

# Las conexiones de la enfermedad de Alzheimer: ¿Dónde están? Análisis desde la Proteómica cuantitativa

## The Alzheimer's connection: Where is it? Insights from Quantitative Proteomics

Sergio Mejía<sup>1</sup>, Cristina Osorio<sup>2</sup>, Carolina Londoño<sup>3</sup>, Jessica Booe<sup>4</sup>, SunYong Jeong<sup>5</sup>, Óscar Alzate<sup>6</sup>

### RESUMEN

---

En el presente artículo se presentan los conceptos básicos que definen la patología de la enfermedad de Alzheimer (EA) y los métodos fundamentales utilizados en Neuroproteómica para su estudio. De igual manera, se discuten algunos resultados en el análisis de esta enfermedad y su relación con el genotipo *APOE4* de *APOE*, el gen que codifica la Apolipoproteína E (ApoE). Finalmente se hacen algunas consideraciones generales sobre la EA, cómo evitar su progresión y se discute brevemente el futuro de la investigación en esta área.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer. Apolipoproteína E. Estrés oxidativo. Proteómica/métodos. Espectrometría de masas. Proteómica.

### ABSTRACT

---

In this review we present the basic concepts that define the pathology of Alzheimer Disease (AD) and the fundamental methods used in Neuroproteomics for its study. Some results in the analysis of this disease are discussed and their relationship with the *APOE4* allele of *APOE*, the gene coding for the *APOE4* genotype of the Apolipoprotein E (ApoE). Finally we present some general considerations on AD, how to avoid the progression and we discuss briefly about the future of research in this area.

**Keywords:** Alzheimer disease; apolipoprotein E; oxidative stress; proteomics/methods; mass spectrometry; proteomics.

---

<sup>1</sup> Médico, PhD. Systems Proteomics Center, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

<sup>2</sup> Psicóloga. Systems Proteomics Center - Program in Molecular Biology and Biotechnology, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

<sup>3</sup> Ingeniera Biomédica, MSc. Systems Proteomics Center, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

<sup>4</sup> Estudiante. Systems Proteomics Center - Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

<sup>6</sup> PhD. Systems Proteomics Center - Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

<sup>6</sup> PhD. Systems Proteomics Center - Program in Molecular Biology and Biotechnology - Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA. Laboratorio de Proteómica, Facultad de Medicina. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Dirección de correspondencia: Óscar Alzate. Correo electrónico: alzate@med.unc.edu

Fecha de recibido: 8 de noviembre de 2010

Fecha de aprobación: 28 de marzo de 2011

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en personas mayores de 65 años. Debido al aumento de la expectativa de vida en la población, la EA representa un problema de salud pública mundial. La EA es un desorden neurodegenerativo de origen multifactorial. Se han propuesto varias causas de neurodegeneración en la EA que incluyen factores genéticos y ambientales, apoptosis, procesos inflamatorios, exceso de radicales libres, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, entre otros. En la actualidad no hay un tratamiento totalmente efectivo y los medicamentos que se encuentran en uso sólo logran retrasar la progresión del deterioro neurológico. La investigación sobre EA sigue siendo un problema vigente y dentro de los objetivos que actualmente tienen los investigadores en el tema, está determinar las proteínas implicadas en el desarrollo de la enfermedad para encontrar posibles blancos terapéuticos. En el presente artículo se presenta una descripción general de la EA, se hace una revisión sobre algunas de las teorías que buscan explicar el origen y la progresión de la enfermedad y finalmente se describen técnicas de neuroproteómica, encaminadas hacia la investigación de mecanismos moleculares relacionados con la aparición y el progreso de esta enfermedad tan compleja. El presente artículo tiene la siguiente organización:

1. Descripción de la EA
2. Etiología de la EA
3. Desarrollo de la EA
4. EA y Estrés oxidativo
5. La Proteómica en la investigación de la EA
6. Discusión y prospectivas

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El Doctor Alois Alzheimer en 1906, describió las características neuropatológicas de la enfermedad; éstas son: presencia de depósitos densos que rodean las neuronas y formación

de ovillos neurofibrilares (NFT, por sus iniciales en inglés *neurofibrillary tangles*) dentro de las mismas. La EA es la causa más común de demencia en la población adulta en los Estados Unidos<sup>1,2,3</sup>. La prevalencia de esta enfermedad la convierte en un problema de salud pública; su diagnóstico es principalmente clínico y, por lo tanto, se deben tener en cuenta los criterios de demencia para realizar un diagnóstico acertado y no confundirla con trastornos que son potencialmente reversibles.

Según el *Diagnósticos and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition* DSM IV<sup>4</sup>, los criterios para el diagnóstico de la EA son: 1) déficit de memoria demostrado en forma objetiva por medio de pruebas cognitivas; 2) al menos otro déficit cognitivo como afasia, compromiso en la ejecución de funciones, agnosia o apraxia; 3) alteración en el desempeño de las actividades diarias; 4) el desarrollo de la enfermedad se caracteriza por inicio gradual y deterioro cognitivo progresivo; 5) los déficits deben representar una declinación a partir de un nivel funcional previo más alto y 6) no debe existir otra enfermedad neurológica que justifique los síntomas.

Dentro de los diagnósticos diferenciales de demencia causada por EA que deben ser tenidos en cuenta se encuentran otras condiciones del sistema nervioso central que causan déficits de memoria progresivos (enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal y tumores cerebrales), condiciones sistémicas relacionadas con el desarrollo de demencia (hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico y niacina, hipercalcemia e infección por VIH) y otras demencias inducidas por sustancias<sup>5</sup>. Adicionalmente, se han encontrado otros factores de riesgo<sup>6,7</sup>, entre ellos: edad, factores hereditarios, enfermedad cerebrovascular, hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes mellitus tipo II (DM-II), daño oxidativo por la presencia de radicales libres, inflamación, y trauma craneoencefálico, entre otros (véase por ejemplo<sup>8,9,10,11</sup>); no obstante, no se han encontrado relaciones causales entre estos

factores y la aparición y el desarrollo de la enfermedad.

El diagnóstico de la EA es enteramente clínico – fundamentalmente se hace siguiendo el método empírico propuesto por Knopman *et al.* (2001)<sup>12</sup>, y la confirmación sólo se logra durante la autopsia, al demostrarse la presencia de depósitos de placas de amiloide y NFTs. Mirra *et al.* (1991)<sup>13</sup> proponen una serie de criterios neuropatológicos para clasificar los casos como EA definida, EA probable, EA posible y cerebro normal basado en la edad y en la frecuencia y la distribución de las placas de amiloide.

Con el progreso en las técnicas de investigación molecular, se ha conseguido describir genes asociados con variedades de la EA, de inicio temprano y de inicio tardío, y se han identificado algunas proteínas codificadas por estos genes que promueven la aparición de los cambios histopatológicos. La realización de pruebas genéticas preconcepcionales para definir el riesgo de EA sigue siendo un tema sin fundamento científico, ya que no se conocen genes responsables de las formas más comunes de esta enfermedad<sup>14</sup>.

## 2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

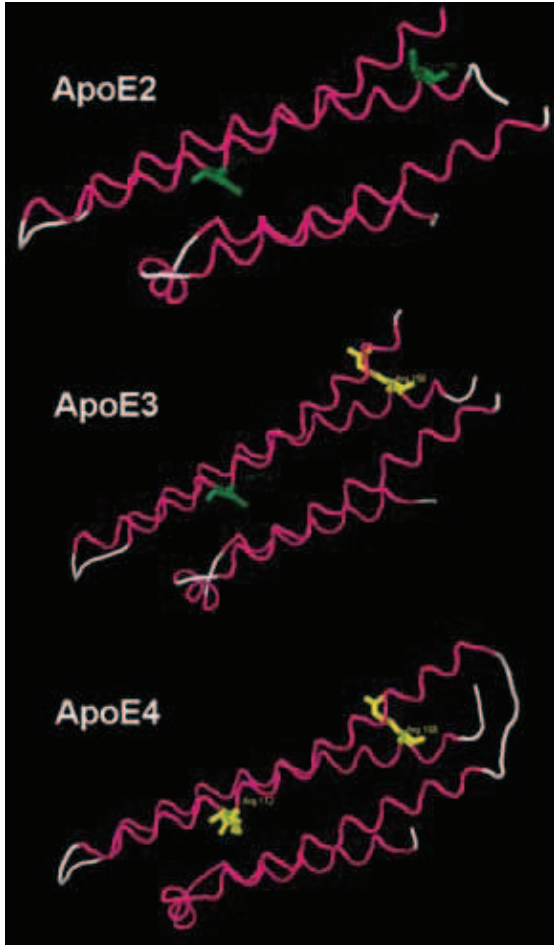
Muchos factores como la dieta, los trastornos del metabolismo y la presencia de enfermedades concomitantes pueden influir en la etiología de la EA. Se ha encontrado que alteraciones en algunas proteínas tales como la Proteína Precursora del Amiloide (APP, por sus siglas en inglés *Amyloid Precursor Protein*), Presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), homocisteína y  $\alpha$ -2 Macroglobulina se relacionan con formas tempranas de EA, las cuales dan cuenta del 5% de los casos de pacientes con EA. Así mismo, la variante *APOE4* de *APOE* (que codifica la proteína Apolipoproteína E) es el único gen conocido hasta el momento, que confiere riesgo de desarrollar la enfermedad<sup>1,2,3,15,16</sup>. Durante los últimos años nuestro grupo de estudio, primero en la Universidad de Duke, y

