

PAPEL DE LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER*

Ana Esther Estrada Rodríguez y Viviana Chantal Zomosa Signoret

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México. Correo E: viviana.zomasasg@uanl.edu.mx

RESUMEN

El péptido β -amiloide ($A\beta$) está relacionado con la enfermedad de Alzheimer (EA) y es el principal componente de las placas amiloides.

Las variantes del péptido $A\beta$ son $A\beta$ (1-40), (1-42) y (25-35), que es la región más tóxica y juega un papel relevante en la EA.

En este trabajo se revisan los orígenes moleculares, cambios conformacionales y actividad biológica del péptido para proveer un panorama a nivel molecular de la EA.

ABSTRACT

Amyloid β -peptide ($A\beta$) is related to Alzheimer Disease (AD) and is the main component of the amyloid plaques.

The variants of $A\beta$ peptide are $A\beta$ (1-40), (1-42) and (25-35), which is the most toxic region and plays an important role in the disease.

In this work, the molecular origins, conformational change and biological activity of $A\beta$ peptide are reviewed to provide a better picture at the molecular level of AD.

PALABRAS

CLAVE:

Péptido β -amiloide, agregación, Enfermedad de Alzheimer.

KEY WORDS:

Amyloid β -peptide Alzheimer Disease.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza clínicamente por una disminución gradual y progresiva de las habilidades cognitivas y de manera patológica por la presencia de marañas neurofibrilares, placas seniles, pérdida específica de neuronas y de sinapsis neuronal. Hoy en día no se cuenta con una cura para la enfermedad, por lo que la búsqueda de los mecanismos moleculares subyacentes de ésta son de gran interés en la comunidad científica debido al gran impacto que tiene la EA tanto para la persona que la padece, sus familiares y en general, para toda persona a su alrededor. Los dos rasgos patológicos característicos de EA son los depósitos de placas extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) y las marañas neurofibrilares de la proteína Tau hiperfosforilada. Los depósitos de la proteína Tau hiperfosforilada se encuentran en otros trastornos neurodegenerativos en donde no se encuentran las placas amiloides, por lo tanto, la presencia de estas placas, compuestas en su mayoría de la forma altamente insoluble de $A\beta$ en el parénquima del cerebro son un requisito para el diagnóstico de EA (1).

Origen molecular de $A\beta$

El péptido $A\beta$ con un peso molecular de 4kD es el principal componente de los depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con EA. El péptido $A\beta$ es el producto de la digestión proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP). A pesar de que aún no se esclarece en su totalidad la función de APP, se ha producido información acerca del procesamiento del péptido $A\beta$ y cómo éste es posteriormente eliminado en el cerebro, o puede ser también transportado hacia la periferia. Los procesos enzimáticos responsables del metabolismo de APP para formar $A\beta$ se han ido esclareciendo con el paso de los años. APP es cortada secuencialmente por dos proteínas con actividad de endoproteasa que se encuentran ancladas en la membrana (β - y γ - secretasas), dando como resultado un péptido de 36 a 43 aminoácidos; este proceso es conocido como la vía amiloidogénica (2) (Fig. 1).

La primera en llevar a cabo la función de endoproteasa en la APP es β -secretasa y libera un derivado largo que es secretado ($sAPP\beta$). Un frag-

