



Cinvestav
Unidad Irapuato

***"Enfermedad de Alzheimer: un tratamiento basado en una VLP
quimérica producida en *Nicotiana benthamiana*".***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestría en Biotecnología de Plantas

PRESENTA

Rafael González Castro

TUTOR

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim

CO TUTORA: Dra. Gohar Gevorgyan Markosian

SINODALES: Dr. Mauricio Carrillo Tripp

Dr. Víctor Olalde Portugal

Irapuato, Gto

Agosto 2016

Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim** en el **Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados** Unidad Irapuato.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

. **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim**

. **Dra. Gohar Gevorgyan Markosian**

. **Dr. Mauricio Carrillo Tripp**

. **Dr. Víctor Olalde Portugal**

Se agradece al Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana y al **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim** por su invaluable ayuda, constante participación, asesoría y consejos en el desarrollo de este proyecto ya que sin los cuales no hubiera sido posible la realización del mismo.

Se agradece a la **Dra. Gohar Gevorgyan Markosian** por prestar todas las facilidades dentro del Laboratorio de Investigación sobre la Enfermedad de Alzheimer para el desarrollo de la parte inmunológica dentro del presente proyecto además de su asesoría para la realización del mismo.

Se agradece al **Dr. Mauricio Carrillo Tripp** por las asesorías y construcción *in silico* de las estructuras de cápside además de las facilidades prestadas dentro de su laboratorio.

Se agradece al **Dr. Víctor Olalde Portugal** por sus asesorías, críticas y aportaciones a la realización del proyecto presente.

Se agradece la asesoría técnica de la **M. en C. Brisia Alejandra Aguilar Barragán** para el desarrollo de la parte de biología molecular del presente trabajo.

Se agradece la asesoría técnica y capacitación de la **Dra. Laura Uribe Campero, M. en C. Yardená Margarita García Salcedo y M. en C. Víctor Alejandro Vázquez Pérez** para el desarrollo de la parte de bioquímica del presente trabajo.

Se agradece la asesoría técnica del **Biól. Exp. Gonzalo Acero** para el desarrollo de la parte inmunológica del presente trabajo.

Se reconocen los servicios y materiales facilitados por el **Dr. Lino Sánchez Segura** y el **Dr. José Luis Luna Muñoz** para la realización de este proyecto.

Agradecimientos

Antes que nada agradezco al Dr. Miguel por haberme dado la oportunidad de entrar a su laboratorio y dejarme ser parte de su equipo de trabajo. Doc, le agradezco todos los consejos técnicos y de vida que me dio, todo el apoyo que me brindó ya que no recuerdo una sola vez que haya necesitado de usted y que no me hubiera atendido a la mayor brevedad posible y siempre de la manera más amable. También le agradezco haberme dado la libertad de crear el proyecto a mi entero criterio, pero más que nada le agradezco haberme devuelto la confianza en mi mismo al depositar en mí su confianza. Ojalá sean muchas más carnes asadas, idas al Jaibón, festejos en Guanajuato y risas las que nos queden por compartir.

Agradezco de antemano a la Dra. Gohar por haberme abierto las puertas de su laboratorio por segunda vez, ya que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible..... hay ocasiones en que las segundas partes también son buenas.....muchas gracias Doctora.

Agradezco a todas las personas que me ayudaron, aconsejaron, regañaron y se preocuparon porque esto saliera adelante:

Nancy muchas gracias. Tú que fuiste mi primer Maestra Pokémon y la que me enseñó mis primeros pasos de biología molecular. Cuando la ligación parecía imposible y recurrí a tu ayuda solo miraste los apuntes y me dijiste: "No te preocupes Rafa, para mañana esto sale, tranquilo". Ojalá y algún día cuando alguien con menos experiencia acuda a mí en busca de ayuda se la pueda brindar y decirle con la misma seguridad que no se preocupe, que para mañana su problema sale.

Agradezco a Ale por tooooooda su paciencia conmigo y por toda la ayuda que me brindó. Cuando no podía encontrar las enzimas para la ligación y me resolviste la vida con un mail, cuando me conseguías el material que necesitaba en cuestión de minutos y sobre todo por todas las fiestas, carnes asadas, risas y Lunes por la mañana comentando Game of Thrones. Muchas gracias Ale, sin ti todo hubiera sido más duro y mucho menos divertido.

Quiero darle las gracias a Luis por todas las veces que me dio de sus plásmidos y por todos sus consejos tan acertados de biología molecular. Siempre de buen humor y siempre dispuesto a ayudar a todos.....ojalá todos fuéramos un poco menos como nosotros y un poco más como tú.

Agradezco a Anny y a Dianita por su invaluable ayuda a lo largo de todo este tiempo pero por encima de ello quiero agradecerles su amistad tan sincera. Dianita, tú siempre con una sonrisa y buen humor, sinceramente a veces creo que no eres de este mundo, eres demasiado pura y amigable.....demasiadas pocas personas como tú y que lástima. A mi Chaparra querida no puedo hacer otra cosa más que cubrirla de elogios. Anna Gloria eres una de las mujeres más fuertes, sinceras, agradables y fregonas que conozco. Agradezco tanto haberte conocido porque me enseñaste tantas cosas positivas dentro del laboratorio pero también fuera de él, siempre tan madura y certera con tus comentarios pero sobre todo con tus consejos. Te agradezco muchísimo Anny, sabes que te quiero de a madres.

Julio, muchas gracias por todo carnal, sabes que no tengo conque pagarte toda la ayuda que me diste durante el tiempo que estuvimos juntos en esto. Eres una persona increíble y un gran amigo.....experimento a experimento, fiesta a fiesta y borrachera a borrachera salimos adelante y siempre héchandonos la mano.....nadie como tú Funda, te estimo un buen.

Quiero agradecerle también Gonzalo, tengo tantas y tantas cosas que agradecerle y no solo de este proyecto sino de estos casi 8 años de conocernos. Eres la persona más alegre, eficiente y posiblemente de las más listas e inteligentes que he conocido o conoceré. Siempre ayudándome, siempre empujándome hacia adelante cuando el camino era una cuesta muy muy empinada, siempre aconsejándome y regañándome cuando debías hacerlo e incluso a veces metiendo las manos al fuego por mí. Cuando estuve a punto de claudicar me levantaste y me dijiste que no diera gusto a otros, que tenía que hacer que las cosas se resbalaran y las dejara ir.....uno de los mejores consejos que he recibido en toda mi vida. Muchas gracias, sin ti en verdad que nunca lo hubiera logrado mi estimado Dr. Mononoke.

También quiero agradecer a mis actuales compañeros de laboratorio y a los que ya no están: Marco, Alex, Cristian, Beto, Lina, Uriel, Adri, Marisol, Mayté, Chava, Andrea, Yareli y Fernando. Gracias por los consejos, tooooooda la ayuda, las fiestas pero sobre todo gracias por todas las sonrisas compartidas y las carcajadas arrancadas, sin todos ustedes esto nunca hubiera sido lo mismo.

Agradezco también a las personas de RECOMBINA por todas las atenciones que tuvieron conmigo. Laura, muchas gracias por permitirme sacar adelante la purificación allá, gracias por los consejos y por las veces que tuviste que quedarte hasta más tarde de lo que debías por mi culpa...en serio muchas muchas gracias. A Holjes y a Itzel por toda la ayuda que me brindaron, por todos los consejos técnicos y sobre todo por el buen ambiente del laboratorio.....se extrañan los comentarios doble sentido de los dos y las noches de Mario en el Wii ☺

A Vic le tengo que agradecer de manera especial. Carnal en serio que nunca te voy a poder pagar todo lo que has hecho por mí. Me llevaste a ser mejor con tu ejemplo, y también hay que decirlo, con tus regañíos jajajaja....."la primera vez lo hago yo y tú observas, la segunda vez lo haces tú mientras yo te vigilo y la tercera vez olvídate de mí, ya debes saber hacerlo solo"....era aprender o morir en el intento jajaja. Si no hubiera sido por ti seguramente todavía estaría purificando las proteínas. Gracias por todas las veces que te quedaste conmigo hasta la madrugada para poder purificar la proteína en menos de un mes, un mes de locura en donde se trabajaba de Lunes a Domingo y de 10 de la mañana a 12 de la noche pero al final lo logramos. Gracias por todos los buenos momentos, risas, fiestas, Beer Hours, karaokes, viajesillos y borracheras. Sabes que eras una persona especial y que cuando me necesites siempre voy a estar ahí para lo que sea carnal, muchas gracias.

Le agradezco a mi tía Agus y a mi Viejo por todo lo que me han apoyado a través de los años. Desde que era un niño de 7 años que soñaba con ser paleontólogo hasta el momento en que me convertí en un profesionalista han estado conmigo en todo. Muchas gracias a los dos, no tengo como pagar lo que han hecho por mí. Ustedes son una de las causas que me hacen seguir adelante, ustedes son una de mis principales referencias del camino que he de seguir en la vida.

A mi mamá, a mi papá y a mi hermana. Casi todo lo que hay dentro de mí es un reflejo de ustedes tres. Ustedes me han apoyado en todo y muchas veces más allá de sus propias fuerzas y posibilidades. Mamá de ti he aprendido que la honestidad y pureza de corazón son mejor que cualquier otra cosa, que si realmente deseas algo tienes que luchar por ello con absolutamente todas tus fuerzas porque nadie te va a regalar nada y que por más difícil que sea el momento y más oscura que parezca la noche todo tiene solución y siempre llega el amanecer. Sabes que te amo con todo mi corazón. Papá de ti he aprendido que a pesar de todo tengo que ser responsable: responsable de cumplir mis obligaciones, responsable de acatar el deber aunque muchas veces no es lo que quisiéramos y responsable de mis actos. Gracias por siempre estar a mi lado y cuidándome las espaldas, sin ti nunca hubiera llegado hasta aquí. Simio de ti he aprendido que un corazón noble siempre es algo de lo que se debe estar orgulloso a pesar de que la gente en ocasiones se aproveche de ello. Tu bondad es lo más preciado que tienes, nunca vayas a cambiar eso porque hoy en día una persona como tú es muy rara pero al mismo tiempo apreciada. Ustedes tres son el principal espejo en el que me observo y me auto-crítico para saber si aún sigo con los pies en la tierra, si aún soy la persona que debo de ser, si no he olvidado de donde vengo y aún más importante....hacia donde voy. También por los que ya no están conmigo, Abuelita y Sacroso, todavía lloro por ustedes y los extraño.

Por último quiero agradecer a la persona más sorprendente, intrigante e importante de mi vida.....a Yari Wararita. ¿Y que te puedo decir que no te haya dicho ya? Antes que nada te quiero agradecer por todo lo que me ayudaste en este proyecto: la ligación, la purificación, el gel imposible que tuvimos que repetir 5 veces para que se viera bonito, todos los Sábados que me acompañaste a trabajar, los innumerables consejos técnicos, el que me resolvías o facilitabas la vida y también el que me calmabas cuando me ponía psicótico y me abrumaba el trabajo, muchas muchas muchas gracias por todo ello Yari. Eres la persona más especial y mágica que he conocido, porque ese es el mejor adjetivo para describirte "mágica". Siempre la voz de mi razón, siempre a un lado de mí en los buenos y malos momentos, siempre cuidándome y siempre queriéndome a pesar de todos mis defectos. Todo este esfuerzo dio fruto gracias a ti. Eres lo mejor que me ha pasado en la vida y es por ello que siempre voy a estar junto a ti, TE AMO.

PROVEHITO IN ALTUM

ÍNDICE

<u>Índice de figuras</u>	7
<u>Resumen</u>	10
<u>Introducción</u>	11
. Descripción	11
. Epidemiología	11
. Factores de riesgo	11
. Sintomatología	12
. Patología característica	12
. Péptido beta amiloide	14
. Hipótesis de la cascada amiloide	16
. Especies amino-truncadas del péptido beta amiloide	16
. Péptido A β p(E) ₁₁₋₄₂	18
. Tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer	18
. Estrategias inmunoterapéuticas contra la Enfermedad de Alzheimer	19
. Inmunoterapia en humanos	20
. Mecanismos de acción inmunoterapéutica de los anticuerpos contra el péptido beta amiloide	20
. Estrategias para el desarrollo de un tratamiento efectivo contra la Enfermedad de Alzheimer	22
. Virus Like Particles	22
. Proteína de cápside L1	24
. Expresión de proteínas heterólogas en plantas	25
<u>Justificación</u>	26
<u>Objetivo general</u>	27
<u>Objetivos particulares</u>	27
<u>Metodología</u>	28
Creación por homología <i>in silico</i> de las estructuras de cápside L1a y L1b mediante el paquete <i>Rosetta</i>	28

. Creación del vector de clonación pUC57 codificante para la proteína quimérica	28
. Obtención del DNA plasmídico	29
. Digestión del DNA plasmídico	29
. Ligación de los insertos L1a y L1b en el vector de expresión pICH31070	29
. Obtención del producto de ligación en alta copia	30
. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> recombinante y agroinfiltración	31
. Extracción de la proteína quimérica	32
. Concentración de la proteína L1 quimérica	33
. Purificación de la proteína L1 quimérica	33
. Desensamble y ensamble de la proteína quimérica	34
. Análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica	34
. Cuantificación de la concentración de la VLP quimérica	34
. Comprobación de la presencia del epítipo A β 11-28 sobre la superficie de la VLP quimérica	34
. Protocolo de inmunización para ratones de la cepa C57BL/6	35
. Obtención de sueros	35
. Detección de anticuerpos anti-A β en suero de ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	36
. Reconocimiento del péptido beta amiloide de longitud completa y especies amino-truncadas por medio de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	36
. Identificación de los isótipos de IgG encontrados en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	37
. Análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro humano y ratón transgénico para comprobar el reconocimiento de beta amiloide por parte de los anticuerpos inducidos	37
. Determinación de la estabilidad de las VLPs quiméricas a partir de diferentes condiciones de pH y concentración de NaCl	38
<u>Resultados</u>	40
. Creación por homología <i>in silico</i> de las VLPs quiméricas del Virus de Papiloma Humano 16 y representación del fragmento 11-28 dentro de su estructura	40
. Creación del vector de clonación pUC57 codificante para la proteína quimérica	44

. Ligación de los insertos L1a y L1b en el vector de expresión pICH31070	45
. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> recombinante y agroinfiltración	46
. Comprobación de la integridad de las proteínas extraídas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
. Purificación de las proteínas L1 quiméricas	48
. Análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica	53
. Comprobación de la presencia del epítipo A β 11-28 sobre la superficie de la VLPs quiméricas	55
. Detección de anticuerpos anti-A β en suero de ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	55
. Reconocimiento del péptido beta amiloide de longitud completa y especies amino-truncadas por medio de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	58
. Evaluación de la respuesta inmune mediante la identificación de isotipos IgG encontrados en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas	59
. Análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro de ratones transgénicos 3xTg-AD y en cortes de cerebro humano para comprobar la capacidad de los anticuerpos inducidos para reconocer agregados amiloide	60
. Análisis de inhibición de los anticuerpos anti-VLPs quiméricas con diferentes fragmentos del péptido beta amiloide	62
. Determinación de la estabilidad y condiciones de almacenamiento de las VLPs quiméricas	63
<u>Discusión</u>	67
<u>Conclusiones</u>	71
<u>Bibliografía</u>	72

Índice de figuras

Figura 1. <u>Micrografías de corte de cerebro de pacientes con EA que muestran marañas neurofibrilares</u>	13
Figura 2. <u>Micrografías de corte de cerebro humano correspondientes a pacientes con EA que muestran agregados amiloides</u>	14
Figura 3. <u>Procesamiento proteolítico de la APP</u>	15
Figura 4. <u>Modelado molecular de la estructura terciaria del péptido beta amiloide 1-42</u>	15
Figura 5. <u>Diagrama de flujo que muestra el desarrollo de la hipótesis de la cascada amiloide</u>	16
Figura 6. <u>Secuencia de aminoácidos de Aβ1-40, Aβ1-42 y las especies amino-truncadas Aβ3-42 y Aβ11-42</u>	17
Figura 7. <u>Formación del piroglutamato</u>	17
Figura 8. <u>Modelado de la estructura terciaria del péptido beta amiloide 11-42</u>	18
Figura 9. <u>Mecanismos de eliminación del péptido beta amiloide a través de anticuerpos anti-beta amiloide</u>	21
Figura 10. <u>VLPs aprobadas para su uso en humanos</u>	22
Figura 11. <u>Estructura de una VLP</u>	23
Figura 12. <u>Modelado molecular de una VLP formada a partir de la proteína de cápside L1 del HPV16</u>	24
Figura 13. <u>Modelado molecular del péptido Aβ1-42</u>	40
Figura 14. <u>Modelado molecular de la proteína de cápside L1 wt en representación globular y de listones</u>	41
Figura 15. <u>Modelado molecular de la proteína quimérica L1a</u>	41
Figura 16. <u>Modelado molecular de la proteína quimérica L1b</u>	42
Figura 17. <u>Modelado molecular de la cápside del Virus de Papiloma Humano 16</u>	42
Figura 18. <u>Modelado molecular de la cápside quimérica L1a</u>	43
Figura 19. <u>Modelado molecular de la cápside quimérica L1b</u>	43
Figura 20. <u>Mapa del vector de clonación pUC57 con el inserto de DNA codificante para la proteína quimérica L1a o L1b</u>	44
Figura 21. <u>Caracterización del vector de clonación pUC57-L1a/L1b</u>	44
Figura 22. <u>Mapa del vector de expresión pICH31070 con el inserto de DNA codificante para la proteína quimérica L1a o L1b</u>	45
Figura 23. <u>Caracterización del vector de expresión pICH31070-L1a/L1b</u>	45
Figura 24. <u>Vectores de expresión utilizados para la técnica de agroinfiltración</u>	46

Figura 25. <u>Comprobación mediante GFP de la expresión heteróloga en plantas de la especie <i>Nicotiana benthamiana</i></u>	46
Figura 26. <u>Comprobación de integridad de la proteína total extraída de las plantas <i>N. benthamiana</i></u>	47
Figura 27. <u>Detección de proteínas L1 quiméricas mediante Western Blot</u>	47
Figura 28. <u>Purificación de las proteínas L1 quiméricas mediante cromatografía de intercambio catiónico</u>	48
Figura 29. <u>Cromatograma de la purificación de la muestra L1a S2 por cromatografía de intercambio catiónico</u>	49
Figura 30. <u>Cromatograma de la purificación de la muestra L1b S2 por cromatografía de intercambio catiónico</u>	50
Figura 31. <u>Purificación de la muestra L1a S2 por cromatografía de exclusión molecular</u>	51
Figura 32. <u>Purificación de la muestra L1b S2 por cromatografía de exclusión molecular</u>	51
Figura 33. <u>Detección por Western Blot de las proteínas L1 quiméricas en las muestras obtenidas por cromatografía de exclusión molecular</u>	52
Figura 34. <u>Muestras concentradas de las proteínas L1 quiméricas purificadas mediante métodos cromatográficos</u>	52
Figura 35. <u>Detección mediante Western Blot de las proteínas L1 quiméricas purificadas</u>	53
Figura 36. <u>Micrografías de VLP L1a tomadas con Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM)</u>	54
Figura 37. <u>Micrografías de VLP L1b tomadas con Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM)</u>	54
Figura 38. <u>Ensayo de ELISA realizado para comprobar la presencia del epítipo heterólogo 11-28 sobre la superficie de las VLPs quiméricas</u>	55
Figura 39. <u>Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-Aβ1-42</u>	56
Figura 40. <u>Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-Aβ3-42</u>	57
Figura 41. <u>Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-Aβ11-42</u>	57
Figura 42. <u>Detección por Western Blot de monómeros y oligómeros de beta amiloide a través de los anticuerpos inducidos</u>	58
Figura 43. <u>Isotipificación mediante ensayo de ELISA de los anticuerpos anti-beta amiloide</u>	59
Figura 44. <u>Determinación mediante inmunohistoquímica de la capacidad de los anticuerpos inducidos para detectar agregados amiloides en cerebro de ratón transgénico</u>	60
Figura 45. <u>Determinación mediante inmunohistoquímica de la capacidad de los anticuerpos inducidos para detectar agregados amiloides en cerebro humano</u>	61
Figura 46. <u>Análisis de inhibición <i>in vitro</i> de los anticuerpos anti-VLPs quiméricas con diferentes fragmentos del péptido beta amiloide</u>	62
Figura 47. <u>Micrografía de la muestra madre de las VLPs quiméricas tomada con el TEM</u>	63

Figura 48. Micrografías de los grupos control del análisis de estabilidad de las VLPs quiméricas 64

Figura 49. Micrografías de las muestras de VLPs quiméricas almacenadas a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y rango de pH 4-7 65

Figura 50. Micrografías de las muestras de VLPs quiméricas almacenadas a 4°C en buffer MOPS 500 mM de NaCl y rango de pH 4-7 67

1. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central manifestado por deficiencias conductuales, de memoria, demencia progresiva, pérdida de autovalía y finalmente la muerte. La EA es el tipo de demencia más común en personas de edad avanzada y se caracteriza por la presencia de placas amiloides en la corteza cerebral formadas por el péptido beta amiloide.

El péptido beta amiloide presenta una longitud variable que va de los 40 a los 43 aminoácidos (a.a.) de longitud, siendo el beta amiloide 1-42 ($A\beta$ 1-42) el principal responsable de la formación de las placas amiloides en el cerebro. Debido al rol crítico del péptido amiloide en la patogénesis de la EA, este ha sido históricamente el principal blanco terapéutico para el desarrollo de una vacuna. Recientes estudios, sin embargo, han demostrado la existencia de especies del péptido beta amiloide que carecen del extremo amino terminal (N-terminal), las cuales han sido bautizadas como especies amino-truncadas. Las especies amino-truncadas han sido descritas como más fibrillogénicas, con mayor rapidez de agregación y más inmunógenas que el péptido de longitud completa. Estas especies amino-truncadas contienen una modificación postraducciona consistente en la ciclización del glutamato en el extremo N-terminal. Esta modificación otorga a las especies amino-truncadas una mayor resistencia a su degradación a través de aminopeptidasas extracelulares, lo que conlleva a su acumulación. Por otra parte, estudios han demostrado que las especies amino truncadas sirven como centro de nucleación para la deposición de otras isóformas de beta amiloide como el $A\beta$ 1-42, el cual es el conformante principal de las placas amiloides.

Debido a que una de las características patológicas de la EA es la presencia de inflamación en diferentes zonas del cerebro, el reto para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la EA es el generar una respuesta inmune anti- $A\beta$ lo bastante robusta como para romper la inmunotolerancia contra el mismo beta amiloide y que sea capaz de evitar una respuesta inmune de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Lo anterior tiene como propósito minimizar el riesgo de meningoencefalitis causada por una respuesta inflamatoria. Es por ello que en el presente proyecto se desarrolló una vacuna contra la Enfermedad de Alzheimer basada en la creación de una VLP (Virus Like Particles por su nombre en inglés) producida en plantas y formada a partir de la proteína de cápside L1 del Virus del Papiloma Humano 16. Esta VLP expresa en su superficie secuencias en tándem con el fragmento 11-28 del péptido beta amiloide 1-42, la cual al ser inmunizada en ratones de la cepa C57BL/6, produjo un alto título de anticuerpos anti- $A\beta$ 1-42, anti $A\beta$ 3-42 y anti $A\beta$ 11-42. Los anticuerpos anti beta amiloide producidos resultaron ser de tipo anti-inflamatorios y capaces de reconocer placas amiloides en cortes de cerebro humano pertenecientes a pacientes que padecieron la EA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 DESCRIPCIÓN

La EA es la forma de demencia más frecuente en adultos mayores. Fue nombrada así por Emil Kraepelin en honor al neuropatólogo alemán Alois Alzheimer (1864-1915). En 1907 Alzheimer describió por vez primera las manifestaciones a nivel clínico y la patología de la enfermedad en una mujer de 51 años de edad, las cuales en general se pueden resumir como una pérdida paulatina y continua de las habilidades cognitivas.

La EA se manifiesta inicialmente por afectar levemente las funciones cognitivas como pérdida de memoria episódica a corto plazo y la orientación espacio-temporal. Posteriormente sobreviene una pérdida creciente de las funciones motrices, equilibrio y el caminar para finalizar en una demencia particularmente marcada, desorientación e inmovilidad total hasta culminar con la muerte.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La EA representa alrededor del 50% de las demencias reportadas a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en el planeta hay alrededor de 20 millones de enfermos de EA. Actualmente en México se cree hay un aproximado de medio millón de personas afectadas, cifra la cual en 10 años podría triplicarse si se toma en consideración que la población de edad mayor ésta en alza. Para el año 2040 se calcula que solo en los Estados Unidos habrá cerca de 14 millones de personas que padezcan la enfermedad mientras que India, China y Latinoamérica experimentaran el mayor crecimiento de enfermos con EA conteniendo un 70% de la población mundial de afectados (OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>).

2.3 FACTORES DE RIESGO

Se han identificado diversos factores de riesgo asociados con la aparición de la EA como pueden ser:

Edad: el factor de riesgo de más peso para la aparición de la EA es sin duda la edad. Diversos estudios han demostrado que después de los 60 años, la cantidad de personas que se encuentran afectadas por la Enfermedad de Alzheimer representan más del 50% de todas las demencias reportadas a nivel mundial.

Predeterminación genética: hoy día se sabe que hay familias que presentan la EA debido a genes autosómicos dominantes. Las mutaciones de 3 genes, el de la proteína precursora amiloide (APP) en el cromosoma 21, el de presenilina 1 (PS1) en el cromosoma número 14 y el de la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1, en conjunto determinan una forma autosómica para la EA capaz de empezar en edades tan tempranas como los 30 años de edad. Aunque esta forma autosómica de la enfermedad no supone más de un 1% de los casos totales de enfermos con EA, su descubrimiento ha sido muy importante ya que ha permitido conocer más acerca de los mecanismos patogénicos de la enfermedad (**Huse y Doms, 2000**).

Otro factor genético implicado en la aparición de la EA es la presencia del alelo APOE4, codificante para la producción de la apolipoproteína E (apoE). Esta proteína se caracteriza por ser el principal acarreador de lípidos hacia el cerebro a través de receptores específicos. La proteína apoE es codificada por 4 alelos distintos conocidos como APOE1, APOE2, APOE3 Y APOE4, siendo que la expresión de APOE4 es un factor de riesgo mayor para la aparición de la EA. El mecanismo por el cual apoE4 ésta implicada en la

patogenia de la EA no es claro aún pero se sabe que las otras isóformas de la proteína tienen propiedades protectoras ya que son capaces de capturar al péptido amiloide impidiendo su agregación y protegen las neuronas del daño oxidante propio del envejecimiento, mientras que apoE4 presenta estas propiedades disminuidas (Poirier, 1994).

Otros posibles factores de riesgo en la aparición de la EA son traumatismos craneoencefálicos, una dieta alta en grasas, falta de ejercicio, exposición a metales pesados como el Cu y el Fe.

2.4 SINTOMATOLOGÍA:

Los síntomas más característicos en los pacientes con EA son:

Pérdida de la memoria episódica y semántica: la memoria episódica es la responsable de recordar a largo plazo situaciones, nombres, rostros o acontecimientos característicos. La memoria semántica por su parte es aquella que nos permite recordar y retener conocimientos para llevar a cabo alguna actividad específica (Martínez Castillo et al, 2001). En los pacientes afectados por la EA estos tipos de memoria se ven reducidas de manera gradual y paulatina. En un principio el paciente y las personas que le rodean no perciben estos síntomas ya que son tomados como parte natural del proceso de envejecimiento, sin embargo no es parte natural de dicho proceso ya que el cerebro se ve afectado de manera que se llega a perder toda destreza adquirida para el desarrollo de diferentes actividades (Feldman et al, 2007).

Desorientación espacio-temporal: generalmente los pacientes que sufren la EA presentan dificultad para orientarse dentro del espacio sin importar que sea un lugar conocido, además de tener problemas para ubicarse en una fecha o momento determinado ya sea en tiempo presente o pasado.

Cambios de comportamiento: las personas con EA tienden a presentar cambios drásticos de humor que pueden ir de un estado normal a la ira, agresividad, pasividad total, angustia, depresión, llanto, insomnio o incluso alucinaciones (Martínez Castillo et al, 2001).

Incapacidad para realizar las actividades diarias: las personas afectadas por la EA con el avance de la enfermedad se ven imposibilitadas para realizar actividades tan sencillas y cotidianas como el aseo personal, comer o pérdida del control en esfínteres, dificultad en el habla e incapacidad para ejecutar actividades motrices de toda índole.

Lamentablemente la sintomatología determinante solo es perceptible cuando la enfermedad ya se encuentra en una etapa avanzada y clínicamente la EA puede ser diagnosticada con base en exámenes neurológicos, pruebas neuropsicológicas e imágenes cerebrales obtenidas por tomografía computacional y/o resonancia magnética. Sin embargo un diagnóstico definitivo de la enfermedad solo puede ser obtenido en un examen histológico del cerebro *post-mortem* ya que la patología característica se presenta en forma de una extensa pérdida de neuronas y por placas amiloides, así como marañas neurofibrilares de la proteína tau en el cerebro (Hendriks et al, 1996).

2.5 PATOLOGÍA CARACTERÍSTICA:

Los marcadores patológicos característicos de la EA son dos: marañas neurofibrilares y agregados amiloides.