ahora en la Universidad de Carolina del Norte, ha estado estudiando la relación entre ApoE y la aparición y el progreso de la EA. *APOE* presenta tres alelos diferentes *APOE2*, *APOE3* y *APOE4* que codifican tres isoformas diferentes de la proteína. *APOE3* se considera la isoforma normal, mientras que *APOE2* se relaciona con hiperlipoproteinemia tipo III y *APOE4* se relaciona con EA y aterosclerosis<sup>15</sup>.

Se ha determinado que el envejecimiento es el mayor riesgo para la aparición de EA, así como las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus iniciales en inglés *Reactive Oxygen Species*), responsables de la aparición del desequilibrio en el estrés oxidativo<sup>15</sup>. Es importante clarificar que la EA, una enfermedad cuya prevalencia aumenta en personas mayores de 65 años, en general no tiene un componente genético; esto ocurre en aquellos casos usualmente asociados con mutaciones en *APP* y *PSEN1* y *2*, los cuales sólo representan el 5% de todos los casos de EA. El 95% de los casos restantes no tiene un factor genético definido y el único gen que se ha descubierto hasta el momento que representa un riesgo es el *APOE4*, usualmente asociado con EA de aparición tardía. Recientemente, nuevos genes se han adicionado a esta lista, aunque su verdadero valor como factores de riesgo y desarrollo de la enfermedad está por demostrarse<sup>17,18,19,20,21</sup>.

Existen diferencias estructurales entre las proteínas ApoE3 y ApoE4 que podrían tener efectos potenciales en la aparición de EA. ApoE3 estimula el crecimiento de las dendritas y la plasticidad neuronal, la eliminación del colesterol y del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), tiene efecto antioxidante, previene la fosforilación de la proteína tau y previene el deterioro cognitivo; por su parte ApoE4 inhibe el crecimiento de las dendritas, produce ruptura del citoesqueleto, aumenta los depósitos de A $\beta$  y propicia las fugas lisosomales inducidas por A $\beta$  y apoptosis, reduce el receptor de andrógenos, estimula la fosforilación de la proteína tau y causa deterioro cognitivo<sup>15</sup>. Todas las diferencias entre personas con ApoE2, ApoE3 y ApoE4 surgen de las variaciones en la secuencia primaria de

estas proteínas, las cuales consisten en una variación mínima en las posiciones 112 y 158, así: ApoE2 tiene residuos de cisteína en ambas posiciones, ApoE3 tiene cisteína en la posición 112 y arginina en la 158, y ApoE4 tiene argininas en ambas posiciones<sup>16</sup> (Figuras 1 y 2).



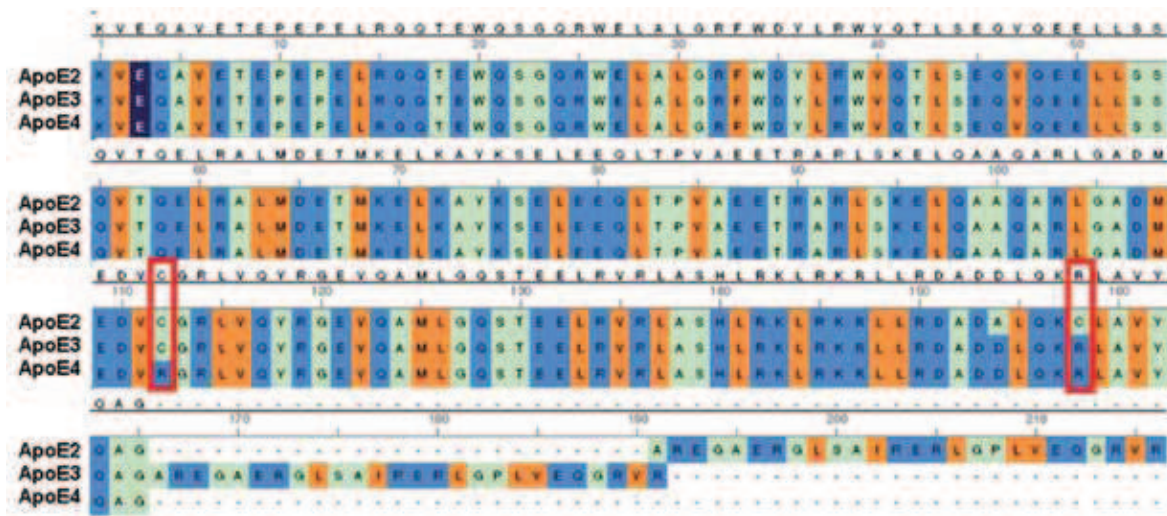
**Figura 1.** Imágenes comparativas de las estructuras ApoE2, ApoE3 y ApoE4, que indican las posiciones 112 y 158. Cisteína (Cys) aparece en color verde y Arginina (Arg) en amarillo. Las imágenes fueron realizadas con Molviewer® de Matlab® y las estructuras fueron obtenidas de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) y sus referencias respectivas son 1NFO, 1NFN y 1GS9.

La predisposición conocida para la aparición de EA asociada con la presencia de genes de *APOE*, *PSEN1* y 2 y *APP*, ha permitido la creación de modelos animales para el estudio de esta enfermedad. Utilizando uno de estos modelos, los ratones humanizados con reemplazo dirigido de *APOE* humano<sup>22</sup>, encontramos que las distintas isoformas de la Mortalina, la chaperona mitocondrial Hsp70 (mtHsp70), se expresan y se fosforilan diferencialmente en el hipocampo de ratones *APOE4/4* comparados con ratones *APOE3/3*. Posteriormente, hicimos la misma comparación con cerebros de pacientes con EA con genotipos *APOE3/3* y *APOE4/4* y con individuos normales sin EA como control. Se encontró el mismo patrón de expresión diferencial para la Mortalina por lo que se postula que la expresión de esta proteína en el hipocampo de pacientes con EA es regulada por el genotipo *APOE*, es decir, se infiere que éste es un mecanismo de defensa celular como respuesta al incremento del estrés oxidativo<sup>22</sup>.

Otros factores de riesgo para la aparición de EA incluyen altos niveles de colesterol<sup>23</sup>, el complejo apoE4-VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) en la inhibición de la actividad antiapoptótica de las HDL (*High Density Lipoprotein*) y la influencia de este efecto en la aparición de enfermedades como aterosclerosis<sup>24</sup> y su actividad sobre la fosfoinositol fosfatasa<sup>25</sup>, considerada un factor de riesgo independiente para DM-II, hipertensión y obesidad.

### 3. DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Selkoe (2003)<sup>26</sup> describe el papel del plegamiento anormal de algunas proteínas en la patogénesis de varias enfermedades. En condiciones normales estas proteínas son secretadas en forma soluble pero, por modificaciones en las secuencias de aminoácidos, tienden a formar agregados o fibrillas altamente estables en el espacio extracelular que alteran la función celular. Algunas de estas enfermedades son amiloidosis sistémica primaria, mieloma múltiple,



**Figura 2.** Alineación de las secuencias de ApoE2, ApoE3 y ApoE4 que resaltan las posiciones 112 y 158 en las que se presentan los cambios que determinan las variaciones funcionales entre las isoformas de las proteínas. La imagen fue realizada con Multialign viewer de Matlab® y se extrajeron las secuencias obtenidas de Protein Data Bank y sus referencias respectivas son 1NFO, 1NFN y 1GS9.

diabetes pancreática, EA, Síndrome de Downy y enfermedad de Parkinson. En la enfermedad de Huntington y la Ataxia Cerebroespinal Familiar se presentan depósitos citoplasmáticos de secuencias de glutamina que se repiten.