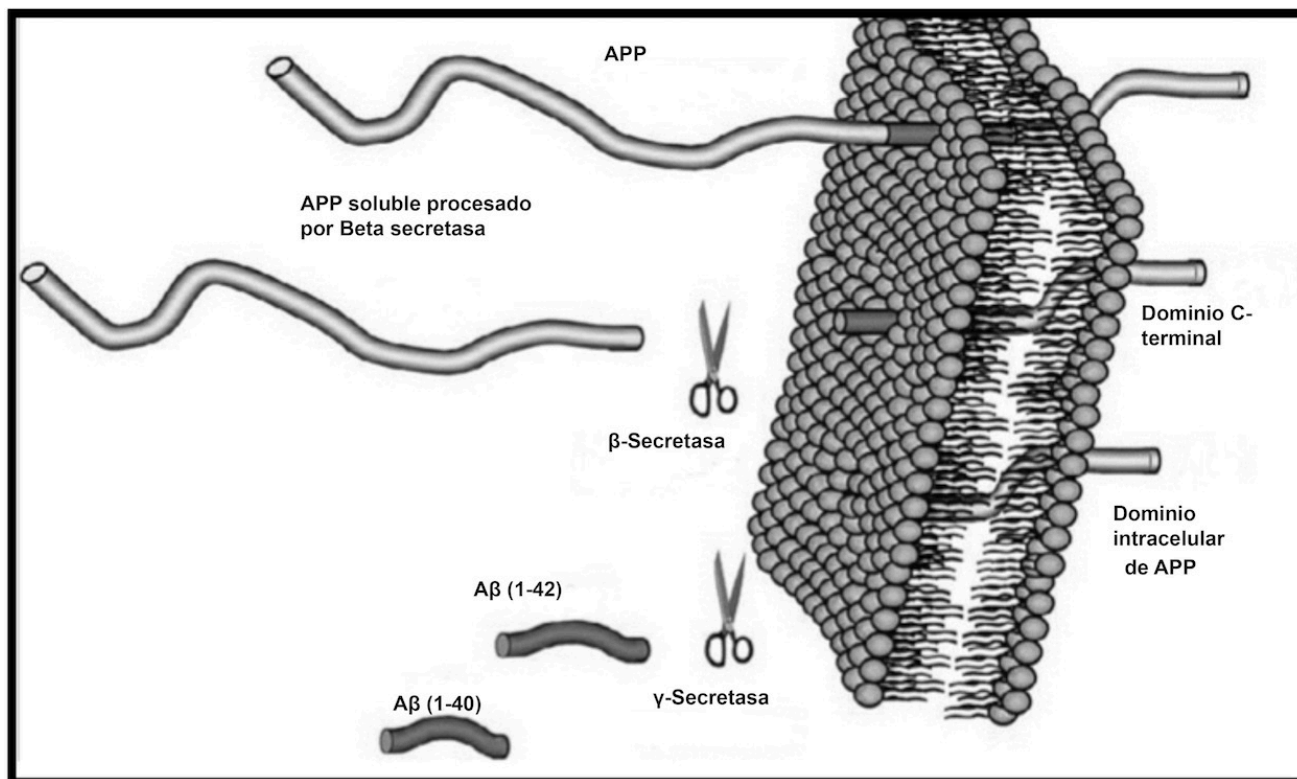


Figura 1. Corte proteolítico de APP. (Imagen adaptada de referencia 21).

mento de 99 aminoácidos (CTFβ) queda anclado a la membrana, el cual es cortado inmediatamente por γ -secretasa generando el péptido Aβ. El corte producido por γ -secretasa es impreciso y esto ocasiona una heterogeneidad en el extremo C-terminal de los péptidos resultantes. Es por esta razón que existen diferentes especies de Aβ, pero aquellos que terminan en la posición 40 (Aβ₄₀) son los más abundantes; en una proporción del 80 a 90% de todos los péptidos generados; a éste le sigue el de la posición 42 (Aβ₄₂). Las formas ligeramente más largas de Aβ, en especial Aβ₄₂, tienden a ser más hidrofóbicas y fibrillogénicas y son estas especies las principales en depositarse en el cerebro. Debido al papel esencial en la generación del péptido Aβ, las β - y γ -secretasas son consideradas como posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos contra EA (3).

γ -secretasa es una enzima multimérica compuesta de las subunidades APH1, PEN2, nicastrina y presenilina (PS1 o PS2) (Fig. 2). Este complejo enzimático contiene una copia de cada subunidad, y es responsable del corte de varias proteínas de membrana, además de la proteína precursora del amiloide. Los cuatro componentes son necesarios para la maduración y correcto funcionamiento

de γ -secretasa. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que hay otras proteínas interactuando y regulando la función de este complejo enzimático (4). Se han reportado por lo menos dos subunidades moduladoras potenciales: CD147 y TMP21. La glicoproteína de membrana tipo 1, CD147, copurifica con γ -secretasas provenientes de líneas celulares humanas, se observó que la reducción de CD147, utilizando RNA de interferencia, aumentaba la producción de Aβ, con estos resultados se sugiere que CD147 regula a la baja a Aβ. La proteína de transporte TMP21 se ha asociado con una regulación diferencial en la producción de Aβ. Al realizar modelos "knockdown" de TMP21 se observa un aumento en la producción de los residuos 40- y 42- sin alterar los niveles de APP intracelular, y se ha observado que se une a los complejos de presenilina y actúa como modulador suprimiendo selectivamente el corte proteolítico por parte de γ -secretasa (5).

El mecanismo de acción de γ -secretasa ha sido esclarecido recientemente. Se postula que el corte producido en la bicapa lipídica es realizado bajo la señal de sustratos que han sido removidos por otras proteasas que remueven una región del ectodominio de APP. La presenilina contiene un sitio de acoplamiento molecular donde el dominio transmembrana

