

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



**EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA
BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis presentada por la Bachiller:

Alvarez Valdivia, Maria Gracia

Para optar el Título Profesional de

Médico Cirujano

Asesor:

Dr. Núñez Bernal, Cesar Augusto

Arequipa - Perú

2022

DICTAMEN APROBATORIO

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
MEDICINA HUMANA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 14 de Abril del 2022

Dictamen: 005942-C-EPMH-2022

Visto el borrador del expediente 005942, presentado por:

2015100092 - ALVAREZ VALDIVIA MARIA GRACIA

Titulado:

**EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y
NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

1241 - LLERENA CONCHA YOLANDA ANGELICA
DICTAMINADOR



1379 - DEL CASTILLO SOLORZANO NOEMI
DICTAMINADOR



1576 - SALCEDO CATA CORA MARIO ENRIQUE
DICTAMINADOR



EPÍGRAFE

Oración San Francisco de Asís

Oh, Señor, hazme un instrumento de Tu Paz.

Donde hay odio, siembre yo Amor.

Donde haya injuria, Perdón.

Donde haya duda, Fe

Donde haya tristeza, Alegría.

Donde haya desaliento, Esperanza.

Donde haya sombras, Luz.

Oh, Divino Maestro, que no busque ser consolado, sino consolar;

Ser amado, sino amar;

ser comprendido, sino comprender;

Porque:

Dando, es como recibimos;

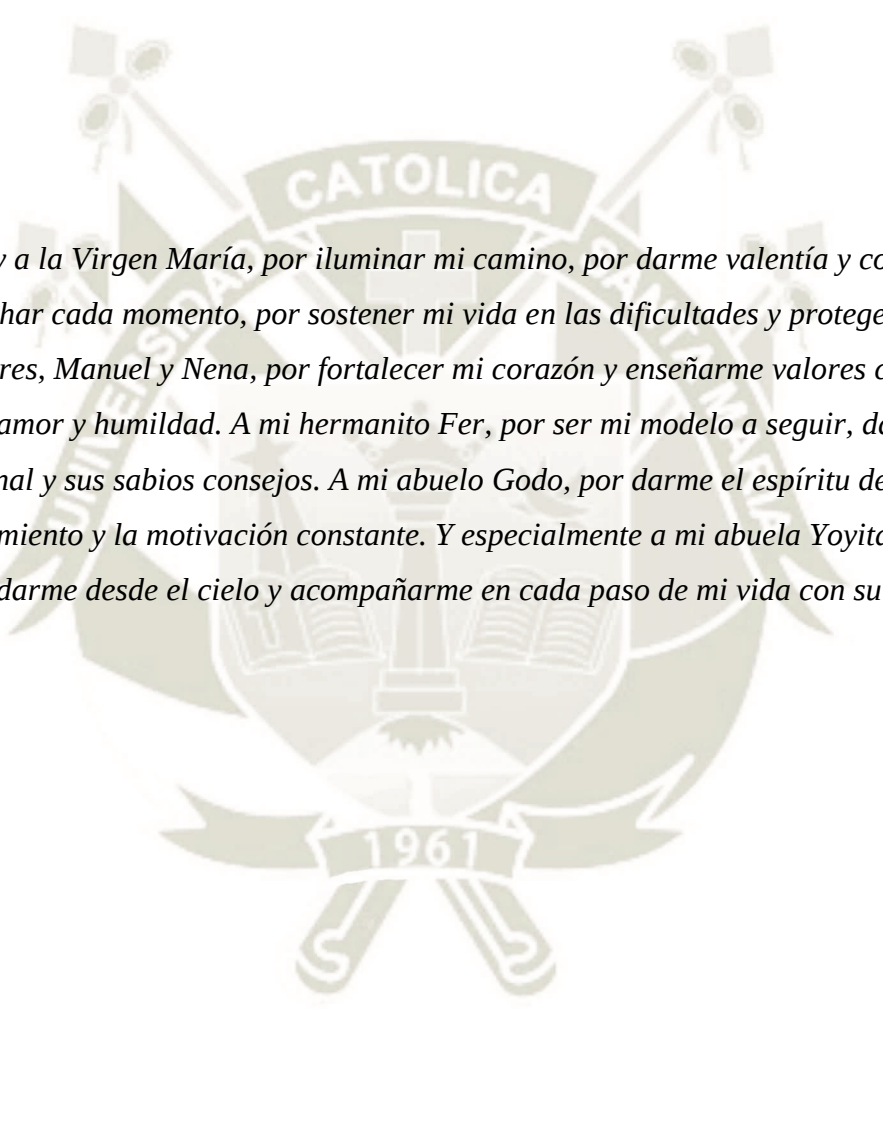
Perdonando, es como Tú perdonas;

Y muriendo en Ti, es como nacemos a la

Vida Eterna.

Amén.

DEDICATORIA



A Dios y a la Virgen María, por iluminar mi camino, por darme valentía y constancia para aprovechar cada momento, por sostener mi vida en las dificultades y protegerme día a día. A mis padres, Manuel y Nena, por fortalecer mi corazón y enseñarme valores con su ejemplo de amor y humildad. A mi hermanito Fer, por ser mi modelo a seguir, darme su apoyo incondicional y sus sabios consejos. A mi abuelo Godo, por darme el espíritu de búsqueda del conocimiento y la motivación constante. Y especialmente a mi abuela Yoyita (QEPD), por cuidarme desde el cielo y acompañarme en cada paso de mi vida con su infinito amor.