Las marañas neurofibrilares: son el otro marcador característico en el diagnóstico de la EA. Están formadas por filamentos de forma helicoidal de la proteína tau hiperfosforilada. Tau es una proteína neuronal localizada en los axones que está asociada a la membrana plasmática y a los microtúbulos (Ávila et al, 2002). Tau es responsable de facilitar la polimerización de la tubulina y estabilizar a los microtúbulos previamente polimerizados además de suprimir la dinámica microtubular confiriendo así rigidez axonal (Bre y Karsenti, 1990). Por otra parte se ha observado que la proteína tau en su forma hiperfosforilada interviene en varios procesos de carácter neuronal como la respiración mitocondrial y el transporte vesicular entre axones (Ittner y Gotz, 2011).

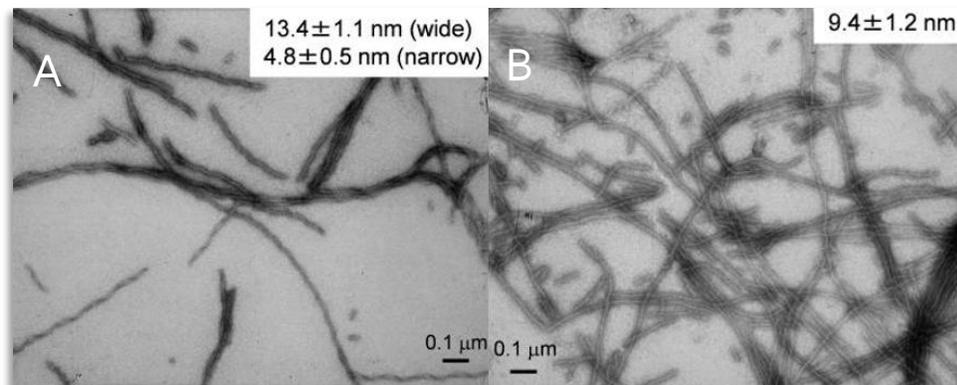


Figura 1. Micrografías de corte de cerebro de pacientes con EA que muestran marañas neurofibrilares. A y B) Marañas neurofibrilares de la proteína tau en su forma hiperfosforilada observadas al microscopio electrónico (Yoshiaki Furukawa et al, 2011).

Agregados amiloides: Los agregados amiloides son uno de los dos marcadores inequívocos para el diagnóstico de la EA. Los agregados amiloides son depósitos del beta amiloide con un tamaño aproximado de 200 nm. El beta amiloide es un péptido que en condiciones fisiológicas se encuentra en cantidades pequeñas en forma de monómero soluble que circula en el líquido cerebro-espinal y en la sangre, sin embargo, en pacientes con EA los niveles de este péptido se ven incrementados y se observa la acumulación en forma de agregados fibrilares insolubles. Estos agregados se encuentran presentes en el área de la corteza, el hipocampo y amígdala (Hendriks et al., 1996). Estos agregados, también llamados placas neuríticas, están formadas por depósitos extracelulares del péptido beta-amiloide 1-42 fibrilar que se puede observar como una masa de fibrillas con una forma característica de estrella. Dentro de los depósitos amiloides y a su alrededor se encuentran neuritas distróficas así como células de la microglía y astrocitos. La microglía usualmente se encuentra en el centro de la placa amiloide o en la región adyacente a esta, mientras que los astrocitos se agrupan en forma de anillo rodeando el exterior de la placa amiloide. Estos depósitos amiloides son la causa principal de la pérdida sináptica. Hoy día se sabe que la especie dominante del péptido beta-amiloide en agregados es el péptido beta amiloide formado por 42 residuos de aminoácidos (A β 1-42).

Un segundo tipo de agregados amiloides son los agregados difusos. Los agregados difusos son depósitos del péptido beta-amiloide que carecen de su aspecto fibrilar y compacto como en las placas neuríticas. Los agregados difusos se caracterizan por la ausencia de neuritas y astrocitos (Iwatsubo et al, 1994).

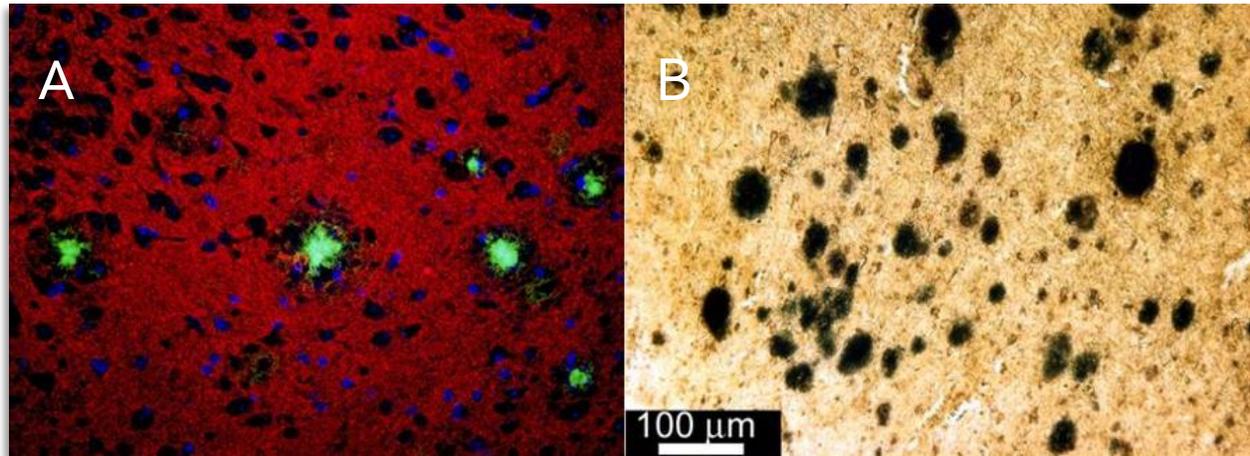


Figura 2. Micrografías de corte de cerebro humano correspondientes a pacientes con EA que muestran agregados amiloides. **A)** Corte de cerebro humano que muestra los agregados amiloides teñidos en color verde. **B)** Cortes de cerebro humano que muestran agregados amiloides en el lóbulo frontal (sin teñir) (Disha Sha et al, 2013; Roher et al, 2013).

2.6 PÉPTIDO BETA AMILOIDE

El péptido beta amiloide tiene un peso molecular de alrededor de 4 kDa. El beta amiloide es un péptido que presenta heterogeneidad en su longitud ya que puede contener en su secuencia de 39 a 43 aminoácidos. Las personas sanas producen mayormente el péptido beta amiloide con longitud de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$). En condiciones fisiológicas normales el $A\beta_{1-40}$ tiene diversas funciones ya que actúa como neuroprotector, antioxidante y promueve la proliferación y adhesión celular (Puzzo et al, 2008 y Giuffrida et al 2010). El beta amiloide se deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) (Van Gassen et al, 2003). La APP es una glicoproteína transmembranal que se encuentra codificada en el cromosoma 21. La APP tiene un dominio intramembranal, un largo dominio amino terminal extracelular y una pequeña región citoplasmática en el lado carboxilo terminal (Van Gassen et al, 2003). Debido a diferencias en el corte y pegado (splicing alternativo) existen diferentes isóformas de la APP que tienen una longitud de 695 a 770 aminoácidos, tales isóformas son conocidas como APP695, APP751 y APP770, de las cuales la APP695 es la forma más común encontrada en la región cerebral (Hendriks et al, 1996; Van Gassen et al, 2003).

El procesamiento de la APP puede llevarse a cabo de dos diferentes rutas: no amiloidogénica y amiloidogénica. La ruta no amiloidogénica incluye el procesamiento proteolítico de la APP por la actividad de la α -secretasa (formada por ADAM17, ADAM9 y ADAM10) en la superficie de la célula la cual genera una proteína soluble de 612 aminoácidos ($sAPP\alpha$). El fragmento carboxilo terminal de la APP permanece anclado a la membrana y es procesado proteolíticamente por la actividad de la γ -secretasa (formada por presenilina 1, APH-1, PEN-2 y nicastrina) generando el fragmento p3. Por definición se podría decir que p3 es un péptido truncado del péptido beta amiloide que consta de los residuos del 17 al 42 ($A\beta_{17-42}$). También es sabido que p3 ésta presente en extractos de cerebro de pacientes con EA y que tiene un efecto tóxico para las neuronas (Hass et al, 1992).

2.7 HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

La hipótesis de la cascada amiloide es una teoría propuesta a principios de los años 90's. Esta teoría propone que la EA es el resultado de un desequilibrio entre la síntesis y la degradación del péptido beta amiloide. El incremento del péptido $A\beta_{42}$ activa una cascada de eventos que confluyen en la activación local de la microglía y astrocitos, lo cual provoca la liberación de citosinas inflamatorias (McGeer et al, 1995). La combinación de un proceso pro-inflamatorio aunado a la neurotoxicidad intrínseca del beta amiloide, conlleva a la aparición de profundos cambios metabólicos y lesiones neuronales entre la que se incluye la hiperfosforilación de la proteína tau. Así mismo el péptido beta amiloide en su forma agregada es capaz de producir alteraciones en la homeostasis de calcio, aparición de poros en la membrana plasmática y daño oxidante a través de la formación de radicales libres en neuronas y glía. El resultado de estos acontecimientos es una pérdida de neuronas y la sinapsis entre estas, dando como producto la aparición de los síntomas clínicos de demencia característicos para la EA (Selkoe, 1997).

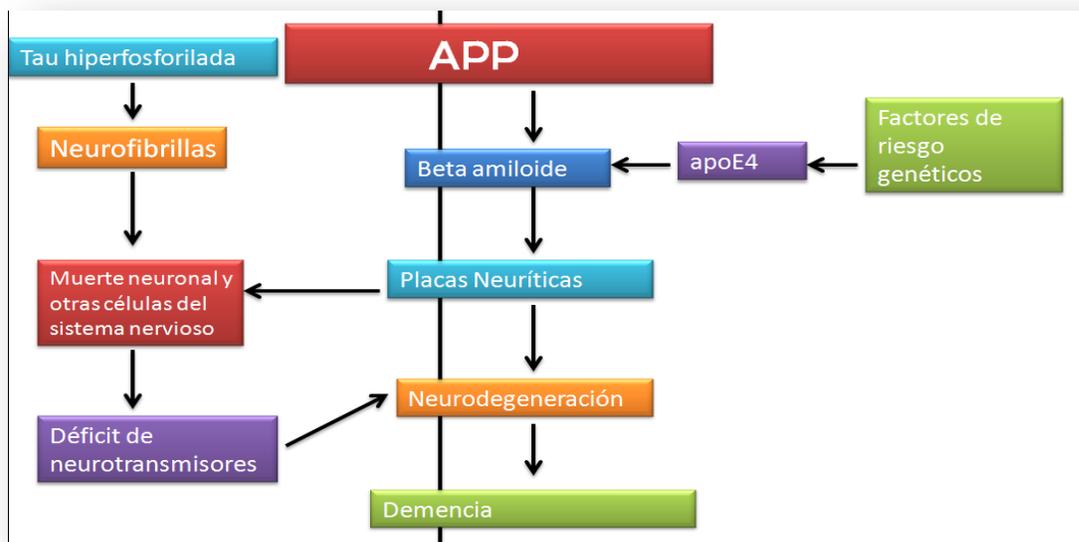


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra el desarrollo de la hipótesis de la cascada amiloide.

2.8 ESPECIES AMINO TRUNCADAS DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE

Estudios y análisis realizados en cortes de cerebro humano pertenecientes a pacientes afectados por la EA han demostrado la existencia de especies de $A\beta$ escindidas en su extremo amino terminal. Estas formas de beta amiloide han sido denominadas como especies amino-truncadas. Las especies amino-truncadas fueron reportadas por primera vez en 1985 por Masters, para posteriormente demostrarse que alrededor del 60% del $A\beta$ que se encuentra en el cerebro de pacientes con EA pertenece a especies amino-truncadas (Sergeant et al, 2003). En pacientes con trisomía 21 en co-desarrollo con EA se ha visto la presencia de especies amino-truncadas, principalmente las formas $A\beta_{3-42}$ y $A\beta_{11-42}$ (Kumar et al,

2000). En estos pacientes se ha observado que las especies amino-truncadas son más abundantes que el péptido de longitud completa.

Las especies amino-truncadas contienen una modificación postraduccional consistente en la ciclización del glutamato (E) presente en el extremo amino terminal (posiciones 3 y 11 del beta amiloide) para formar las especies $A\beta_p(E)_{3-42}$ y $A\beta_p(E)_{11-42}$ (Mori et al, 1992). Debido a esta ciclización, las especies amino-truncadas obtienen características que las vuelven aún más tóxicas que el propio péptido de longitud completa, ya que se vuelven inmunes a la degradación por parte de aminopeptidasas además de presentar una mayor capacidad de agregación que el péptido $A\beta_{1-42}$ (Perez-Garmendia et al, 2013). Otra característica que se confiere a estas especies amino-truncadas debido a la ciclización del E, es la de fungir como péptidos semilla ya que se ha observado que una vez que se deposita alguna de las especies amino-truncadas, éstas funcionan como centro de nucleación para la deposición del $A\beta_{1-42}$ y formación de las placas neuríticas (Schilling et al, 2006). Estudios recientes han demostrado que oligómeros del $A\beta_p(E)_{3-42}$ provocan toxicidad a largo plazo al acumularse dentro de las neuronas tanto de pacientes con EA como de ratones transgénicos (Wirths et al, 2010).

La ciclización del E en las especies amino-truncadas es llevada a cabo por la enzima conocida como glutaminil ciclasa (QC), la cual se ha encontrado sobreexpresada en pacientes con EA. En base a ello se ha sugerido que la GC juega un papel clave en la generación de especies amino-truncadas (Schilling, 2008).

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	beta amiloide 1-40
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	beta amiloide 1-42
EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	beta amiloide 3-42
EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	beta amiloide 11-42

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ y las especies amino-truncadas $A\beta_{3-42}$ y $A\beta_{11-42}$. En rojo se señala la posición del Glutamato (E) que se ve ciclado en las especies amino-truncadas.

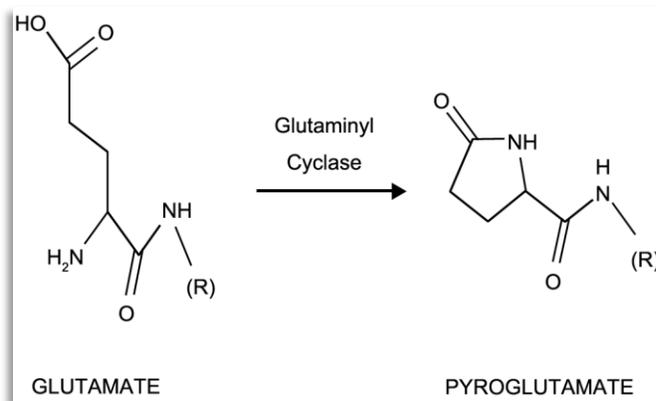


Figura 7. Formación del piroglutamato. Reacción sufrida por las especies amino-truncadas del péptido beta amiloide que consiste en la ciclización del glutamato a través de la enzima glutaminil ciclasa para formar piroglutamato (Perez-Garmendia et al, 2013).

2.9 PÉPTIDO A β p(E)11-42

El A β p(E)11-42 es una especie amino-truncada que se ha visto escindida por la β -secretasa entre la Tirosina con posición 10 y el Glutamato con posición 11 del extremo N-terminal para posteriormente sufrir una ciclización en el Glutamato a través de la QC (Liu et al, 2002).

Se ha observado que el A β p(E)11-42 se encuentra sobreexpresado en pacientes con EA con respecto a personas sanas (Liu et al, 2006), además de que se ha postulado que esta especie amiloide funge como centro de nucleación para la formación y crecimiento de agregados amiloides en el cerebro de personas afectadas por la EA (Sullivan et al, 2011). La única forma de remoción conocida para la eliminación del Glutamato ciclizado es la enzima conocida como piroglutaminil aminopeptidasa, sin embargo esta enzima se encuentra en el citosol celular mientras que las especies amino-truncadas por lo general se encuentran encapsuladas en vesículas celulares por lo cual es prácticamente imposible el contacto entre éstas dos para la eliminación de la especie amino-truncada (Liu et al, 2002). Con base en lo anterior es factible pensar que la especie A β p(E)11-42 es un posible blanco terapéutico para el diseño de un tratamiento contra la EA.

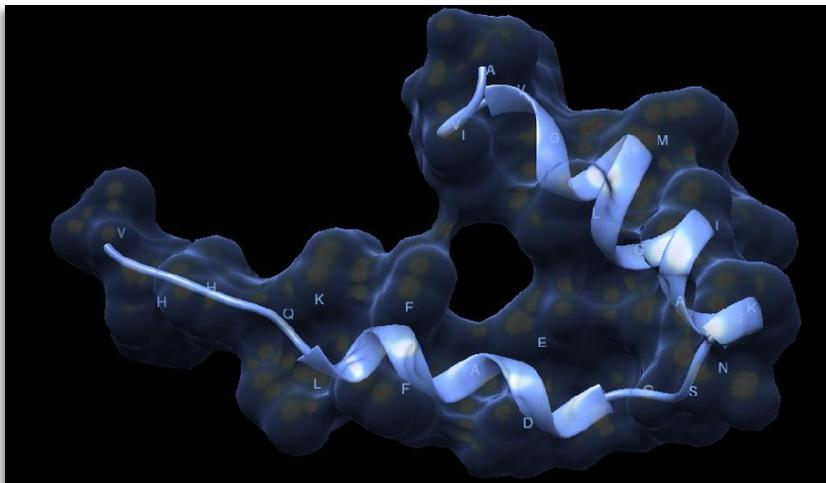


Figura 8. Modelado de la estructura terciaria del péptido beta amiloide 11-42 (A β 11-42) (Programa UCSF Chimera).

2.10 TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente varios fármacos que contrarrestan los efectos de la sintomatología de la enfermedad han sido aprobados en diferentes países, sin embargo, el efecto de dichos fármacos solamente se limita a retrasar la evolución natural de la enfermedad, lo que solo permite una mejora de carácter temporal no mayor a 18 meses, más no una cura definitiva (Standaert y Young, 2001).

A través de cerebros examinados *post mortem* se ha descubierto que los pacientes con EA presentan una disminución del neurotransmisor acetilcolina debido a la muerte de células nerviosas productoras de dicho neurotransmisor. La acetilcolina es un neurotransmisor implicado en procesos de memoria y

aprendizaje. El bajo nivel de acetilcolina encontrado en pacientes con EA parece indicar que el déficit de este neurotransmisor desempeña un papel importante en el deterioro cognitivo. En la actualidad los fármacos encaminados a aumentar los niveles de acetilcolina en pacientes con EA (donepezilo, tacrina, rivastigmina o galantamina) son la única estrategia farmacológica que ha demostrado cierta eficacia para mejorar los síntomas propios de la enfermedad por cortos períodos de tiempo (Standaert y Young, 2001).

Para el tratamiento de síntomas conductuales tales como agresividad, ansiedad, agitación, insomnio o alucinaciones se recomienda el uso de ansiolíticos. En caso de presencia depresiva el tratamiento a seguir es el uso de antidepresivos como la trazodona.

Debido a que la EA está ligada a procesos inflamatorios en la zona cerebral se utiliza anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) para tratar dicho problema. Se sabe que administraciones constantes de altas dosis de AINES inician una reducción en la carga amiloide y de la activación de la microglia *in vivo* en ratones transgénicos que sobre expresan APP (Citron et al, 2004).

El incremento en la producción de colesterol en plasma es un factor de alto riesgo para el padecimiento de la EA. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el procesamiento de la APP es dependiente del colesterol y que una disminución en los niveles de este también reduce la producción de beta amiloide. Es por ello que una de las medidas preventivas contra la EA es el consumo de una dieta sana baja en grasas y el ejercitarse regularmente.

Otra medida implicada en el tratamiento contra la EA es el uso de antioxidantes, como la vitamina E, para la inhibición de la agregación del péptido beta amiloide, esto se logra al disminuir los niveles de zinc; ya que el zinc y el cobre pueden formar complejos con el péptido beta amiloide e inducir su agregación. El cobre por su parte, al estar en presencia del péptido beta amiloide, se ve reducido y forma especies oxidantes reactivas como el peróxido de hidrógeno, el cual se ha reportado es capaz de causar daño a nivel neuronal (Wolfe et al, 2002; Atwood et al, 2003).

2.11 ESTRATEGIAS INMUNOTERAPEÚTICAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La hipótesis de la cascada amiloide señala que el incremento en la producción y la acumulación del péptido A β 1-42 es la causa principal de la patogénesis en la EA, es por ello que se han diseñado varias estrategias terapéuticas que consideran al péptido A β 1-42 como el blanco principal. En diversos estudios se ha observado que tanto la inmunoterapia activa como pasiva son prometedoras estrategias para tratar la EA ya que ambas están basadas en anticuerpos específicos contra el péptido beta amiloide: la inmunoterapia pasiva consiste en administrar de manera directa los anticuerpos específicos, mientras que en la inmunoterapia activa el péptido beta amiloide es administrado junto con un adyuvante para desarrollar una respuesta inmune contra el péptido beta amiloide (Lemere et al, 2004).

INMUNIZACIÓN PASIVA: en el caso de la EA se han llevado a cabo estudios en ratones transgénicos a los que se administraron anticuerpos monoclonales y policlonales contra el péptido beta amiloide. Estos anticuerpos, administrados de manera periférica, entran al sistema nervioso central (SNC) y logran reducir las placas en un 93% y 81% respectivamente (Bard et al, 2000). Esto indica que los anticuerpos por sí solos son capaces de disminuir la acumulación de agregados amiloides en la zona cerebral.

Aunque la disminución de carga amiloide a través de la inmunización pasiva probó tener buenos resultados en la mejora cognitiva de los ratones a los que se les administró los anticuerpos, la inmunización pasiva tiene ciertas desventajas. Una de las desventajas consiste en tener que administrar constantemente al paciente una dosis de anticuerpo ya que la inmunización pasiva no produce memoria inmunológica. Por otro parte la mayor de las desventajas es el hecho del desarrollo de microhemorragias intracerebrales, hecho demostrado en 2002 en un estudio con ratones transgénicos (Pfeifer, 2002).

INMUNIZACIÓN ACTIVA: en la última década se han efectuado diversos estudios en ratones transgénicos a los que se les administró el péptido A β 1-42 en conjunto con algún adyuvante (adyuvante de Freund en la mayoría de los casos). Estos estudios demostraron un decremento en la patología característica de la EA como la formación de nuevas lesiones en la zona cerebral, disminución de la carga amiloide así como la generación de anticuerpos anti-beta amiloide y una activación de células de microglía en zonas con carga amiloide en forma de placas (Ferrer, 2004). Por otra parte los ratones a los que se les sometió a tratamiento experimentaron una mejora en las funciones cognitivas y es por ello que se decidió dar el siguiente paso y llevar las pruebas clínicas.

2.12 INMUNOTERAPIA EN HUMANOS

En base al éxito logrado con la inmunización activa en ratones transgénicos con el péptido beta amiloide, se llevaron a cabo pruebas clínicas con una forma sintética del péptido A β 1-42 más saponina como adyuvante, al que se denominó AN1792. En este estudio se administraron 4 inyecciones a los pacientes con EA en un período de 6 meses, aunque 4 pacientes fallecieron en este lapso de tiempo ninguna de las muertes fue atribuida a causa de la inmunización. El estudio arrojó como resultado una reducción en la velocidad de deterioro cognitivo, aunque no se logró recuperar el nivel cognitivo normal como en el caso de los estudios hechos en ratones transgénicos (Munch y Robinson, 2002).

El estudio fue llevado a la Fase II, en donde 300 pacientes recibieron el tratamiento con AN1792. Para medir la eficacia del tratamiento se hicieron evaluaciones de la función cognitiva, volumen cerebral, concentración de biomarcadores y el funcionamiento y desempeño personal día a día. De manera desafortunada fueron reportados 17 casos de encefalitis entre los pacientes, después de recibir entre una y tres dosis de AN1792, por lo que todo el estudio fue cancelado.

Los pocos resultados obtenidos a partir de este estudio mostraron que la vacuna AN1792 es capaz de promover la producción de anticuerpos anti- beta amiloide, sin embargo se debe mencionar que esta vacuna no disminuyó el declive cognitivo (Senior et al, 2002).

2.13 MECANISMOS DE ACCIÓN INMUNOTERAPEÚTICA DE LOS ANTICUERPOS CONTRA EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE

Actualmente, gracias a los ensayos clínicos realizados en pacientes con EA y a diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos animales, se sabe que hay 3 posibles mecanismos a través de los cuales los anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de disgregar y disminuir los depósitos del péptido beta amiloide en el área cerebral.

1.- Disgregación de forma directa: por medio de este mecanismo los anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de disolver y neutralizar la forma oligomérica del péptido beta-amiloide. Esto también se

ha demostrado en estudios *in vitro* en donde anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de impedir la agregación del péptido beta amiloide (Frenkel et al, 2002).

2.- Fagocitosis por acción de microglía: en este mecanismo los anticuerpos anti-beta amiloide se unen a través de su fracción cristalizable (Fc) al receptor FcR localizado en las células de microglía en el cerebro. La unión Fc al receptor FcR media la fagocitosis por medio de la microglía del complejo beta amiloide-anticuerpo. Estudios *in vivo* han demostrado que al administrar de forma periférica anticuerpos anti-beta amiloide se puede detectar la presencia de microglía activada rodeando las placas amiloides en la zona cerebral (Wilcock et al, 2004).

3.- Peripheral sink: a través de este mecanismo se lleva a cabo un "secuestro" del péptido beta amiloide periférico, causando con esto una migración del péptido beta amiloide encontrado en cerebro al plasma. Estudios *in vivo* demuestran que algunos anticuerpos monoclonales contra el péptido beta amiloide no atraviesan la barrera hematoencefálica sin embargo hay una disminución en la formación de placas amiloides e incluso de daño cognitivo (Sigursson et al, 2001).

Aunque la inmunización activa ha probado tener una cierta eficacia en el tratamiento contra la EA, su principal problema radica en la activación de linfocitos T autorreactivos capaces de producir neuroinflamación a través de una respuesta inmune tipo Th1. Es por ello que se ha propuesto al ácido retinoico como un posible inmunomodulador capaz de cambiar una respuesta inmune Th1 hacia una respuesta inmune de tipo Th2.

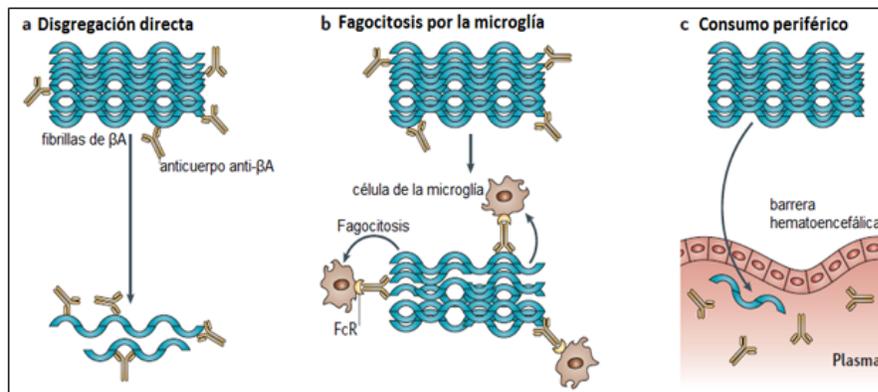


Figura 9. Mecanismos de eliminación del péptido beta amiloide a través de anticuerpos anti-beta amiloide. a) desagregación de oligómeros y fibrillas por medio de anticuerpos anti-beta amiloide. **b)** fagocitosis de agregados del péptido beta amiloide a través de la microglía. **c)** anticuerpos anti-beta amiloide se unen a monómeros de beta amiloide en el plasma y promueven la salida del beta amiloide del parénquima cerebral (Weiner y Frenkel, 2006).

2.14 ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO EFECTIVO CONTRA LA EA

Estudios posteriores sobre los resultados del ensayo clínico con la vacuna AN1792 mostraron que los pacientes que presentaron encefalitis tenían infiltración de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Análisis posteriores descubrieron que estos efectos colaterales se debieron a dos factores:

La saponina no fue un adyuvante adecuado debido a su capacidad de desarrollar respuestas inmunes pro-inflamatorias.

La utilización del péptido de longitud completa (A β 1-42) como inmunógeno ya que hoy en día se sabe que el A β 1-42 dentro de su estructura contiene un epítipo capaz de inducir linfocitos pro-inflamatorios T CD4+ (Ferrer et al, 2004).

Debido a que una de las características patológicas de la EA es la presencia de inflamación en diferentes zonas cerebrales, el reto para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la EA es el generar una respuesta inmune anti-A β lo bastante robusta como para romper la inmunotolerancia contra el beta amiloide y que sea capaz de evitar una respuesta inmune de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Lo anterior tiene como propósito minimizar el riesgo de encefalitis causada por una respuesta inflamatoria autoinmune.

2.15 VIRUS-LIKE PARTICLES

Actualmente una de las estrategias más prometedoras para el desarrollo de vacunas es la utilización de Virus-Like Particles (VLPs por sus siglas en inglés). Las VLPs consisten en proteínas estructurales de naturaleza vírica que tienen la capacidad de autoensamblarse para formar una cápside viral. Esta cápside viral al carecer de material genético en su interior no es capaz de llevar a cabo procesos autoreplicativos e infecciosos.

En la actualidad hay tres vacunas basadas en VLPs que han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para su comercialización y uso en humanos:

Contra Virus de la Hepatitis B (aprobada en 1986).

Contra Virus del Papiloma Humano (aprobada en 2006).

Contra Virus de la Hepatitis E (aprobada en 2011).

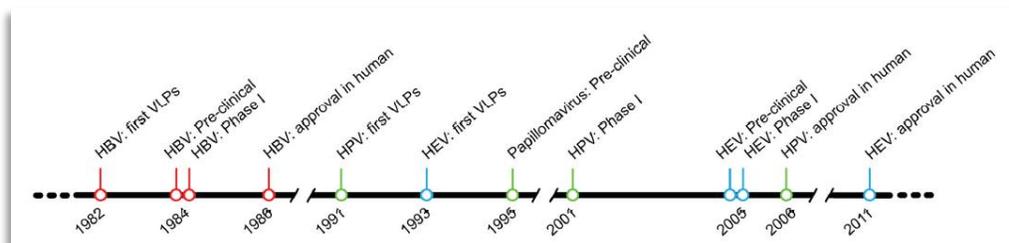


Figura 10. VLPs aprobadas para su uso en humanos. Línea del tiempo que muestra el desarrollo y aprobación de las 3 vacunas basadas en VLPs que han sido aprobadas por la FDA para su uso en humanos (Lua et al, 2013).

La principal razón por la cual las VLPs son consideradas como potenciales candidatas para el desarrollo de vacunas se debe a que poseen características altamente aprovechables para este fin, por ejemplo:

- . Capacidad para desarrollar potentes respuestas inmunes y romper inmunotolerancia debido a la repetición en tándem de epítomos sobre su superficie (**Chen et al, 2013**).
- . Epítomos que presentan arreglos en patrones altamente repetitivos sobre la superficie de las VLPs, los cuales son capaces de desarrollar una respuesta inmune adaptativa al activar linfocitos B a través de cross-linking (**Bachmann et al, 1993**).
- . Poseer propiedades autoadyuvantes (**Keller et al, 2010**).
- . Tamaño que permite la fagocitosis y el procesamiento de epítomos a través de células presentadoras de antígeno (**Lua et al, 2013**).

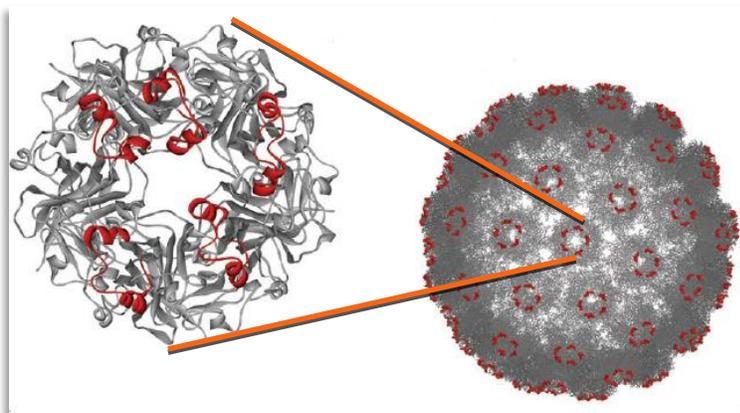


Figura 11. Estructura de una VLP. VLP que muestra rodeado en rojo el arreglo altamente repetitivo de epítomos (**Lua et al, 2013**).

2.16 PROTEÍNA DE CÁPSIDE L1

Hoy en día una de las vacunas basadas en VLPs cuyo uso se encuentra más extendido es la diseñada contra el Virus del Papiloma Humano (HPV), la cual está compuesta por la proteína de cápside L1 (Kumar et al, 2015). El HPV consiste en una cápside icosaédrica no recubierta con un tamaño entre 50 y 70 nm, la cual cuenta con 72 capsómeros de forma pentámerica, los cuales están formados por 5 proteínas L1 unidas entre sí a través de puentes disulfuro formados por cisteínas (Sapp et al, 1998).

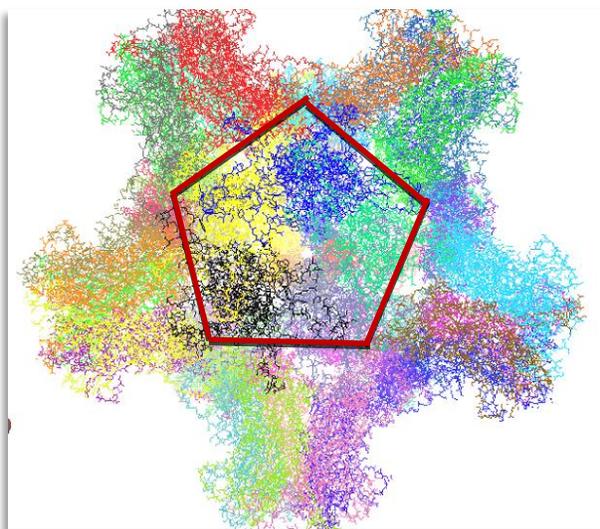


Figura 12. Modelado molecular de una VLP formada a partir de la proteína de cápside L1 del HPV16. Dentro del perímetro en rojo se observa la unión de 5 proteínas L1 (en azul, amarillo, negro, morado y verde) unidas por puentes disulfuro para formar el pentámero (Programa VMD 1.9.1).

Diversos estudios han corroborado la existencia de 12 cisteínas dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de cápside L1 (Fligge et al, 2000). Estas 12 cisteínas han sido reportadas como fundamentales para la formación y estabilidad de la VLP como macroestructura. Entre las 12 cisteínas mencionadas las más importantes son las cisteínas encontradas en las posiciones 176 (C176) y 428 (C428) de la secuencia de aminoácidos (Xiaojiang et al, 2000). La C176 desempeña la función de unir entre sí cada una de las 5 proteínas L1 que conforman el pentámero mediante puentes disulfuro, mientras que la C428 forma puentes disulfuro entre pentámeros para formar la VLP y proporcionarle estabilidad (Martin Sapp et al, 2003).

Debido a sus características, diversos estudios han demostrado que la proteína L1 es un excelente vehículo para la inserción de epítopos heterólogos (Monroy-García et al, 2014). Una de las razones por la cual la utilización de la proteína L1 para el anclaje de epítopos heterólogos está tan difundida, es la facilidad con que esta proteína puede ser expresada en una gran diversidad de sistemas como bacterias, células de insecto y plantas.

Recientemente, epítopos heterólogos provenientes del péptido beta amiloide han sido insertados en la secuencia de aminoácidos de la proteína L1. Estas L1 quiméricas fueron ensambladas para formar VLPs de tal manera que los epítopos insertados queden dispuestos sobre la superficie de la VLP formando patrones en alta repetición capaces de activar la respuesta inmune humoral para la producción de anticuerpos específicos (Chackerian et al, 2006).

2.17 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETEROLÓGAS EN PLANTAS

En años recientes una gran cantidad de grupos de investigación han seleccionado a las plantas como sistema de producción de proteínas heterólogas. Entre las diferentes plantas utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes, *Nicotiana benthamiana* se ha convertido en una elección por excelencia para muchos grupos de investigación debido a su susceptibilidad para expresar proteínas codificadas en una gran variedad de vectores virales de plantas (Goodin et al, 2008) y por su adaptabilidad a diferentes ambientes y esquemas de producción a gran escala (Pogue et al, 2010). Hoy en día una gran cantidad de compañías farmacéuticas y empresas han optado por la utilización de *N. benthamiana* y el sistema denominado *transient expression* para la producción de proteínas recombinantes.

El sistema conocido como *transient expression* consiste en la inducción y sobreexpresión, mediante un vector viral, de una proteína heteróloga dentro del tejido foliar de *N. benthamiana*. A diferencia de las transformaciones estables, la proteína heteróloga es producida dentro de la planta durante un breve período de tiempo (5-10 días), sin embargo, la proteína de interés se convierte en la proteína más expresada dentro del organismo por lo que sus rendimientos durante los procesos de extracción son bastante altos.

El sistema de *transient expression* explota la capacidad innata de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para infectar los espacios aéreos dentro de la planta e inducir la sobreexpresión de proteínas y compuestos de interés que sirven para la alimentación de la bacteria. En el sistema *transient expression* se inserta dentro de *A. tumefaciens* un vector viral de expresión que contenga DNA codificante para una proteína heteróloga de interés y una vez que la bacteria infecta a la planta, esta se ve obligada a producir la proteína heteróloga codificada dentro del vector de expresión.

La utilización de este sistema se ha visto bastante extendida durante los últimos años debido a que ofrece una gran cantidad de ventajas como:

1. La producción de proteínas recombinantes tiene un rendimiento muy superior a otros sistemas de transformación y expresión en plantas.
2. Los tiempos de producción de la proteína de interés son mucho más cortos que en otros sistemas de expresión.
3. Los costos de producción son muy inferiores a casi cualquier otro sistema de expresión.
4. Las proteínas recombinantes obtenidas se encuentran glicosiladas debido a la maquinaria celular eucariota de la planta, mientras que la producción en bacterias no permite la glicosilación de las proteínas.
5. El riesgo biológico es mucho menor ya que la transcripción y traducción del gen que codifica la proteína de interés solo se efectúa de manera transitoria y por lo tanto no es posible que dicho gen escape al medio ambiente.
6. El sistema permite expresar casi cualquier proteína recombinante.
7. La producción de las proteínas recombinantes es completamente escalable ya que se puede producir desde una cantidad muy pequeña hasta cantidades industriales.
8. Los cuidados requeridos por la planta *N. benthamiana* son prácticamente nulos ya que solo necesita una fuente de luz y agua para sobrevivir hasta su cosecha.
9. Correcta traducción y plegamiento de las proteínas heterólogas producidas dentro de la planta mediante este sistema.

3. JUSTIFICACIÓN

El péptido beta amiloide es un producto fisiológico que desempeña diversas funciones, debido a ello es improbable que el sistema inmune reconozca cualquier especie del péptido como un agente inmunogénico. En base a lo anterior, el presente proyecto propone el desarrollo de una vacuna contra la Enfermedad de Alzheimer basada en la creación de una VLP formada a partir de la proteína de cápside L1 del virus del papiloma, la cual exprese en su superficie secuencias en tándem con el fragmento 11-28 del péptido beta amiloide 1-42.

La utilización de una VLP como modelo de vacuna permite resolver varias de las problemáticas que plantea el desarrollo de una vacuna efectiva contra la Enfermedad de Alzheimer:

1. Vacunas basadas en VLPs tienden a producir respuestas inmunes anti-inflamatorias (tipo Th2), esto debido a arreglos altamente repetitivos en su superficie que funcionan como epítomos para activación de linfocitos B (Lua et al, 2013). Con base en esta característica, la fabricación de una vacuna contra la EA basada en una VLP evita la problemática de producir una respuesta inmune pro-inflamatoria que pueda desembocar en una meningoencefalitis.
2. Patrones altamente repetitivos característicos de las VLPs proporcionan la habilidad de convertir en inmunogénicas moléculas normalmente toleradas por el sistema inmune. Esto supone una estrategia propicia para resolver la problemática consistente en la inmunotolerancia de sistema inmune hacia las diferentes especies del péptido beta amiloide.
3. Epítomos específicos en alta copia representados sobre la superficie de las VLPs son capaces de estimular al sistema inmune adaptativo para desarrollar un alto título de anticuerpos específicos.
4. La propiedad auto adyuvante de las VLPs evita la problemática de buscar un adyuvante que produzca una respuesta inmune anti-inflamatoria y que además sea aprobado en su uso con humanos por la FDA.

La decisión de utilizar la proteína de cápside L1 del Virus del Papiloma Humano 16, se debe a su capacidad de autoensamblado *in vivo* e *in vitro* para formar estructuras como capsómeros y VLPs además de su versatilidad para ser expresada en diversos sistemas (Chackerian et al, 2006). La proteína L1 contiene dentro de su topología una región denominada L4 la cual, debido a su posición expuesta dentro de la formación de la cápside, ha sido utilizada en anteriores trabajos como un sitio de inserción para epítomos foráneos de interés, obteniendo resultados favorables en cuanto a la correcta formación de VLPs y la producción de un alto título de anticuerpos específicos contra dichos epítomos (Matic et al, 2011). Es por ello que en este proyecto propone la utilización de la región L4 para la inserción del epítomo 11-28 correspondiente a la especie amino-truncada del péptido A β 11-42.

Se sabe que la secuencia 11-28 contiene epítomos de activación para linfocitos B debido a lo cual, en teoría, debería producirse una respuesta inmune humoral de tipo Th2, y al ser expresado en tándem sobre la superficie de la VLP tendría la capacidad de desencadenar una respuesta inmune lo suficientemente robusta como para inhibir la inmunotolerancia del péptido beta amiloide y crear un título de anticuerpos específicos anti-beta amiloide.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si una vacuna basada en una VLP que contenga el fragmento 11-28 del péptido beta amiloide es una buena candidata como posible tratamiento contra la Enfermedad de Alzheimer.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Creación *in silico* de un modelo que muestre y recree el mejor sitio de anclaje para el fragmento 11-28 del péptido beta amiloide dentro de una VLP formada por la proteína L1 del Virus de Papiloma Humano 16.
2. Síntesis de la secuencia codificante para la proteína quimérica.
3. Creación del vector de expresión.
4. Expresión de la proteína de interés en *Nicotiana benthamiana*.
5. Purificación de la proteína quimérica.
6. Ensamblaje *in vitro* de las VLPs.
7. Inmunización de ratones de las cepas C57BL/6.
8. Análisis de la respuesta inmune humoral producida en los ratones inmunizados.
9. Análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro de ratón transgénico y humano para comprobar el reconocimiento de beta amiloide por parte de los anticuerpos inducidos.
10. Análisis de inhibición de los anticuerpos anti-VLPs quiméricas Vs diferentes fragmentos del péptido beta amiloide.
11. Análisis de estabilidad de las VLPs quiméricas.

6. METODOLOGÍA

6.1 CREACIÓN *IN SILICO* DE LAS VLPs QUIMÉRICAS DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO 16 Y REPRESENTACIÓN DL EPITOPO 11-28 DENTRO DE SU ESTRUCTURA

6.1.1 Creación por homología *in silico* de las estructuras de cápside L1a y L1b mediante el paquete *Rosetta*.

Se creó una cuenta en el servidor *Robetta* (rosettaserver.backerlab.org) a la cual se envió la secuencia de ambas proteínas quiméricas y el templado de la secuencia *wild type* de la proteína de cápside L1 del Virus de Papiloma Humano 16, la cual se obtuvo de la página <http://vipfdb.scripps.edu/>. A partir del templado y las secuencias quiméricas enviadas, el servidor creó varios archivos necesarios para la construcción por homología de las estructuras de cápside quiméricas. Los archivos creados fueron descargados a un sistema con ambiente Lynux (al que previamente se les descargaron los comandos y archivos necesarios para el funcionamiento del algoritmo *Rosetta*) y se realizó un alineamiento de las secuencias primarias en formato *grishin*. Se le indicó al programa que creara un mínimo de 10,000 *decoys* para hacer una correcta estadística del sistema y se realizó un agrupamiento por energía y tamaño. Se eligió la estructura con la menor cantidad de energía necesaria para su funcionamiento y que al mismo tiempo tuviera el mayor tamaño posible. La estructura seleccionada se convirtió en un archivo binario PDB de salida. El archivo PDB fue enviado al cluster de súper computo "Biofisikx" en donde se combinaron los *decoys* de cada carpeta enviada y los archivos finales de cada nodo utilizado en la súper computadora. Después de ejecutar lo anterior se obtuvo un archivo PDB para cada construcción quimérica, el cual se pudo visualizar y modificar gráficamente en un programa de visualización molecular como Chimera, Pymol o VMD.

6.2 SÍNTESIS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA QUIMÉRICA

6.2.1 Creación del vector de clonación pUC57 codificante para la proteína quimérica.

Previo a la síntesis del vector de clonación se realizó un análisis *in silico* para su construcción con el programa SnapGene Viewer 2.5. Se insertó la secuencia de DNA codificante para la proteína L1 quimérica (L1a y L1b por separado) dentro de la secuencia de DNA del vector de clonación pUC57 y se flanqueó con sitios de corte para Bsal en los extremos 5' y 3'. Una vez realizada la construcción *in silico* del vector de clonación se procedió a la síntesis del mismo, lo cual fue llevado a cabo por la empresa GenScript™. La concentración del vector de clonación recibido fue de 4µg/µL para cada una de las dos construcciones. Cada construcción se centrifugó a 6000 G durante 1 minuto y posteriormente se le adicionó 20 µL de agua MiliQ estéril para almacenarlo como stock a -20°C.

6.3 CREACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN

6.3.1 Obtención del DNA plasmídico.

Del stock para cada construcción se tomaron 2 μL y se realizó una dilución 1:10 con agua MiliQ estéril. De cada dilución se tomaron 10 μL y se dializaron en una membrana para diálisis de DNA con un tamaño de poro de 0.025 μm por un lapso de 20 minutos. Se recuperó el dializado y se mezcló con 50 μL de *E. coli* (DH5- α electrocompetentes) dentro de una celda de electroporación nueva, a la cual se le aplicó un choque eléctrico de 1800V. Una vez electroporadas, las células fueron colocadas inmediatamente en medio SOC para su recuperación durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, para crecer la bacteria con el vector de clonación insertado, se inoculó 25 μL de cada construcción en 10 mL de medio Luria-Bertani suplementado con carbenicilina (concentrada a 100 mg/mL) y se colocaron en tubos de cultivo. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posterior a la incubación, se seleccionaron 5 colonia positivas de cada construcción (L1a y L1b) y se procedió a realizar la extracción del DNA plasmídico por medio de miniprep.

6.3.2 Digestión del DNA plasmídico.

Posteriormente a la extracción del DNA plasmídico por medio de miniprep, se realizó la digestión enzimática. Se tomaron 3 μL de DNA plasmídico purificado por miniprep y se le agregó 1 μL de la enzima KpnI, 1 μL de la enzima ApaI, 3 μL de buffer CutSmart más 12 μL de agua MiliQ estéril para llevar la reacción de digestión a un volumen total de 20 μL . La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Para observar el resultado de la reacción de digestión, la muestra fue cargada en un gel de agarosa al 0.8% teñido con 1.5 μL de bromuro de etidido y sometida a electroforesis con un voltaje de 80V.

6.3.3 Ligación de los insertos L1a y L1b en el vector de expresión pICH31070.

Del gel de agarosa se seleccionó y se cortó la banda con un peso de 1500 pb, la cual correspondía al fragmento del vector con el inserto de DNA codificante para L1a o L1b. La banda fue purificada de acuerdo al protocolo del Kit de purificación de DNA "*DNA Clean & ConcentratorTM, Zymo Research*".

La ligación de los insertos de L1a y L1b en el vector de expresión pICH31070 se llevó a cabo en 2 pasos:

1. El vector de expresión fue digerido con la enzima de restricción BsaI para producir cortes en él y posteriormente ligar en su secuencia los insertos de DNA codificante para las proteínas quiméricas. Para la reacción de digestión del vector de expresión se tomaron 1.5 μL de

pICH31070, 2 μ L de buffer CutSmart, 1 μ L de Bsal más 15.5 μ L de agua MiliQ estéril para llevar la reacción a un volumen total de 20 μ L. La reacción se dejó incubando durante 2 horas a 37°C.

2. Una vez que el vector de expresión fue digerido, se procedió a ligar los insertos codificantes para las proteínas quiméricas. Para realizar lo anterior se tomaron 3 μ L del vector digerido, 8 μ L de inserto purificado, 4 μ L de buffer CutSmart, 1 μ L de T4 ligasa, 1.5 μ L de ATP más 2.5 μ L de agua MiliQ estéril para llevar el volumen total de reacción a 20 μ L.

Para corroborar que la ligación se llevó a cabo de manera correcta, se procedió a efectuar la digestión del vector con el inserto ligado. Lo anterior se realizó tomando 7 μ L del vector con el inserto ligado, 2 μ L de buffer L, 0.8 μ L de enzima HINDIII, 1 μ L de enzima KPN más 9.2 μ L de agua MiliQ estéril para llevar a un volumen total de 20 μ L, se dejó incubando por 2 horas a 37°C. Una vez efectuada la reacción de digestión, se corrió un gel de agarosa del 0.8% a 80V para comprobar la ligación del inserto dentro de vector de expresión. El gel mostró en cada una de las construcciones 2 fragmentos correspondientes a 4815 y 1585 pb, los cuales eran tamaños los tamaños esperados para el producto ligado.

6.3.4 Obtención del producto de ligación en alta copia.

Para obtener una cantidad considerable del producto de ligación se procedió a insertarlo dentro de *E. coli*. Para ello los productos de ligación fueron dializados, insertados en *E. coli* por medio de electroporación e incubados en tubos de cultivo durante toda la noche a 37°C (de acuerdo al protocolo mencionado con anterioridad). Para cada uno de los insertos ligados se seleccionaron 3 tubos en donde se observó crecimiento de *E. coli*, los cuales fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue desechado y los pellet fueron inoculados en cajas Petri con medio agar Luria-Bertani enriquecido con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X.gal) y kanamicina a una concentración de 50 mg/mL, las cuales fueron incubadas 24 horas a 37°C.

6.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA EN NICOTIANA BENTHAMIANA

6.4.1 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para cada construcción se tomó el vector de expresión pICH31070 con el inserto correspondiente ligado y se llevó a cabo la dialización del DNA plasmídico (de acuerdo al protocolo ya descrito anteriormente). Se tomaron 5 μ L de DNA dializado y se agregaron a 50 μ L de *Agrobacterium tumefaciens* PGV-3101 para su electroporación (de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente). Inmediatamente fueron resuspendidas en 1 mL de medio SOC para su recuperación y se incubaron a 28°C durante 5 horas. Posteriormente a su recuperación, la muestra fue puesta en un tubo para centrifuga y se centrifugó a

10,000 G durante 2 min, el sobrenadante fue desechado y el pellet fue recuperado para ser plaqueado en una caja Petri con medio agar YEB enriquecido con rifampicina y kanamicina a una concentración de 50 mg/mL. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante 48 horas para el crecimiento de la bacteria y guardadas a 4°C para su posterior uso.

6.4.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante y agroinfiltración.

Para la agroinfiltración de las plantas *Nicotiana benthamiana* con las cepas transformadas de *A. tumefaciens* se procedió a preparar los inóculos de la bacteria. La cepa de *A. tumefaciens* PGV3101 con el vector de expresión 31070 codificante para cada construcción de la proteína quimérica, con el vector pICH14011 y con el vector pICH15879 fueron inoculadas por separado en tubos de cultivo con 5 mL de medio YEB enriquecido con kanamicina a una concentración de 50 mg/mL e incubadas durante 48 horas a 28°C. Para ser usado como futuro control positivo de la expresión en *N. benthamiana*, se utilizó a la cepa de *A. tumefaciens* PGV3101 insertada con el vector pICHGFP, la cual fue inoculada e incubado de la misma manera que la cepa de la bacteria con los otros vectores. Posteriormente a la incubación durante 48 horas, se procedió a hacer una re-inoculación tomando 2 mL de cada cultivo y por separado colocándolos en matraces Erlenmeyer de 1L con 230 mL de medio YEB enriquecido con kanamicina y carbemilina 100 mg/mL. Los matraces fueron incubados por 24 horas a 28°C y se les midió la densidad óptica hasta que cada uno de los cultivos alcanzó la densidad óptica de 1.0. Una vez que cada uno de los inóculos alcanzó la densidad óptica deseada se procedió a hacer las mezclas de la siguiente manera:

Mezcla n° 1 (Control positivo)	Mezcla n° 2 (L1a)	Mezcla n° 3 (L1b)
50 mL pICHGFP + 50 mL pICH14011 + 50 mL pICH15879	100 mL pICH31070 (L1a) + 100 mL pICH14011 + 100 mL pICH15879	100 mL pICH31070 (L1b) + 100 mL pICH14011 + 100 mL pICH15879

Posteriormente a cada una de las 3 mezclas se les agregó acetosiringona en una relación de 1µL por cada mL de mezcla. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se centrifugaron a 5500 G durante un tiempo de 15 minutos. Los sobrenadantes fueron desechados y los pellets fueron resuspendidos en medio MES (MES 1M pH5.5 + MgSO₄ 1M). Una vez que las mezclas estuvieron listas, se procedió a efectuar la agroinfiltración de las plantas *N. benthamiana*. Se agroinfiltraron 30 plantas para cada construcción y 2 plantas para GFP como control positivo de expresión. La agroinfiltración se efectuó realizando una pequeña punción en el envés de la hoja y con una jeringa sin aguja se inoculó la mezcla correspondiente. Una vez realizada la agroinfiltración de las plantas, se procedió a su recuperación almacenándolas en una incubadora a 25°C y con una humedad ambiental del 55% con períodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

6.5 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA L1 QUIMÉRICA

6.5.1 Extracción de la proteína quimérica.

Después del 3er día post-agroinfiltración se llevó a cabo un monitoreo de la expresión de la proteína quimérica en plantas. Para efectuar lo anterior, cada día se observó bajo luz UV las plantas agroinfiltradas con GFP, las cuales fueron utilizadas como control positivo de expresión. 6 días post-agroinfiltración se encontró el punto de mayor expresión en las plantas, con lo cual se procedió a efectuar su cosecha. Para la cosecha se procedió a cortar las hojas agroinfiltradas, las cuales se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -70°C . La extracción de la proteína quimérica se realizó de la siguiente manera:

1. Para cada construcción se pesaron los gramos de material vegetal utilizados para la extracción y se les agregó buffer de extracción ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1%) en una proporción 1.5/1 volumen de buffer-gramos de material vegetal.
2. Se licuaron las muestras hasta obtener una consistencia totalmente líquida, las cuales fueron filtradas a través de cubre-bocas estériles para deshacerse del material vegetal de mayor tamaño.
3. Las muestras fueron ajustadas a pH_4 y colocadas en un recipiente estéril y hermético dentro de baño María a 45°C durante 20 minutos.
4. Posteriormente, las muestras fueron retiradas del baño María y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 40 minutos.
5. Cada muestra fue centrifugada a 10,000 rpm durante un periodo de 15 minutos. El sobrenadante (S1) fue recuperado y almacenado a 4°C , el pellet fue resuspendido en PBS $\text{pH}7.4$ en un volumen final de la mitad del volumen utilizado en el buffer de extracción. La mezcla se dejó reposando durante toda la noche a 4°C .
6. Para cada construcción se centrifugaron las mezclas a 10,000 rpm durante un lapso de 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante (S2) y se almacenó a 4°C , el pellet fue colectado en un tubo falcón y almacenado a 4°C .
7. Para eliminar impurezas y pigmentos, los S1 y S2 fueron filtrados por vacío a través de membranas de celulosa de 0.45 y 0.22 μm .

8. Para cada construcción, se corrieron 2 geles de poliacrilamida al 12%. El primer gel se utilizó para determinar la presencia y ubicación de la proteína quimérica en las muestras obtenidas (S1, S2 y Pellet) mientras que el segundo gel fue utilizado para determinar mediante Western Blot la presencia de la proteína L1 quimérica (peso molecular de 52 kDa) a través de un anticuerpo monoclonal anti-HPV16 (*Santa Cruz Biotechnology, IncTM sc-53324*). Para ambas construcciones los resultados del gel de poliacrilamida y Western Blot mostraron que la proteína L1 quimérica se encontraba en la muestra S2.

6.5.2 Concentración de la proteína L1 quimérica.

Para la concentración de la proteína de interés y sustitución de buffer, el S2 de cada construcción fue depositado en agitación en el equipo de concentración por nitrógeno *Solvent Resistant Stirred Cells* de MILLIPORE^R, al cual se lo adicionó con una membrana de celulosa con tamaño de poro de 30kDa. La sustitución del buffer PBSpH7.4 fue llevada a cabo agregando por lapsos 50 mL de buffer de acetatos pH5 50 mM (esto fue efectuado hasta haber agregado un total de 400 mL del buffer de acetatos). Posteriormente, cuando el volumen final alcanzó los 20 mL, se recolectó con mucho cuidado la muestra concentrada y fue almacenada en un recipiente estéril a 4°C.

6.5.3 Purificación de la proteína L1 quimérica.

Se equilibró una columna de purificación *ionic exchange HiTrap Capto S ImpAct purification column* (GE Healthcare Life SciencesTM) con 15 volúmenes de columna de buffer de acetatos pH5 50 mM y posteriormente se pasó la muestra S2 de cada construcción por la columna de intercambio iónico. La columna cargada con la muestra fue conectada al sistema *ÄKTA Protein Purification System* (GE

Healthcare Life SciencesTM) utilizando buffer de acetatos 50 mM pH5 NaCl 1M como buffer de trabajo del sistema. El sistema *ÄKTA* fue calibrado para obtener 40 fracciones de 1 mL, las cuales fueron colectadas y cargadas en un gel de poliacrilamida al 12% para determinar las fracciones en que se encontraba la proteína L1 quimérica (peso de 52 kDa). Para corroborar los resultados del gel de poliacrilamida se realizó un Western Blot incubado con un anticuerpo monoclonal anti HPV16 (*Santa Cruz Biotechnology, IncTM sc-53324*). Una vez determinada la presencia de la proteína L1 quimérica en las fracciones obtenidas a través del sistema *ÄKTA*, se procedió a cargar dichas fracciones en una columna de exclusión molecular *Exclusion Superdex 75 10/300 GL column* (GE Healthcare Life SciencesTM). El sistema nuevamente fue calibrado para obtener 40 fracciones de 1 mL, las cuales fueron analizadas por Western Blot para determinar la presencia de la proteína quimérica. Una vez que fueron seleccionadas las muestras que contenían la proteína de interés, se hizo un pool con ellas y se centrifugaron en un *CentriconTM* de 10 kDa a 4500 rpm durante 20 minutos.

6.7 ENSAMBLAJE IN VITRO DE LAS VLPs

6.7.1 Desensamble y ensamble de la proteína quimérica.

Las proteínas L1 quiméricas correspondientes a cada construcción fueron ensambladas para la formación de la VLP. Para llevar a cabo lo anterior, a cada muestra se le agrego buffer de desensamble 10x (PBS pH7.4, DTT 2mM, Tween 80 0.03%, NaCl 0.116 M llevado a pH8.2) en un volumen correspondiente a 1/10 parte del volumen total de muestra, se dejó incubar en total reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. Se tomaron las muestras y se pusieron en diálisis contra PBS pH6 NaCl 1M en agitación durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se cambió el buffer por PBS pH7.4 y se dejó en diálisis durante 48 horas a 4°C en agitación.

6.7.2 Análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).

La muestra dializada fue observada en el microscopio electrónico para corroborar la formación de las VLPs y su correcta morfología y tamaño. Para cada una de las dos construcciones se tomaron 10 µL de muestra dializada y se colocaron en celdillas de cobre para microscopia electrónica, se dejaron totalmente cubiertas y en reposo durante 20 minutos y posteriormente se retiró cuidadosamente el exceso de muestra con papel filtro estéril. Para el contraste de las muestras se utilizó ácido fosfotúngstico pH7.2 al 2%. El ácido fosfotúngstico se colocó sobre la celdilla donde se depositó la muestra y se dejó cubierto y en reposo durante 10 minutos, después se removió cuidadosamente el excedente del contrastante con papel filtro estéril. Posteriormente se procedió a la observación de las muestras en el microscopio electrónico.

6.7.3 Cuantificación de la concentración de la VLP quimérica.

La cuantificación de la concentración de la VLP quimérica se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford et al, 1976).

6.7.4 Comprobación de la presencia del epítipo Aβ11-28 sobre la superficie de la VLP quimérica.

Para comprobar la presencia de nuestro epítipo de interés sobre la superficie de la VLP se procedió a realizar un ensayo de ELISA. Se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, MaxiSorp) durante toda la noche a 4°C con 0.2 µg Aβ1-42, 0.2 µg Aβ11-28, 0.2 µg péptido no relacionado, 0.2 µg

VLP L1wt, 0.2 µg VLP L1a y 0.2 µg de L1b por cada 100 µL de buffer de carbonatos (pH 9.6). Posteriormente se efectuaron 4 lavados de la placa con PBS-tween 0.2%. Se bloquearon los pozos de la placa con PBS-albúmina al 2% (200 µL por pozo) durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS-tween 0.2% y se agregó el anticuerpo monoclonal BAM90.1 (Sigma-Aldrich *catA8978*) el cual reconoce a la región 12-28 del péptido beta amiloide. Se incubó durante 1 hora a 37°C y se efectuaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2%. Se agregó un anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo) y se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se reveló con ABTS (100 µL por pozo). Las lecturas de densidades ópticas se realizaron a 405 nm en un lector automático de placa.

6.8 INMUNIZACIÓN DE RATONES DE LA CEPA C57BL/6

6.8.1 Protocolo de inmunización para ratones de la cepa C57BL/6.

Los grupos de inmunización se formaron acorde a la siguiente tabla:

Grupo	Nº de ratones	Dosis	Vía de Administración
PBS (control)	3	100 µL	Intramuscular
VLP L1wt (control)	6	10 µg en 40 µL	Intramuscular
VLP L1a	6	10 µg en 40 µL	Intramuscular
VLP L1b	6	10 µg en 40 µL	Intramuscular

Todos los ratones eran machos y fueron inmunizados en intervalos de dos semanas, efectuando un total de 5 inmunizaciones. Seis días después de la última inmunización se sangraron a blanco.

6.8.2 Obtención de sueros.

La obtención del suero correspondiente a cada ratón se efectuó bajo los principios bioéticos correspondientes al protocolo aprobado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas. La sangre extraída fue depositada en tubos eppendorf de 1.5 mL y puesta a incubar durante 1hr a 37°C. Posteriormente fue centrifugada a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvieron los sobrenadantes y fueron depositados en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL para ser nuevamente centrifugados a 5,000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se extrajo el sobrenadante y fue depositado en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL para ser almacenados a 4°C.

6.9 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRODUCIDA EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 INMUNIZADOS CON LA VLP QUIMÉRICA

6.9.1 Detección de anticuerpos anti-A β en suero de ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Para detectar la presencia de anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β ₃₋₄₂ y anti-A β ₁₁₋₄₂ en el suero de los ratones inmunizados, se procedió a realizar ensayos de ELISA. Para la detección de anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂ se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, MaxiSorp) durante toda la noche a 4°C con 0.2 μ g A β ₁₋₄₂ por cada 100 μ L de buffer de carbonatos (pH 9.6). Posteriormente se efectuaron 4 lavados de la placa con PBS-tween 0.2%. Se bloquearon los pozos de la placa con PBS-albúmina al 2% (200 μ L por pozo) durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS-tween 0.2% y se agregaron los sueros de ratones inmunizados con las dos VLPs quiméricas L1a y L1b, PBS y L1 wt en una dilución de 1:100. Se incubó durante 1 hora a 37°C y se efectuaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2%. Se agregó un anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (*Molecular Probes*, Invitrogen, Oregon, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-triton 0.2% (100 μ L por pozo) y se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se reveló con ABTS (100 μ L por pozo). Las lecturas de densidades ópticas se realizaron a 405 nm en un lector automático de placa. Para la detección de anticuerpos anti-A β ₃₋₄₂ y anti-A β ₁₁₋₄₂ se realizó el mismo procedimiento con el cual se detectaron los anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂.

6.9.2 Reconocimiento del péptido beta amiloide de longitud completa y especies amino-truncadas por medio de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Los resultados de los ensayos de ELISA se corroboraron efectuando un Western Blot. Para la realización del Western Blot se cargaron, en un gel de gradiente 4-11%, los péptidos A β ₁₋₄₂, A β p(E)₃₋₄₂ y A β p(E)₁₁₋₄₂ en 2 tripletes. El gel se corrió a 90V y posteriormente en una cámara de transferencia semi-húmeda, se realizó la transferencia del gel hacia la membrana de polivinilo a 15V durante 1 hora. Se cortó la membrana para separar los tripletes y cada membrana se bloqueó con PBS-leche 2% durante 1 hora a temperatura ambiente y se le dieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-tween 0.2%. Posteriormente, un triplete fue incubado en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de ratón inmunizado con la VLP L1b en una dilución 1:50. El segundo triplete fue incubado con suero de ratón inmunizado con la VLP L1wt. A cada triplete se le dieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-tween 0.2% y se agregó un anticuerpo anti-mouse conjugado a HRP en una dilución de 1:2500. Los tripletes fueron incubados en agitación 1 hora a temperatura ambiente y se efectuaron 3 lavados de manera igual a lo descrito anteriormente. El revelado se efectuó dentro de una habitación en

completa oscuridad sumergiendo las membranas en solución reveladora durante 15 segundos y deteniendo la reacción al resurgir las membranas en agua.

6.9.3 Identificación de los isótipos de IgG encontrados en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Para la identificación de los isótipos se realizó la sensibilización de una placa de microtitulación de 96 pozos durante toda la noche a una temperatura de 4°C con 0.2 µg de péptido beta- amiloide 1-42 por cada 100 µL de buffer de carbonatos (100 µL por pozo). En el día posterior se efectuaron 4 lavados de la placa con PBS-tween 0.2%. Se bloquearon los pozos de la placa con PBS-albúmina al 2% (200 µL por pozo) durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS-tween 0.2%, se agregaron los sueros obtenidos de cada ratón en una dilución 1:100 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se agregaron los siguientes anticuerpos:

1. Anticuerpo de conejo anti-IgG1 de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo)
2. Anticuerpo de ratón (BALB/c) anti IgG2a de ratón (C57BL/6) acoplado a biotina (BD Biosciences Pharmigen, USA) en una dilución de 1: 10,000 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo)
3. Anticuerpo de conejo anti-IgG2b de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) en dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo).
4. Anticuerpo de conejo anti-IgG3 de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) en dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo).

Después de la incubación y lavados, a los pozos correspondientes a IgG2a se agregó estreptavidina acoplada a HRP (BD Biosciences Pharmigen™, USA) en una dilución de 1: 2000 y se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se reveló con ABTS (100 µL por pozo). Las lecturas de densidades ópticas se realizaron a 405 nm en un lector automático de placa.

6.10 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO EN CORTES DE CEREBRO DE RATÓN TRANSGÉNICO DE LA CEPA 3XTg-AD Y CORTES DE CEREBRO HUMANO PARA COMPROBAR EL RECONOCIMIENTO DE BETA AMILOIDE POR PARTE DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS

6.10.1 Análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro humano y de ratón transgénico para comprobar el reconocimiento de beta amiloide por parte de los anticuerpos inducidos.

Los cortes de cerebro de 30 μm fueron lavados y puestos en agitación con TBS pH7.2 durante 5 minutos y posteriormente fueron incubados en ácido fórmico al 70% durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con TBS pH7.2. Los tejidos fueron incubados en TBSA (TBS + tritón 0.2%) por 15 minutos para posteriormente ser puestos en TBSB (TBS + albúmina 2%) durante 30 minutos. Los cortes de cerebro fueron incubados de manera separada durante toda la noche a 4°C con los sueros de ratón inmunizados con la VLP L1wt y VLP L1a y BAM10 como control positivo. La dilución de los anticuerpos primarios fue hecha 1:100 en TBS + 5% de suero de cabra. A la mañana siguiente los cortes fueron lavados de manera secuencial con TBS, TBSA y TBSB de igual manera a lo ya descrito anteriormente. En completa oscuridad y agitación se incubaron los cortes de cerebro con el anticuerpo secundario (Alexa anti-mouse 594 IgG) diluido 1:1000 en TBS + suero de cabra 5%, la incubación se efectuó durante 2 horas. En total oscuridad, los cortes de cerebro humano fueron lavados secuencialmente con TBS, TBSA y TBSB de acorde a lo ya descrito. Los cortes de cerebro fueron montados sobre porta objetos y se les agregó VectaShield-DAPI antes de ser sellados.

6.11 DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS VLPs QUIMÉRICAS

6.11.1 Determinación de la estabilidad de las VLPs quiméricas a partir de diferentes condiciones de pH y concentración de NaCl.

Para determinar la estabilidad de las nano-partículas, se purificó proteína L1a y L1b y se ensamblaron las VLPs quiméricas de acuerdo al protocolo descrito en el apéndice 6.7.1. Se llevó a cabo la observación de las VLPs en el TEM de acuerdo al protocolo mencionado en el apéndice 6.7.2 para confirmar la presencia y correcto ensamblaje de las VLPs. Una vez que se determinó que ambas VLPs se encontraban presentes y mostraban la morfología y tamaño adecuado se pasó a denominar a estas muestras como "muestra madre". La muestra madre fue dividida y colocada en diferentes combinaciones de pH (rango 4-7) y concentración de sal (150 mM y 500 mM), las cuales fueron almacenadas a 4°C.

Las diferentes combinaciones de pH-concentración de sal fueron las siguientes:

<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 150 mM• MOPS 50 mM pH 7	<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 500 mM• MOPS 50 mM pH 7
<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 150 mM• MOPS 50 mM pH 6	<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 500 mM• MOPS 50 mM pH 6
<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 150 mM• MOPS 50 mM pH 5	<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 500 mM• MOPS 50 mM pH 5
<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 150 mM• MOPS 50 mM pH 4	<ul style="list-style-type: none">• Tween 80: 0.006%• NaCl 500 mM• MOPS 50 mM pH 4

Como controles se utilizaron las siguientes combinaciones:

<ul style="list-style-type: none">• PBS pH 7.4• Almacenado 4°C	<ul style="list-style-type: none">• PBS pH 7.4• Almacenado temperatura ambiente
---	--

Tabla 1. Combinaciones de pH (de rango 4 hasta 7) y concentración de sal (150 mM y 500 mM) para el almacenaje de las VLPs quiméricas.

Posteriormente, tras ser almacenadas, las diferentes muestras eran observadas al microscopio una vez por semana para determinar la integridad y estabilidad de cada una de las muestras almacenadas bajo las diferentes condiciones.

7. RESULTADOS

7.1 Creación *in silico* de las VLPs quiméricas del Virus de Papiloma Humano 16 y representación del fragmento 11-28 dentro de su estructura.

Para determinar el mejor sitio de anclaje del fragmento 11-28 sobre la superficie de la VLP, se procedió a realizar modelos computacionales que recrearan la mejor zona de inserción del epítipo heterólogo. Las representaciones moleculares de las estructuras proteínicas fueron visualizadas con el programa Chimera UCSF 10.0.1 utilizando las bases de datos del sitio web VIPERdb (<http://viperdbscripps.edu/>) (Figuras 13, 14, 15 y 16). Las estructuras tridimensionales de cápsides quiméricas del Virus de Papiloma Humano 16 fueron desarrolladas por el Dr. Mauricio Carrillo Tripp (Figuras 18 y 19). Se utilizó la base de datos del sitio web VIPERdb y se aplicó el algoritmo Rosetta 3.1 para desarrollar el modelado por homología de las cápsides quiméricas del Virus de Papiloma Humano 16 (Figuras 18 y 19).

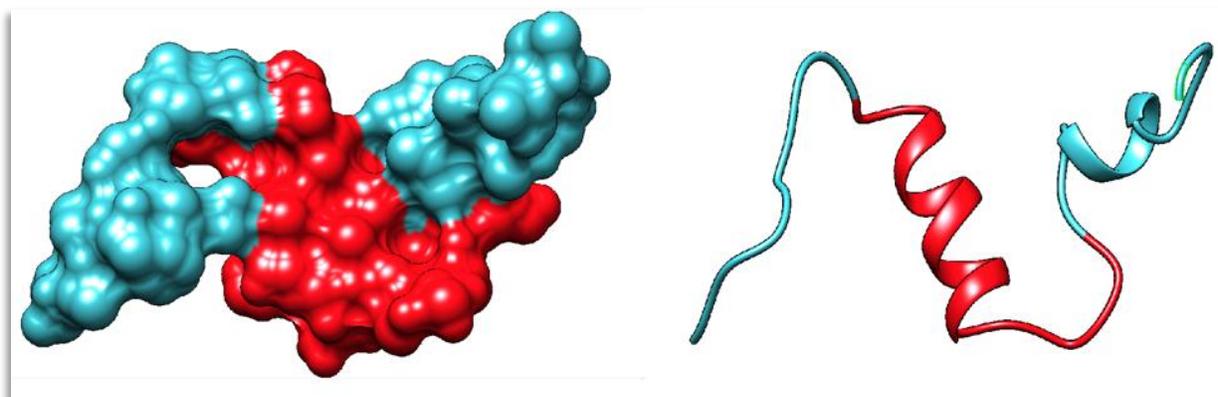


Figura 13. Modelado molecular del péptido Aβ₁₋₄₂. El modelado molecular representa al Aβ₁₋₄₂ en representación globular y de listones. En rojo se puede apreciar la región 11-28 dentro de la estructura terciaria del péptido.

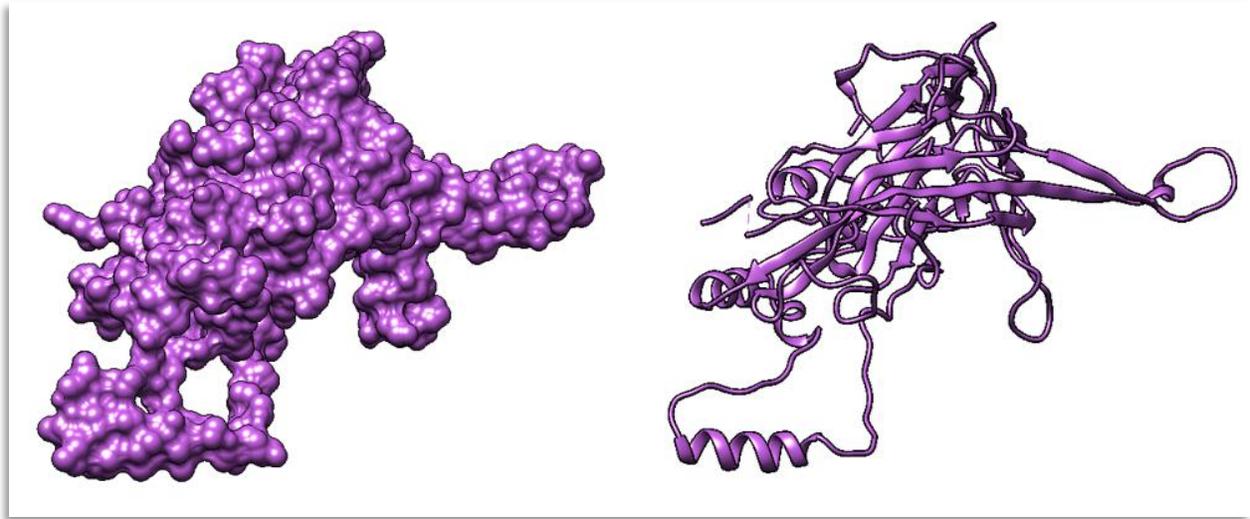


Figura 14. Modelado molecular de la proteína de cápside L1 wt en representación globular y de listones.

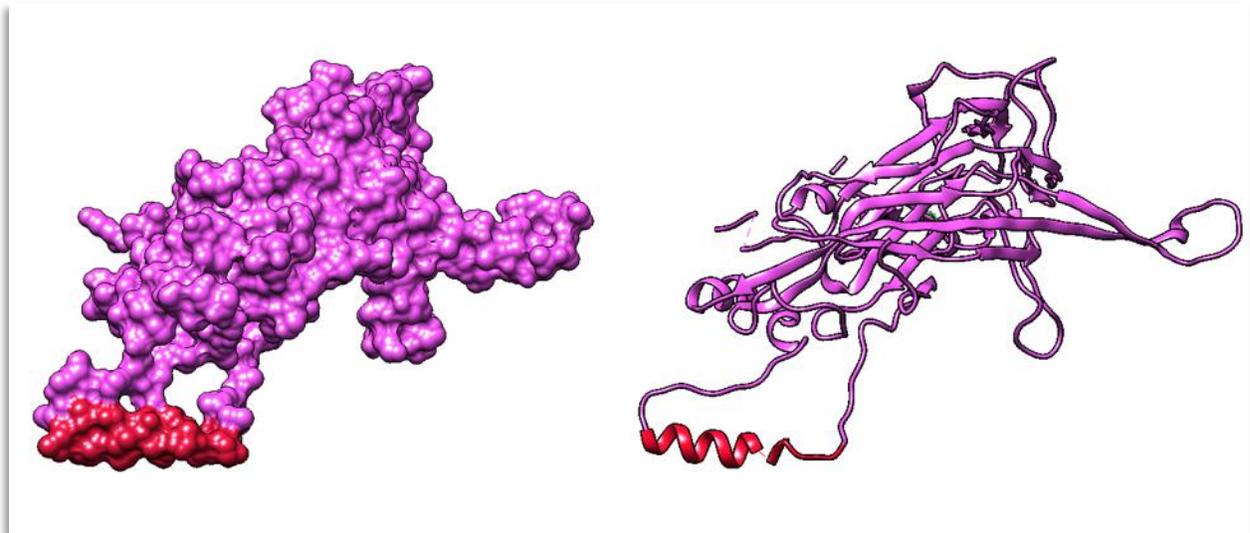


Figura 15. Modelado molecular de la proteína quimérica L1a. El modelado molecular de la proteína quimérica L1a en representación globular y de listones. En rojo se puede observar el sitio de inserción del fragmento 11-28 del péptido beta amiloide.

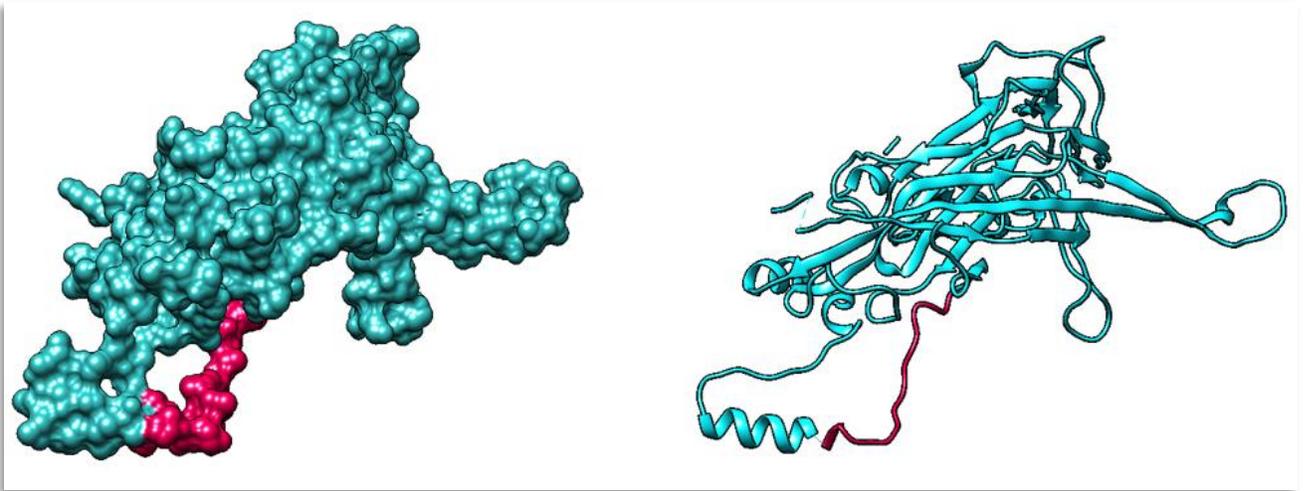


Figura 16. Modelado molecular de la proteína quimérica L1b. El modelado molecular de la proteína quimérica L1a en representación globular y de listones. En rojo se puede observar el sitio de inserción del fragmento 11-28 del péptido beta amiloide.

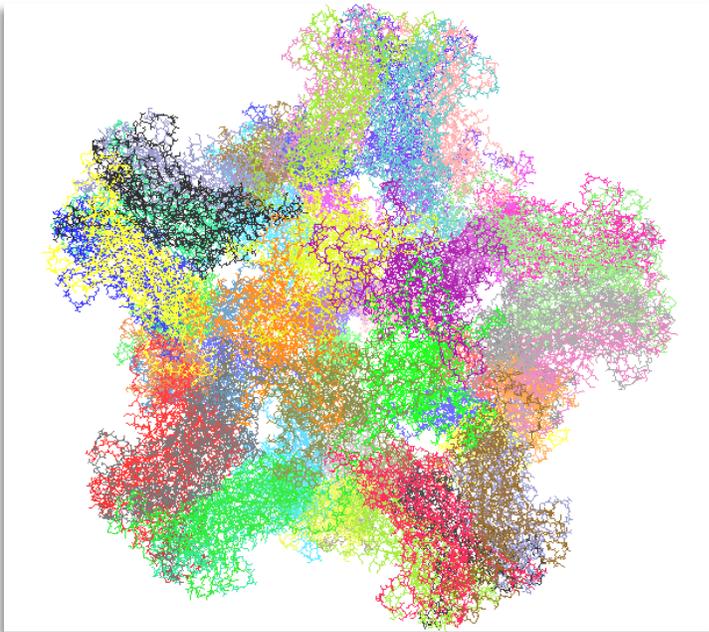


Figura 17. Modelado molecular de la cápside del Virus de Papiloma Humano 16.

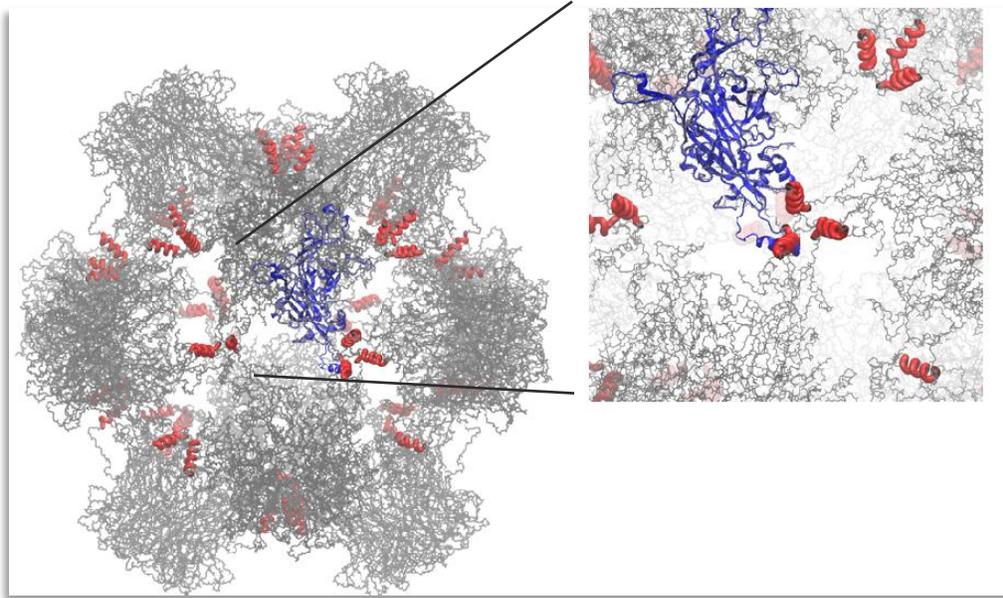


Figura 18. Modelado molecular de la cápside quimérica L1a. En azul se puede apreciar un monómero de la proteína quimérica L1a y en rojo la disposición de los epítomos 11-28 dentro de la estructura péptido beta amiloide (Carrillo-Tripp).

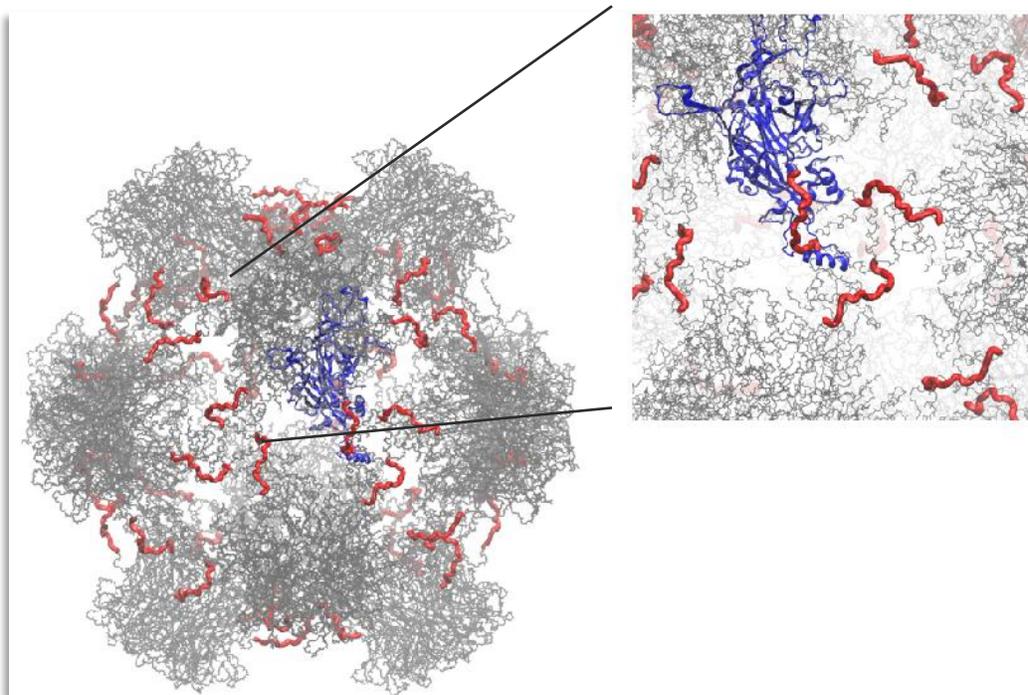


Figura 19. Modelado molecular de la cápside quimérica L1b. En azul se puede apreciar un monómero de la proteína quimérica L1b y en rojo la disposición de los epítomos 11-28 dentro de la estructura péptido beta amiloide (Carrillo-Tripp).

7.2 Creación del vector de clonación pUC57 codificante para la proteína quimérica.

Realizamos un mapa del vector de clonación pUC57 con el inserto de DNA codificante para la proteína quimérica L1a o L1b mediante el programa SnapGene Viewer (**Figura 20**). Los insertos de DNA codificante para la proteína quimérica fueron liberados mediante la digestión con las enzimas de restricción KpnI y ApaI. La digestión del vector con la secuencia codificante liberó dos fragmentos, el primero de 2695 pb y el segundo de 1500 pb (**Figura 21**).

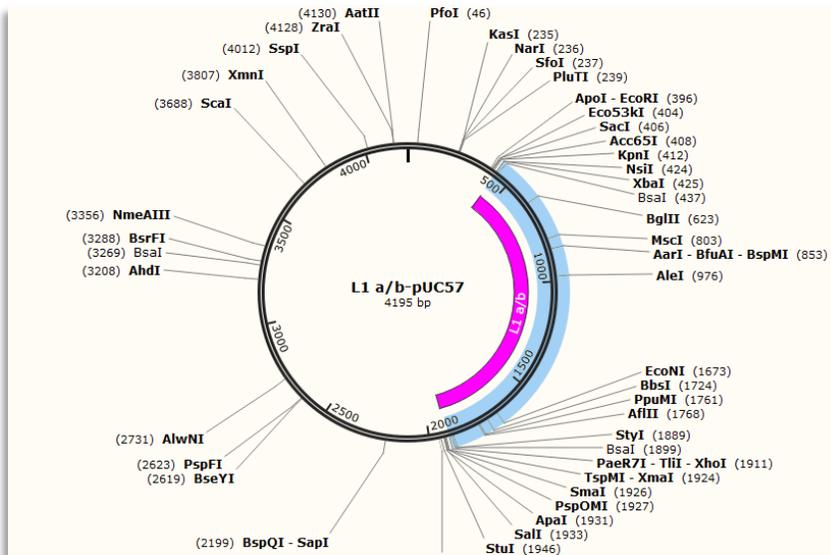


Figura 20. Mapa del vector de clonación pUC57 con el inserto de DNA codificante para la proteína quimérica L1a o L1b. El peso total del vector es de 4195 pb, mientras que el peso de la secuencia codificante para la proteína quimérica es de aproximadamente 1500 pb. El mapa fue creado mediante el programa SnapGene Viewer.

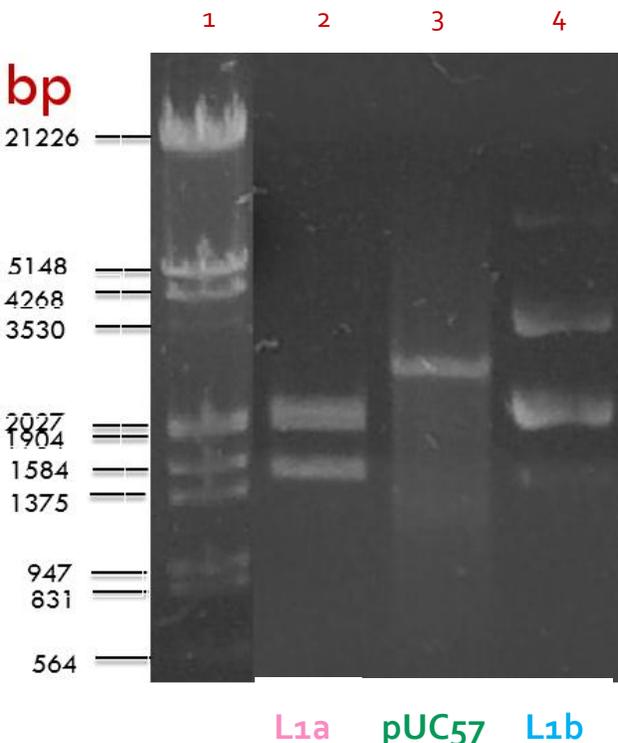


Figura 21. Caracterización del vector de clonación pUC57-L1a/L1b. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% comprobando la digestión del vector pUC57-L1a/L1b con las enzimas de restricción KpnI y ApaI. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** pUC57-L1a digerido. **Carril 3:** pUC57 digerido. **Carril 4:** L1b digerido.

7.3 Ligación de los insertos L1a y L1b en el vector de expresión pICH31070.

Las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas L1a y L1b fueron ligadas en el vector de expresión pICH31070 (Figura 22). El vector posteriormente fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y HindIII para comprobar que la ligación fuera efectuada. Los fragmentos liberados por la digestión fueron de 4900 pb y 1500 pb (Figura 23).

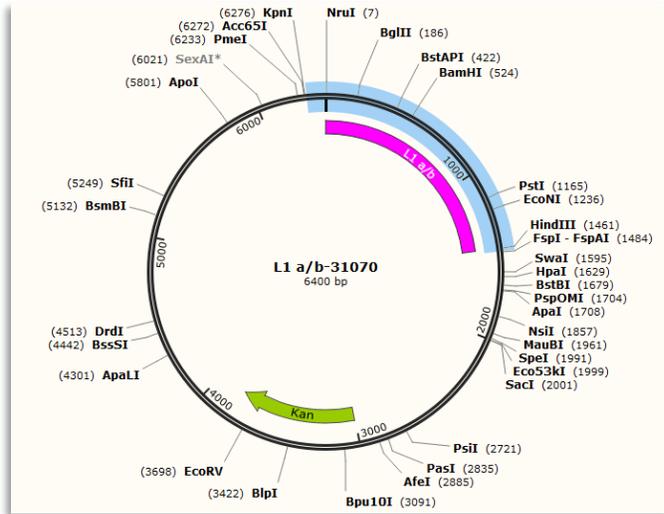


Figura 22. Mapa del vector de expresión pICH31070 con el inserto de DNA codificante para la proteína quimérica L1a o L1b. El peso total del vector es de 6400 pb, mientras que el peso de la secuencia codificante para la proteína quimérica es de aproximadamente 1500 pb. El mapa fue creado mediante el programa SnapGene Viewer.

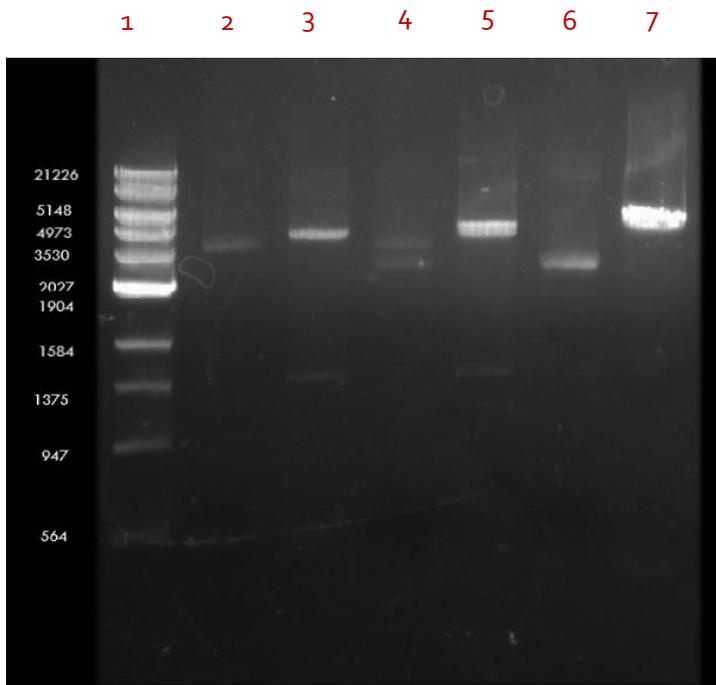


Figura 23. Caracterización del vector de expresión pICH31070-L1a/L1b. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% mostrando la ligación de los insertos L1a/L1b en pICH31070. La digestión de los vectores de expresión pICH31070 y pICH31070-L1a/L1b fue realizada con las enzimas de restricción KpnI y HindIII. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** pICH31070-L1a sin digerir. **Carril 3:** pICH31070-L1a digerido. **Carril 4:** pICH31070-L1b sin digerir. **Carril 5:** pICH31070-L1b digerido. **Carril 6:** pICH31070 digerido. **Carril 7:** pICH31070 sin digerir.

7.4 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante y agroinfiltración.

Previo a la agroinfiltración, la cepa PGV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada con los 3 vectores de expresión optimizados necesarios para la correcta infección de la planta y expresión de la proteína heteróloga: el módulo de citoplasma, el módulo de la integrasa y el módulo codificante para las proteínas quiméricas (**Figura 24**). Posteriormente, se monitorearon las plantas infectadas con el control positivo de expresión (GFP) para determinar el día óptimo de cosecha (**Figura 25**).



Figura 24. Vectores de expresión utilizados para la técnica de agroinfiltración. La cepa PGV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada con los vectores pICH31070-L1a/L1b, pICH14011 y pICH15879 para su uso durante el proceso de agroinfiltración.



Figura 25. Comprobación mediante GFP de la expresión heteróloga en plantas de la especie *Nicotiana benthamiana*. Plantas de la especie *N. benthamiana* después de 6 días post-agroinfiltración mostraron el pico más alto de expresión heteróloga. Las plantas fueron transformadas para expresar la proteína GFP (control positivo de expresión heteróloga) con lo cual fueron capaces de emitir bioluminiscencia al ser puestas bajo luz UV.

7.5 Comprobación de integridad de las proteínas extraídas de *Nicotiana benthamiana*.

Para comprobar el estado de integridad de las proteínas después de la extracción, se corrió un gel de poliacrilamida al 12%. Un segundo propósito por el cual se elaboró este gel fue el determinar la fracción de la extracción (pellet, sobrenadante 1 o sobrenadante 2) en donde se encontraba la proteína quimérica (Figura 26). Una vez corrido el gel, se procedió a comprobar la presencia de las proteínas L1 quiméricas mediante un Western Blot incubado con un anticuerpo monoclonal anti-L1 (Figura 27).

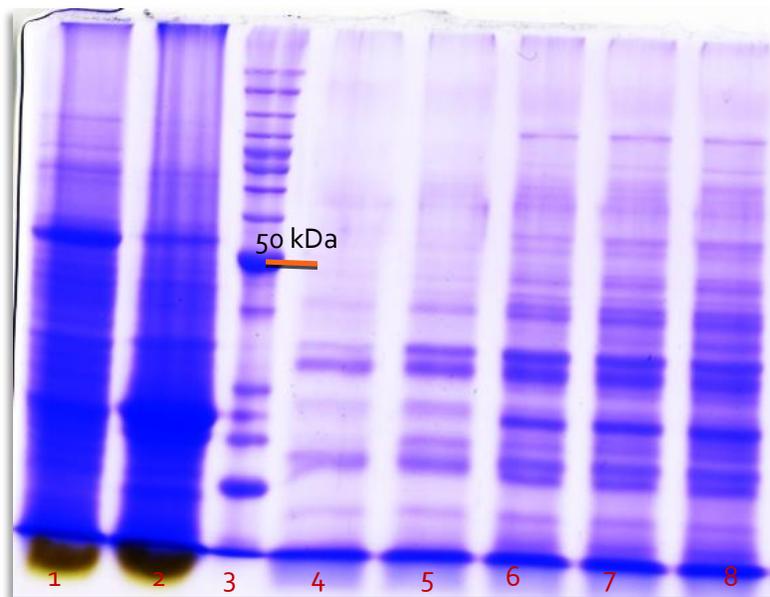


Figura 26. Comprobación de integridad de la proteína total extraída de las plantas *N. benthamiana*. Gel de poliacrilamida 12% efectuado para comprobar la integridad de las proteínas extraídas. **Carril 1:** L1a pellet. **Carril 2:** L1b pellet. **Carril 3:** Marcador de peso molecular. **Carril 4:** GFP S2. **Carril 5:** L1a S1. **Carril 6:** L1b S1. **Carril 7:** L1a S2. **Carril 8:** L1b S2.

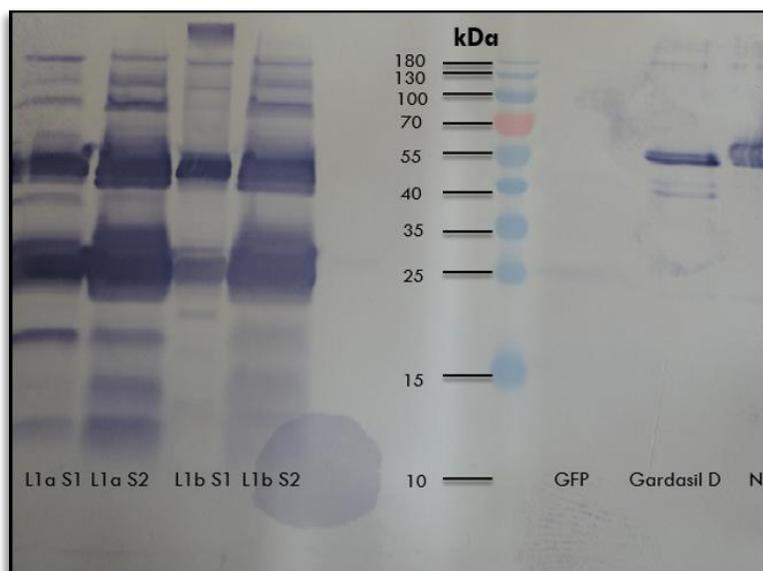


Figura 27. Detección de proteínas L1 quiméricas mediante Western Blot. Se realizó la técnica de Western Blot para corroborar la presencia de L1 quimérica en el extracto de las plantas agroinfiltradas. El Western Blot fue incubado con un anticuerpo monoclonal anti L1. **Carril 1:** L1a S1. **Carril 2:** L1a S2. **Carril 3:** L1b S1. **Carril 4:** L1b S2. **Carril 5:** -----. **Carril 6:** -----. **Carril 7:** Marcador de peso molecular. **Carril 8:** GFP (control negativo). **Carril 9:** Gardasil desnaturalizado (control positivo). **Carril 10:** Gardasil (control positivo). Las proteínas quiméricas se encontraron en el peso esperado de 52 kDa.

7.6 Purificación de las proteínas L1 quiméricas

Las fracciones S2 de L1a y L1b fueron cargadas en una columna de intercambio catiónico *ionic exchange HiTrap Cpto S ImpAct purification column* (GE Healthcare Life Sciences™) y pasadas por el sistema de purificación *AKTA Protein Purification System* (GE Healthcare Life Sciences™) (**Figura 28**). Posteriormente, para cada proteína quimérica, las fracciones obtenidas del sistema *AKTA* que contenían proteínas de aproximadamente 52 kDa fueron seleccionadas y se hizo un pool con ellas. El pool fue cargado en una columna de exclusión molecular *Exclusion Superdex 75 10/300 GL column* (GE Healthcare Life Sciences™) (**Figura 31 y 32**). Se realizó un Western Blot para comprobar que las proteínas purificadas por intercambio iónico y exclusión molecular correspondieran a la proteína de cápside L1 (**Figura 33**) y posteriormente las muestras fueron centrifugadas en un centricon de 10 kDa (**Figura 34**). Se efectuó nuevamente un Western Blot para corroborar la pureza de la proteína (**Figura 35**).

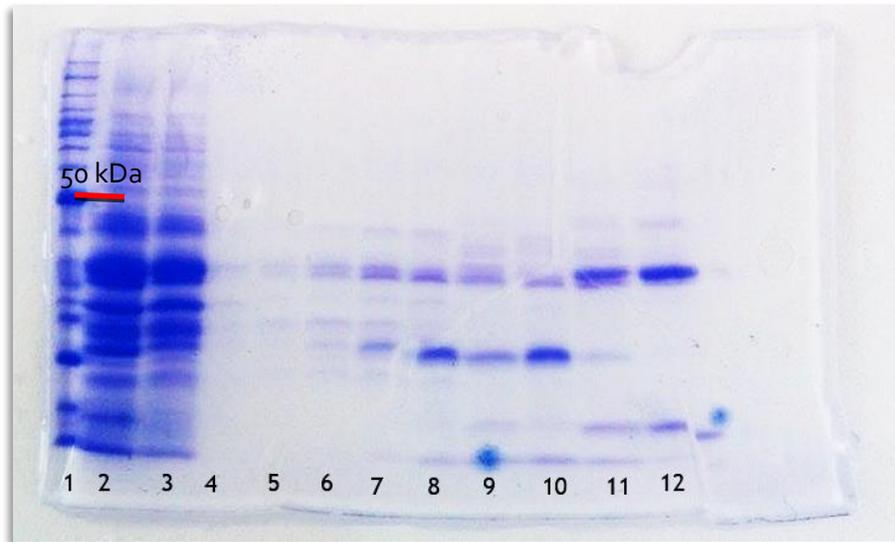


Figura 28. Purificación de las proteínas L1 quiméricas mediante cromatografía de intercambio catiónico. Gel de poliacrilamida 12% que muestra las fracciones obtenidas después de que las proteínas quiméricas fueron cargadas y pasadas por la columna de intercambio catiónico. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** L1a S2 antes de ser pasado por la columna de intercambio catiónico. **Carril 3:** L1b S2 antes de ser pasado por la columna de intercambio iónico. **Carriles 4, 5, 6 y 7:** fracciones obtenidas después de que la muestra L1a S2 fuera cargada en la columna de intercambio catiónico y fuera pasada por el sistema *AKTA*. **Carriles 8, 9, 10, 11 y 12:** fracciones obtenidas después de que la muestra L1b S2 fuera cargada en la columna de intercambio catiónico y fuera pasada por el sistema *AKTA*.

Chromatogram

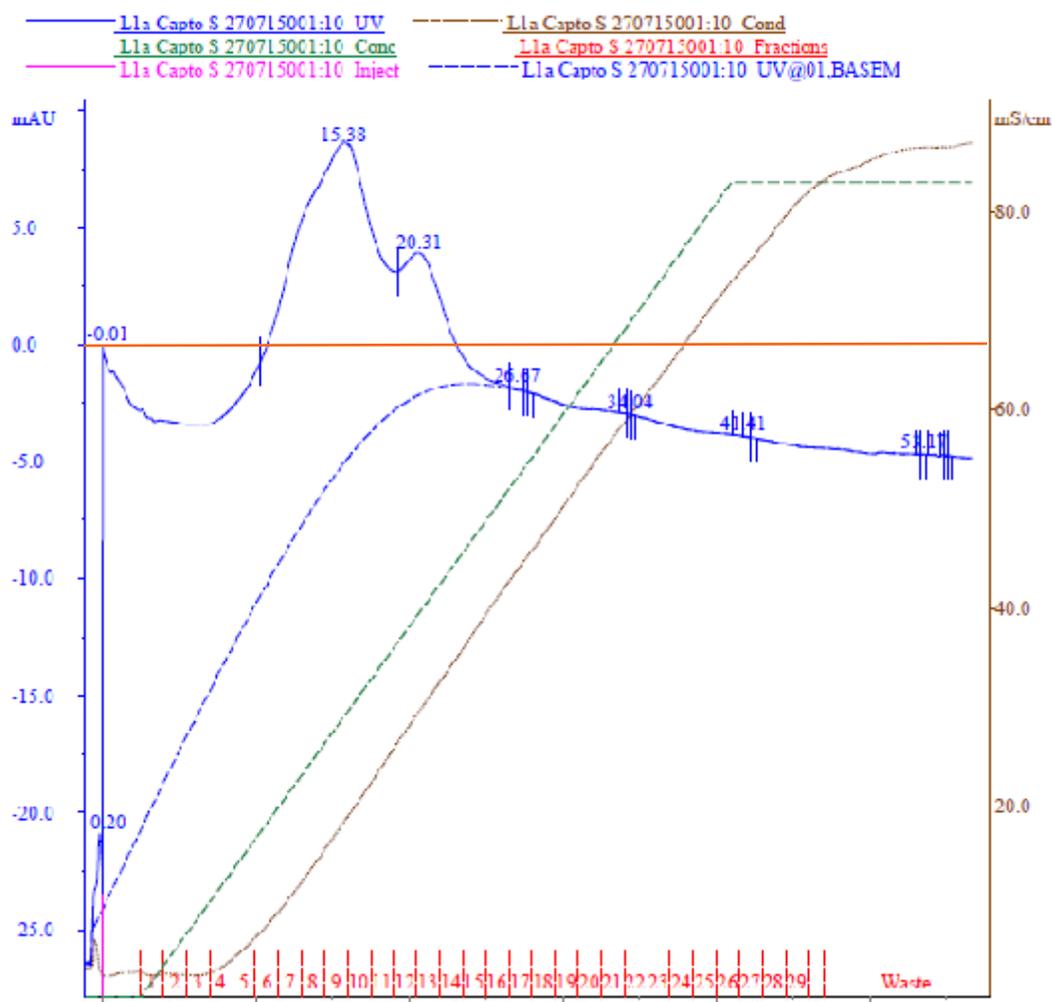


Figura 29. Cromatograma de la purificación de la muestra L1a S2 por cromatografía de intercambio catiónico. Cromatograma obtenido con el programa UNICORN al cargar la muestra L1a S2 en una columna de intercambio catiónico *ionic exchange HiTrap Capto S ImpAct purification column* y ser pasada por el sistema de purificación ÄKTA. Los picos que muestran las poblaciones de proteínas se pueden observar entre las fracciones 6 – 17.

Chromatogram

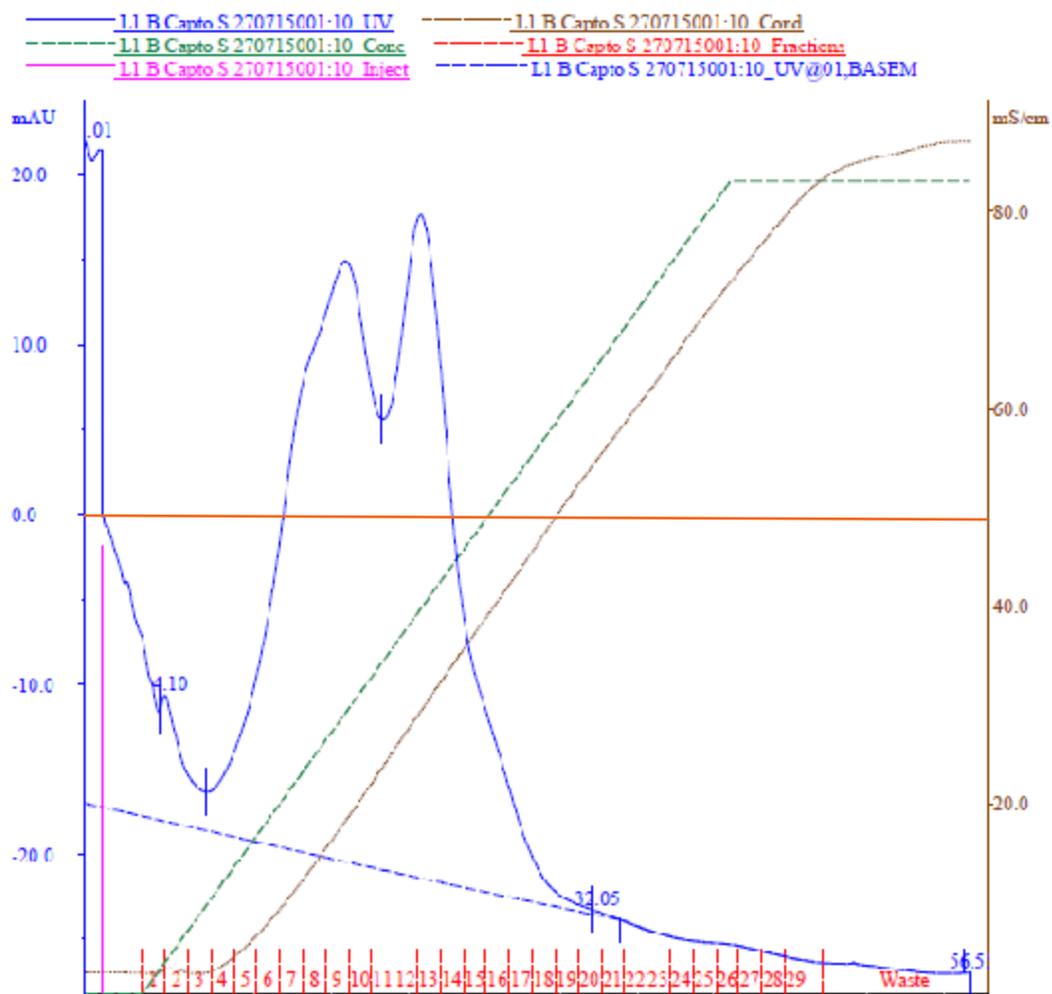


Figura 30. Cromatograma de la purificación de la muestra L1b S2 por cromatografía de intercambio catiónico. Cromatograma obtenido con el programa UNICORN al cargar la muestra L1b S2 en una columna de intercambio catiónico *ionic exchange HiTrap Capto S ImpAct purification column* y ser pasada por el sistema de purificación ÁKTA. Los picos que muestran las poblaciones de proteínas se pueden observar entre las fracciones 6 – 16.

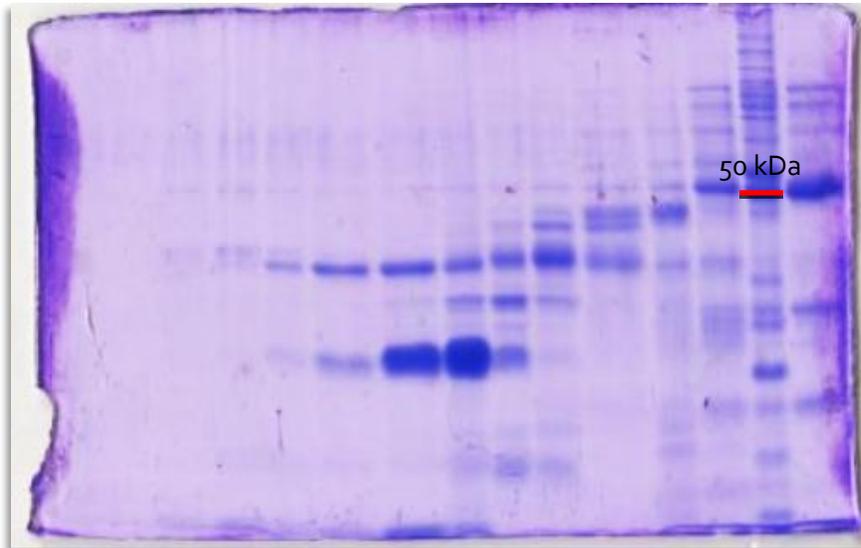


Figura 31. Purificación de la muestra L1a S2 por cromatografía de exclusión molecular. Gel de poliacrilamida 12% que muestra las fracciones obtenidas después de pasar el pool (formado tras combinar las fracciones obtenidas al pasar la muestra L1a S2 por una columna de intercambio catiónico) por una columna de exclusión molecular *Exclusion Superdex 75 10/300 GL column*.

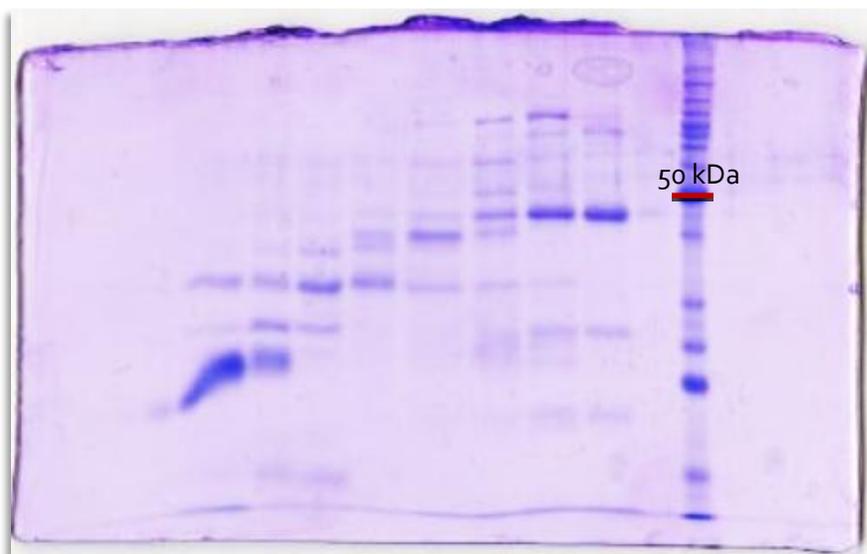


Figura 32. Purificación de la muestra L1b S2 por cromatografía de exclusión molecular. Gel de poliacrilamida 12% que muestra las fracciones obtenidas después de pasar el pool (formado tras combinar las fracciones obtenidas al pasar la muestra L1b S2 por una columna de intercambio catiónico) por una columna de exclusión molecular *Exclusion Superdex 75 10/300 GL column*.

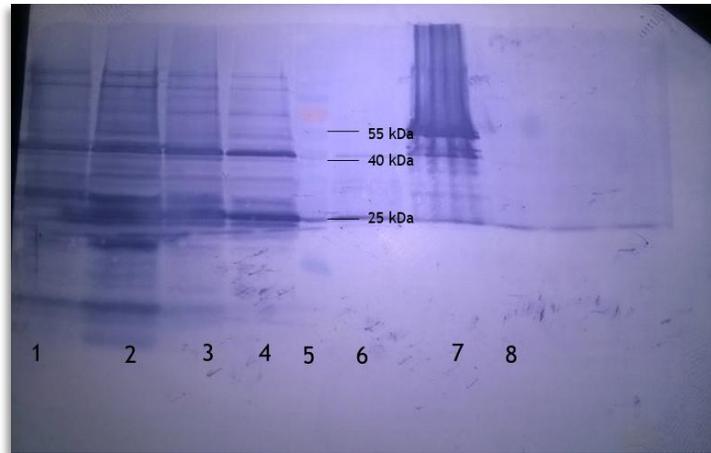


Figura 33. Detección por Western Blot de las proteínas L1 quiméricas en las muestras obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Western Blot realizado para comprobar la presencia de las L1 quiméricas en el pool hecho con las fracciones obtenidas de la exclusión molecular. **Carril 1:** Pool L1a S2 (después de exclusión molecular). **Carril 2:** Pool L1a S2 (después de exclusión molecular). **Carril 3:** Pool L1b S2 (después de exclusión molecular). **Carril 4:** Pool L1b S2 (después de exclusión molecular). **Carril 5:** Marcador de peso molecular. **Carril 6:** contaminación del carril 7. **Carril 7:** Gardasil (control positivo). **Carril 8:** GFP (control positivo).

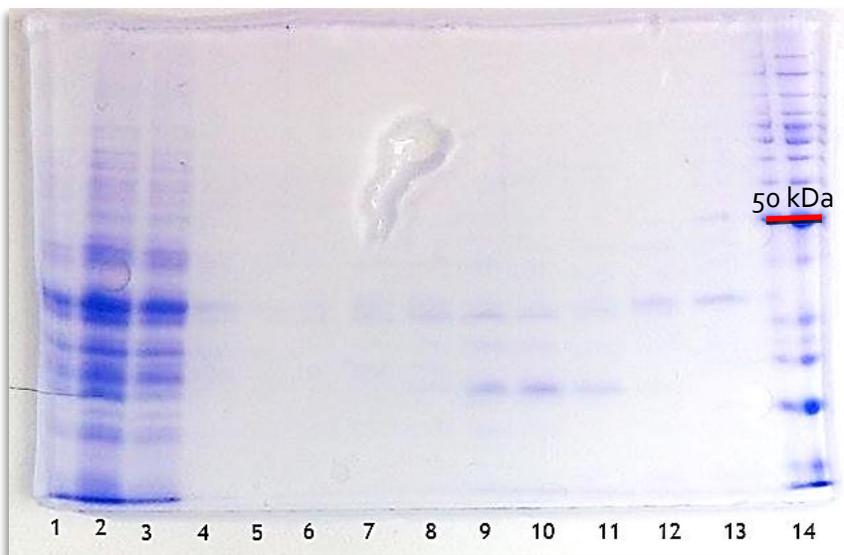


Figura 34. Muestras concentradas de las proteínas L1 quiméricas purificadas mediante métodos cromatográficos. Gel de poliacrilamida 12% cargado con los pool de ambas proteínas quiméricas después de haber sido centrifugados en centricones de 10 kDa. **Carril 1:** contaminación del carril 2. **Carril 2:** L1a S2 sin recibir ningún tratamiento de purificación. **Carril 3:** L1b S2 sin recibir ningún tratamiento de purificación. **Carriles 4, 5, 6, 7 y 8:** muestras de L1a S2 después de pasar por exclusión y posteriormente un centricon de 10 kDa. **Carriles 9, 10, 11, 12 y 13:** pertenecientes a L1b S2 después de pasar por exclusión y posteriormente por un centricon de 10 kDa. **Carril 14:** Marcador de peso molecular.

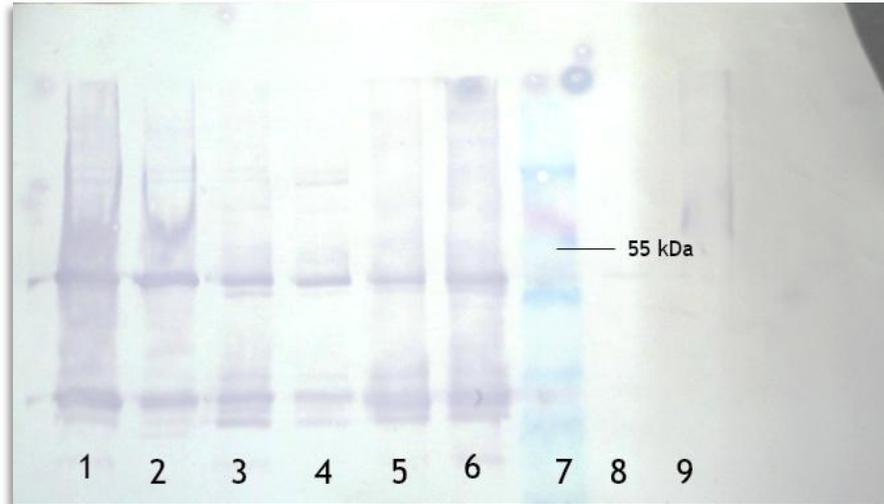


Figura 35. Detección mediante Western Blot de las proteínas L1 quiméricas purificadas. Western Blot incubado con anticuerpo monoclonal anti L1 y realizado para determinar la pureza de las proteínas quiméricas sometidas a procesos de purificación. **Carriles 1, 2 y 3:** Muestras de L1a S2 sometidas a los procesos de intercambio iónico, exclusión molecular y centrifugación en centricon de 10 kDa. **Carriles 4, 5 y 6:** Muestras de L1b S2 sometidas a los procesos de intercambio iónico, exclusión molecular y centrifugación en centricon de 10 kDa. **Carril 7:** Marcador de peso molecular. **Carril 8:** GFP (control negativo). **Carril 9:** Gardasil (control positivo).

7.7 Análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica.

Se determinó la capacidad de las proteínas L1a y L1b para formar VLPs mediante el protocolo de desensamble-ensamble. Por separado, las proteínas L1a y L1b fueron desensambladas, dializadas y ensambladas nuevamente para formar las VLPs quiméricas. Para determinar contundentemente la presencia de VLPs, se observaron las muestras en un Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM). Las muestras fueron tratadas y colocadas en celdillas de cobre a las que se contrastó con ácido fosfotúngstico para ser observadas en el TEM. Se realizaron observaciones de ambas VLPs quiméricas, tanto L1a y como L1b. Ambas VLPs quiméricas presentaban la morfología (forma icosaédrica) y tamaño (50-70 nm) correcto.

VLP L1a

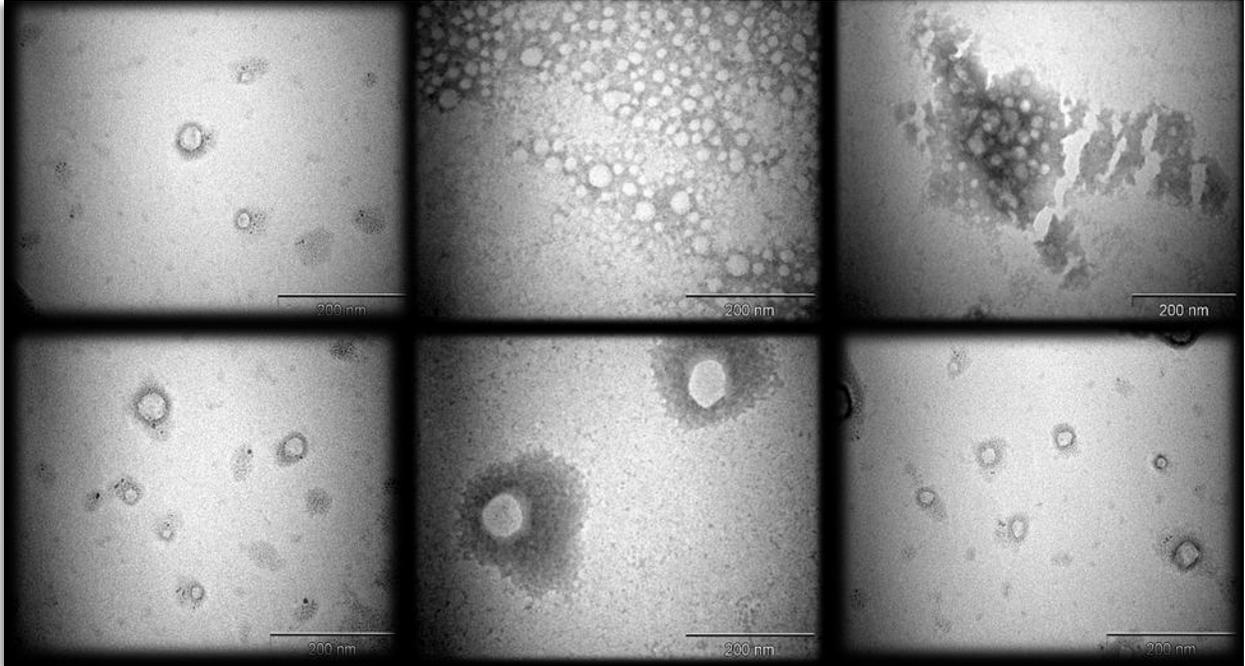


Figura 36. Micrografías de VLP L1a tomadas con Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM). Las VLPs quiméricas muestran la forma y tamaño característicos de la cápside de HPV16. Las imágenes corresponden a diferentes campos de una misma muestra.

VLP L1b

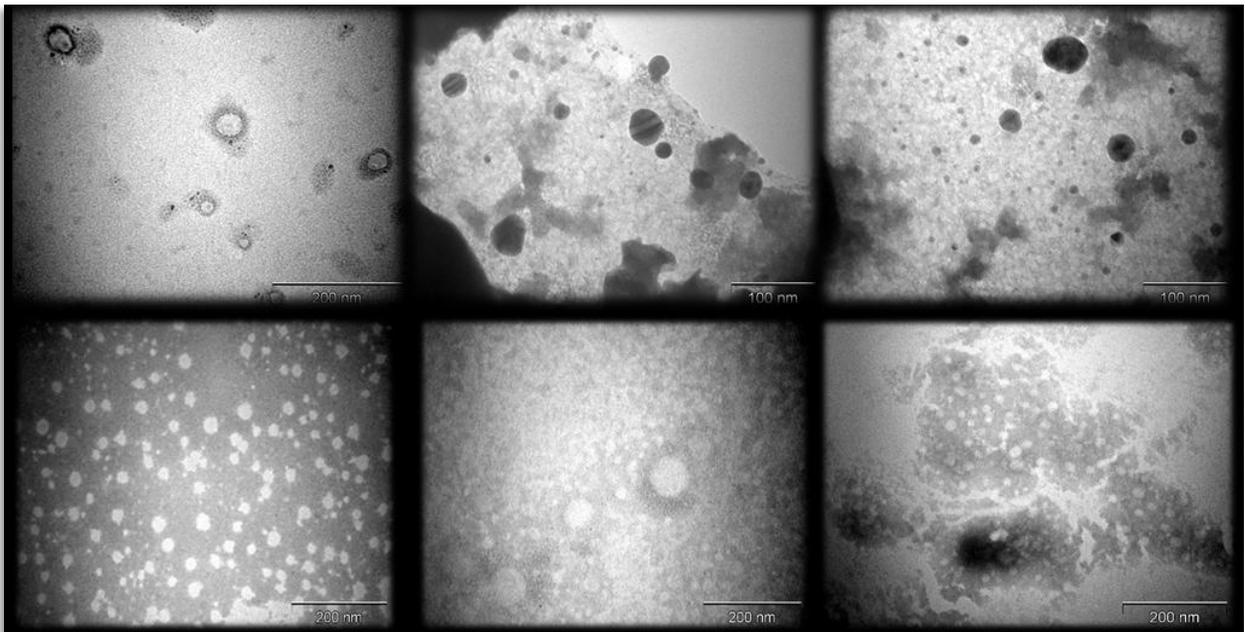


Figura 37. Micrografías de VLP L1b tomadas con Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM). Las VLPs quiméricas muestran la forma y tamaño característicos de la cápside de HPV16. Las imágenes corresponden a diferentes campos de una misma muestra.

7.8 Comprobación de la presencia del epítipo A β 11-28 sobre la superficie de las VLPs quiméricas.

Una vez que se observó la presencia de VLPs y su correcto ensamblaje, se procedió a determinar que efectivamente expresaran el epítipo heterólogo 11-28 sobre su superficie, para ello se llevó a cabo un ensayo de ELISA en el cual se utilizó el anticuerpo comercial BAM90.1 para detectar el epítipo de interés. El anticuerpo BAM90.1 es un monoclonal que reconoce a la región 12-28 del péptido beta amiloide (**Figura 38**). Como control positivo de placa se sensibilizaron pozos con el péptido A β 1-42 y A β 11-28. Como controles negativos se utilizaron pozos sensibilizados con un péptido no relacionado y la VLP L1 wt. La gráfica es la representación del promedio de 3 ensayos de ELISA diferentes. Los ensayos de ELISA comprobaron que el epítipo efectivamente se encuentra expuesto en la superficie de ambas VLPs quiméricas.

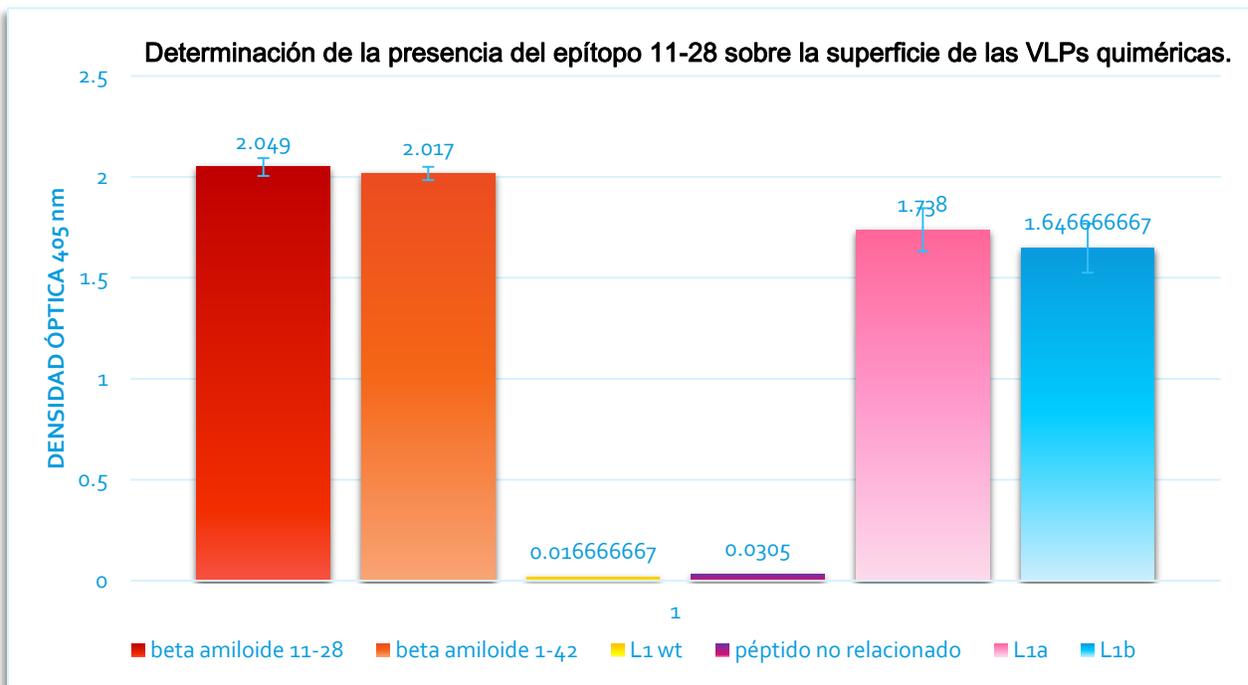


Figura 38. Ensayo de ELISA realizado para comprobar la presencia del epítipo heterólogo 11-28 sobre la superficie de las VLPs quiméricas. Para determinar la presencia de nuestro epítipo de interés sobre la superficie de las VLPs quiméricas se efectuó un ensayo de ELISA, el cual fue incubado con un anticuerpo monoclonal anti 12-28 por lo que solo emitió señal al unirse a las muestras que presentaron dicho epítipo.

7.9 Detección de anticuerpos anti-A β en suero de ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Para determinar si las VLPs quiméricas eran capaces de producir anticuerpos anti- beta amiloide, se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 con las VLPs L1 wt, L1a y L1b y se inoculó PBS a ratones de la misma cepa con la finalidad de utilizar el suero producido en ellos como control negativo. Con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos anti-A β 1-42, anti-A β 3-42 y anti-A β 11-42 en el suero de los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas, se procedió a realizar ensayos de ELISA (**Figuras 39,**

40 y 41). Dependiendo del tipo de anticuerpo a detectar, el control positivo de placa fue el suero de un ratón inmunizado con el péptido A β ₁₋₄₂, A β ₃₋₄₂ o A β ₁₁₋₄₂. Los controles negativos fueron los sueros de ratones inoculados con PBS y el suero de ratones inmunizados con la VLP L1 wt. Para la detección de cada tipo de anticuerpos se llevaron a cabo ensayos de ELISA por separado. Cada gráfica es la representación del promedio de 3 ensayos de ELISA diferentes. Los resultados de los ensayos de ELISA demostraron que los anticuerpos producidos por los ratones a los que se inmunizó con las VLPs quiméricas, son capaces de reconocer al péptido de longitud completa y a las dos especies amino-truncadas.

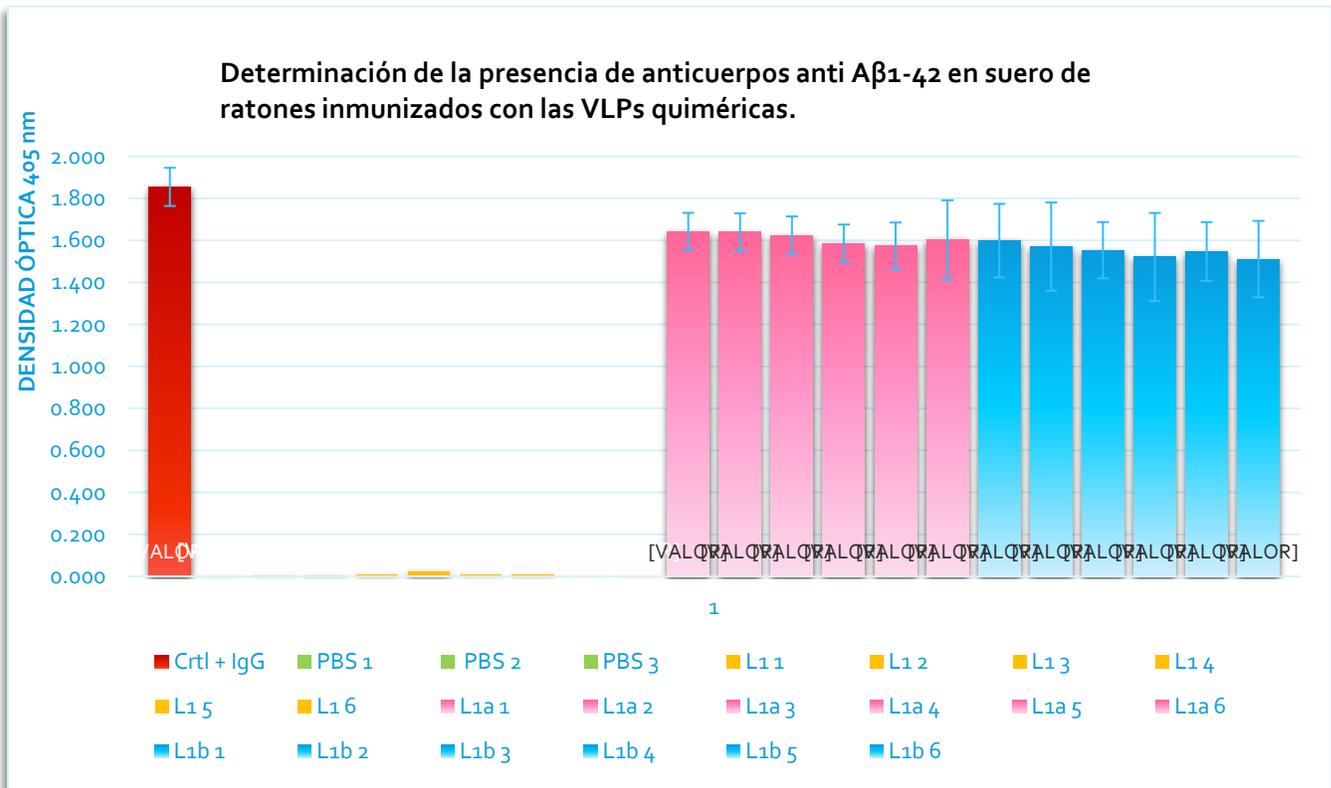


Figura 39. Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂. Ensayo de ELISA realizado para determinar la presencia de anticuerpos anti A β ₁₋₄₂ en el suero de los ratones que fueron inmunizados con las VLPs quiméricas.

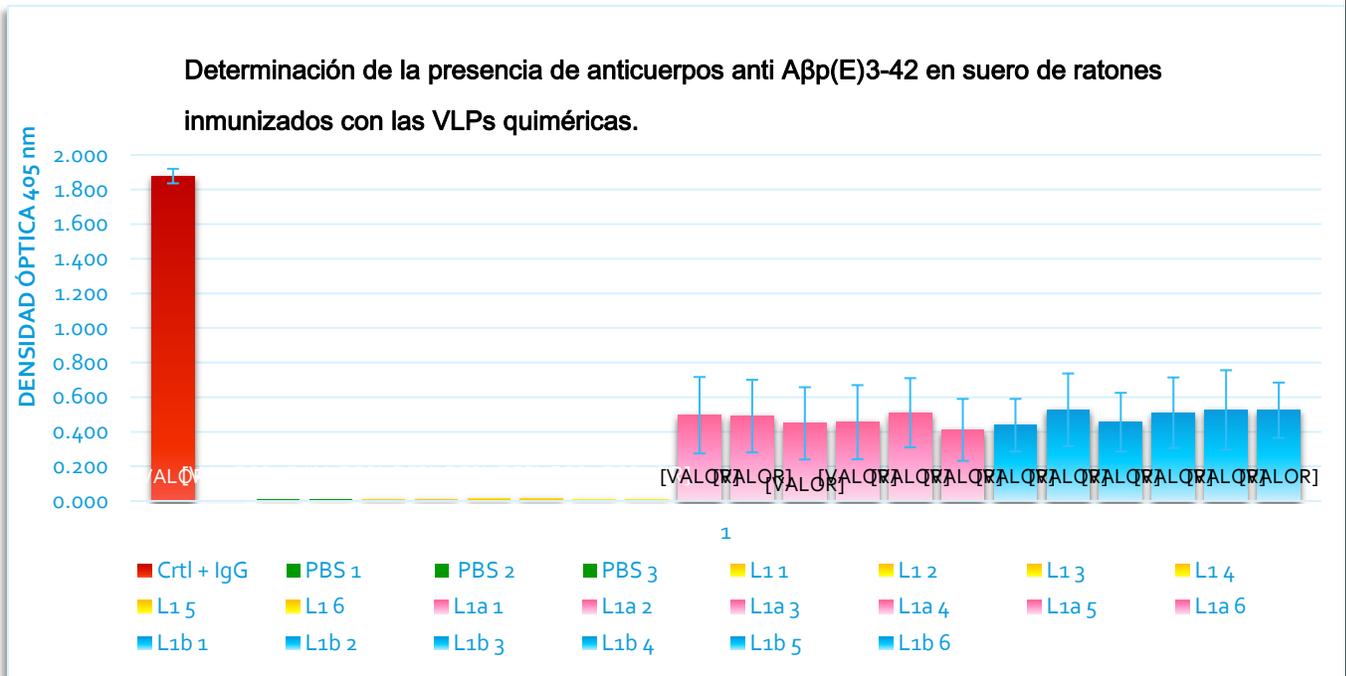


Figura 40. Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-A β 3-42. Ensayo de ELISA realizado para determinar la presencia de anticuerpos anti A β 3-42 en el suero de los ratones que fueron inmunizados con las VLPs quiméricas.

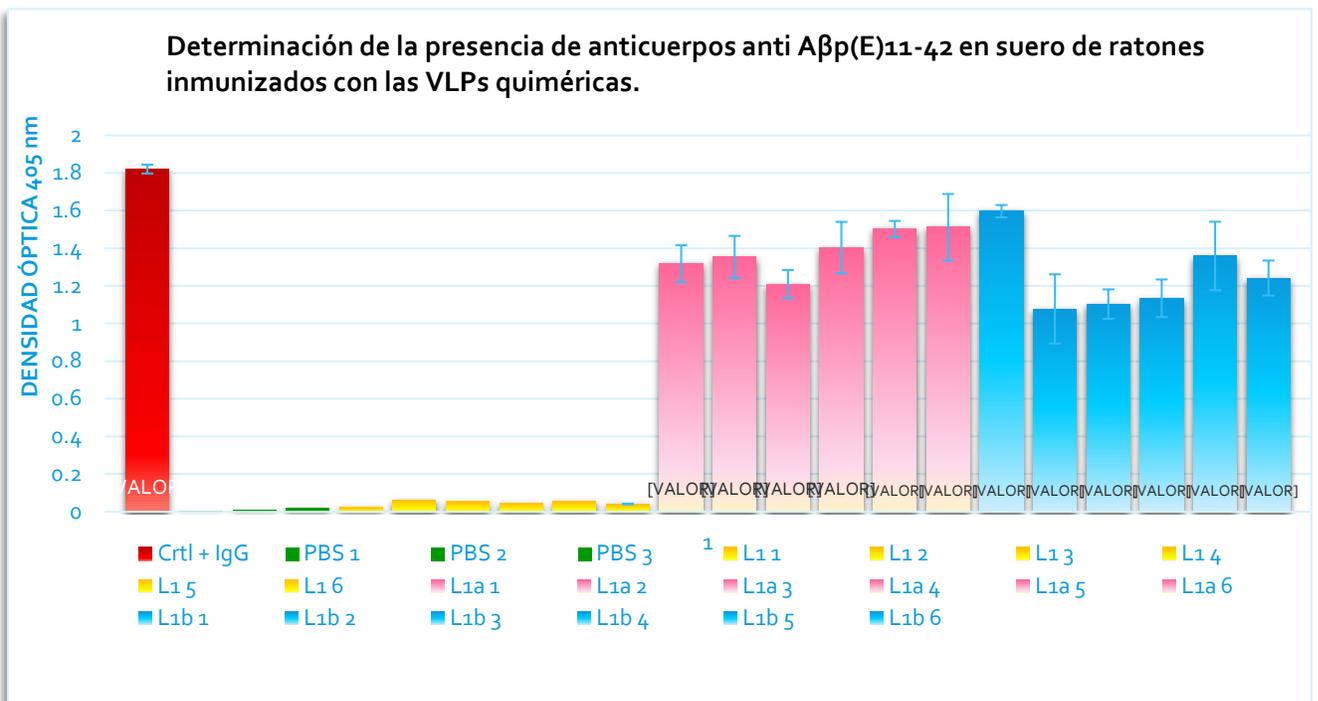


Figura 41. Detección mediante ensayo de ELISA de anticuerpos anti-A β 11-42. Ensayo de ELISA realizado para determinar la presencia de anticuerpos anti A β 11-42 en el suero de los ratones que fueron inmunizados con las VLPs quiméricas.

7.10 Reconocimiento del beta amiloide de longitud completa y especies amino-truncadas por medio de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante los ensayos de ELISA, se realizó un Western Blot. Se corrieron geles de gradiente 4-11% en donde se cargaron por tripletes los péptidos A β 1-42, A β p(E)3-42 y A β p(E)11-42. Los tripletes fueron incubados de la siguiente manera:

- . Triplete incubado con suero de ratón inmunizado con la VLP L1a.
- . Triplete incubado con suero de ratón inmunizado con el anticuerpo monoclonal BAM90.1 (reconoce la región 12-28 del péptido beta amiloide) como control positivo.
- . Triplete incubado con suero de ratón inmunizado con la VLP L1b.

El A β 1-42 y las especies amino-truncadas tiene una capacidad natural de agregación y oligomerización, por lo tanto es fundamental que los anticuerpos producidos por una vacuna contra la EA sean capaces de reconocer a la formas de monoméricas y oligoméricas. El A β 1-42 tiene un peso molecular de 4.5 kDa en su forma monomérica, debido a que los geles utilizados para la realización del Western Blot contienen un gradiente de concentración, permitieron la detección de monómeros y oligómeros del péptido beta amiloide por parte de los anticuerpos producidos (**Figura 42**).

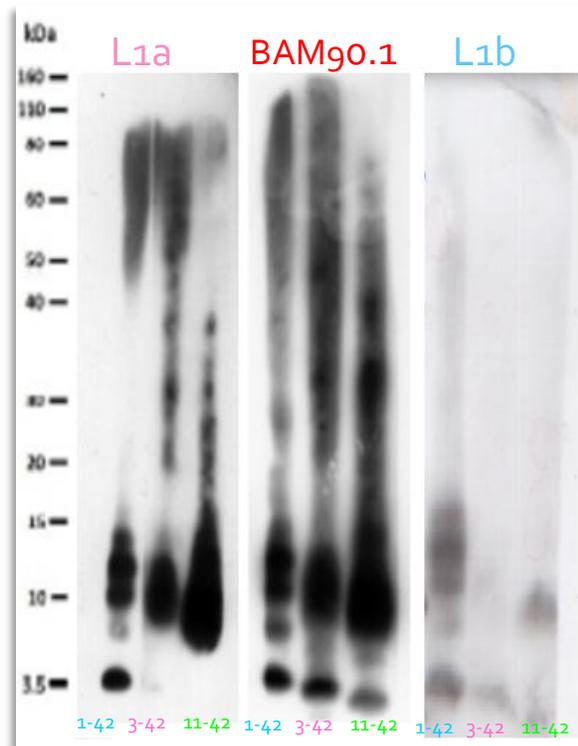


Figura 42. Detección por Western Blot de monómeros y oligómeros de beta amiloide a través de los anticuerpos inducidos. Se efectuó un Western Blot para comprobar los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA y para determinar el reconocimiento de las formas monoméricas y oligoméricas por parte de los anticuerpos producidos en los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas. **Triplete 1:** Incubado con suero de ratón inmunizado con la VLP L1a. De izquierda a derecha el orden de los péptidos es A β 1-42, A β p(E)3-42 y A β p(E)11-42. **Triplete 2:** Incubado con anticuerpo monoclonal BAM90.1. De izquierda a derecha el orden de los péptidos es A β 1-42, A β p(E)3-42 y A β p(E)11-42. **Triplete 3:** Incubado con suero de ratón inmunizado con la VLP L1b. De izquierda a derecha el orden de los péptidos es A β 1-42, A β p(E)3-42 y A β p(E)11-42.

7.11 Evaluación de la respuesta inmune mediante la identificación de isótipos IgG encontrados en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

Debido a que una de las características patológicas de la Enfermedad de Alzheimer es la neuroinflamación, el desarrollo de una vacuna contra la EA debe ser capaz de producir anticuerpos anti-A β de naturaleza anti-inflamatoria (Th2). Las IgGs, dependiendo del tipo la respuesta inmune producida, pueden ser de carácter pro-inflamatorio (Th1) o anti-inflamatorio (Th2). La principal IgG pro-inflamatoria es el isótipo IgG2a, mientras que los isótipos IgG1 e IgG2b son indicativos de una respuesta inmune de tipo anti-inflamatoria. Es por ello, que para corroborar la naturaleza de los anticuerpos producidos con las VLPs quiméricas, se efectuaron ensayos de ELISA que permitieran determinar los isótipos. Se hizo un pool con los anticuerpos de los diferentes ratones de cada grupo de inmunización y se efectuó la medición de 4 isótipos diferentes: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. La placa fue sensibilizada para detectar A β ₁₋₄₂. Los resultados obtenidos por medio de pruebas de ELISA muestran que los anticuerpos anti-A β de las subclases IgG1 e IgG2b están presentes en mayor medida en el suero de los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas (**Figura 43**).

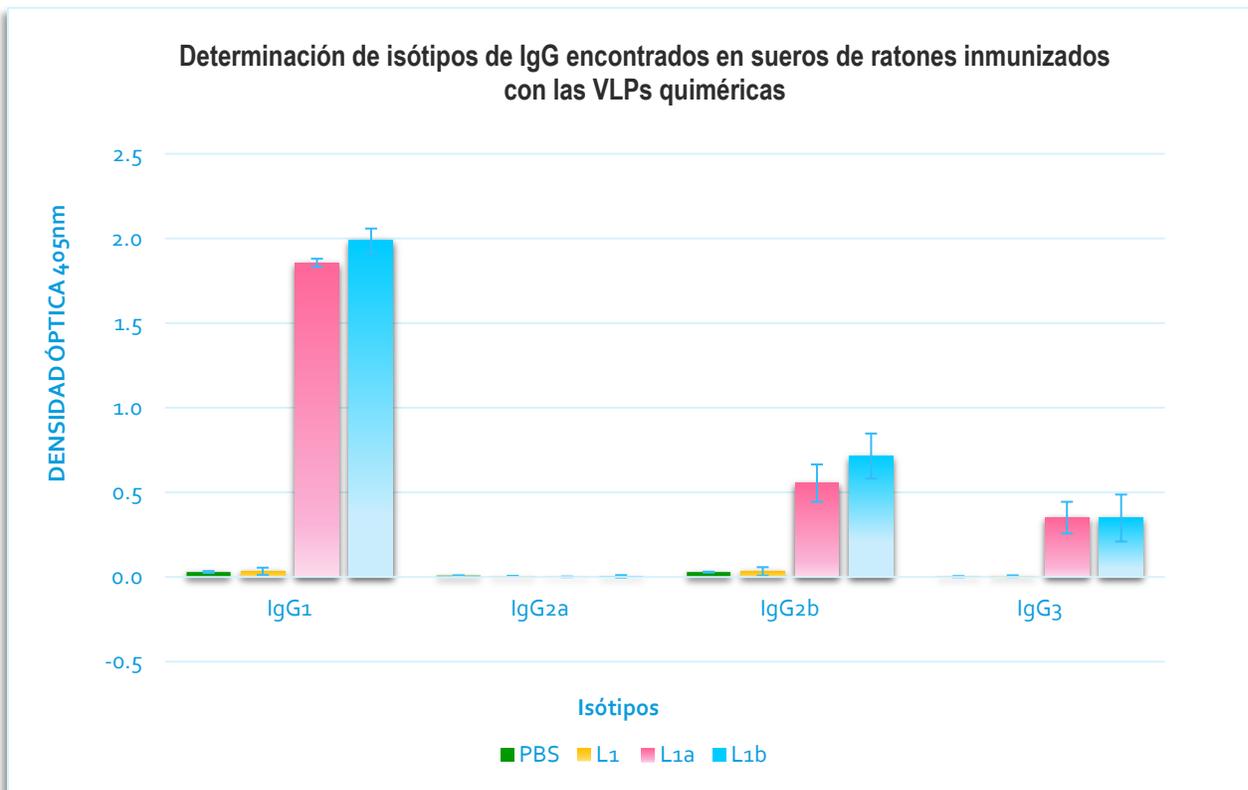


Figura 43. Isotipificación mediante ensayo de ELISA de los anticuerpos anti-beta amiloide. Ensayo de ELISA efectuado para determinar los isótipos de IgG producidos en los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas.

7.12 Análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro de ratones transgénicos 3xTg-AD y en cortes de cerebro humano para comprobar la capacidad de los anticuerpos inducidos para reconocer agregados amiloides.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de reconocer agregados amiloides por parte de los anticuerpos anti-A β producidos en los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas, se analizaron cortes de cerebro de ratones transgénicos de la cepa 3xTg-AD, los cuales desarrollan agregados amiloides y otras características patológicas características de la EA después de los 9 meses de edad y también se analizaron cortes de cerebro humano de pacientes con EA. Los cortes de cerebro fueron incubados con suero de ratones inmunizados con VLP L1a y VLP L1b. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal BAM10, el cual es capaz de reconocer al péptido beta amiloide de longitud completa y agregados amiloides, y como control negativo un corte se utilizó el suero de un ratón inmunizado con la VLP L1 wt. Como anticuerpo secundario el anticuerpo Alexa 594- anti IgG, el cual emite una fluorescencia de color rojo y DAPI, el cual reconoce el núcleo celular y emite una fluorescencia azul (**Figura 44**). De igual manera, para los cortes de cerebro humano se utilizó como control positivo el anticuerpo BAM10 y como control negativo el suero anti-VLP L1 wt. También se utilizaron cortes de cerebro de una persona sin EA. Como anticuerpo secundario se utilizó Alexa 594 –anti IgG (**Figura 45**).

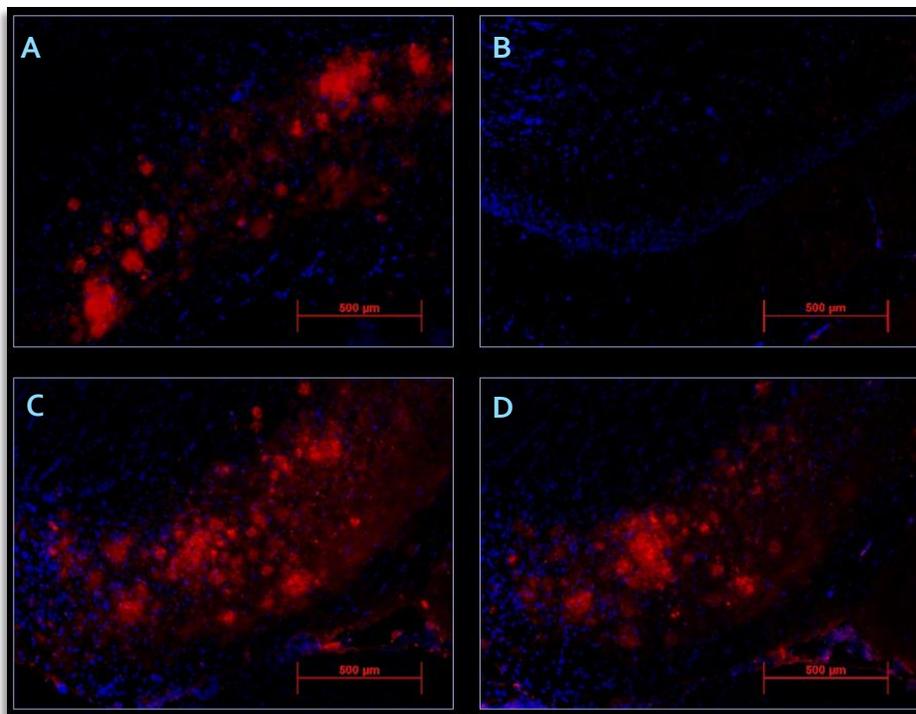


Figura 44. Determinación mediante inmunohistoquímica de la capacidad de los anticuerpos inducidos para detectar agregados amiloides en cerebro de ratón transgénico. Para determinar la capacidad de los anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas de reconocer agregados amiloides en cerebro de ratón 3xTg-AD, se efectuó un ensayo de inmunohistoquímica. En fluorescencia roja se pueden observar los agregados amiloides y en fluorescencia azul el núcleo celular. **A)** Corte de cerebro de ratón transgénico 3xTg-AD incubado con BAM10 (control positivo). **B)** Corte de cerebro de ratón transgénico 3xTg-AD incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1 wt. **C)** Corte de cerebro de ratón transgénico 3xTg-AD incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1a. **D)** Corte de cerebro de ratón transgénico 3xTg-AD incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1b.

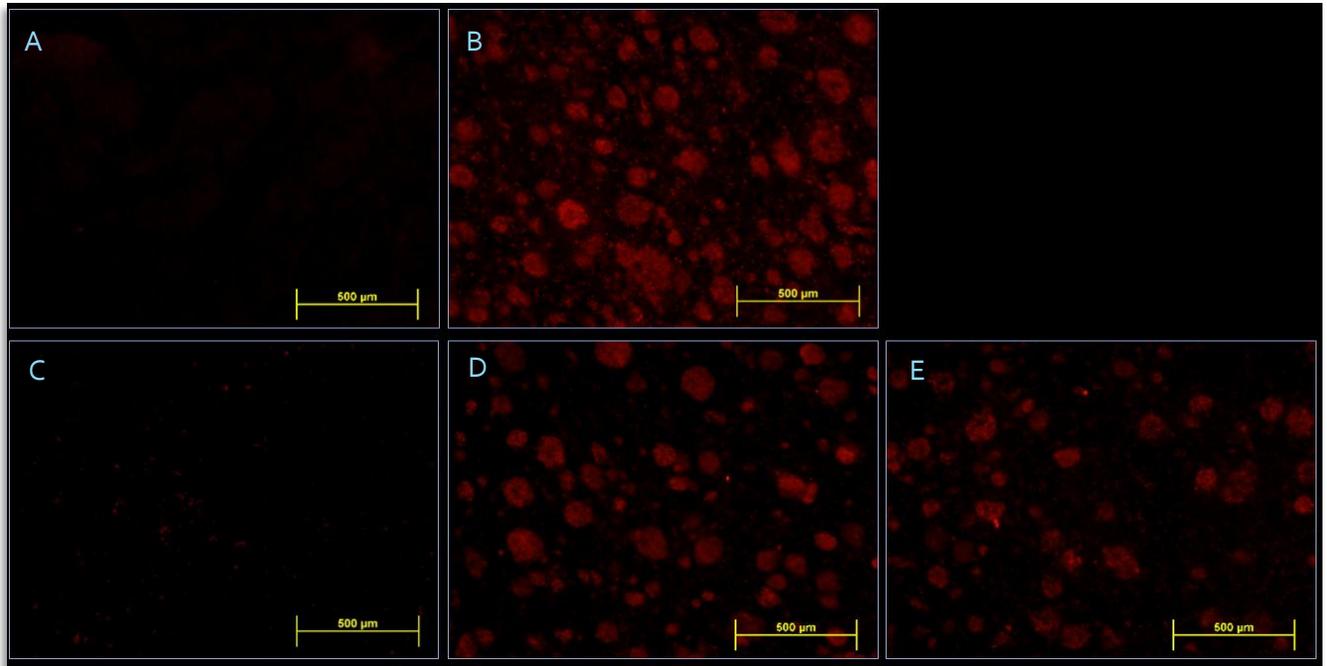


Figura 45. Determinación mediante inmunohistoquímica de la capacidad de los anticuerpos inducidos para detectar agregados amiloides en cerebro humano. Para determinar la capacidad de los anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas de reconocer agregados amiloides en cerebro humano, se efectuó un ensayo de inmunohistoquímica. En fluorescencia roja se pueden observar los agregados amiloides. **A)** Corte de cerebro humano sano y sin agregados amiloides incubado con BAM10 (control negativo). **B)** Corte de cerebro humano con EA incubado con BAM10 (control positivo). **C)** Corte de cerebro humano con EA incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1a wt. **D)** Corte de cerebro humano con EA incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1a. **E)** Corte de cerebro humano con EA incubado con suero de ratón inmunizado con VLP L1b.

7.13 Análisis de inhibición de los anticuerpos anti-VLPs quiméricas con diferentes fragmentos del péptido beta amiloide.

Con el fin de evaluar la especificidad de los anticuerpos anti VLP L1a/L1b, se realizaron ensayos de ELISA de competencia utilizando los péptidos sintéticos A β 1-42, A β 1-16, A β 12-28 y un péptido no relacionado (pAF3). Como control negativo se utilizó un péptido no relacionado (PNR). Se observó que los péptidos A β 1-42 y A β 12-28 son capaces de inhibir la interacción de los anticuerpos anti-VLP L1a/L1b, sin embargo, el péptido A β 1-16 no presentó inhibición. El PNR tampoco presentó inhibición alguna (Figura 46).

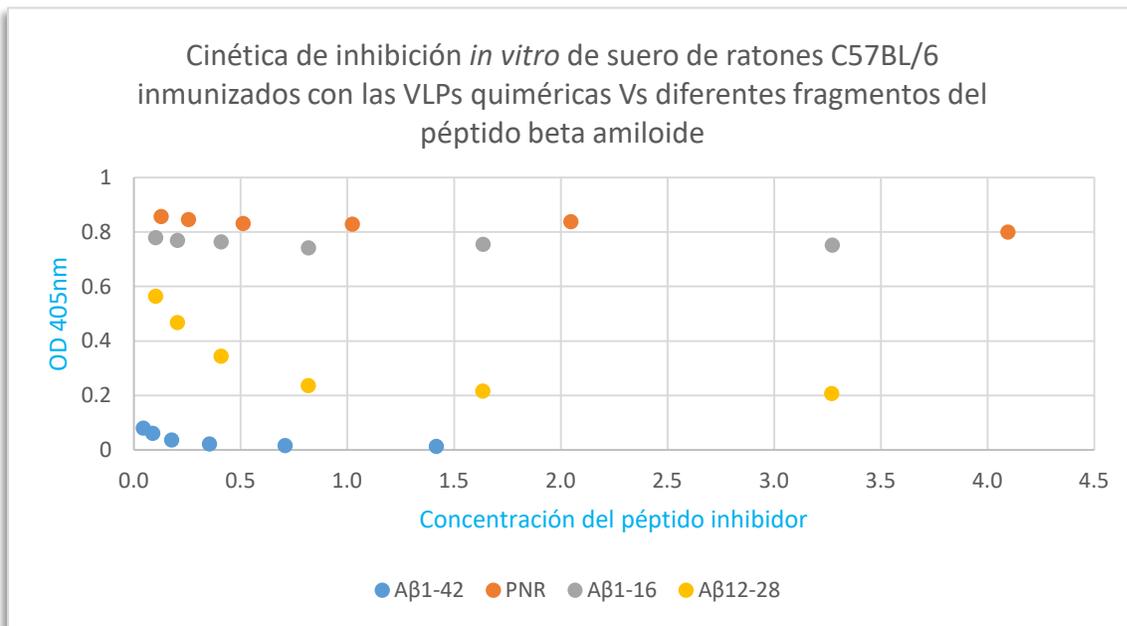


Figura 46. Análisis de inhibición *in vitro* de los anticuerpos anti-VLPs quiméricas con diferentes fragmentos del péptido beta amiloide. El ensayo de inhibición muestra que los péptidos A β 1-42 y A β 12-28 son capaces de inhibir a los anticuerpos producidos en ratones C57BL/6 inmunizados con VLPs quiméricas. Los péptidos A β 1-16 y PNR no fueron capaces de llevar a cabo dicha inhibición.

7.14 Determinación de estabilidad y condiciones de almacenamiento de las VLPs quiméricas.

Para determinar el tiempo de vida media de las VLPs quiméricas y las mejores condiciones para su almacenamiento se realizó un análisis de estabilidad con base en trabajos y estudios publicados anteriormente (Li Shi et al, 2005; Lynch et al, 2012; Ladd Effio et al, 2015). Se determinó que los parámetros adecuados a considerar para el almacenaje de nano partículas virales son el pH y la concentración de sal. Con base en lo anterior se diseñaron una serie de combinaciones pH-concentración de sal (Tabla 1). El análisis demostró que el buffer MOPS (3-(N-morpholino) ácido propanesulfónico) con un pH7 y una concentración de sal de 500 mM es la mejor combinación para el almacenamiento de las nano partículas, sin embargo, en el mejor de los casos las VLPs quiméricas solo alcanzaron un tiempo de vida media de 2 semanas (Figura 50) y dependiendo de la concentración de sal y escala de pH mostraron un cambio en sus tamaños y morfologías.

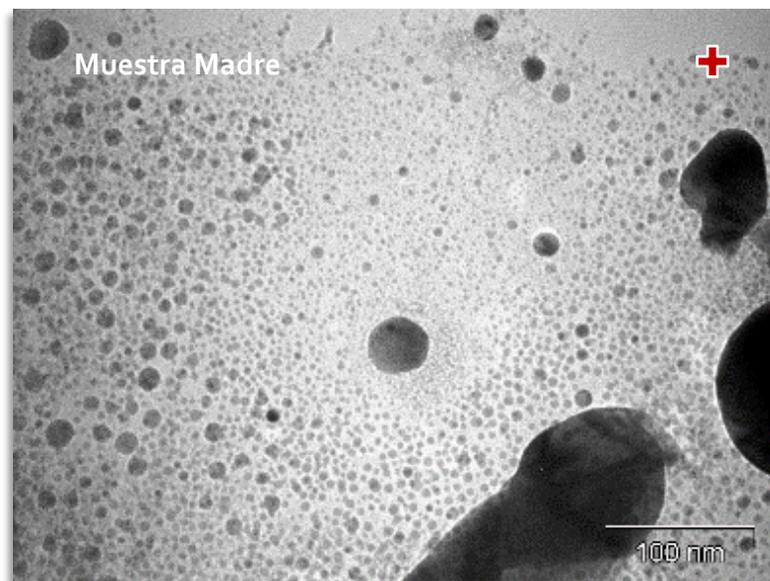


Figura 47. Micrografía de la muestra madre de las VLPs quiméricas tomada con el TEM. La muestra madre muestra el tamaño correcto de 50-70 nm y la forma icosaédrica característica de la cápside del Virus de Papiloma Humano 16. A partir de esta muestra se tomaron alícuotas, las cuales se almacenaron a diferentes temperaturas, concentraciones de sal y escalas de pH para determinar las mejores condiciones de almacenamiento y la estabilidad de las VLPs quiméricas. El signo "+" sobre la esquina superior derecha denota presencia de VLPs.

Controles

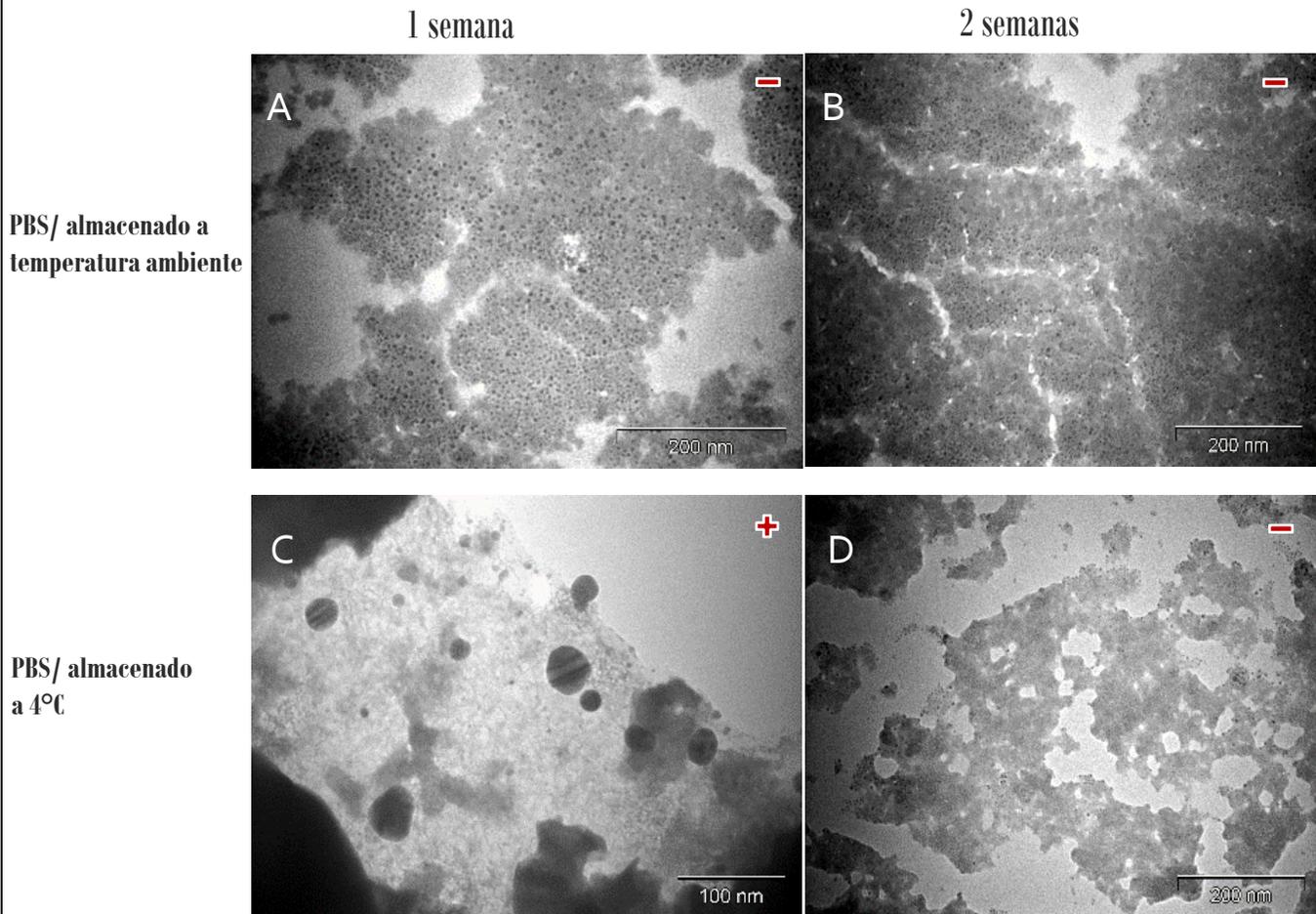


Figura 48. Micrografías de los grupos control del análisis de estabilidad de las VLPs quiméricas. **Fotografías A y B:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente en buffer PBS a temperatura ambiente. **Fotografías C y D:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas en buffer PBS a 4°C. El signo "+" sobre la esquina superior derecha denota la presencia de VLPs en la muestra observada. El signo "-" sobre la esquina superior derecha denota la ausencia de VLPs en la muestra observada.

MOPS-Concentración 150 mM NaCl

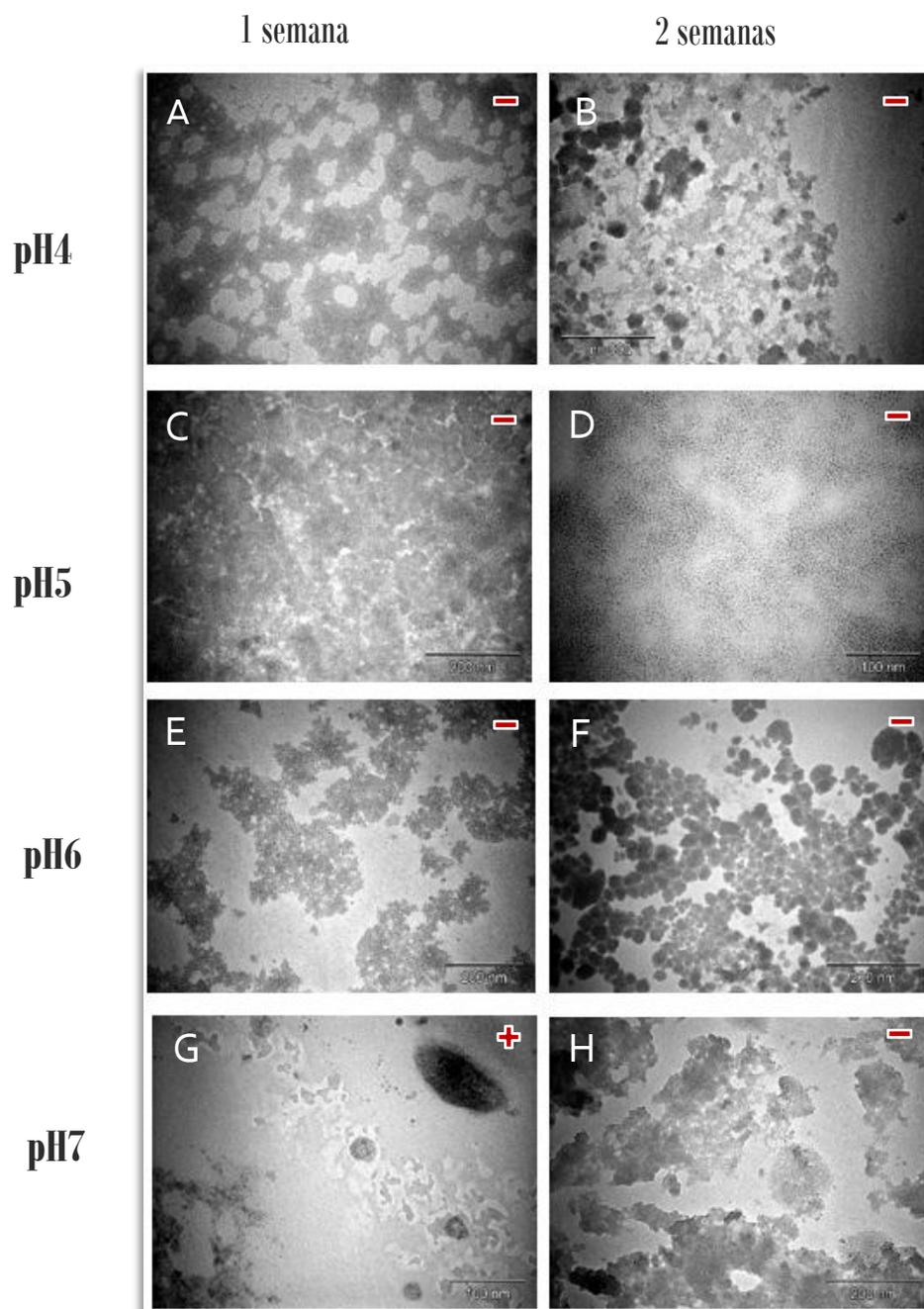


Figura 49. Micrografías de las muestras de VLPs quiméricas almacenadas a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y rango de pH 4-7. **Fotografías A y B:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y pH4. **Fotografías C y D:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y pH5. **Fotografías E y F:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y pH6. **Fotografías G y H:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y pH7. El signo "+" sobre la esquina superior derecha denota la presencia de VLPs en la muestra observada. El signo "-" sobre la esquina superior derecha denota la ausencia de VLPs en la muestra observada.

MOPS-Concentración 500 mM NaCl

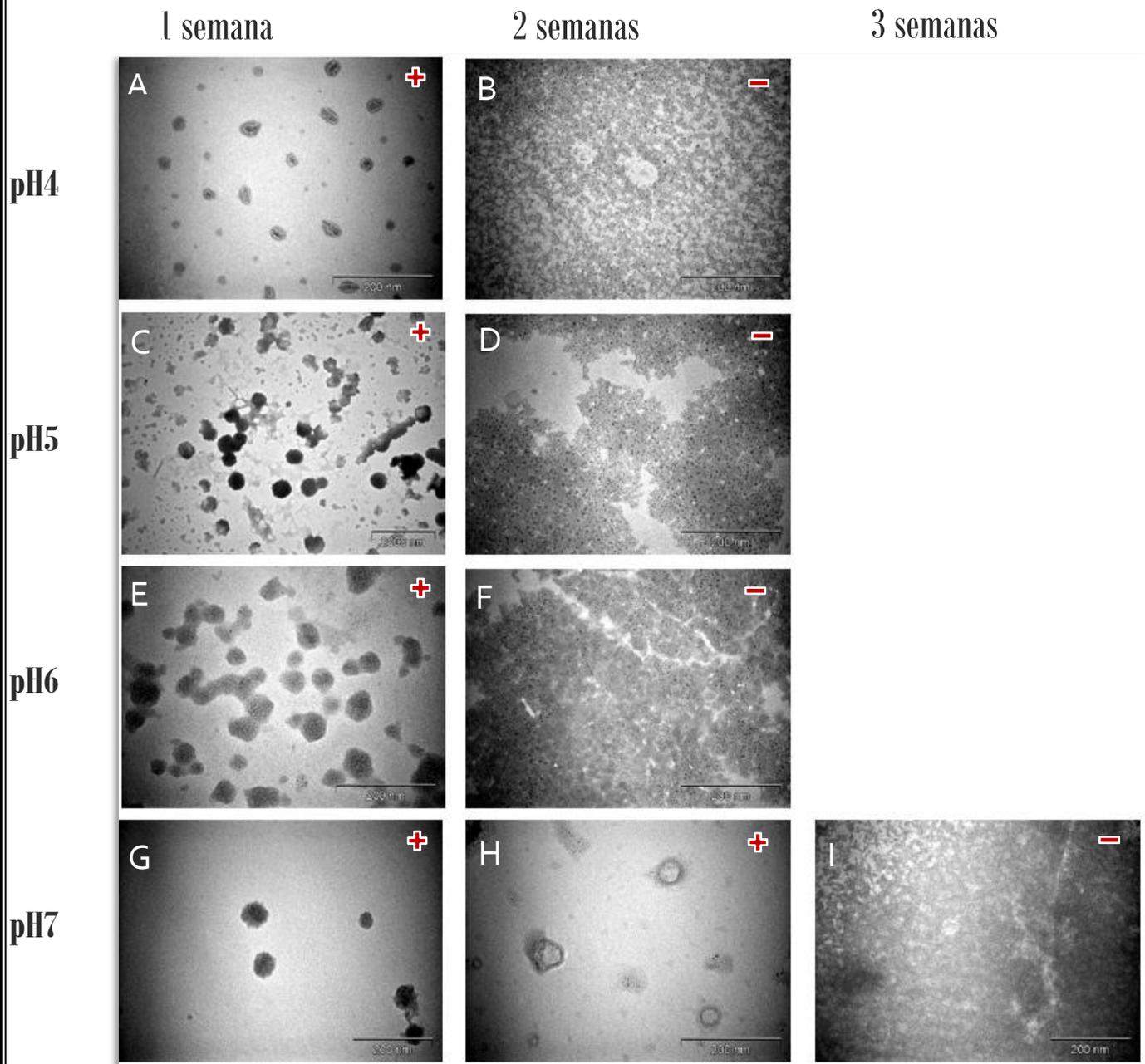


Figura 50. Micrografías de las muestras de VLPs quiméricas almacenadas a 4°C en buffer MOPS 500 mM de NaCl y rango de pH 4-7. **Fotografías A y B:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 500 mM de NaCl y pH4. **Fotografías C y D:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 500 mM de NaCl y pH5. **Fotografías E y F:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 500 mM de NaCl y pH6. **Fotografías G, H e I:** muestra de VLPs quiméricas almacenadas durante 1 y 2 semanas respectivamente a 4°C en buffer MOPS 150 mM de NaCl y pH7. El signo "+" sobre la esquina superior derecha denota la presencia de VLPs en la muestra observada. El signo "-" sobre la esquina superior derecha denota la ⁶⁶ ausencia de VLPs en la muestra observada.

8. DISCUSIÓN

La Enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central manifestado por deficiencias conductuales, de memoria, demencia progresiva, pérdida de autovalía y finalmente la muerte. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la EA es el tipo de demencia más común en personas mayores a los 65 años de edad, representando alrededor del 50% de los casos de demencia reportados a nivel mundial (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>).

El desarrollo de una vacuna contra la EA ha sido un tema evasivo a lo largo del tiempo debido a la difícil tarea de abordar varias problemáticas de manera conjunta. Es bien sabido que la utilización del péptido de longitud completa como inmunógeno no es una idea viable ya que contiene dentro de su estructura epítomos para la activación de linfocitos T autorreactivos (Ferrer et al, 2004) además de que la utilización de un adyuvante para potenciar la respuesta inmune producida por el inmunógeno es otro punto restrictivo. Se debe mencionar que la FDA solo tiene permitido un adyuvante para su uso en humanos: las sales de aluminio. Las sales de aluminio son el adyuvante más ampliamente utilizado en la fabricación de vacunas para su uso en humanos, sin embargo, el aluminio es un metal que está directamente asociado con la aparición de la EA por lo que su uso en el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad es de carácter prohibitivo. Por otra parte, una gran cantidad de estudios han reportado la capacidad de las sales de aluminio para favorecer respuestas inmunes de tipo Th1 (Liqi D. et al, 2015) lo que considera un grave problema en el diseño de una vacuna contra la EA puesto que una de las características patológicas de la enfermedad es inflamación en diferentes zonas del cerebro. Diversos estudios han abordado esta problemática mediante la utilización de VLPs para el desarrollo de una vacuna contra la EA. Debido a sus características intrínsecas, la utilización de VLPs como estructuras portadoras de epítomos heterólogos, ha probado ser una buena estrategia que permite evadir muchas de las problemáticas surgidas a la hora del desarrollo para una vacuna ya que poseen propiedades autoadyuvantes, tienden a producir respuestas inmunes anti-inflamatorias y activan linfocitos B a través de cross-linking por lo que no necesita la presencia de linfocitos T (Lua et al, 2013). Entre las diferentes VLPs desarrolladas, se ha demostrado que la cápside del HPV16 es un excelente vehículo de inserción para epítomos heterólogos de todo tipo (Monroy-García et al, 2014).

Dentro de la temática de la EA, Chackerian y colaboradores insertaron diferentes segmentos de la región N-terminal del péptido beta amiloide en la cápside del VPH16 obteniendo un buen título de anticuerpos anti-beta amiloide y sin registros de activación de linfocitos T (Chackerian et al, 2006). Por otra parte Zamora y colaboradores también diseñaron una VLP de HPV16 la cual contenía el fragmento 1-9 de la región N-terminal del péptido beta amiloide. Los ratones transgénicos APP/ presinilina 1 inmunizados con esta VLP desarrollaron un alto título de anticuerpos anti-beta amiloide y un decremento de los depósitos amiloides en cerebro aunque también registraron un aumento en la actividad de la microglía (Zamora et al, 2006). En el presente proyecto, los ratones de la cepa C57BL/6 que fueron inmunizados con las VLPs quiméricas VLP L1a y VLP L1b mostraron un alto título de anticuerpos anti-beta amiloide que fueron capaces de reconocer monómeros y oligómeros de las especies A β 1-42, A β p(E)3-42 y A β p(E)11-42. Lo anterior fue un resultado esperado en base a nuestra

hipótesis ya que se planteaba el reconocimiento de las especies amiloides que contuvieran el fragmento 11-28 por parte de los anticuerpos obtenidos en los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas. El alto título de anticuerpos obtenido en el suero de los ratones inmunizados fue un resultado también esperable debido a la capacidad de las VLPs de aumentar considerablemente la reactividad de un inmunógeno además de ser capaces de vencer la inmunotolerancia (Chen et al, 2013).

Los anticuerpos producidos también fueron capaces de reconocer agregados amiloides en corte de cerebro humano perteneciente a pacientes con EA e inhibir en concentraciones nano molares diferentes fragmentos del péptido beta amiloide que contuvieran el epítipo 11-28 dentro de su secuencia de aminoácidos. Con esto demostramos que los anticuerpos producidos son capaces de unirse a varias especies del péptido beta amiloide independientemente de su estado de plegamiento y agregación.

Al realizar el análisis de isotipificación de IgG mediante el ensayo de ELISA, comprobamos que los anticuerpos producidos por los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas fueron de tipo anti-inflamatorio principalmente, puesto que el isótipo encontrado en mayor cantidad fue IgG₁, el cual está reportado como principal indicador de una respuesta inmune de tipo Th₂ (Ciprandi et al, 2006). También cabe mencionar que IgG_{2a}, el cual es considerado como principal isótipo indicador de una respuesta inmune de tipo pro-inflamatoria o Th₁, no fue detectado en nuestro ensayo de isotipificación. Una posible explicación para la obtención de una respuesta inmune tan polarizada hacia el tipo Th₂ es la característica intrínseca de las VLPs, tan ampliamente reportada en la bibliografía, para desarrollar respuestas inmunes anti-inflamatorias independientemente del epítipo heterólogo insertado en ellas (Lua et al, 2013).

En este trabajo también se demostró la practicidad de los análisis computacionales para predecir y determinar fenómenos biológicos. Dentro del presente proyecto, los análisis *in silico* permitieron determinar el mejor sitio de anclaje para la región 11-28 dentro de la secuencia de la proteína L1, así como la correcta predicción de la formación de las estructuras de cápside quiméricas. Una observación a tomarse en cuenta es que los análisis *in silico* predijeron desde un inicio que dentro la construcción L1a, el fragmento 11-28 al ser insertado, tomaría una configuración de α -hélice prácticamente igual a la adquirida dentro del péptido beta amiloide de longitud completa, mientras que ese mismo fragmento dentro de la construcción L1b adquiere una conformación totalmente diferente (Figuras 13, 14, 15 y 16). Al hacer un análisis comparativo entre los resultados obtenidos con ambas VLPs quiméricas se puede apreciar que en todos ellos L1a es superior a L1b. En un principio se pensó que L1b por presentar el fragmento 11-28 de una manera más expuesta sobre la superficie de la VLP en comparación L1a, obtendría un mejor desempeño ya que esto permitiría que el epítipo fuera reconocido más fácilmente por los linfocitos B, sin embargo esto no fue así. Una explicación para esto pudiera ser que es más importante el que el epítipo mantenga su estructura y conformación nativa a que se encuentre de manera más expuesta sobre la superficie de la VLP para su reconocimiento por parte de los linfocitos B u otras células presentadoras de antígeno, sin embargo, son necesarias más pruebas para corroborar esta idea.

Durante la determinación de la presencia del fragmento 11-28 sobre la superficie de las VLPs quiméricas mediante un ensayo de ELISA (figura 38), una de nuestras suposiciones fue pensar que si el fragmento efectivamente se encontraba expuesto sobre la superficie de ambas VLPs quiméricas,

durante la lectura los pozos sensibilizados con dichas VLPs se tendría que mostrar una señal mayor a la señal obtenida en los pozos sensibilizadas con el péptido A β ₁₋₄₂ y A β ₁₁₋₂₈, sin embargo este no fue el caso. La razón por lo cual asumimos lo anterior se debió a que los grupos de pozos fueron sensibilizados con la misma concentración de péptido beta amiloide o VLP (concentración de 0.2 μ g) según el caso, sin embargo, debido a que las VLPs contienen dentro de su estructura 360 copias del fragmento 11-28 contra una sola copia del fragmento por molécula de péptido lo más razonable hubiera sido pensar en una mayor señal por parte de los pozos sensibilizados con las VLPs quiméricas. Los análisis y reconstrucciones *in silico* de las VLPs quiméricas L1a y L1b (figuras 18 y 19) sirvieron para responder esta incógnita. En las figuras correspondientes a las reconstrucciones de las VLPs quiméricas L1a y L1b, se puede apreciar que una gran cantidad de los epítomos no se encuentran expuestos sobre la superficie de la VLP (sobre todo en el caso de la VLP L1a) sino que están semi-expuestos debido a la conformación que adoptan dentro de la macro-estructura. Con base en lo anterior, es importante recalcar la emergente importancia de realizar pruebas y análisis *in silico* debido a que hoy en día se presentan como una importante herramienta auxiliar en el desarrollo experimental.

Hoy en día, una de las principales problemáticas para el desarrollo de vacunas basadas en VLPs se centra en el complejo sistema necesario para la purificación de las proteínas virales y sobre todo en su estabilidad (Ladd Effio et al, 2016; Li Shi et al, 2004). Gran cantidad de reportes y protocolos han sido diseñados para atacar estas dos problemáticas, sin embargo, en el caso de las proteínas quiméricas cada pequeño cambio a la secuencia *wild type* de la proteína supone cambios estructurales y bioquímicos que repercuten en el correcto plegamiento, carga, punto isoeléctrico y estabilidad de la proteína en sí. Debido a lo anterior, con cada nueva proteína quimérica se debe de desarrollar un protocolo completamente nuevo para su purificación puesto que está se comporta de manera totalmente diferente a la proteína *wild type* y por lo tanto protocolos y métodos de purificación ya diseñados podrían no funcionar.

Durante el presente trabajo, en nuestro laboratorio desarrollamos un protocolo de purificación para las proteínas L1a y L1b tomando como base anteriores trabajos desarrollados por nuestro equipo de investigación. La fase de purificación de las proteínas quiméricas se cimentó previamente en métodos y protocolos de transformación, agroinfiltración y extracción desarrollados o mejorados en nuestro laboratorio. Una de las razones que nos permitieron obtener un buen rendimiento de la proteína quimérica para su posterior purificación fue las modificaciones realizadas en anteriores trabajos dentro del laboratorio a la planta *Nicotiana benthamiana*, lo que le permite una mayor producción de proteína heteróloga mediante la técnica *transient expression*. En cuanto a la purificación de las proteínas quiméricas, el protocolo de purificación que desarrollamos se dividió en 3 partes, las cuales correspondieron a la purificación por intercambio iónico, purificación por exclusión molecular y centrifugación en centricones. La primer etapa de la purificación fue elegida en base a la carga total y punto isoeléctrico de las proteínas quiméricas. A la proteína se le llevó desde su punto isoeléctrico hasta adquirir una carga negativa mediante el decremento de pH del buffer en el que estaba resuspendida. Lo anterior permitió que al pasar la proteína por una columna de intercambio iónico con una matriz de carga positiva, la proteína misma se quedará unida a la matriz por una atracción de cargas opuestas. Esto permitió deshacernos de un gran número de otras proteínas con carga positiva encontradas dentro del extracto crudo de la planta. La segunda etapa, correspondiente a la exclusión molecular, nos permitió separar las proteínas en base a su peso molecular. Debido a las características de las columnas

de exclusión molecular, nos fue posible separar en las primeras fracciones las proteínas de mayor peso molecular mientras que las proteínas con menor peso fueron obtenidas en las fracciones finales. La última etapa consistió en la purificación por centricones que nos permitió separar por centrifugación a nuestras proteínas quiméricas de otras proteínas que enriquecían las muestras, permitiéndonos obtener nuestras proteínas de interés en estado puro. Con el desarrollo de este protocolo, fuimos capaces de abordar y resolver el primer problema presente en la fabricación de una vacuna basada en una VLP, el cual es la purificación de las proteínas virales.

El segundo problema al cual se enfrenta el desarrollo de una vacuna basada en una VLP es la estabilidad de la nano-partículas (Ladd Effio et al, 2015). Las VLPs por definición son cápsides de un virus en particular que no contienen material genómico dentro de su estructura y por lo tanto no pueden llevar a cabo procesos de replicación ni infectivos. A lo largo de su historia evolutiva, los virus han estado sometidos a procesos de selección natural en donde las estructuras más estables, no detectables para el sistema inmune y viables para subsistir en un determinado ambiente son las que se mantienen (Shapiro et al, 2016; Casanova et al, 2015). Debido a que una cápside viral es una estructura altamente refinada, cualquier cambio mínimo o alteración en esta puede resultar en un beneficio o ser perjudicial para la estabilidad de la estructura. En el presente proyecto se llevó a cabo la sustitución de 18 residuos de la proteína de cápside L1 con el fragmento 11-28 de péptido beta amiloide. Estas sustituciones, dependiendo de la construcción (L1a o L1b), fueron efectuadas en 2 diferentes zonas del extremo C-terminal de la proteína L1 con lo cual se dio origen a las proteínas quiméricas L1a y L1b.

Con cada una de las proteínas quiméricas se dio paso a la construcción de las VLPs quiméricas VLP L1a y VLP L1b las cuales presentaron sobre su superficie repeticiones ordenadas del fragmento 11-28 del péptido beta amiloide. Para medir la estabilidad de estas VLPs quiméricas procedimos a recrear una serie de combinaciones de pH y concentración de NaCl dentro del buffer MOPS el cual, suplementado con una concentración de tween80 0.006%, ha sido reportado como un excelente medio para el almacenaje nano-partículas (Li Shi et al, 2004). Los resultados de este experimento mostraron que las VLPs quiméricas VLP L1a y VLP L1b al ser almacenadas a 4°C en una concentración de 150 mM de NaCl y diferentes rangos de pH, solo tuvieron un tiempo de vida media de una semana en el mejor de los casos mientras que su almacenaje en 500 mM de NaCl y diversos rangos de pH supuso una vida media de 2 semanas en el mejor de los casos (figuras 45, 46 y 47). Con base en este resultado pudimos comprobar que la estabilidad de las VLPs quiméricas VLP L1a y VLP L1b es muy baja. Una posible explicación para este fenómeno son las cisteínas (C) dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína L1.

La cápside del HPV16 consiste en una estructura formada por 72 capsómeros de forma pentámerica, los cuales están formados por 5 proteínas L1 unidas entre sí a través de puentes disulfuro formados por cisteínas (Sapp et al, 1998). Diversos estudios han corroborado la existencia de 12 cisteínas dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de cápside L1 (Fligge et al, 2000). Estas 12 cisteínas han sido reportadas como fundamentales para la formación y estabilidad de la VLP como macroestructura. Entre las 12 cisteínas mencionadas las más importantes son las cisteínas encontradas en las posiciones 176 (C176) y 428 (C428) de la secuencia de aminoácidos (Xiaojiang et al, 2000). La C176 desempeña la función de unir entre sí cada una de las 5 proteínas L1 que conforman el pentámero mediante puentes disulfuro, mientras que la C428 forma puentes disulfuro entre pentámeros para formar la VLP y proporcionarle estabilidad (Martin Sapp et al, 2003). En nuestro caso y para ambas construcciones, durante la sustitución del fragmento 11-28 del péptido beta amiloide dentro de la secuencia de la proteína L1, la C428 fue sustituida por uno de los aminoácidos del fragmento heterólogo, con lo cual

muy probablemente se causó inestabilidad a la macroestructura ya que no se produjo la formación de puentes disulfuro necesarios para la unión entre pentámeros. Esta teoría parece ser muy probable y explica la gran inestabilidad de las nano-partículas aunque más estudios deben ser realizados para corroborar esta idea.

9. CONCLUSIONES

La estrategia utilizada en este proyecto para la creación de una vacuna contra la EA basada en una VLP puede servir de base para la realización de posteriores trabajos ya que los anticuerpos producidos en ratones a los que se inmunizó con las VLPs quiméricas son capaces de reconocer la especie completa del beta amiloide y las especies amino-truncadas $A\beta(E)_{3-42}$ y $A\beta(E)_{11-42}$, son capaces de reconocer especies monoméricas y oligoméricas, pueden reconocer agregados amiloides en cerebros humanos además de presentar isótipos relacionados con una respuesta inmune de tipo anti-inflamatoria.

10. BIBLIOGRAFÍA

- . Apelt, J., A. Kumar and R. Schliebs (2002). "Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human beta-amyloid precursor protein." Brain Res **953**(1-2): 17-30.
- . Atwood, C. S., M. E. Obrenovich, T. Liu, H. Chan, G. Perry, M. A. Smith and R. N. Martins (2003). "Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta." Brain Res Brain Res Rev **43**(1): 1-16.
- . Avila, J., F. Lim, F. Moreno, C. Belmonte and A. C. Cuervo (2002). "Tau function and dysfunction in neurons: its role in neurodegenerative disorders." Mol Neurobiol **25**(3): 213-231.
- . Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." Science **262**(5138): 1448-1451.
- . Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk and T. Yednock (2000). "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease." Nat Med **6**(8): 916-919.
- . Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- . Bre, M. H. and E. Karsenti (1990). "Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes." Cell Motil Cytoskeleton **15**(2): 88-98.
- . Carney, R. M., M. A. Slifer, P. I. Lin, P. C. Gaskell, W. K. Scott, C. F. Potocky, C. M. Hulette, K. A. Welsh-Bohmer, D. E. Schmechel, J. M. Vance and M. A. Pericak-Vance (2008). "Longitudinal follow-up of late-onset Alzheimer disease families." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **147B**(5): 571-578.
- . Casanova, J. L. (2015). "Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(51): E7128-7137.
- . Castellani, R. J., R. K. Rolston and M. A. Smith (2010). "Alzheimer disease." Dis Mon **56**(9): 484-546.
- Castro, A. and A. Martinez (2001). "Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease." Mini Rev Med Chem **1**(3): 267-272.

- . Ciprandi, G., G. L. Marseglia and M. A. Tosca (2006). "Allergen-specific immunotherapy: an update on immunological mechanisms of action." Monaldi Arch Chest Dis **65**(1): 34-37.
- . Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **5**(9): 677-685.
- . Chackerian, B., M. Rangel, Z. Hunter and D. S. Peabody (2006). "Virus and virus-like particle-based immunogens for Alzheimer's disease induce antibody responses against amyloid-beta without concomitant T cell responses." Vaccine **24**(37-39): 6321-6331.
- Chen, Q. and H. Lai (2013). "Plant-derived virus-like particles as vaccines." Hum Vaccin Immunother **9**(1): 26-49.
- . Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini and S. C. Harrison (2000). "Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16." Mol Cell **5**(3): 557-567.
- . Dunah, A. W. and D. G. Standaert (2001). "Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane." J Neurosci **21**(15): 5546-5558.
- . Effio, C. L. and J. Hubbuch (2015). "Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles." Biotechnol J **10**(5): 715-727.
- . Ferrer, I., M. Boada Rovira, M. L. Sanchez Guerra, M. J. Rey and F. Costa-Jussa (2004). "Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease." Brain Pathol **14**(1): 11-20.
- . Fligge, C., T. Giroglou, R. E. Streeck and M. Sapp (2001). "Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33." Virology **283**(2): 353-357.
- . Frenkel, D. and B. Solomon (2002). "Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5675-5679.
- . Giuffrida, M. L., F. Caraci, P. De Bona, G. Pappalardo, F. Nicoletti, E. Rizzarelli and A. Copani (2010). "The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology." Rev Neurosci **21**(2): 83-93.
- . Hasselkus, B. R. (1992). "The meaning of activity: day care for persons with Alzheimer disease." Am J Occup Ther **46**(3): 199-206.
- . Hendriks, L., C. Jonghe, P. Cras, J. J. Martin and C. V. Broeckhoven (1996). "Beta-amyloid precursor protein and early-onset Alzheimer's disease." Ciba Found Symp **199**: 170-180.
- . Huse, J. T. and R. W. Doms (2000). "Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **22**(1-3): 81-98.
- . Ittner, L. M. and J. Gotz (2011). "Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **12**(2): 65-72.

. Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina and Y. Ihara (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." Neuron **13**(1): 45-53.

. Kumar-Singh, S., C. De Jonghe, M. Cruts, R. Kleinert, R. Wang, M. Mercken, B. De Strooper, H. Vanderstichele, A. Lofgren, I. Vanderhoeven, H. Backhovens, E. Vanmechelen, P. M. Kroisel and C. Van Broeckhoven (2000). "Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **9**(18): 2589-2598.

. Kumar, A., S. Hussain, G. Sharma, R. Mehrotra, L. Gissmann, B. C. Das and M. Bharadwaj (2015). "Identification and validation of immunogenic potential of India specific HPV-16 variant constructs: In-silico & in-vivo insight to vaccine development." Sci Rep **5**: 15751.

. Kumar, S., M. Biswas and T. Jose (2015). "HPV vaccine: Current status and future directions." Med J Armed Forces India **71**(2): 171-177.

. Leduc, V., S. Jasmin-Belanger and J. Poirier (2010). "APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease." Trends Mol Med **16**(10): 469-477.

. Lee, M., F. Bard, K. Johnson-Wood, C. Lee, K. Hu, S. G. Griffith, R. S. Black, D. Schenk and P. Seubert (2005). "Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies." Ann Neurol **58**(3): 430-435.

. Leissring, M. A., M. P. Murphy, T. R. Mead, Y. Akbari, M. C. Sugarman, M. Jannatipour, B. Anliker, U. Muller, P. Saftig, B. De Strooper, M. S. Wolfe, T. E. Golde and F. M. LaFerla (2002). "A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4697-4702.

. Lemere, C. A., A. Beierschmitt, M. Iglesias, E. T. Spooner, J. K. Bloom, J. F. Leverone, J. B. Zheng, T. J. Seabrook, D. Louard, D. Li, D. J. Selkoe, R. M. Palmour and F. R. Ervin (2004). "Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet." Am J Pathol **165**(1): 283-297.

. Lichtlen, P. and M. H. Mohajeri (2008). "Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools." J Neurochem **104**(4): 859-874.

. Ligi, D., M. Santi, L. Croce and F. Mannello (2015). "Aluminum induces inflammatory and proteolytic alterations in human monocytic cell line." J Inorg Biochem **152**: 190-198.

. Liu, K., I. Solano, D. Mann, C. Lemere, M. Mercken, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2006). "Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **112**(2): 163-174.

- . Lua, L. H., N. K. Connors, F. Sainsbury, Y. P. Chuan, N. Wibowo and A. P. Middelberg (2014). "Bioengineering virus-like particles as vaccines." Biotechnol Bioeng **111**(3): 425-440.
- . Matic, S., R. Rinaldi, V. Masenga and E. Noris (2011). "Efficient production of chimeric human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants." BMC Biotechnol **11**: 106.
- . McGeer, P. L. and E. G. McGeer (1995). "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases." Brain Res Brain Res Rev **21**(2): 195-218.
- . Munch, G. and S. R. Robinson (2002). "Potential neurotoxic inflammatory responses to Abeta vaccination in humans." J Neural Transm (Vienna) **109**(7-8): 1081-1087.
- Perez-Garmendia, R. and G. Gevorkian (2013). "Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer s Disease Immunotherapy." Curr Neuropharmacol **11**(5): 491-498.
- . Perez-Garmendia, R., V. Ibarra-Bracamontes, V. Vasilevko, J. Luna-Munoz, R. Mena, T. Govezensky, G. Acero, K. Manoutcharian, D. H. Cribbs and G. Gevorkian (2010). "Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid beta antibodies cross-react with other pathological Abeta species: relevance for immunotherapy." J Neuroimmunol **229**(1-2): 248-255.
- . Pfeifer, L. A., L. R. White, G. W. Ross, H. Petrovitch and L. J. Launer (2002). "Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study." Neurology **58**(11): 1629-1634.
- . Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri and O. Arancio (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." J Neurosci **28**(53): 14537-14545.
- . Sapp, M., C. Fligge, I. Petzak, J. R. Harris and R. E. Streeck (1998). "Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines." J Virol **72**(7): 6186-6189.
- . Schilling, S., T. Appl, T. Hoffmann, H. Cynis, K. Schulz, W. Jagla, D. Friedrich, M. Wermann, M. Buchholz, U. Heiser, S. von Horsten and H. U. Demuth (2008). "Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ." J Neurochem **106**(3): 1225-1236.
- . Schilling, S., T. Lauber, M. Schaupp, S. Manhart, E. Scheel, G. Bohm and H. U. Demuth (2006). "On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro)." Biochemistry **45**(41): 12393-12399.
- . Schilling, S., U. Zeitschel, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Francke, A. Kehlen, M. Holzer, B. Hutter-Paier, M. Prokesch, M. Windisch, W. Jagla, D. Schlenzig, C. Lindner, T. Rudolph, G. Reuter, H. Cynis, D. Montag, H. U. Demuth and S. Rossner (2008). "Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology." Nat Med **14**(10): 1106-1111.
- . Selkoe, D. J. (1997). "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments." Science **275**(5300): 630-631.

- . Selkoe, D. J. (1997). "Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis." Am J Psychiatry **154**(9): 1198.
- . Senior, K. (2002). "Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended." Lancet Neurol **1**(1): 3.
- . Sergeant, N., S. Bombois, A. Ghestem, H. Drobecq, V. Kostanjevecki, C. Missiaen, A. Wattez, J. P. David, E. Vanmechelen, C. Sergheraert and A. Delacourte (2003). "Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach." J Neurochem **85**(6): 1581-1591.
- . Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." Nat Med **14**(8): 837-842.
- . Shapiro, J. A. (2016). "Nothing in Evolution Makes Sense Except in the Light of Genomics: Read-Write Genome Evolution as an Active Biological Process." Biology (Basel) **5**(2).
- . Shi, L., G. Sanyal, A. Ni, Z. Luo, S. Doshna, B. Wang, T. L. Graham, N. Wang and D. B. Volkin (2005). "Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants." J Pharm Sci **94**(7): 1538-1551.
- . Sigurdsson, E. M., H. Scholtzova, P. D. Mehta, B. Frangione and T. Wisniewski (2001). "Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice." Am J Pathol **159**(2): 439-447.
- . Sullivan, C. P., E. A. Berg, R. Elliott-Bryant, J. B. Fishman, A. C. McKee, P. J. Morin, M. A. Shia and R. E. Fine (2011). "Pyroglutamate-Abeta 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-Abeta 11 forming the central core." Neurosci Lett **505**(2): 109-112.
- . Van Gassen, G. and W. Annaert (2003). "Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease." Neuroscientist **9**(2): 117-126.
- . Wilcock, D. M., S. K. Munireddy, A. Rosenthal, K. E. Ugen, M. N. Gordon and D. Morgan (2004). "Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration." Neurobiol Dis **15**(1): 11-20.
- . Wirths, O., C. Erck, H. Martens, A. Harmeyer, C. Geumann, S. Jawhar, S. Kumar, G. Multhaup, J. Walter, M. Ingelsson, M. Degerman-Gunnarsson, H. Kalimo, I. Huitinga, L. Lannfelt and T. A. Bayer (2010). "Identification of low molecular weight pyroglutamate A{beta} oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis." J Biol Chem **285**(53): 41517-41524.
- . Wolfe, M. S. (2002). "Therapeutic strategies for Alzheimer's disease." Nat Rev Drug Discov **1**(11): 859-866.

. Zamora, E., A. Handisurya, S. Shafti-Keramat, D. Borchelt, G. Rudow, K. Conant, C. Cox, J. C. Troncoso and R. Kirnbauer (2006). "Papillomavirus-like particles are an effective platform for amyloid-beta immunization in rabbits and transgenic mice." J Immunol **177**(4): 2662-2670.