La EA es el único desorden neurológico que presenta depósitos intracelulares (tau) y extracelulares (Aβ) de proteínas. Se han encontrado mutaciones hereditarias en APP o en una de las proteasas (presenilina/γ-secretasa) que actúa sobre APP para liberar Aβ y que causa EA de inicio temprano<sup>27</sup>.

Según Selkoe y Podlisny (2002)<sup>27</sup>, una secuencia hipotética de los pasos patogénicos de las formas familiares de EA podría ser la siguiente: 1) mutaciones en los genes de APP, PSEN1 y PSEN2; 2) proteólisis alterada de APP; 3) producción incrementada de Aβ<sub>42</sub>; 4) acumulación y agregación progresivas de Aβ<sub>42</sub> en el líquido intersticial del cerebro; 5) depósitos de agregados de Aβ<sub>42</sub> en forma difusa; 6) agregación de Aβ<sub>40</sub> sobre placas difusas de Aβ<sub>42</sub> y sobre posición de ciertas proteínas asociadas

a las placas (complemento c1q, por ejemplo; 7) respuesta inflamatoria, activación microglial, liberación de citoquinas, astrocitosis y liberación de proteínas de fase aguda; 8) lesión dendrítica progresiva dentro de las placas de amiloide; 9) ruptura de la homeostasis iónica y metabólica neuronal y daño oxidativo; 10) actividades de kinasa/fosfatasa alteradas, hiperfosforilación de la proteína tau y formación de filamentos helicoidales pareados; 11) lesión neuronal y dendrítica difusa y muerte celular en hipocampo y corteza cerebral con déficit progresivo de neurotransmisores; y 12) demencia.

#### 4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y ESTRÉS OXIDATIVO

De acuerdo con el estudio de Keller *et al.* (2005)<sup>28</sup> el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ADN ocurre en las primeras etapas de la EA, e incluso puede ocurrir en las fases preclínicas; y se relaciona con deterioro cognitivo leve y alteración en la memoria verbal. En la EA, los astrocitos y la microglia activada liberan



radicales libres y factores inflamatorios. El daño oxidativo y la sensibilidad al estrés oxidativo se incrementan con la edad. En la EA, las vías y mecanismos oxidativos incluyen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y del ADN. El incremento en la peroxidación de lípidos precede a la formación de placas de amiloide en modelos animales de EA<sup>15</sup>. Las placas amiloides extracelulares, los NFT y la pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro son el resultado de anomalías en el metabolismo de los lípidos y peroxidación y puede ser causada o exacerbada por A $\beta$ <sup>15</sup>. Las isoformas de ApoE pueden influir específicamente la distribución celular de productos de la peroxidación de lípidos en el cerebro y ayudar a la estratificación del riesgo de EA asociada con ApoE4<sup>28,29</sup>.

Las mitocondrias son fuentes de radicales y precursores oxidativos en forma de O<sup>2•</sup>, que por acción de la superóxido dismutasa se transforman en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es difusible y estable y termina produciendo radicales hidroxilo a través de otras reacciones, la producción de éstos está ligada al metabolismo. Se observa oxidación del ADN mitocondrial (mtADN) en la corteza parietal de personas con EA y en ancianos sanos. De igual manera, se observa incremento del mtADN en los núcleos de neuronas de personas susceptibles de desarrollar EA lo que produce un incremento del potencial oxidativo<sup>28</sup>.

Se ha postulado que el estrés oxidativo, la depleción de energía, la excitotoxicidad y la patología endotelial vascular participan en la patogénesis de la EA. Cuando el estrés oxidativo es activado, las enzimas antioxidantes se incrementan y el metabolismo intermediario se desplaza al ciclo de la pentosa fosfato para promover la desintoxicación reductora, la reparación y la biosíntesis. En el cerebro de pacientes con EA se han encontrado varios productos de la oxidación de ácidos grasos ( $\omega$ 3,  $\omega$ 6), entre ellos el trans-4-hidroxi-2-hexenal (HNE) y acroleína, que inhiben los transportadores de la membrana plasmática, el ensamblaje de microtúbulos y la función mitocondrial. El HNE inhibe la colina transferasa, responsable de la síntesis de acetilcolina. El

malondialdehído, producto de la peroxidación de lípidos, se ha identificado en el lóbulo temporal en las primeras fases de la EA pero no en otras regiones del cerebro. También se han encontrado productos de la peroxidación del ácido araquidónico en el cerebro y LCR<sup>30,31</sup>.

El daño oxidativo de las proteínas se determina por la generación de grupos carbonilo<sup>29</sup>. Muchas de las proteínas oxidadas en la EA se encuentran relacionadas con la glicólisis y la generación de ATP, esto ocurre temprano al inicio de la enfermedad en regiones del cerebro vulnerables y se relaciona con deterioro cognitivo leve, acompañado de glucosilación no enzimática de proteínas oxidadas<sup>30,32</sup>.

Como respuesta al estrés oxidativo se produce un aumento de la actividad antioxidante. Se encuentran, por ejemplo, niveles incrementados de glutatión peroxidasa que detoxifica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superóxido dismutasa que convierte el O<sup>2•</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hemoxygenasa-1 (HSP: *heat shock protein*) que convierte el grupo hemo prooxidante en biliverdina que es reducida a bilirrubina antioxidante. El grupo hemo es liberado de la citocromo oxidasa por daño mitocondrial. Las aldo-ketoreductasas también se incrementan y ayudan a detoxificar HNE y acroleína. La succínico semi aldehído reductasa se incrementa y aumenta la concentración de gamma hidroxibutirato (GHB). La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) se encuentra incrementada en el cerebro de pacientes con EA y genera el NADPH requerido como cofactor para las enzimas antioxidantes y para la regeneración de glutatión GSH<sup>29,30,32</sup>.

El A $\beta$  tiene capacidad para generar radicales libres, alterar la homeostasis del calcio intracelular, disminuir el metabolismo de la energía y dañar el endotelio vascular, además, afecta la función de las neuronas colinérgicas, liga metales y los transloca a través de la membrana celular donde alteran la función de otros canales iónicos e inicia la peroxidación de lípidos. Los antioxidantes como la vitamina E, al bloquear los canales de calcio, protegen de la toxicidad *in vitro* y la muerte inducida por A $\beta$ . Los depósitos tempranos de A $\beta$

disparan la formación de peróxidos tóxicos, bloquean la producción de energía y dañan los transportadores de glucosa<sup>32</sup>.

La entrada de calcio, la depresión de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y HNE pueden alterar el intercambio de glutamato en neuronas que usan este neurotransmisor como los astrocitos corticales, particularmente en presencia de Aβ. El exceso de glutamato en la sinapsis altera el transporte de la cisteína y promueve la depleción de GSH y conduce al aumento de los niveles de peróxido tisular. Las neuronas vulnerables en la EA se protegen cuando se aumenta el número de receptores glutamato metabotrópicos del grupo II, lo que inhibe la liberación de glutamato y previene la lesión por excitotoxicidad<sup>32</sup>.

En el cerebro con EA se observa reducción de la actividad de la sintetasa de glutamina glial y reducción significativa de la actividad del transportador de glutamato. Se ha observado aumento del glutamato en el cerebro, en etapas tempranas de la enfermedad, lo que produce alteración de las conexiones corticales y posterior reducción de los niveles de glutamato. Los productos de la peroxidación de lípidos, como HNE y acroleína, producen lesión y muerte celular al reducir el metabolismo de la energía. Los aldehídos tóxicos interfieren con la función mitocondrial y con la utilización de la glucosa. El HNE se une al transportador de la glucosa neuronal y reduce el transporte de la misma y la producción de ATP<sup>32</sup>.

El Aβ lesiona también el endotelio vascular y genera grandes cantidades de superóxido, este radical puede actuar sobre el óxido nítrico, un factor relajante derivado del endotelio, y producir peroxinitrito, un potente agente oxidante que inicia la cadena de daños de la peroxidación de lípidos, lo que reduce la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina y el flujo sanguíneo, reduce el metabolismo energético y causa estrés oxidativo. El efecto contrario también se observa ya que el estrés oxidativo es un inductor de la expresión de APP con la consecuente producción de Aβ. La APP es un reactante de fase aguda que es regulada en las neuronas, astrocitos y microglia

en respuesta a la inflamación y al estrés celular por lesión axonal, estrés excitotóxico, estrés oxidativo y envejecimiento. La producción de Aβ a partir de APP en concentraciones fisiológicas está dirigida a reducir el estrés neuronal, prevenir la muerte celular, promover el crecimiento de dendritas y la regeneración tisular<sup>32</sup>.

Con el uso de proteómica de óxido-reducción (*Redox proteomics*) se han identificado proteínas oxidadas en cerebros con EA, incluyendo la proteína relacionada con la dihidro pirimidasa (DRP2, *dihydro pyriminidase related protein 2*), α-enolasa, proteína de choque térmico 71 (Hsc71), creatina kinasa BB (CK-BB), glutamina sintetasa (GS) y ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCHL-1), peptidil-prolil-cis, transisomerasa 1 (Pin1), triosa fosfato isomerasa (TPI) y anhidrasa carbónica II (CAII), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cadena α de la ATP sintetasa, canales proteínicos aniónicos dependientes de voltaje, γ-enolasa, β-actina, L-lactato deshidrogenasa (LDH), neuropolipéptido h3 (N-h3) y TPI<sup>29,31,32</sup>.

La UCHL-1 es crucial para la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas a través de la vía del proteosoma; su disfunción se relaciona con acumulación de éstas y con exceso en la ubiquitinización de proteínas observada en las áreas vulnerables del cerebro para EA. La UCHL-1 puede ayudar a recuperar la función sináptica y la formación de memoria contextual a partir de la oxidación inducida de Aβ. Otra de las proteínas ligadas al proteosoma y a la degradación de proteínas es Hsc71 que también liga el dominio intracelular de APP y puede contribuir en las modificaciones observadas en su procesamiento y en la producción de Aβ. Las alteraciones en la β-actina pueden ser las responsables de cambios en la estructura del citoesqueleto como el acortamiento de las dendritas, estos cambios estructurales pueden contribuir en la muerte celular. La DRP2 modula la actividad de la colapsina, que es esencial para el crecimiento de las dendritas y del axón; esta proteína se encuentra reducida en la EA y su función puede perderse por efecto de la oxidación que implica defectos en la

comunicación neuronal y en la pérdida de la memoria y el deterioro cognitivo<sup>32</sup>.

El N-h3 es esencial en la producción de colina acetiltransferasa. La alteración en la producción de esta última, por oxidación del N-h3, reduce los niveles de acetilcolina y ocasiona alteraciones en la transducción de señales y en la neurotransmisión. La oxidación de GS y su consecuente pérdida de función induce acumulación del glutamato extracelular y se presenta sobre activación de sus receptores, aumento del calcio intracelular, aumento de ROS intracelulares y muerte celular<sup>32</sup>.

La nitración de CAII puede alterar el balance hidroelectrolítico y el pH celular; muchas enzimas, reacciones y el gradiente de protones mitocondrial son dependientes de pH por lo que las alteraciones en la CAII pueden resultar en el mal funcionamiento de estas vías<sup>32</sup>.

## 5. LA PROTEÓMICA EN LA INVESTIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Para estudiar y comprender la participación de las proteínas en el origen y la progresión de la EA, se emplean muchos métodos de la proteómica en general y de la neuroproteómica en particular (aunque neuroproteómica es una palabra que aún no existe en español, la queremos introducir acá como aquella rama de la proteómica que estudia el **proteoma** asociado con el sistema nervioso y las enfermedades neurodegenerativas). En su definición más amplia, la proteómica es la identificación y la caracterización de las proteínas expresadas por un genoma; por su parte la neuroproteómica es el estudio de las proteínas relacionadas con el sistema nervioso y de cómo éstas se expresan diferencialmente en los diversos tejidos de acuerdo con influencias genéticas y ambientales<sup>33</sup>. La proteómica se puede utilizar para determinar la presencia y evolución de enfermedades. En la presente revisión se hará una breve descripción de las técnicas usadas para la caracterización de las proteínas expresadas en el sistema nervioso central y en

el líquido cefalorraquídeo para el estudio de la EA.

### 5.1. Ratones transgénicos

El uso de ratones transgénicos es muy común dada la facilidad de obtener cepas consanguíneas, la gran homología genética entre seres humanos y ratones, la facilidad de controlar la reproducción y la disponibilidad de reactivos. La posibilidad de obtener cepas consanguíneas permite conseguir ratones homocigóticos para cualquiera de los locus y se limita la variabilidad genética. La expresión “*transgénico*” hace referencia específicamente a la introducción de ADN extraño dentro del genoma. Existe una gran cantidad de reportes del uso de ratones transgénicos en el estudio de la EA<sup>22,34-41</sup>. En nuestro laboratorio, se usan ratones “*humanizados*” a los que se les han introducido genes humanos de *APOE*, para generar ratones conocidos como ratones hApoE-TR (*human ApoE-Targeted replacement*), desarrollados en el Laboratorio de Oliver Smithies en la Universidad de Carolina del Norte durante la década de los noventa<sup>42</sup>. Estos ratones son usados en nuestro laboratorio, en combinación con neuroproteómica, para entender la relación entre ApoE y EA. A continuación se describen estas técnicas y se presentan algunos resultados.

### 5.2. Western blot

Western blot es una técnica usada para identificar y localizar proteínas, basada en la capacidad de las proteínas para unirse a anticuerpos específicos. Esta técnica permite detectar proteínas de interés a partir de una mezcla de un gran número de proteínas y, adicionalmente, determinar su tamaño (kDa) y dar información sobre la expresión de las proteínas cuando se usa una muestra de control conocida. El análisis Western blot es altamente dependiente de la calidad y especificidad de los anticuerpos usados para la detección. (Para buscar protocolos y métodos, se sugiere un sitio como: <http://www.westernblotting.org/>).



Para utilizar esta técnica se debe obtener una muestra de las células del tejido de interés; éstas se deben lisar para liberar la proteína y se usa un gel de electroforesis para separar las proteínas de acuerdo con su tamaño. Posteriormente, las proteínas son transferidas a una membrana y sometidas a la acción de los anticuerpos específicos. El anticuerpo que se liga a la proteína se conoce como anticuerpo primario y se emplea un anticuerpo secundario que se une al primario para formar una estructura proteína-anticuerpo-anticuerpo. El anticuerpo secundario contiene una enzima peroxidada que convierte un sustrato de luminol a una mancha de luz que es detectado sobre una película fotosensible; de esta manera se puede determinar el tamaño de la proteína bajo estudio y se compara con el control de tamaño conocido, el tamaño es expresado en kDa. Una aplicación particular de este sistema es el análisis de isoformas de proteínas usando Western blot en dos dimensiones (2D-WB) como el mostrado en la Figura 3A, en la cual tejidos de pacientes con EA se han solubilizado para mostrar que proteínas sinápticas tienen diferentes isoformas de acuerdo con el genotipo de *APOE*.

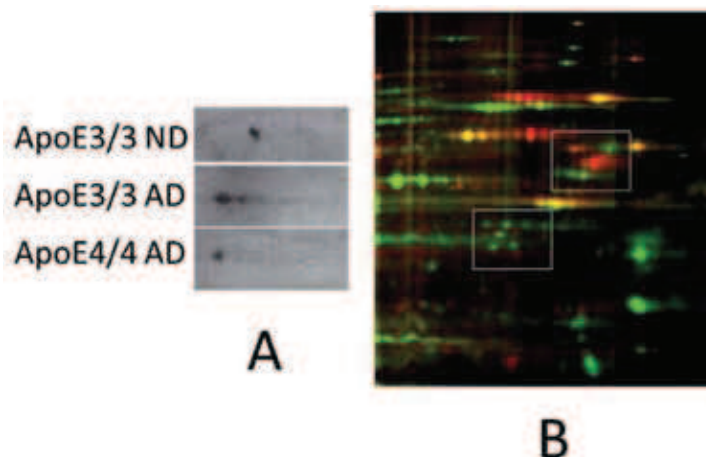
**5.3. 2D-DIGE (2D - difference gel electrophoresis)**

Es una variación de la técnica clásica de electroforesis en gel, en la cual se utiliza un gel de poliacrilamida en el que se separan mezclas de proteínas mediante el uso de dos campos eléctricos aplicados sucesivamente de manera perpendicular<sup>43</sup>. La masa y la carga de las proteínas se emplean como factores de separación. Las moléculas se mueven a diferentes velocidades y producen diversas manchas que muestran un patrón de migración característico de cada proteína. Para el proceso de identificación de las proteínas se usa espectrometría de masas,

como se explica en la siguiente sección. En DIGE, las muestras de proteínas son marcadas covalentemente con marcadores fluorescentes (Cy2, Cy3, Cy5) antes de la electroforesis. Después de ésta, el gel es escaneado usando frecuencias láser de diferentes longitudes de onda, lo que permite identificar variaciones en las cantidades relativas de las proteínas y observar discrepancias entre la muestra en estudio y una muestra de control. Una ventaja adicional de esta técnica es que las muestras en estudio y de control son sembradas en el mismo gel, lo que elimina las variaciones inter-gel y reduce el tiempo de experimentación (Figura 3B).

**5.4. MS – Mass spectrometry (espectrometría de masas)**

La MS es una herramienta analítica que sirve para medir la masa molecular de una muestra de forma precisa; con esta técnica es posible medir cambios en la masa de una molécula del orden de un aminoácido en una secuencia



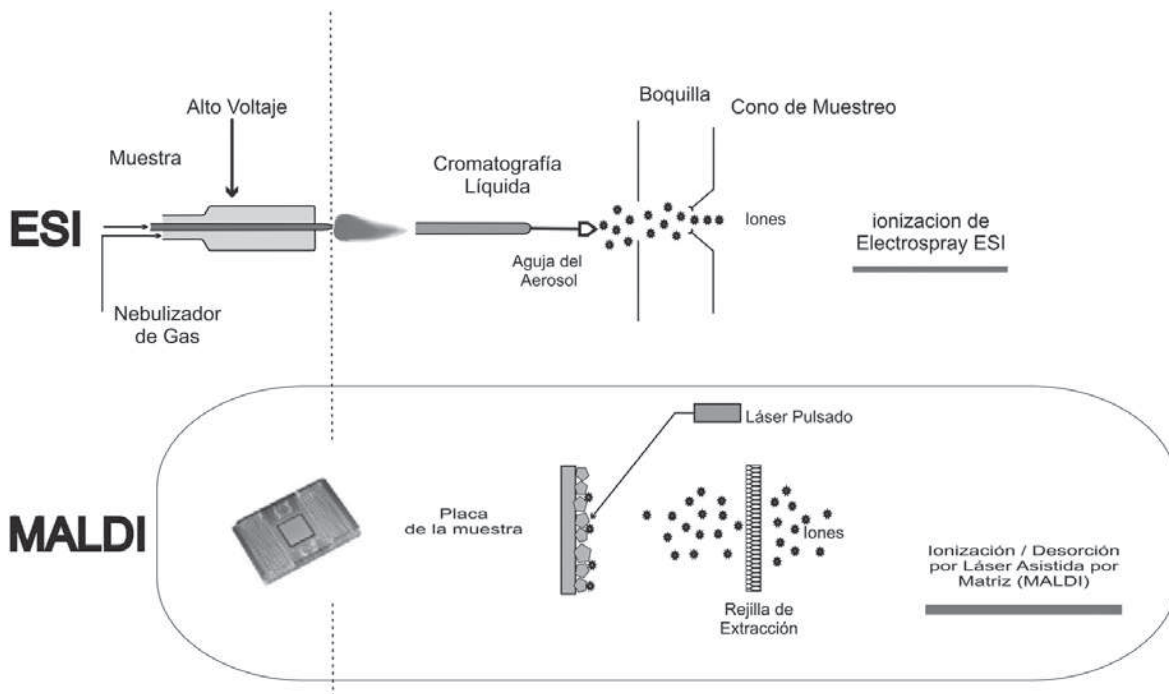
**Figura 3. A.** Identificación por Western blot de la expresión diferencial de proteínas sinápticas en controles sanos ApoE3/3, en cerebros con este mismo genotipo pero con EA y en cerebros ApoE4/4 con EA. **B.** Fragmento de un gel 2D-DIGE típico. En los recuadros se observa la marcación diferencial de ApoE3 con Cy3 (verde) y ApoE4 con Cy5 (rojo). Las proteínas analizadas corresponden a extractos mitocondriales del cerebro de ratones transgénicos que expresan la proteína ApoE humana.

de una proteína. En proteómica, la MS es empleada para identificar y analizar proteínas y péptidos; verificar la localización de aminoácidos; detectar modificaciones postraduccionales; calcular el número de puentes de disulfuro; monitorear reacciones enzimáticas y formación de complejos de proteínas–ligando y determinar estructuras macromoleculares, entre otras aplicaciones<sup>44,45</sup>.

En la MS, la muestra que se analiza es introducida en una fuente de ionización. La muestra es ionizada para que los iones puedan viajar a través de un espacio al vacío hasta un detector en el que son identificados y cuantificados (Figura 4). La ionización puede ser alcanzada usando varios métodos. (Para una discusión detallada de MS véase Parker *et al.*<sup>44</sup>). Los iones son detectados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Para este análisis, los instrumentos disponibles utilizan cuadrupolos, analizadores de tiempo de vuelo

(TOF, por sus iniciales en inglés *Time Of Flight*), sectores magnéticos y trampas de iones cuadrupolos combinada con transformada de Fourier. Los detectores monitorean la corriente de iones, la amplifican y la transmiten a un sistema de datos donde es registrada en forma de espectro de masas. Los valores  $m/z$  son graficados contra sus intensidades para mostrar el número de componentes, la masa molecular y la abundancia relativa de cada componente en la muestra.

La MS–MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) es apropiada para masas moleculares altas como proteínas, péptidos, glicoproteínas, oligosacáridos y oligonucleótidos. La exactitud del método es de aproximadamente 0.001% por cada 40.000 Da. Como su nombre lo indica, en MS–MALDI, la ionización se logra utilizando un láser para bombardear la muestra (Figura 4). La muestra se mezcla previamente con un compuesto matriz para lograr que los



**Figura 4.** Esquema de la Espectrometría de Masas en la que se muestran las fases de ionización usando Electro spray (como en ESI, *Electrospray ionization*) o Láser (como en MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), fragmentación, separación y detección.

péptidos o moléculas de interés vuelen de la fuente al detector y su peso molecular pueda ser determinado por el tiempo de vuelo. La composición de la matriz depende de la ionización que se quiera lograr (positiva para proteínas y péptidos o negativa para oligonucleótidos y oligosacáridos). La matriz convierte la energía del láser en energía de excitación que ioniza la muestra que se encuentra en la superficie de la mezcla y, al mismo tiempo, atenúa la energía directa para evitar la descomposición de la muestra. Los analizadores de TOF separan los iones de acuerdo con la relación  $m/z$ , y se mide el tiempo que toma el ión en viajar hasta el detector.

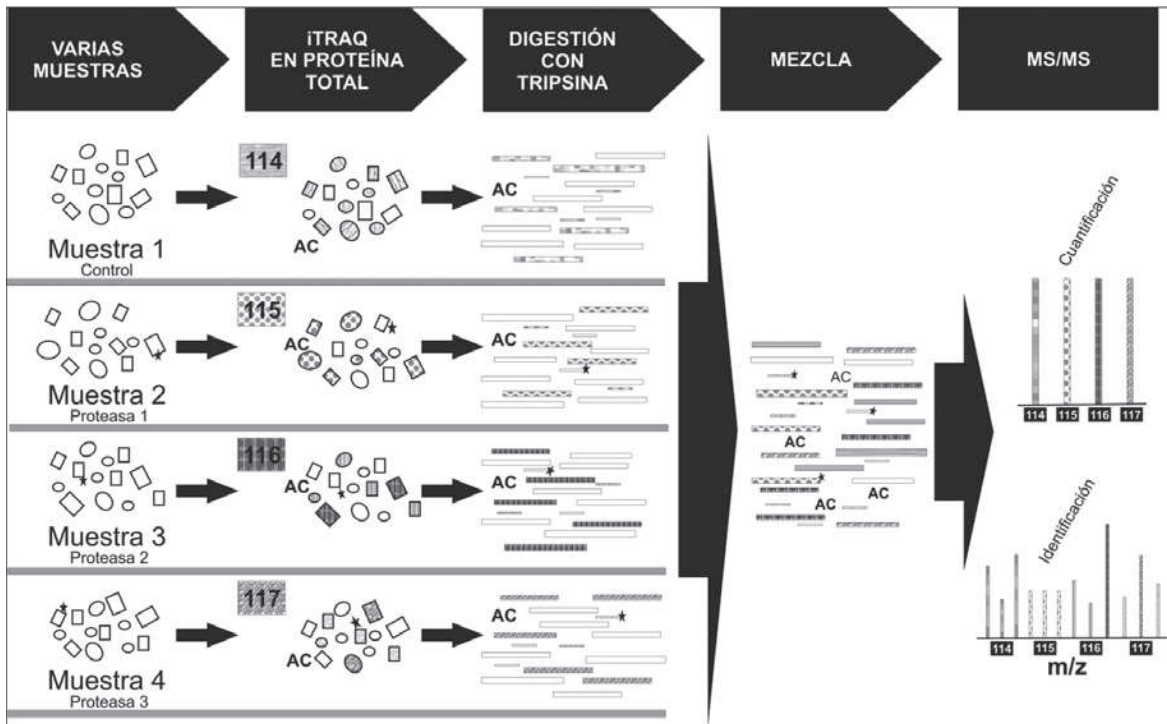
Cuando se va a identificar una proteína con MS utilizando un método conocido como “bottom-up”, ésta debe pasar por una digestión enzimática. La mezcla digerida es analizada con el espectrómetro de masas para producir

un espectro complejo a partir de los pesos moleculares de los fragmentos proteolíticos que puedan ser leídos. Este espectro, con la información de los pesos moleculares, es lo que se conoce como un mapa del péptido que es comparado con una base de datos de proteínas; si la proteína existe en esta base de datos, este mapa es suficiente para la identificación<sup>44</sup>.

**5.5. ITRAQ – Isobaric tag for relative and absolute quantitation**

La marcación isobárica para cuantificación absoluta y relativa es una técnica de multiplexado que permite la marcación de cuatro a ocho muestras de proteínas para análisis en forma simultánea (Figura 5).

En esta técnica, se introducen isótopos peptídicos estables empleando reactivos iTRAQ en los péptidos que resultan de la proteólisis.



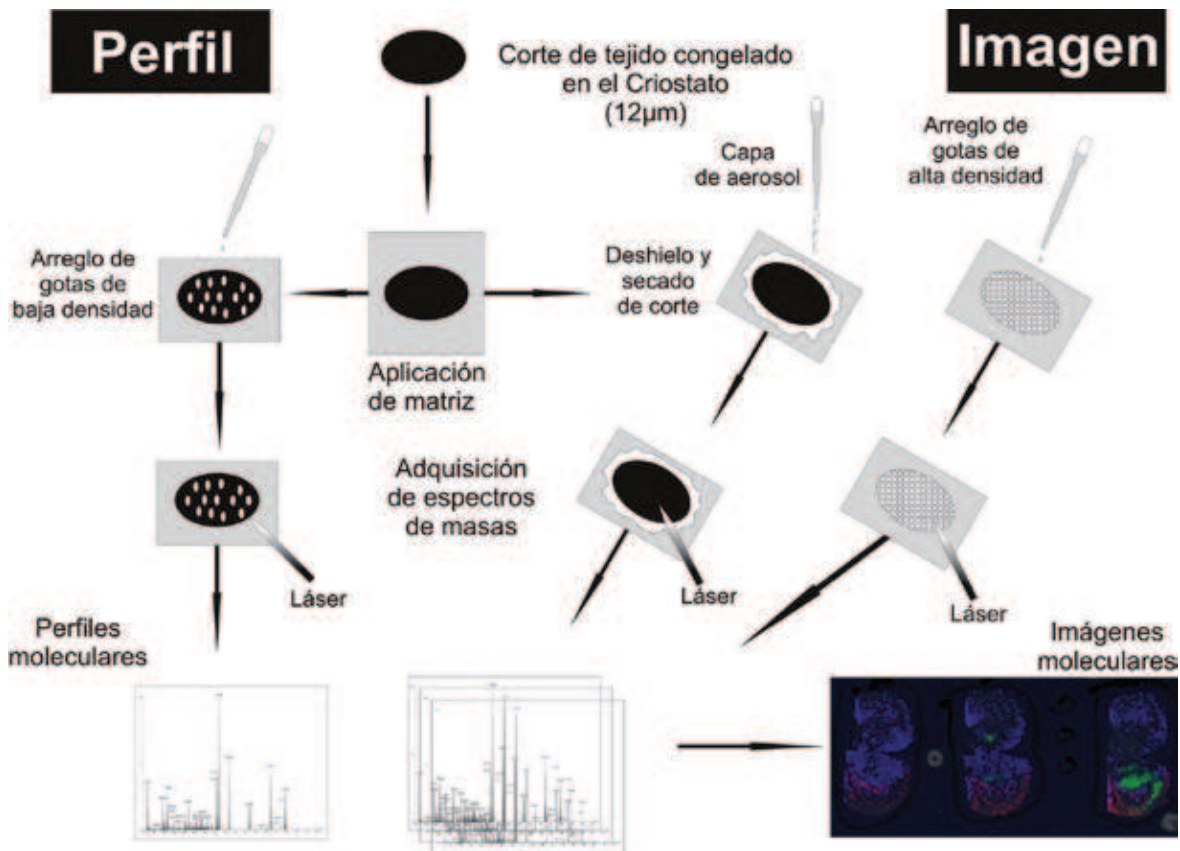
**Figura 5.** Diagrama del proceso de iTRAQ en el que se muestran los procesos de desnaturalización y digestión de la muestra, la fase de marcado y la cuantificación e identificación de péptidos y proteínas usando MS.

La tecnología iTRAQ usa un derivado del éster NHS (N-hidroxisuccimida) para modificar grupos amino primarios y crean enlaces entre grupos de balance de masas (grupos carbonilo) y un grupo reportero (basado en N-metilpiperazina) con péptidos proteolíticos por medio de la formación de un enlace amida. Debido al diseño de masas isobáricas de los reactivos iTRAQ, los péptidos marcados diferencialmente aparecen como un pico único en la espectrometría de masas y se reduce el riesgo de superposición de picos. Cuando los péptidos con marcación iTRAQ son sometidos a análisis con MS, la fracción carbonilo es liberada como un fragmento neutro y se liberan los iones reporteros marcados con isótopos. Este análisis provee información cuantitativa

relacionada con la cantidad de expresión de las proteínas. La digestión enzimática, previa a la marcación iTRAQ, aumenta la complejidad de la muestra. Para que la determinación de las proteínas sea confiable se requiere un fraccionamiento multidimensional antes de la identificación con espectrometría de masas<sup>45</sup>.

### 5.6. MSI – Imágenes moleculares de tejidos usando MS

Esta metodología usa el poder de MS-MALDI para crear una imagen molecular de un tejido, mediante el mapeo de proteínas detectadas por MS sobre la imagen óptica del tejido (Figura 6)<sup>45</sup>.



**Figura 6.** Esquema del uso de Espectrometría de Masas (MS) para la obtención de imágenes moleculares. El inserto de la parte inferior derecha muestra imágenes moleculares obtenidas con MS realizada sobre cortes de cerebro de ratón. La diferencia de colores corresponde a grupos de proteínas que se localizan en zonas específicas del cerebro.

### 5.7. Bioinformática

Existe gran cantidad de herramientas informáticas para facilitar el análisis y la correlación de datos. El hecho de que el genoma humano posea únicamente cuatro nucleótidos, que se repiten y se combinan de diferentes formas, ha permitido el desarrollo de algoritmos para traducir la información del genoma en información de secuencias de proteínas que pueden ser comparadas “intra- o inter-especies” para determinar variaciones estructurales, predecir la estructura tridimensional o cruzar grandes bases de datos para analizar resultados y confirmar hipótesis o diseñar nuevos experimentos.

Nuestro grupo ha desarrollado varias aplicaciones de software para consultar los parámetros de las proteínas que se han identificado en el hipocampo y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA en múltiples bases de datos. Estas bases de datos incluyen iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/><sup>47,48</sup>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/><sup>49</sup>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/><sup>50</sup>), PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do><sup>51</sup>), BioGRID(<http://thebiogrid.org/><sup>52,53</sup>) y Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/><sup>54</sup>). La información obtenida a partir de estas bases de datos permite estudiar las secuencias de aminoácidos y analizar la estructura tridimensional de las proteínas (como las mostradas en la Figura 1). Estas imágenes se producen mediante modelación molecular usando Molviewer (Matlab™). Además, se puede hacer alineación de secuencias (Figura 2) para lo que se usa Multialign viewer (Matlab™). Esto permite identificar variaciones en el número o en la posición de aminoácidos de diferentes isoformas de una proteína<sup>55</sup>.

De igual manera, también se puede determinar la parte del ciclo celular y la región de la célula donde se desarrolla la función de cierta proteína y determinar las coincidencias dentro de un listado de proteínas para una función en particular. Por ejemplo, de acuerdo con el listado de proteínas identificadas por nuestro grupo en el hipocampo,

mediante las técnicas referidas anteriormente<sup>22</sup>, usando una aplicación de software desarrollada por el Systems-Proteomics Center Facility en Matlab, encontramos en Gene Ontology que APP comparte con PSEN1 la anotación ‘GO:0009986’ que las relaciona con funciones que se ejercen en la parte externa de la membrana celular y que PSEN1 y PSEN2 comparten la anotación ‘GO:0016485’ que las asocia con un proceso biológico relacionado con modificaciones postraduccionales de proteínas que puede corresponder a ruptura de enlaces peptídicos y que se presenta en proteínas secretoras o de membrana (Figura 7)<sup>55</sup>.

Estos hallazgos, a través de herramientas computacionales, sirven para la planificación de experimentos en los que se pueden crear modelos animales manipulados genéticamente para obtener la sobreexpresión o inhibición de una o varias proteínas y observar los efectos deletéreos que propician la aparición de cambios patológicos en los tejidos estudiados.

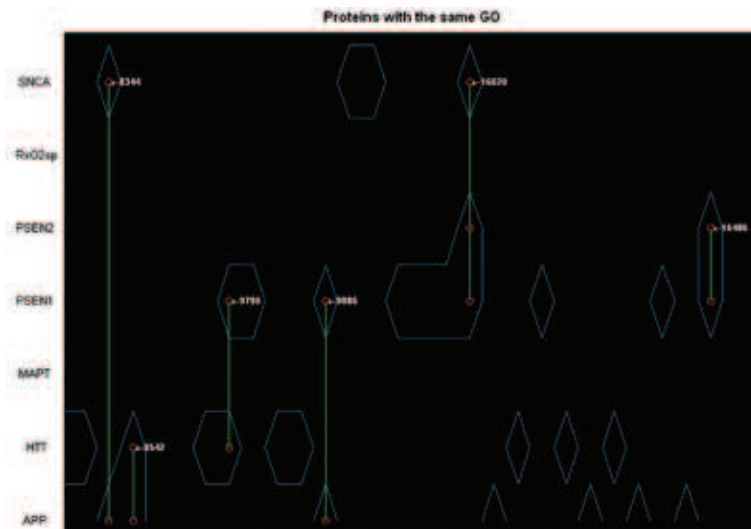
La información obtenida en las bases de datos sirve también para la creación de redes de interacción de proteínas (Figura 8).

Aunque existen varias aplicaciones de libre acceso o licenciadas para estas tareas, la aplicación que hemos desarrollado para este propósito tiene la posibilidad de crear redes de interacción tridimensionales que facilitan su visualización y análisis y cruza información procedente de varias fuentes en forma simultánea. La aplicación genera documentos \*.doc que sirven como fuente de consulta sin necesidad de volver a navegar en los sitios WEB de las bases de datos mencionadas, lo que permite análisis posteriores<sup>55</sup>.

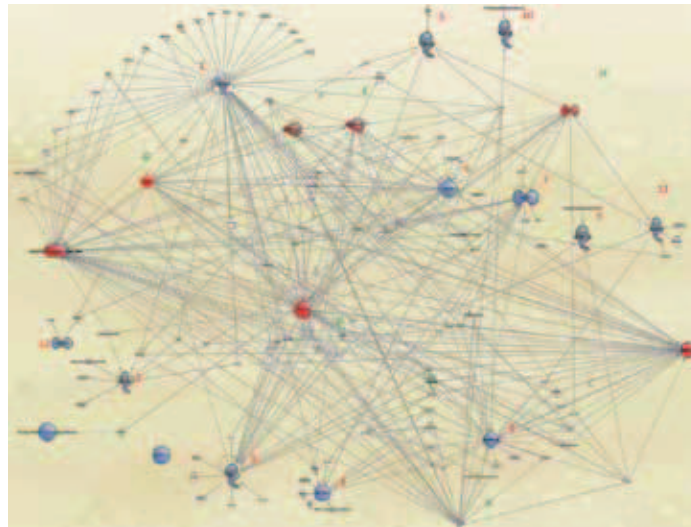
## 6. DISCUSIÓN

La EA es un problema vigente. Sin lugar a dudas, la detección oportuna y el control de factores de riesgo como los trastornos en el metabolismo del colesterol, la glucemia y la presión arterial, tienen un papel clave en impedir





**Figura 7.** Mapa de anotaciones en Gene Ontology para grupo de proteínas identificadas en el hipotálamo de seres humanos con EA que aparece a la izquierda. Los contornos azules corresponden a las anotaciones para cada proteína, los círculos rojos y las líneas verdes señalan grupos de proteínas que coinciden en la anotación que aparece en la figura. La imagen fue obtenida con un programa desarrollado por el Systems-Proteomics Center en entorno Matlab®.



**Figura 8.** Gráfica de una Red de Interacción de Proteínas realizada utilizando Ingenuity Pathway Analyzer (<http://www.ingenuity.com/>). Las proteínas de color rojo son aquellas que, según reportes de la literatura, han sido identificadas dentro de la patología de la EA. Las proteínas de color azul son proteínas identificadas por nuestro grupo y que se expresan diferencialmente en el hipotálamo de pacientes con EA comparadas con cerebros de controles normales. La proteína mostrada en color verde es Mortalina, la cual fue descubierta por nuestro grupo como una molécula que potencialmente interactúa con ApoE, lo que resulta en funcionamiento aberrante de la mitocondria, con la consecuente deficiencia en la respuesta al estrés oxidativo.

que se presenten factores que desencadenan la cascada de cambios neuropatológicos. La degeneración neuronal, una vez establecida, es probable que sea irreversible ya que la plasticidad neuronal se encuentra reducida con la edad por deficiencia de los factores neuroquímicos que la estimulan y por la pérdida de conexiones sinápticas causada por los eventos que se presentan en las neuronas y en el espacio extracelular que brindan el estímulo trófico para su mantenimiento (actividad eléctrica, disponibilidad de neurotransmisores, facilitación neuronal)<sup>56-58</sup>. Se ha caracterizado la relación directa que existe entre factores genéticos como la presencia del alelo *APOE4* y los cambios neuropatológicos de la EA. Junto con la detección y control de los factores de riesgo es importante entonces la implementación de pruebas que puedan aplicarse en forma sistemática para la detección de los cambios cognitivos tempranos que preceden el desarrollo de la enfermedad ya que la evidencia apunta a que la clave es prevenir el deterioro de las funciones neuronales.

Dónde se encuentra la conexión para el origen y progresión de la EA, es una pregunta para la que aún se busca y buscará solución por mucho tiempo. Del breve análisis incluido en el presente artículo se vislumbran relaciones importantes entre los factores de riesgo mencionados; se requiere la realización de nuevos estudios para ponderar de manera más precisa el peso relativo de cada uno de ellos, la participación de las proteínas mencionadas y su influencia relativa en la sobreexpresión o supresión de otras que tienen efectos benéficos o deletéreos en el curso de la enfermedad. Mientras se logra dilucidar esta cuestión, las recomendaciones más relevantes están orientadas al control de los factores de riesgo por parte de los pacientes y a la aplicación de pruebas para la detección temprana del deterioro cognitivo por parte del personal médico.

### **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### **AGRADECIMIENTOS**

Todos los trabajos presentados en este manuscrito fueron llevados a cabo con el apoyo financiero del Systems Proteomics Center (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill), Neuroproteomics Center (Duke University) y el North Carolina Biotechnology Center.

## REFERENCIAS

1. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, *et al.* Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA*. 1989 Nov 10;262(18):2551-6.
2. Pfeffer RI, Afifi AA, Chance JM. Prevalence of Alzheimer's disease in a retirement community. *Am J Epidemiol*. 1987 Mar;125(3):420-36.
3. Rocca WA, Amaducci LA, Schoenberg BS. Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1986 May;19(5):415-24.
4. British Columbia. Alzheimer's drug therapy initiative: diagnostic criteria for dementias [Internet]. Victoria: British Columbia; 2011 [acceso 29 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.health.gov.bc.ca/pharmacare/adi/clinician/pdf/SECTION%20-%20Diagnostic%20Criteria%20for%20Dementias.pdf>.
5. American Psychiatric Association. Diagnostic criteria for dementia of the Alzheimer's type [Internet]. Madison, WI: Madison Institute of Medicine; 1994 [acceso 29 de marzo de 2011]. Disponible en: [http://alzheimers.factsforhealth.org/pdf/dementia\\_criteria.pdf](http://alzheimers.factsforhealth.org/pdf/dementia_criteria.pdf).
6. Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, *et al.* Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology*. 1999 Jan 1;52(1):78-84.
7. American Health Assistance Foundation. Alzheimer's risk factors and prevention [Internet]. Clarksburg, MD: AHAF; 2011 [acceso 29 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/risk/>.
8. Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166(4):367-378.
9. Reitz C, den Heijer T, van Duijn C, Hofman A, Breteler MMB. Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam study. *Neurology*. 2007;69: 998 -1005.
10. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, K reholt I, Winblad B, *et al.* Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol*.2005;62:1539-1544.
11. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Eng J Med*. 2002;346:476-483.
12. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, *et al.* Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001 May 8;56(9):1143-53.
13. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991 Apr;41(4):479-86.
14. Steinbart EJ, Smith CO, Poorkaj P, Bird TD. Impact of DNA testing for early-onset familial Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch Neurol*. 2001 Nov;58(11):1828-31.
15. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5644-51.
16. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-37.
17. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, *et al.* Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genetics*. 2009 Oct;41(10):1088-93.
18. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, *et al.* Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genetics*. 2009 Oct;41(10):1094-9.
19. Van ES MA, van den Berg LH. Alzheimer's disease beyond *APOE*. *Nat Genetics*. 2009;41:1047-1048.
20. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, *et al.* Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* and *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genetics*. 2011 May;43(5):429-435.
21. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan, Buros J, *et al.* Common variants at *MS4A4/MS4A6E*, *CD2AP*, *CD33* and *EPHA1* are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):436-41.
22. Osorio C, Sullivan PM, He DN, Mace BE, Ervin JF, Strittmatter WJ, *et al.* Mortalin is regulated by *APOE* in hippocampus of AD patients and by human *APOE* in TR mice. *Neurobiol Aging*. 2007 Dec;28(12):1853-62.
23. Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev*. 2007 Dec;56(2):384-402.
24. DeKroon RM, Mihovilovic M, Goodger ZV, Robinette JB, Sullivan PM, Saunders AM, *et al.* ApoE genotype-specific inhibition of apoptosis. *J Lipid Res*.2003 Aug;44(8):1566-73.
25. DeKroon R, Robinette JB, Hjelmeland AB, Wiggins E, Blackwell M, Mihovilovic M, *et al.* *APOE4-VLDL* inhibits

- the HDL-activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway via the phosphoinositol phosphatase SHIP2. *Circ Res*. 2006 Oct 13;99(8):829-36.
26. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):900-4. Review. Erratum in: *Nature*. 2004 Mar 25;428(6981):445.
  27. Selkoe DJ, Podlisny MB. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:67-99.
  28. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, *et al*. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005 Apr 12;64(7):1152-6.
  29. DeKroon RM, Osorio C, Robinette JB, Mocanu M, Winnik WM, Alzate O. Simultaneous detection of changes in protein expression and oxidative modification as a function of age and APOE genotype. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1632-1644.
  30. Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1340-60.
  31. Butterfield DA. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res*. 2004 Mar 12;1000(1-2):1-7.
  32. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*. 2007 Sep 1;43(5):658-77.
  33. Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton: CRC Press; 2009.
  34. Dewachter I, van Dorpe J, Spittaels K, Teseur I, Van Den Haute C, Moechars D, *et al*. Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. *Exp Gerontol*. 2000 Sep;35(6-7):831-41.
  35. Apelt J, Ach K, Schliebs R. Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci Lett*. 2003 Mar 27;339(3):183-6.
  36. Arendash GW, Jensen MT, Salem N Jr, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, *et al*. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience*. 2007 Oct 26;149(2):286-302.
  37. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, *et al*. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jun 15;44(12):2051-7.
  38. Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, *et al*. In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jan 1;48(1):136-44.
  39. Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B. Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine*. 2003 Mar 7;21(11-12):1060-5.
  40. Coma M, Serenó L, Da Rocha-Souto B, Scotton TC, España J, Sánchez MB, *et al*. Triflusal reduces dense-core plaque load, associated axonal alterations and inflammatory changes, and rescues cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2010 Jun;38(3):482-91.
  41. George AJ, Holsinger RM, McLean CA, Laughton KM, Beyreuther K, Evin G, *et al*. APP intracellular domain is increased and soluble Aβ is reduced with diet-induced hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*. 2004 Jun;16(1):124-32.
  42. Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, *et al*. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):17972-80.
  43. Diez R, Herbstreith M, Osorio C, Alzate O. 2-D fluorescence difference gel electrophoresis (DIGE). In: Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton: CRC Press; 2009. p. 51-70.
  44. Parker CE, Mocanu V, Mocanu M, Dicheva N, Warren MR. Mass Spectrometry for post-translational modifications. In: Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton: CRC Press; 2009. p. 93-114.
  45. Ernoult E, Gamelin E, Guette C. Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci*. 2008 Oct 13;6:27.
  46. Andersson M, Andren P, Caprioli RM. MALDI imaging and profiling mass spectrometry in neuroproteomics. In: Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton: CRC Press; 2009. p. 115-134.
  47. Information Hyperlinked Over Proteins [sede Web]. Bethesda, MD :IHOP; 2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>.
  48. Hoffmann R, Valencia A. A gene network for navigating the literature. *Nat Genet*. 2004 Jul;36(7):664.
  49. The EMBL Nucleotide Sequence Database [base de datos en Internet]. Cambridge: European Bioinformatics Institute; 2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.
  50. Kanehisa Laboratories. KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Internet]. Kyoto: Kanehisa Laboratory; 2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.genome.jp/kegg/>.

51. PDB Protein Data Bank [Internet]. La Jolla, CA:Research Collaboratory for Structural Bioinformatics;2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en:<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.
52. BioGRID Database of Protein and Genetic Interactions [Internet]. Bethesda MD: thebiogrid.org; 2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://thebiogrid.org/>.
53. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D535-9.
54. The Gene Ontology [Internet]. [S.l.]: geneontology.org; 2011 [acceso 30 de marzo de 2011]. Disponible en:<http://www.geneontology.org/>.
55. Mejía S, Osorio C, Alzate O. An integrated Matlab@-based computer program to visualize and analyze protein interaction networks. En prensa 2010.
56. Swaab DF. Brain aging and Alzheimer's disease, "wear and tear" versus "use it or lose it". *Neurobiol Aging.* 1991 Jul-Aug;12(4):317-24.
57. Casoli T, Spagna C, Fattoretti P, Gesuita R, Bertoni-Freddari C. Neuronal plasticity in aging: a quantitative immunohistochemical study of GAP-43 distribution in discrete regions of the rat brain. *Brain Res.* 1996 Apr 1;714(1-2):111-7.
58. Mirmiran M, van Someren EJ, Swaab DF. Is brain plasticity preserved during aging and in Alzheimer's disease? *Behav Brain Res.* 1996 Jun;78(1):43-8.