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen, por el regalo de la vida y su amor eterno. A mi familia, Manuel, Nena, Fer y mi perrito Machín, por acompañarme en cada momento de mi vida, darme todo su amor e inculcarme valores que me identifican día a día. A mi colegio SSCC, por darme conocimientos y sentimientos de servicio al prójimo. A la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María, por ser mi alma mater donde desarrollé mis estudios académicos. Al Hospital III Goyeneche y Centro de Salud Javier Llosa García por darme la oportunidad de poner en práctica todos mis conocimientos. A CIEM y SOCIMEP por sembrar en mí la semilla de la investigación, conocer diferentes realidades y avivar mi vocación de servicio. Al docente Dr. Diego Valencia, por ser mi mentor, por permitirme descubrir conocimientos y motivarme a continuar en el campo de la investigación. A los docentes Mg. Haruna Barazorda, Dr. Badhin Gómez y Dr. George Galdos por asesorarme, por mostrarme el mundo de la ingeniería molecular y su apoyo en alcanzar los objetivos de mi tesis. A mis asesores Dr. Enrique Salcedo, Dra Yolanda Llerena, Dr. Cesar Núñez y Dra. Noemi Del Castillo por darme los consejos y motivaciones para culminar el presente estudio de investigación.

“Contemplar, vivir y anunciar el amor de Dios” SSCC

RESUMEN

Introducción. Desde el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales (mAbs) y nanocuerpos (VHH), nuevas investigaciones buscan la aplicación de la inmunología en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer (EA), teniendo como blanco de interacción la proteína beta-amiloide (β A), sin embargo, sus resultados aún son expectantes. El objetivo del estudio fue evaluar las interacciones de anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello) sobre las estructuras de la proteína beta-amiloide para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

Materiales y Métodos. Fue un estudio experimental in silico, las estructuras se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB), la simulación de dinámica molecular (DM) se realizó en el software GROMACS v.5.0.5., RMSD (Root mean square deviation), radio de giro (RG) y diagrama de Ramachandran validaron las estructuras, Se hizo un análisis de las fluctuaciones después de la interacción. La predicción de drogabilidad y acoplamiento se realizaron en los servidores PockDrug y PatchDock respectivamente.

Resultados. Las estructuras PDB de mAbs fueron 4XXD (Solanezumab), 5VZY (Crenezumab), 5CSZ (Gantenerumab), de nanocuerpos 1I3V (Llama), 5J57 (Vicuña) y 5U64 (Camello) y de β A fueron 1IYT (Monómero), 2NAO (Trímero) y 5OQV (Tetrámero, Pentámero y Estructura Fibrilar). La DM fue de 10ns; los valores del RMSD, fluctuación RMS, RG y Ramachandran indicaron su buena calidad, estabilidad y naturalidad. El acoplamiento molecular indicó las zonas de interacción y la energía atómica de contacto entre mAbs y VHH frente a las formas de β A, con un valor entre -3.12 y -17.15 kcal/mol.

Conclusión. Se validó los modelos estructurales, la variación conformacional y energía generada por las interacciones moleculares entre los mAbs y VHH frente a las estructuras de la proteína β A, mediante herramientas computacionales. Este estudio contribuye en el planteamiento de nuevos métodos diagnósticos para la EA.

Palabras Clave.

Enfermedad de Alzheimer, Beta-Amiloide, Anticuerpos Monoclonales, Anticuerpos de Dominio Único, In Silico, Simulación de Dinámica Molecular.

ABSTRACT

Introduction. Since the discovery of monoclonal antibodies (mAbs) and nanobodies (VHH), new research has sought the application of immunology in the diagnosis of Alzheimer's Disease (AD), targeting the beta-amyloid protein (β A), however, its results are still expectant. The objective of the study was to evaluate the interactions of monoclonal antibodies (Solanezumab, Gantenerumab and Crenezumab) and nanobodies from camelids (llama, vicuña, and camel) on the structures of beta-amyloid protein for the diagnosis of Alzheimer's disease, using computational tools.

Materials and methods. It was an experimental in silico study, the structures were obtained from the Protein Data Bank (PDB), the molecular dynamics (DM) simulation was performed in the GROMACS v.5.0.5 software, RMSD (Root mean square deviation), radius of gyro (RG) and Ramachandran diagram validated the structures, An analysis of the fluctuations after the interaction was made. Druggability and docking prediction were performed on the PockDrug and PatchDock servers, respectively.

Results. The PDB structures of mAbs were 4XXD (Solanezumab), 5VZY (Crenezumab), 5CSZ (Gantenerumab), of nanobodies 1I3V (Llama), 5J57 (Vicuña) and 5U64 (Camello) and of β A were 1IYT (Monomer), 2NAO (Trimer) and 5OQV (Tetramer, Pentamer and Fiber Structure). The MD was 10ns; RMSD, RMS fluctuation, RG and Ramachandran values indicated their superior quality, stability, and naturalness. Molecular docking indicated the interaction zones and the contact atomic energy between mAbs and VHH versus β A forms, with a value between -3.12 and -17.15 kcal/mol.

Conclusion. The structural models, the conformational variation and the energy generated by the molecular interactions between the mAbs and VHH were validated against the structures of the β A protein, using computational tools. This study contributes to the approach of new diagnostic methods for AD.

Keywords.

Alzheimer's Disease, Beta-Amyloid, Monoclonal Antibodies, Single Domain Antibodies, In Silico, Molecular Dynamics Simulation.

ÍNDICE

DICTAMEN APROBATORIO.....	ii
EPÍGRAFE	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	3
1. Planteamiento Teórico.....	4
1.1. Problema de Investigación.....	4
1.1.1. Enunciado del Problema	4
1.1.2. Descripción del Problema.....	4
1.1.2.1. Área del Conocimiento.....	4
1.1.2.2. Análisis de Variables.....	4
1.1.2.3. Interrogantes Básicas.....	6
1.1.2.4. Tipo de Investigación.....	7
1.1.2.5. Diseño de Investigación	7
1.1.2.6. Nivel de Investigación.....	7
1.2. Justificación del Problema.....	7
1.2.1. Justificación Científica	7
1.2.2. Justificación social	8
1.2.3. Contemporánea	8
1.2.4. Originalidad	8
1.2.5. Factibilidad	8
1.2.6. Justificación personal.....	9
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo General.....	9
2.2. Objetivos Específicos	9
3. Marco conceptual	10
3.1. Enfermedad de Alzheimer	10

3.1.1.	Definición	10
3.1.2.	Historia.....	10
3.1.3.	Epidemiología.....	11
3.1.4.	Impacto	13
3.1.4.1.	Impacto Psicosocial.....	13
3.1.4.2.	Impacto Socioeconómico	13
3.1.5.	Factores.....	14
A.	Factores de Riesgo.....	15
a.	No Modificables	15
b.	Modificables	17
B.	Factores Protectores.....	18
a.	No Modificables	18
b.	Modificables	18
3.1.6.	Fisiopatología.....	19
A.	Hipótesis colinérgica	19
B.	Hipótesis Tau.....	19
C.	Hipótesis de la Cascada Amiloidea	20
3.1.7.	Fases de la Enfermedad de Alzheimer.....	21
A.	Fase Preclínica.....	22
B.	Fase Deterioro Cognitivo Leve	22
C.	Fase Demencial.....	22
3.1.8.	Clínica de la Enfermedad de Alzheimer	22
A.	Síntomas Cardinales	22
B.	Otros signos y síntomas.....	23
3.1.9.	Diagnóstico	23
3.2.	Anticuerpos.....	26
3.2.1.	Anticuerpos Monoclonales	26
3.2.2.	Anticuerpos de cadena pesada (HCAb)	28
3.2.2.1.	Nanocuerpos.....	28
3.3.	Bioinformática.....	29
3.4.	Análisis de antecedentes investigativos.....	33
4.	Hipótesis.....	35
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		36
1.	Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación	37

1.1. Técnicas	37
1.2. Instrumentos	39
1.3. Materiales de verificación	41
2. Campo de Verificación	41
2.1. Ámbito	41
2.2. Temporalidad.....	41
2.3. Unidades de estudio.....	41
3. Estrategias de Recolección de Datos	42
3.1. Organización.....	42
3.2. Recursos	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS	44
1. Estructuras Moleculares	45
2. Análisis de la Dinámica Molecular	48
3. Predicción de los Sitios Activos	58
4. Acoplamiento Molecular	59
5. Validación de Estructuras.....	60
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y COMENTARIOS	61
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Información de las estructuras utilizadas de Protein Data Bank (PDB).....	46
Tabla 3.2. Resultados de los Acoplamientos realizados en PatchDock/ FireDock.	59
Tabla 3.3. Resultados obtenidos de Ramachandran y ProSA server.....	60



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fotografía de Alöis Alzheimer (izquierda) y su paciente Auguste Deter (derecha) (27).	11
Figura 1.2. Prevalencia de demencia en mayores de 60 años (32,33).....	12
Figura 1.3. Punta del iceberg: evaluación de los costos socioeconómicos globales de la enfermedad de Alzheimer y las demencias relacionadas e implicaciones estratégicas para las partes interesadas (44).	14
Figura 1.4. Esquema del riesgo de Demencia y Enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo y protectores, tanto modificables como no modificables (47).	14
Figura 1.5. Cambios conformacionales de la proteína βA y la proteína Tau (107).....	20
Figura 1.6. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer (110).....	21
Figura 1.7. Infografía de las etapas del proceso de diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer (110).	24
Figura 1.8. 2011 Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer. Criterios clínicos básicos para la probable demencia de la enfermedad de Alzheimer (5).	25
Figura 1.9. Dinamismo de los biomarcadores en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer (126,127).	26
Figura 1.10. Humanización de anticuerpos monoclonales (131).	27
Figura 1.11. Nomenclatura de los anticuerpos monoclonales (131).	27
Figura 1.12. Estructura general de los fragmentos de anticuerpo (141).....	29
Figura 3.1. Estructuras obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (PDB)	45
Figura 3.2. Análisis de la Proteína Beta Amiloide (monómero, oligómero y estructura fibrilar).	47
Figura 3.3. RMSD de la Dinámica Molecular de la Proteína Beta-Amiloide.	48
Figura 3.4. RMSD de la Dinámica Molecular de los Anticuerpos Monoclonales contra la Proteína Beta-Amiloide.	49
Figura 3.5. RMSD de la Dinámica Molecular de los Nanocuerpos contra la Proteína Beta-Amiloide.	50
Figura 3.6. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Monómero.	51
Figura 3.7. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Trímero.	52
Figura 3.8. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Tetrámero.	53
Figura 3.9. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Pentámero.	54
Figura 3.10. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de la Proteína Beta-Amiloide.....	55
Figura 3.11. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de los Anticuerpos Monoclonales contra la Proteína Beta-Amiloide.	56
Figura 3.12. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de los Nanocuerpos contra la Proteína Beta-Amiloide.	57

Figura 3.13. Predicción de los Sitios Activos de los Anticuerpos Monoclonales mediante el servidor PockDrug: Pocket..... 58



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia a nivel mundial (60-80% aproximadamente), siendo la principal enfermedad neurodegenerativa progresiva (1). Actualmente, la prevalencia mundial estimada de demencia es de 50 millones de personas y se proyecta que se triplicarán los casos para el 2050 (152 millones de casos), siendo el 60% de personas pertenecientes a países en vías de desarrollo (2).

La EA es un desorden neurológico progresivo irreversible cuya etapa final es la demencia (3), que inicia 20 años o más antes de que aparezcan los síntomas (4). Morfológicamente se presenta atrofia de la corteza cerebral y pérdida neuronal a nivel cortical y subcortical (5). A nivel patológico existen dos características clásicas: el desequilibrio entre producción y eliminación de placas amiloides o seniles provoca la acumulación de proteína beta amiloide siendo un cambio precoz en la cascada neurodegenerativa (6). Además se produce la acumulación de ovillos neurofibrilares formados a partir de filamentos de proteínas Tau altamente fosforiladas asociados a microtúbulos (7). Así mismo, los factores de riesgo no modificables más importantes son la edad avanzada, la historia familiar y el componente genético (8); junto con otros factores encontrados como la alteración en la producción de neurotransmisores (hipofunción colinérgica e hiperfunción glutamatérgica), el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina, entre otros (9).

El principal componente de las placas seniles son los péptidos de beta amiloides (β A) (36 a 43 aminoácidos), producidos a partir de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) a través de varios procesos enzimáticos (10). Éste es un producto metabólico natural; sin embargo, un desequilibrio entre la producción y metabolización, con la consecuente agregación de péptidos, origina la acumulación de β A, siendo la “hipótesis de la cascada amiloidea” un posible factor causal de dicha enfermedad (11). Estos β A se pueden acumular en oligómeros (entre 2 a 6 péptidos) y fibrillas (los cuales forman ensambles intermedios insolubles), estos últimos conforman fibras insolubles de placas amiloides avanzadas (12). Se ha demostrado que las estructuras más neurotóxicas son los oligómeros solubles y los amiloides intermedios (13).

Al no existir un tratamiento modificador de la enfermedad para la progresión inevitable de este trastorno neurodegenerativo, varios estudios de investigación tienen el objetivo de buscar diagnósticos accesibles más tempranos antes de la aparición de la etapa clínica, siendo un nuevo

enfoque de la Iniciativa de Prevención del Alzheimer (API) (14). Actualmente, existen nuevas investigaciones de inmunodetección con el empleo de anticuerpos monoclonales (15) y el uso de nanocuerpos (16), siendo estos últimos solubles, estables, de tamaño reducido, alta afinidad de unión a epítomos, producción rentable, baja inmunogenicidad y versátiles en su manipulación (17). Hoy por hoy, la nanomedicina juega un rol importante en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas al atravesar la barrera hematoencefálica (18). Únicamente, los estudios experimentales no son suficientes, aunque ayuda a conocer las propiedades estructurales en un promedio de espacio y tiempo. Los estudios mediante simulaciones computacionales exploran situaciones a diferente tiempo y escala de longitud, y pueden complementar perfectamente experimentos en laboratorio, dando énfasis a la rama de la medicina experimental y la bioinformática clínica (19).

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar las interacciones moleculares de tres anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y tres nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) con las estructuras de la proteína beta-amiloide, en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO



1. Planteamiento Teórico

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Enunciado del Problema

Evaluación in silico de interacciones de anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos sobre la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

1.1.2. Descripción del Problema

1.1.2.1. Área del Conocimiento

- 1.1.2.1.1. Área general: Ciencias de la Salud
- 1.1.2.1.2. Área específica: Medicina Humana
- 1.1.2.1.3. Especialidad: Ingeniería Biomédica
- 1.1.2.1.4. Línea: Neurología

1.1.2.2. Análisis de Variables

	Variable	Indicador	Unidad / Categoría	Escala
Obtención de estructuras	Proteína beta amiloide (monómero)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Proteína beta amiloide (trímero)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Proteína beta amiloide (tetramero, pentámero y estructura fibrilar)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Anticuerpo monoclonal (Solanezumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta

	Anticuerpo monoclonal (Gantenerumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Anticuerpo monoclonal (Crenezumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Llama)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Vicuña)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Camello)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
Simulación de dinámica molecular	Número de moléculas	Presencia de moléculas	Átomos	Cuantitativa discreta
	Volumen	Volumen de distribución	L/kg	Cuantitativa continua de razón
	Temperatura	Directo	Grados Celsius (C°)	Cuantitativa continua de intervalo
	Tiempo de optimización	Directo	Nanosegundos (ns)	Cuantitativa discreta
Análisis de las interacciones moleculares	Desviación de la raíz cuadrada media	RMSD (root-mean-square deviation)	RMSD (nm)/ Tiempo (ps)	Cuantitativa continua de razón
	Fluctuación cuadrática media	RMSF (root-mean-square fluctuation)	RMSF (nm)/ residuos (aminoácidos)	Cuantitativa continua de razón

	Radio de giro	Distancia del radio de giro	Radio de giro (nm)/Tiempo (ps)	Cuantitativa continua de razón
	Sitios activos	Presencia de sitios activos	Número de sitios activos	Cuantitativa discreta
	Interacciones de Van-der-Waals	Energía atómica de contacto	Kcal/mol ⁻¹ – kJ/mol ⁻¹	Cuantitativa continua de razón
	Número de residuos de la región favorecida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Número de residuos de la región permitida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Número de residuos de la región atípica	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Calidad general del modelo estructural	Directo	Z-Score	Cuantitativa continua de intervalo

1.1.2.3. Interrogantes Básicas

- ¿Cuál es la capacidad estructural y estabilidad molecular de los diferentes modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello); tras su obtención, minimización y optimización?
- ¿Cuál es el efecto de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello) frente a los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, mediante simulación de dinámica molecular?

- ¿Cuáles son los sitios activos para los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab)?
- ¿Cómo serán las interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello) con los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide?
- ¿Cómo es la calidad general y la validación de los diferentes modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello)?

1.1.2.4. Tipo de Investigación

Investigación descriptiva básica

1.1.2.5. Diseño de Investigación

Experimental

1.1.2.6. Nivel de Investigación

Nivel experimental in silico exploratorio

1.2. Justificación del Problema

1.2.1. Justificación Científica

La presente investigación busca explorar una nueva rama diagnóstica y terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, utilizando como blanco la proteína beta-amiloide, metabolito natural considerado el principal factor causal en la fisiopatología de esta demencia. Para ello, el uso de anticuerpos monoclonales como parte de la inmunoterapia pasiva, es la orientación terapéutica más reciente de los estudios farmacológicos específicos de EA. Asimismo, el empleo de nanocuerpos o anticuerpos homodiméricos de cadena pesada producidos en camélidos naturalmente (VHH), demuestran propiedades superiores tanto en el peso molecular, solubilidad, estabilidad, penetración de la barrera hematoencefálica, etc.

En consecuencia, el presente estudio brindará la visualización e interacción de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos con el blanco objetivo de la proteína beta-amiloide, aportando en el conocimiento de las bases físico-químicas que nos permite las herramientas computacionales de la bioinformática.

1.2.2. Justificación social

El aumento de la población de edad avanzada en nuestra región y en América Latina, ha potenciado la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en los últimos años. Al ser una enfermedad neurodegenerativa progresiva incurable, es de vital importancia el diagnóstico temprano, el seguimiento continuo y la búsqueda de tratamientos más específicos y efectivos.

1.2.3. Contemporánea

La pandemia de COVID-19 ha desatendido las principales enfermedades crónicas de los adultos mayores pertenecientes a centro de atención residencial, provocando un infradiagnóstico y abandono de tratamiento de las enfermedades más frecuentes, siendo la principal demencia la enfermedad de Alzheimer.

1.2.4. Originalidad

La presente investigación busca dar importancia al área de la neuroinmunología en el curso de la enfermedad de Alzheimer, al comparar la visualización diagnóstica y la interacción molecular terapéutica tanto de anticuerpos monoclonales como nanocuerpos frente a la proteína beta-amiloide, fomentando la innovación tecnológica en el área de las enfermedades neurodegenerativas, a través de un estudio preliminar exploratorio.

1.2.5. Factibilidad

En el contexto de la pandemia por COVID-19, el área de la investigación ha resaltado el empleo de las herramientas computacionales bioinformáticas como parte de la adaptación virtual de los estudios, dando una fácil aplicación, mejor accesibilidad y reducción de tiempos empleados para el análisis de interacciones moleculares en la bioinformática clínica.

1.2.6. Justificación personal

Personalmente, mediante el presente estudio pretendo impulsar este tipo de investigaciones para consolidar conocimientos en el área científica y social, colaborando en la salud pública de la población de edad avanzada de nuestra región que aqueja la enfermedad de Alzheimer, dando luz a la reciente tecnología biomédica terapéutica y diagnóstica con el empleo de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos, como la llama y la vicuña, auquénidos de nuestro país.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar las interacciones de anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos sobre las estructuras de la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtener las estructuras de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) mediante la base de datos Protein Data Bank.
- Minimizar y optimizar las estructuras de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) mediante herramientas bioinformáticas.
- Evaluar mediante simulaciones de dinámica molecular de los anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.
- Analizar los sitios activos para los anticuerpos monoclonales.

- Analizar las interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales, nanocuerpos frente a la proteína beta-amiloide mediante herramientas computacionales.
- Validar las estructuras de la proteína beta-amiloide, los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos y evaluar la calidad general de los modelos estructurales mediante servidores bioinformáticos.

3. Marco conceptual

3.1. Enfermedad de Alzheimer

3.1.1. Definición

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo irreversible del deterioro cognitivo cuya etapa final es la demencia y la muerte (5). Este desorden neurológico está considerado como parte de un síndrome de demencia amnésica multidominio, refiriendo un conjunto de cambios neuropatológicos que se caracteriza por presentar una acumulación de placas amiloides o seniles, y como consecuencia la acumulación de ovillos neurofibrilares formados a partir de filamentos de proteínas Tau altamente fosforiladas asociados a microtúbulos (6,7), provocando cambios morfológicos como la atrofia de la corteza cerebral y pérdida de neuronas a nivel cortical y subcortical (3). La EA es la principal demencia en adultos mayores, que inicia 20 o más años antes de que aparezcan los síntomas (4).

Es importante resaltar que la ausencia del síndrome de demencia amnésica multidominio no descarta la presencia de cambios neuropatológicos de EA, y viceversa; por lo tanto, la definición de esta entidad clínico-patológica aún sigue en cuestionamiento gracias a los nuevos avances en el diagnóstico preclínico de EA a través de biomarcadores (20,21).

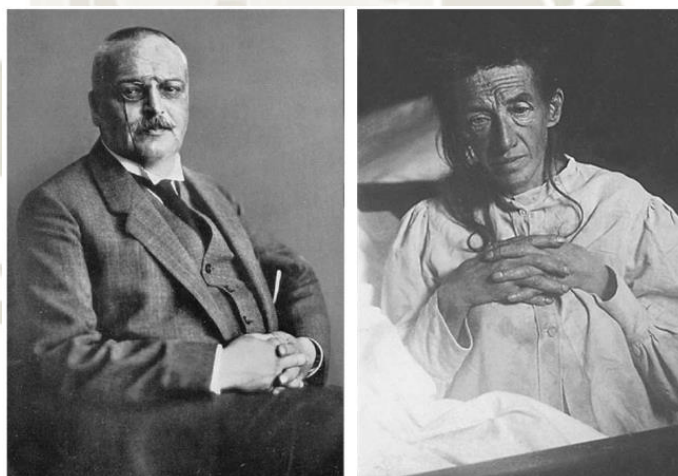
3.1.2. Historia

En 1906 en un asilo en Frankfurt (Alemania), el psiquiatra y neuropatólogo Aloïs Alzheimer, descubrió una condición de demencia en una paciente de 51 años (Auguste Deter), que presentaba deterioro progresivo de la memoria, lenguaje,

desorientación, delirios y cambios psicosociales (22,23) (Figura 1.1). Tras su muerte, Alzheimer realizó una autopsia encontrando atrofia cerebral difusa y “cambios particulares en grupos de células corticales” a través de la histología (placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y angiopatía amiloide) siendo la primera caracterización de esta demencia (24). En 1910, su mentor Emil Kraepelin acuñó el término “Enfermedad de Alzheimer” a este trastorno neurodegenerativo presenil (menores de 65 años) en su escrito *Handbook of Psychiatry* (25), y la comunidad médica utiliza este apelativo hasta el día de hoy.

El estudio de Blessed y colaboradores fue el primero en correlacionar las características clínicas y los cambios histopatológicos cerebrales de EA. Posteriormente, las investigaciones de Katzman en 1976, mostraron que la EA senil y presenil eran histopatológicamente parecidas, siendo esta enfermedad la cuarta causa de muerte en adultos mayores en esa época (26).

Figura 1.1. Fotografía de Alöis Alzheimer (izquierda) y su paciente Auguste Deter (derecha) (27).



3.1.3. Epidemiología

La EA es la principal causa de demencia a nivel mundial (60-80%) (1). Actualmente la prevalencia mundial de demencia es de 50 millones de personas y se proyecta que se triplicarán los casos para el 2050 (2).

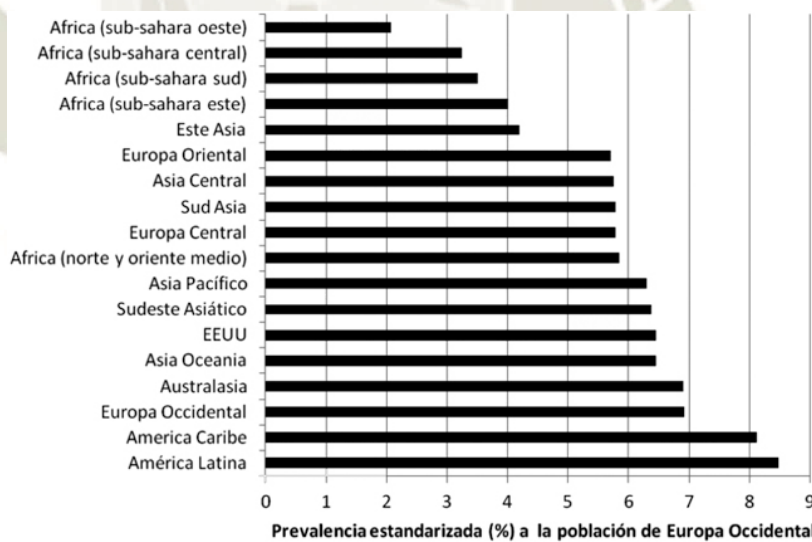
En los países occidentales, se observa una disminución de la incidencia de demencia en hombres, gracias a los niveles de educación, prevención y tratamiento de los factores de riesgo de enfermedad vascular (28,29). Por otro lado, en los países en

vías de desarrollo y bajos niveles socioeconómicos, se presentan el 60% de casos de demencia, debido al aumento del grupo etario de adultos mayores y aumento de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y patologías cardiovasculares (2).

La mortalidad por EA aumentó un 145% entre el 2000 y 2017, siendo la quinta causa de muerte en mayores de 65 años en EE.UU., debido a un mayor registro de defunciones y prevalencia de EA en adultos mayores (1). La mortalidad es debida a la vulnerabilidad y mayor riesgo que conlleva la demencia frente a otros trastornos como infecciones, que finalmente ocasionan la muerte (30,31).

En Latinoamérica, en los últimos 10 años, se ha reporta una alta prevalencia de demencia (6.2-12.1%) en mayores de 65 años, y se proyecta que se cuadruplique la cifra para el 2050 (32) (Figura 1.2). Existen varios estudios, donde se observa una amplia fluctuación de las tasas de prevalencia, que pueden ser atribuidos a los diferentes criterios de diagnóstico de demencia.

Figura 1.2. Prevalencia de demencia en mayores de 60 años (32,33).



En el Perú, actualmente no existe estadística acerca de la prevalencia e incidencia de demencia; sin embargo, en el 2014 MINSA reporta 5 mil casos de demencia, incluyendo EA, de 1.2 millones de adultos mayores (34), y en el 2019 reporta 200 mil casos de EA en pacientes mayores de 60 años (35). En Lima en 2008, un estudio en 1532 individuos presentó una prevalencia de 6.85% de demencia, siendo EA en un 56.2%, incrementándose con la edad, el sexo femenino y bajo nivel educativo

(36). En Huancayo, un estudio del 2016-2017, la prevalencia de demencia fue de 9.9% (37).

Las tasas de incidencia y prevalencia de EA son variables gracias a los biomarcadores de detección, el diagnóstico del deterioro cognitivo leve y la búsqueda de terapias modificadoras de la enfermedad, permitiendo la inclusión de etapas más tempranas de EA (20,38).

3.1.4. Impacto

3.1.4.1. Impacto Psicosocial

La EA es la causa principal de discapacidad, dependencia y mortalidad de los adultos mayores a nivel mundial (39). La familia y el cuidador son la piedra angular en el seguimiento, tratamiento y soporte de estos pacientes, evitando el internamiento y manteniéndolo en comunidad (40). El apoyo social y familiar median los factores del paciente con EA y la carga del cuidador (41). No obstante, ellos sufren consecuencias físicas, psicológicas (ansiedad y depresión), sociales y económicas directos (costo de medicamentos) e indirectos (pago de servicios) que deben afrontar solos (42). La coyuntura actual por la pandemia COVID-19, ha traído cambios sustanciales en nuestra vida, que afectaría a los pacientes con EA. El uso de mascarilla, provocando la dificultad de reconocimiento de personas, generando angustia y poca familiaridad en el paciente, que conduce a la poca integración social y soledad en el adulto mayor (43).

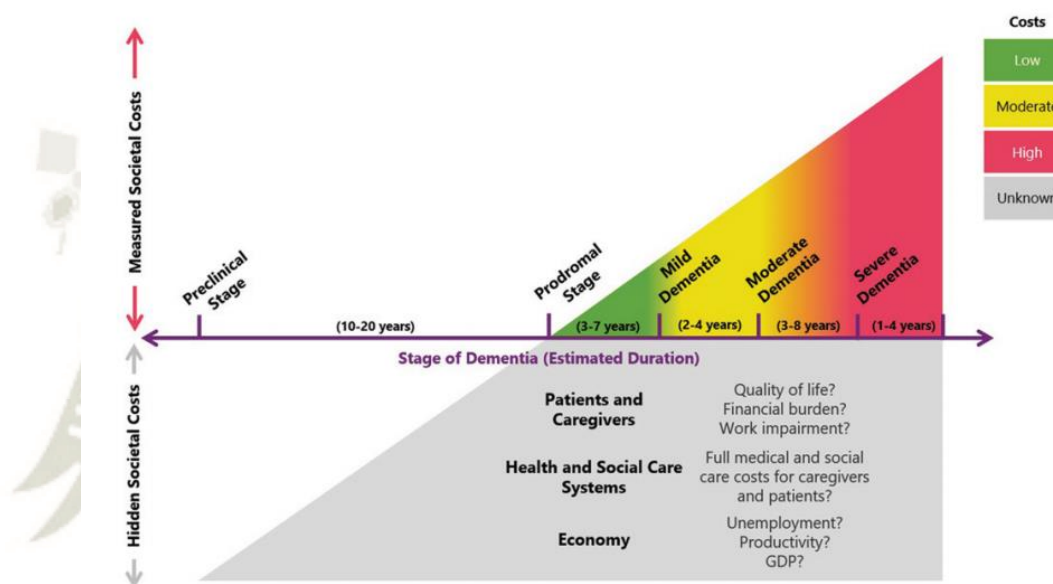
3.1.4.2. Impacto Socioeconómico

Entre el 2010 y 2015, a nivel mundial se vio un incremento de los costos de la demencia en 35%, siendo un gasto de US\$ 818 mil millones, 1.1% del Producto Bruto Interno (PBI) mundial (44). Los costos sociales representan una porción del costo total (45) (Figura 1.3), y se calculan los costos con el diagnóstico. A medida que progresa la enfermedad, incrementan costos (46).

Los costos directos se enfocan en los cuidados sociales (cuidadores, centros de día, hogares y asilos), tratamiento (medicamentos), y cuidados médicos (junto con la comorbilidad asociada) (1). Sin embargo, existen costos no medibles u

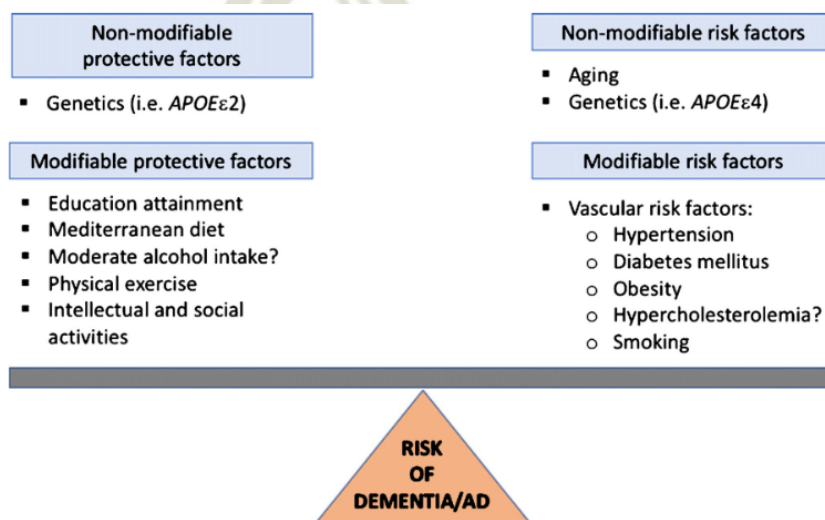
ocultos como indirectos (pérdida de productividad, cuidado informal, etc.), finanzas del hogar (reducción de ahorros, explotación financiera, costos de bolsillo, desempleo, etc.) que aparecen desde la fase preclínica y van aumentando conforme progresa la patología (45).

Figura 1.3. Punta del iceberg: evaluación de los costos socioeconómicos globales de la enfermedad de Alzheimer y las demencias relacionadas e implicaciones estratégicas para las partes interesadas (45).



3.1.5. Factores

Figura 1.4. Esquema del riesgo de Demencia y Enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo y protectores, tanto modificables como no modificables (47).



A. Factores de Riesgo

a. No Modificables

- **Edad**

Este trastorno es considerado una enfermedad de la edad avanzada al presentarse el doble de casos cada cinco años de edad desde los 65 años (2). La prevalencia de EA aumenta con la edad, con 3% de 65 a 75 años, 17% de 75 a 84 años, y 32% en mayores de 84 años (1); a partir de los 90 años se produce una disminución debido a la esclerosis del hipocampo (48). La edad acompañada de la neuropatología, comorbilidad y presentación clínica; aumenta su potencial como factor de riesgo, debido al aumento de la esperanza de vida (49). Si la reserva cerebral se da a una edad más temprana, gracias a la educación y actividad intelectual, la resiliencia cognitiva (cambios neuropatológicos sin demencia) mejora, reduciendo la tasa de demencia en la vejez (50,51).

- **Género**

Los dos tercios de la población afectada por la EA son mujeres y solo un tercio son varones. A los 65 años, los varones tienen 6.3% y las mujeres 12% de riesgo de por vida de desarrollar EA (52). Esta prevalencia se explica por la reducción de estrógenos en la menopausia (53), así como la presencia de APoE $\epsilon 4$ (54).

- **Genéticos**

Los factores genéticos corresponden al 70 % de los factores de riesgo para EA (55). Para su identificación se empleó estrategias: estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), estudio de genes candidatos y análisis de ligamiento (56). GWAS reportó 20 factores genéticos que intervienen en la inflamación, metabolismo del colesterol y vías de reciclaje de vesículas endosomales (57). La combinación de mutaciones genéticas potencia el riesgo poligénico de EA, duplicando la predicción de casos por casualidad (58). Otros estudios de secuenciación de próxima generación revelan otros factores genéticos de alto riesgo, pero baja frecuencia, contribuyendo en la patogénesis de EA (59).

a) Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano: Presenta una herencia autosómica dominante, siendo una forma atípica familiar de presentación entre los 30 y 60 años (1.5-2% de casos). Clínicamente se identifica al presentar una demencia con disfunción visual de orden superior, ejecutiva y déficit de lenguaje (60). A través del análisis de ligamiento se identificaron regiones de los cromosomas 1, 14 y 21, con el descubrimiento de tres genes involucrados en EA (61–64).

- **Gen precursor de la proteína amiloide (APP):** en el cromosoma 21q, que codifica el producto APP, provoca la producción del péptido βA de la vía amiloidogénica (65). Se asocian 30 mutaciones, 10-15% de EA familiar de inicio temprano (60), con edad promedio de 49 años (66).
- **Gen de presenilina 1 (PSEN1):** en el cromosoma 14q, codifica la proteína transmembrana PSEN1, que es partícipe del complejo proteico de escisión de la γ -secretasa, aumentando la liberación de péptidos βA_{42} (67). Se asocian 150 mutaciones, 50% de EA familiar de inicio temprano, con edad promedio de 43 años (66).
- **Gen de presenilina 2 (PSEN2):** en el cromosoma 1q, codifica la proteína PSEN2, promoviendo la apoptosis y la neurodegeneración (68). Se asocian 20 mutaciones, la más rara en EA familiar de inicio temprano (69).
- **Trisomía 21:** síndrome de Down, presenta una copia adicional del gen APP (cromosoma 21 brazo largo), que produce aumento en la producción de proteína APP, presentando cambios neuropatológicos y clínicos de EA entre los 40 y 50 años (70).

b) Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío: Es la forma típica esporádica de EA. Se presenta en 58-79% y en mayores de 60 años, donde influyen factores genéticos y ambientales, siendo más compleja y poligénica (71).

- **Gen Apolipoproteína E (APoE):** Este gen polimórfico se encuentra en el cromosoma 19, y codifica una proteína portadora de lípidos unido a lipoproteínas de baja densidad hacia células del organismo, permitiendo la reparación de sitios de lesión. Presenta tres alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$; siendo la última la de mayor riesgo para EA esporádico de inicio tardío (72). El

gen APoE se ha identificado en 50-60% de casos EA (20-25% de adultos mayores sanos). Un alelo representa de dos a tres veces más probabilidad de EA y dos alelos hasta 8 a 12 veces más probabilidad (73). La eliminación del alelo puede reducir la incidencia de EA hasta 7%, en relación a la fracción atribuible de la población (74).

b. Modificables

- **Médicos**

La presentación de comorbilidades con EA propicia el desarrollo de demencia mixta por la falta de resiliencia (cambios neuropatológicos sin demencia) y reparación (75). Este tipo de demencia se caracteriza por la presencia de placas y ovillos junto con infartos microvasculares que producen el deterioro cognitivo, también se puede presentar en la demencia vascular y el daño cerebrovascular es frecuente en EA (76,77). La EA con infartos lacunares por afecciones cerebrovascular, presenta una clínica más severa de deterioro cognitivo que los casos de EA sin lesiones cerebrovasculares (78). