia*. *Alzheimer's Disease International*, 2010. **1**: p. 1-12.
187. Abbott, A., *A how-to for peer review*. *Nature*, 2011. **473**(7345): p. 17.
188. Taylor, A.W., P. Licence, and A.P. Abbott, *Non-classical diffusion in ionic liquids*. *Phys Chem Chem Phys*, 2011. **13**(21): p. 10147-54.
189. Ma, S.F., et al., *Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2005. **33**(12): p. 1911-9.
190. www.eluniversal.com.mx. 2010.
191. Marquez, M., et al., *A bifunctional non-natural tetrapeptide modulates amyloid-beta peptide aggregation in the presence of Cu(ii)*. *Metallomics*, 2014. **6**(12): p. 2189-92.
192. Zarandi, M., et al., *Synthesis of Abeta[1-42] and its derivatives with improved efficiency*. *J Pept Sci*, 2007. **13**(2): p. 94-9.
193. Williams, A.M. and T. Daviter, eds. *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology*. ed. S.S.B. Media. Vol. 1008. 2013: New York. 267-297.
194. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(7): p. 1405-12.
195. Ban, T., et al., *Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16462-5.
196. Noormagi, A., et al., *Interference of low-molecular substances with the thioflavin-T fluorescence assay of amyloid fibrils*. *J Pept Sci*, 2012. **18**(1): p. 59-64.
197. Instruments, M., *Dinamic Light Scattering, technical note*. Malvern Instruments, 2012. **1**: p. 1-8.
198. Bozzok, J. and L. Russell, eds. *Electron microscopy principles and techniques for biologists*. 2 ed. 1999, Jones and Barlett Publiser.
199. Jun, S. and S. Saxena, *The aggregated state of amyloid-beta peptide in vitro depends on Cu²⁺ ion concentration*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(21): p. 3959-61.
200. Sharma, A.K., et al., *The effect of Cu(2+) and Zn(2+) on the Abeta42 peptide aggregation and cellular toxicity*. *Metallomics*, 2013. **5**(11): p. 1529-36.