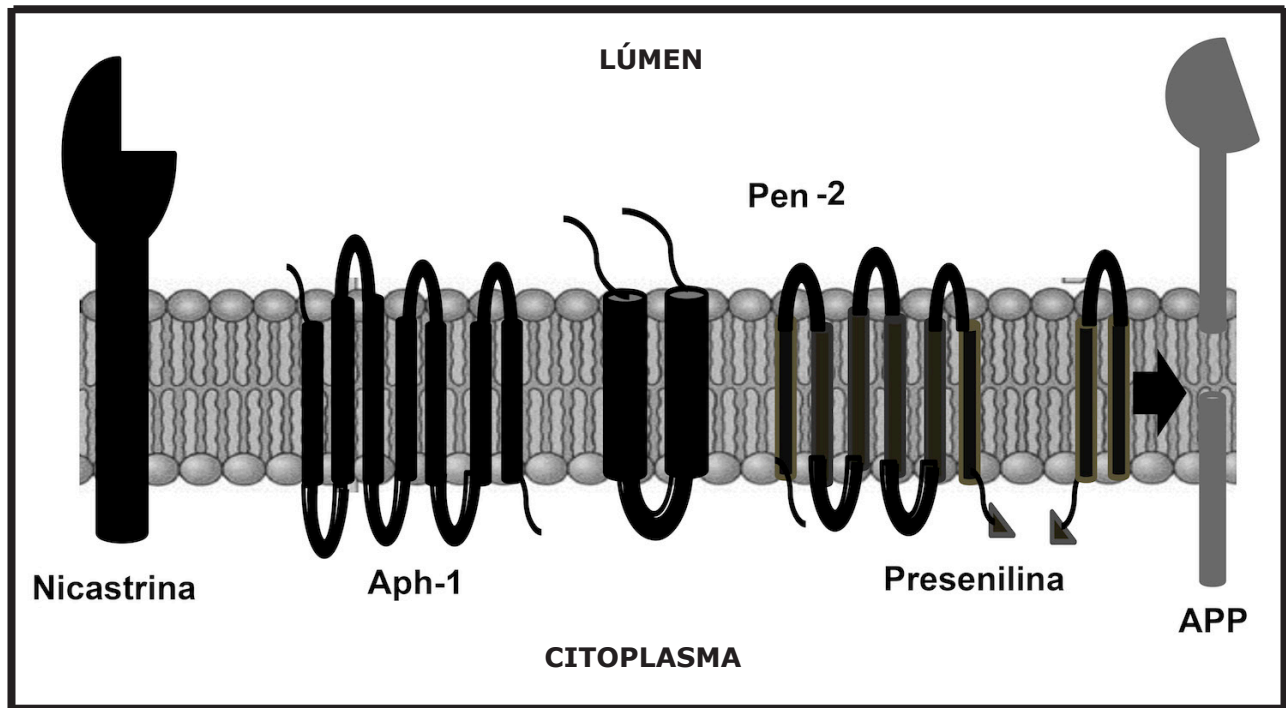


Figura 2. Ilustración de la estructura del complejo gamma secretasa.

del sustrato interactúa previamente a su entrada en el sitio activo interno. Nicastrina sirve para el reconocimiento de los sustratos, debido a que su ectodominio parece una aminopeptidasa, pero le faltan residuos catalíticos y este dominio puede interactuar con el N terminal de los sustratos. APH 1 sirve como andamio para el complejo γ -secretasa, primero realiza el ensamblaje de nicastrina y luego de presenilina y PEN-2. PEN-2 sirve como iniciador de endoproteólisis de la holoproteína presenilina hacia la forma activa, la cual es un heterodímero. APH-1 contiene un motivo en α -hélice de Glicina (GXXXG) que es esencial tanto para ensamblar el complejo de γ -secretasa y la maduración de los componentes (6). Aunque la cantidad de γ -secretasa y su actividad parecen no aumentar en EA, se ha reportado que alteraciones en su actividad que dan como producto formas más largas de $A\beta$ son el principal rasgo genético que causa la forma temprana y familiar de EA.

En cuanto a β -secretasa, una aspartil proteasa que se encuentra unida a la membrana y de manera análoga a γ -secretasa, corta a APP dando lugar a $A\beta$. La localización del sitio de corte en APP difiere en ambas secretasas, mientras que γ -secretasa realiza el corte en la membrana, β -secretasa lo realiza en el ambiente intracelular soluble. Existen dos formas abundantes de la enzima, BACE1 y BACE2 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme),

las cuales poseen un 65% de homología. BACE1 es la enzima responsable en mayor proporción en la producción de $A\beta$, se expresa altamente en el cerebro pero se ha encontrado en niveles menores en otros órganos (7). De manera contraria, BACE2 se encuentra en menor abundancia en el cerebro, y en otros tejidos periféricos es más abundante. En la forma esporádica de EA, tanto la proteína, así como su actividad de β -secretasa aumentan significativamente y este efecto también presenta una selectividad en ciertas regiones del cerebro que se ven afectadas y también se correlaciona moderadamente con la manifestación de EA ya que en estudios recientes se demostró que los niveles elevados de BACE1 en líquido cefalorraquídeo (LCR) tenían una relación con marcadores asociados a EA. La actividad de la β -secretasa también se ha visto que aumenta conforme la edad en roedores y en primates no humanos aunque estas especies no desarrollan EA (8).

Hoy en día, la mayoría de los estudios realizados sobre EA hacen énfasis en entender la producción de $A\beta$ producto de APP, aunque ahora la atención también se enfoca en la degradación del péptido. Se han encontrado dos enzimas: neprilisina (NEP) y la enzima insulina degradante (IDE), las cuales se sugiere que son responsables de la mayor parte de la degradación de $A\beta$. Neprilisina es una metaloproteasa tipo II que se encuentra unida a

la membrana plasmática y es responsable de la degradación extracelular de varios péptidos. IDE es una tiolmetaloenopeptidasa que degrada pequeños péptidos tales como la insulina, glucagon y péptido natriurético y se ha demostrado experimentalmente mediante inhibidores de IDE que regula a la baja los niveles de A β secretados extracelularmente (9,10). En EA, tanto IDE y NEP disminuyen en el envejecimiento normal y en regiones afectadas por la enfermedad, y de manera destacada cabe mencionar que NEP disminuye en muestras de LCR en la forma temprana de EA (10). A pesar de esta nueva evidencia que sugiere la degradación de A β como factor desencadenante de patogenia de la EA, una cantidad significativa de A β queda sin degradar en el cerebro. Esto debido a que existe transporte a través de la barrera hemato-encefálica (BHE) hacia la circulación, y al interferir con este mecanismo causa un gran aumento en la cantidad de A β en el cerebro y todo esto culmina con su acumulación.

La forma soluble de A β es intercambiada a través de la BHE por dos mecanismos principales, el receptor de lipoproteínas de baja densidad relacionado a proteínas (LRP) en el lado abluminal del cerebro y el receptor de productos terminados de glicosilación avanzada (RAGE) en el lado luminal (sangre). La carga neta de A β que atraviesa la BHE puede predecirse mediante el grado de carga de amiloide cerebral; aun no es claro el porqué de este mecanismo bidireccional de transportación de A β o si este mecanismo tiene algún papel fisiológico importante que no esté relacionado con EA. Sin embargo, existe la posibilidad de que la interrupción de este mecanismo acoplado con otras anormalidades vasculares en el cerebro de pacientes con EA pueda contribuir y afectar el desarrollo de la patología amiloidea.

Técnicas de estudio de A β

Al observar al microscopio fragmentos de tejido de cerebros de pacientes con EA procesados con la técnica de tinción con plata, resalta a la vista el grado de heterogeneidad de la patología (Fig. 3). El empleo de la tinción de plata ha sido reemplazado poco a poco por nuevas técnicas para la detección de los agregados amiloides. Se han creado agentes empleados en técnicas de imagen basado en análogos de tintes histológicos que tienen un poder mayor de discriminación entre los estados conformacionales que pueden ser usados ante-mortem para evaluar la etapa de la enfermedad y sus componentes patológicos.

Los patólogos hoy en día emplean tinciones que son específicas de lesiones de la EA, mientras que los bioquímicos buscan la manera de diferenciar los agregados y determinar su composición. Se sabe

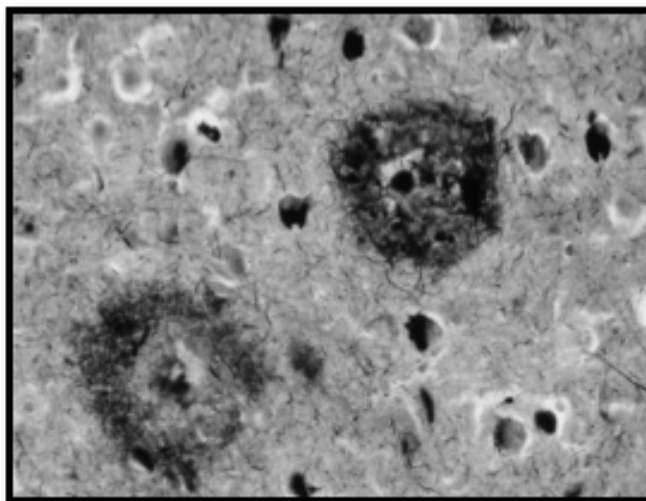


Figura 3. Tinción de plata en corte de tejido de cerebro. Corte histológico de cerebro de paciente con Enfermedad de Alzheimer sometido a la técnica de tinción de plata de Bielschowski. Las zonas con coloración oscura indicadas con flechas negras, corresponden al depósito del péptido beta amiloide en las placas seniles (100 μ m). (Imagen adaptada de referencia 22).

que los agregados están compuestos en su mayoría de una proteína principal (A β o Tau hiperfosforilada), pero existen proteínas adicionales y ciertos glicolípidos asociados a los agregados aunque no forman parte de las estructuras fibrilares. Debido a que estos componentes también se encuentran en cerebros sanos, estas proteínas y glicolípidos asociados no se consideran patológicos (sin embargo, ocasionalmente pueden interferir con la detección de A β , particularmente en aquellos métodos que emplean un anticuerpo para su detección). Las placas amiloides (conformadas por A β en estado fibrilar), el amiloide cerebrovascular (A β en estado oligomérico y/o monomérico) y los ovillos neurofibrilares (Tau hiperfosforilada) pueden ser purificados y separados de otros componentes insolubles. Se han realizado diversos experimentos para poder identificar los componentes principales de las placas y ovillos de cerebros con EA de los cuales destaca el uso de extracciones en gradientes; la primera es una extracción con un álcali diluido la cual libera la forma soluble de A β , seguido de una extracción con SDS (remueve los depósitos difusos) y una última extracción con ácido fórmico para solubilizar las placas amiloides, y el amiloide cerebrovascular para investigar la transición del péptido A β de un monómero soluble a placas difusas (se le llama placa difusa por su apariencia poco demarcada y sin bordes delimitados, están formadas por una delicada red de finas fibrillas de

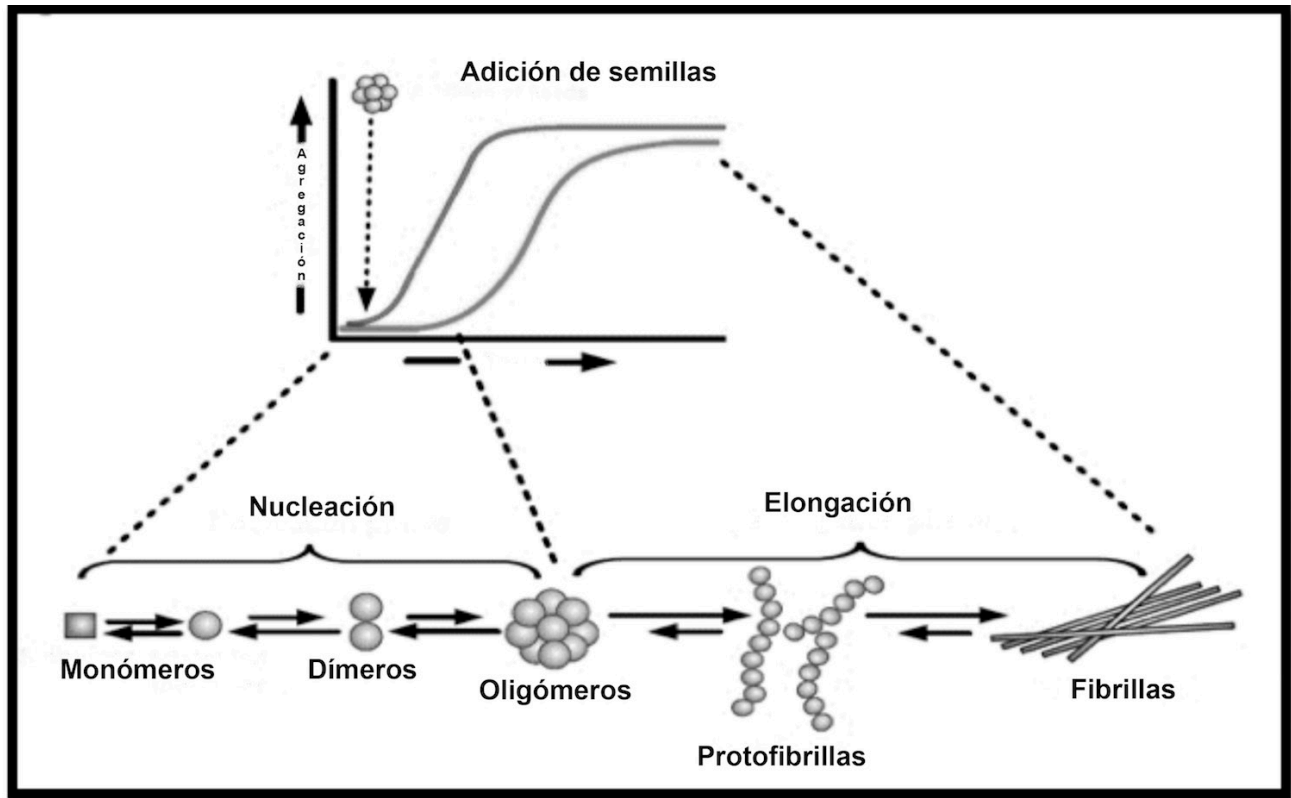


Figura 4. Proceso esquematizado de la cinética de agregación de A β , la cual consta de dos etapas, una denominada nucleación donde los primeros monómeros con estructura alfa hélice cambian a beta plegada reclutando e induciendo nuevos monómeros los cuales en la etapa de elongación aumentan su longitud culminando en la formación de las fibrillas. (Imagen adaptada de referencia 23).

filamentos de amiloide y sin neuritas degeneradas) y finalmente, su depósito en las placas amiloides.

Las tinciones inmunohistoquímicas de secciones de tejidos son una de las técnicas más empleadas para el estudio de las fibrillas del péptido A β . El uso de tintes específicos de amiloide tales como el Rojo Congo y las Tioflavinas T y S iluminan las placas amiloides y reaccionan muy poco con otros depósitos que se pueden detectar por la tinción de plata, esto en cortes de cerebro. La Tioflavina T, compuesto Pittsburgh 1 (PIB, 6-OH-[2, 4-N dimetil-fenil benzotiazol]), es un derivado de tinte amiloide, que fue diseñado con propiedades fisicoquímicas específicas para que sirva como un buen ligando y que se puede emplear en técnicas de imagenología cerebral (11). Por otro lado, la técnica del Rojo Congo se basa en la emisión de birrefringencia al entrar en contacto con el amiloide, esta birrefringencia revela una organización de lámina beta tanto en las placas difusas y en las amiloides y esta característica es específica de la secuencia del péptido A β . También existen estudios que emplean anticuerpos dependientes de la conformación de A β

que son capaces de reconocer fibrillas sintéticas y placas amiloides. Se han llevado a cabo estudios detallados de placas amiloides teñidas con una serie de derivados fluorescentes de poliofenol (los cuáles tienen un espectro de emisión sensible a la cantidad de fibrillas amiloides). Dichos estudios revelaron que las placas individuales o regiones que se encuentran en una sola placa pueden organizarse de manera distinta. Fibrillas sintéticas del péptido A β en diferentes condiciones (agitación o temperatura) se tiñen de manera distinta, lo cual indica la presencia de polimorfismo en las fibrillas de A β o la formación en distintas proporciones de agregados protofibrilares y fibrillas maduras.

El estudio del desarrollo de la patología de EA en el cerebro vivo humano ha sido el sueño de los clínicos. Hoy en día el enfoque para el estudio de EA *in vivo* es medir la progresión de la enfermedad mediante técnicas no invasivas y a la par obtener algún método de diagnóstico para detectarla en etapas tempranas. Se han encontrado biomarcadores tanto en sangre como en LCR (niveles de A β , Tau y p-Tau), pero esta búsqueda se encuentra

activa tanto para el diagnóstico temprano de la enfermedad, como para poder predecir la progresión, e inclusive poder predecir qué individuo es susceptible de padecerla.

Un enfoque alternativo para el estudio de la EA es utilizar análogos de tintes para la detección de amiloides, para visualizar y cuantificar la patología en el cerebro de los individuos, y esto ha producido resultados muy interesantes, y además nos ha provisto de un acercamiento a las diferencias entre la enfermedad en humanos y aquellos sistemas empleados para emular la enfermedad en modelos animales. Mientras que la forma oligomérica de A β está a concentraciones muy por debajo de los límites de detección de las tecnologías de imagen actuales, otras formas de A β (mezcla de A β) pueden ser más adecuadas para las técnicas de imagen. El A β insoluble en SDS aislado de cerebros de pacientes con EA ha demostrado tener una estructura distintiva que al ser estudiada por RMN ^{13}C , podría dar lugar al desarrollo de un ligando específico para estudios de imagen.

Otra técnica empleada para la detección de los depósitos amiloides en regiones específicas del cerebro es la técnica de imagen de tomografía por emisión de positrones (PET) empleando ^{11}C como marcaje, ésta detecta en forma paralela los depósitos de A β con el metabolismo de glucosa que se encuentra disminuido en las mismas regiones en donde se presentan los depósitos, lo cual nos indica la progresión de EA en los pacientes. La utilidad de estas sondas para la detección y predicción de EA y otros trastornos cognitivos está siendo evaluada; así también se están desarrollando nuevas tecnologías para dicho fin como la detección de oligómeros de A β por técnicas no invasivas (12).

Ensamblaje y deposición de A β

El ensamblaje de A β en estructuras multiméricas es la clave de su efecto biológico. Existen dos fases para el ensamblaje de A β , cada una posee características diferentes que producen ensamblados con propiedades biológicas diversas. Los primeros estudios se enfocaban en los rasgos histológicos distintivos de EA, los depósitos amorfos y fibrilares del péptido. Sin embargo, hoy en día los estudios de A β se centran en las fases tempranas de su ensamblaje, lo cual involucra las formas multiméricas solubles del péptido. Estas son distintas en cuanto a su morfología y conformación. El extremo C-terminal de A β (1-42) es el fragmento clave en la formación de oligómeros; ya se definieron algunos parámetros estructurales de los diferentes pasos del ensamblaje de oligómeros *in vitro* con

péptidos sintéticos mutados en esa región (13). De acuerdo a este estudio, los intermediarios tempranos que se forman en la oligomerización de péptidos sintéticos son inestables, y debido a esto son necesarias técnicas de trampas fotoquímicas para su estudio, existen otros oligómeros pequeños y estables que pueden ser aislados de sistemas biológicos mediante técnicas más sencillas. Aún no se conoce la explicación de esta diferencia en la estabilidad de los oligómeros.

Se ha encontrado que los oligómeros de A β de tamaño pequeño de 8 a 70kDa (tal es el caso de dímeros aislados de cerebros con EA y de LCR) que presentan estructuras estables en detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) tienen la capacidad de producir una desregulación de la liberación de neurotransmisores y fallos en la sinapsis. Lo que aún no se determina, es si estos intermediarios se producen durante el ensamblaje o si es después del desensamblado *in vivo*. Los oligómeros solubles sintéticos son altamente polimórficos y de tamaño estable que depende del método de preparación. Los oligómeros solubles son biológicamente activos y causan muerte celular bajo ciertas condiciones, el modo de acción de estos aún no ha sido esclarecido. Hay evidencia que sugiere que la formación de los oligómeros solubles y la formación de fibrillas pueden proceder de diferentes vías, aunque mecánicamente ambos procesos tienen que pasar por diversas etapas multiméricas y proceden del mismo origen.

Debido a que las concentraciones de A β en fluidos intersticiales del cerebro son más bajas que en los ensayos de formación de fibrillas, muy probablemente la formación de fibrillas (nucleación) puede estarse llevando a cabo en la matriz extracelular o en la superficie celular. El crecimiento de las fibrillas (extensión), ya sea de manera sintética o en cerebro de personas con EA, depende linealmente de la concentración del monómero de A β y es altamente específica para la forma de la fibrilla amiloide. Este proceso es reversible *in vivo* en modelos de ratones transgénicos monitoreados mediante microscopia multi-fotón, y el proceso de extensión es rápido e incluye al amiloide vascular. Aunque este proceso no ha sido documentado en cerebro vivo humano, los efectos de la administración pasiva y activa de anticuerpos en modelo animal y ensayos de inmunización humana sugieren que la deposición de A β en el cerebro tiende al equilibrio con el A β intersticial. También hay estudios que revelan que los depósitos de A β sirven como reservorio para los oligómeros solubles (13).

Modelos de estudio de A β y EA

EA es un trastorno específico de humanos. Aún incluso los primates más relacionados al ser humano no desarrollan la patología, y mucho menos los rasgos clínicos que puedan considerarse para ser catalogado como EA. A pesar de esto la mayoría del conocimiento de cómo se desarrolla la patología amiloide ha sido obtenido empleando modelos animales.

Hasta la fecha no hay modelo animal que refleje de manera exacta cada etapa de la enfermedad. Existen modelos apropiados para el estudio de la deposición de A β . Los modelos de estudio, en un amplio sentido, pueden ser subdivididos en: modelos donde la patología del amiloide se desarrolla naturalmente con la edad y, los ratones genéticamente modificados que expresan formas mutantes de APP. El uso de animales en donde la deposición del amiloide ocurre naturalmente es una de las mejores herramientas para el estudio de la patología; de esta manera, los investigadores se evitan el inconveniente de separar las contribuciones de sobre expresar e introducir mutaciones al fenotipo del modelo animal. Sin embargo, una desventaja de utilizar este tipo de modelos es que la esperanza de vida es más larga que en los roedores, e incluso, en los primates no humanos es aún más larga y su uso puede ser difícil de justificar debido al alto costo asociado.

Aunque los primates no humanos poseen la secuencia de A β idéntica, y la secuencia de APP es casi idéntica, los procesos bioquímicos relevantes son muy parecidos a los de los humanos y desarrollan una neuropatología similar a EA con la edad. Se ha visto que los primates no humanos de edad avanzada presentan pequeñas cantidades de depósitos de amiloide, pero este fenómeno es menor comparándolo con los casos de EA en humanos.

Otro modelo de estudio de la deposición de amiloide son los caninos de edad avanzada, ya que se ha encontrado la deposición en gran cantidad de amiloide conforme aumenta la edad del canino. En contraste con los primates no humanos de edad avanzada donde la deposición del amiloide puede ocurrir en varias décadas, el proceso en los caninos empieza a ocurrir aproximadamente a los diez años de edad. La deposición de A β en los caninos se debe a A β 42; sin embargo, estos depósitos ocurren en forma de depósitos difusos, con ausencia de placas amiloides y marañas neurofibrilares. Pero al comparar la cantidad de A β depositado de los caninos y los primates no humanos, en los caninos es equiparable a la EA y una gran proporción es de la forma altamente insoluble. Esto podría sugerir que el modelo

canino de la enfermedad puede correlacionarse con la enfermedad presentada en humanos y puede representar un buen intermediario entre los ratones genéticamente modificados y la EA, e inclusive, se puede pensar en inmunizar con fibrillas de A β en caninos de edad avanzada como un sustituto de los modelos de ratón en etapas pre clínicas de investigación (14).

Cabe mencionar que los modelos de ratón empleados en la investigación de EA han sido indispensables para comprender la deposición del amiloide *in vivo*. Estos modelos son económicos y rápidos de manejar, lo cual es considerado una gran ventaja para el investigador. Todos los modelos murinos para el estudio de EA requieren introducir alguna combinación de mutaciones en los genes APP, PS1 o ambos, que se asocian a la forma familiar de la enfermedad. La desventaja de utilizar este tipo de modelo es la gran cantidad de mutaciones sin funciones conocidas que son introducidas en las proteínas, (particularmente APP), ya que las consecuencias de éstas más allá de la deposición del amiloide no se conocen. Además, es necesario sobre expresar APP con la secuencia humana de A β a niveles relativamente altos para dirigir la deposición de A β , y en la mayoría de estos modelos el A β presente puede afectar el ensamblaje de la secuencia del péptido humano *in vitro* e *in vivo*. Haciendo a un lado estos inconvenientes, el conocimiento derivado de este modelo ha sido de gran ayuda, se logró demostrar que la deposición del amiloide es dirigida por A β 42 y no tanto por A β 40. También se han empleado ratones transgénicos para demostrar de manera contundente que A β aumenta la tasa de las marañas neurofibrilares en ratones que también expresan la proteína Tau hiperfosforilada, colocando de esta manera a la deposición de A β en una mayor jerarquía con respecto a la patología asociada a Tau hiperfosforilada en la progresión de la enfermedad (15).

También hay que recalcar el gran número de ensayos pre clínicos que han mostrado revertir la deposición del amiloide en el ratón, esto puede explicarse debido a que en el ratón el estado del amiloide está menos modificado químicamente y menos entrecruzado que en EA. El amiloide depositado en el cerebro del ratón puede ser consideradamente más plástico que en el humano, posiblemente como consecuencia de un tiempo más corto de vida en el ratón. Cabe mencionar que se ha observado que la unión de PIB (ThT) en el cerebro de ratones transgénicos de APP se encuentra disminuida drásticamente, y puede ser un reflejo de las diferencias en el polimorfismo de A β y su grado de complejidad, que son características del péptido A β humano (16).

Proceso de agregación de A β

La agregación de A β puede definirse como un proceso complicado y que al parecer está involucrada más de una simple conversión de monómeros solubles en fibras. A β existe principalmente como una estructura α -hélice o "random coil", pero puede plegarse de manera incorrecta en estructuras β -plegadas, las cuáles son más propensas a agregarse en forma de oligómeros tóxicos y en fibrillas amiloides insolubles. El mecanismo del plegamiento incorrecto del péptido A β hacia estructuras β -plegadas ocurre por el plegamiento de los aminoácidos de las posiciones 16-23 y 28-35 para formar esta estructura de lámina beta plegada. Una vez formada, esta estructura tiende a agregarse, y esto por mecanismos que los investigadores denominan nucleación favorece a que las demás formas del péptido beta amiloide sufran esta modificación y empiecen a formar dímeros, oligómeros y finalmente las fibrillas maduras (Fig. 4) (17). Los estudios actuales proponen que el rol de los oligómeros solubles del amiloide o los intermediarios pre-fibrilares de agregación, son las principales especies tóxicas en enfermedades neurodegenerativas amiloides. Por ensayos de microscopía electrónica y de fuerza atómica se han identificado partículas esféricas de aproximadamente 3 a 10 nm que aparecen a tiempos tempranos de incubación y desaparecen cuando se forman las fibrillas maduras (18). Estos oligómeros esféricos parecen representar intermediarios en la vía de formación de las fibrillas, ya que son observados transitoriamente en tiempos intermedios de incubación durante la formación de las fibrillas. A pesar de que los oligómeros son intermediarios en la cinética de agregación, aún no es claro si estos son intermediarios obligados en la vía de formación de las fibrillas ya sea por que coalescen directamente entre ellos para la formación de las fibrillas, o si bien estos oligómeros generan una vía de agregación diferente a la clásica de ensamble de las fibrillas dependientes de nucleación (19).

Búsqueda de terapias farmacológicas

La formación de placas de A β es el rasgo patológico que es más asociado con EA; por lo que disminuir o inclusive eliminar la cantidad del péptido A β para evitar su agregación es la estrategia a seguir en la búsqueda para futuros tratamientos farmacológicos. Se ha comprobado el papel que tiene el péptido A β de manera normal en el organismo por lo que la

mera presencia de él no es causa de la neurodegeneración en EA. A β debe llevar a cabo una serie de cambios conformacionales y de plegamiento incorrecto culminando en la formación de agregados, los cuales se depositan en el cerebro, y estos son los que principalmente causan neurotoxicidad. Es por lo anterior que un enfoque racional para la búsqueda de terapias farmacológicas sería el uso de inhibidores de la agregación de A β ; y es en este sentido donde se han buscado inhibidores de fuentes tan diversas que van desde los productos naturales hasta los basados en peptidomimética. Una terapia farmacológica ideal para la enfermedad es aquella en la que el inhibidor sea específico para agregados patológicos, sea capaz de reducir la agregación y/o toxicidad de A β , que él mismo no sea tóxico y que a su vez sea capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica. Es debido a lo anterior que se ha propuesto utilizar modificaciones estructurales que interfieran en el mecanismo de agregación de A β ; esto debido a que el péptido tiene la capacidad de reconocerse él mismo para favorecer la agregación y además, de que es bien conocido que la secuencia aminoacídica está directamente relacionada con sus propiedades de agregación. Existen reportes donde se han producido inhibidores peptídicos de la agregación de A β basados en la modificación estructural del mismo, esto mediante mutaciones puntuales en aminoácidos que parecen ser claves en el proceso de agregación de A β . De estos trabajos podemos destacar inhibidores sintéticos basados en D-amino estereoisómeros de A β para generar péptidos más resistentes a proteasas (proporcionándoles mayor resistencia y mayor durabilidad) y en ensayos *in vitro* redujeron la formación de agregados amiloides en un modelo celular. Otra modificación a la secuencia de aminoácidos propuesta es la conversión a aminoácidos N-metilados, dicha conversión en un modelo *in vitro* logró reducir la agregación de A β nativo. Así como se han tenido resultados favorables en la búsqueda de inhibidores de la agregación de A β bajo el enfoque de modificarlo estructuralmente, se han obtenido inhibidores peptídicos sintéticos como es el caso del D-hexapéptido (KLVFFA), el cual comprende la región de los aminoácidos 16 al 21, los cuales inhiben la agregación *in vitro*, pero desafortunadamente el mismo inhibidor se agregaba (20). La búsqueda de inhibidores de la agregación de A β basada en modificaciones estructurales en su secuencia aminoacídica es un campo prometedor en la búsqueda de terapias farmacológicas para el tratamiento de EA.



REFERENCIAS

1. Xu W, Ferrari C, Wang HX (2013) Epidemiology of Alzheimer's Disease. En: *Mental and Behavioural Disorders and Diseases of the Nervous System*. Editor: Inga Zerr, pp 329-359.
2. Mazzitelli S, Filipello F, Rasile M, Lauranzano E, Starvaggi-Cucuzza C, Tamborini M, Pozzi D, Barajon I, Giorgino T, Natalello A, Matteoli M (2016) Amyloid- β 1-24 C-terminal truncated fragment promotes amyloid- β 1-42 aggregate formation in the healthy brain. *Acta Neuropathologica Communications Neuroscience of Disease* 4:110.
3. Matz A, Halamoda-Kenzaoui B, Hamelin R, Mosser S, Alattia JR, Dimitrov M, Moniatte M, Fraering PC (2015) Identification of new Presenilin-1 phosphosites: implication for γ -secretase activity and A β production. *J Neurochem* 133: 409-421.
4. Li YM, Xu M, Lai MT, Huang Q, Castro JL, DiMuzio-Mower J, Harrison T, Lellis C, Nadin A, Neduvetil JG, Register RB, Sardana MK, Shearman MS, Smith AL, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ (2000) Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405: 689-694.
5. Xie J, Yang Y, Li J, Hou J, Xia K, Song W, Liu S (2014) Expression of tmp21 in normal adult human tissues. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7: 2976-2983.
6. Lee SF, Shah S, Yu C, Wigley WC, Li H, Lim M, Pedersen K, Han W, Thomas P, Lundkvist J, Hao YH, Yu G (2004) A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. *J BiolChem* 279: 4144-52.
7. Marcinkiewicz M, Seidah NG (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75: 2133-2143.
8. Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* 164:719-725.
9. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J BiolChem* 273: 32730-32738.
10. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55: 306-319.
11. Zhou Y, Zhang H, Liu L, Li C, Chang Z, Zhu X1, Ye B, Xu M (2016) Fabrication of an antibody-aptamer sandwich assay for electrochemical evaluation of levels of β -amyloid oligomers. *Sci Rep* 6:35186. doi: 10.1038/srep35186.
12. Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Lemere CA, Cullen WK, Peng Y, Wisniewski T, Selkoe DJ, Anwyl R, Walsh DM, Rowan MJ (2008) Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28: 4231-4237.
13. Necula M, Kaye R, Milton S, Glabe CG (2007) Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J Biol Chem* 282: 10311-10324.
14. Head E, Pop V, Vasilevko V, Hill M, Saing T, Sarsoza F, Nistor M, Christie LA, Milton S, Glabe C, Barrett E, Cribbs D (2008) A two-year study with fibrillar beta-amyloid (A β) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain A β . *J Neurosci* 28: 3555-3566.
15. Meyer-Luehmann M, Spiess-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451: 720-724.
16. Cruz M, Tusell JM, Grillo-Bosch D, Albericio F, Serratos J, Rabanal F, et al (2004) Inhibition of beta-amyloid toxicity by short peptides containing N-methyl amino acids. *J Pept Res* 63: 324-328.
17. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury P T (1997) Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 4: 119-125.
18. Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT (2002)

- Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41:11338-11343.
19. Lambert M P, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Wals P (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6448-6453.
 20. Cruz M, Tusell JM, Grillo-Bosch D, Albericio F, Serratos J, Rabanal F, Giralt E (2004) Inhibition of beta-amyloid toxicity by short peptides containing N-methyl amino acids. *J Pept Res* 63: 324-328.
 21. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC (2012) The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimer Dement* 8: S 1-68.
 22. Agamanolis DP (2006) An illustrated interactive course for medical students and residents. *Degenerative diseases*. En: *Neuropathology* <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9aDementia.html>.
 23. Kumar S, Walter J (2011) Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging* 3: 803-812.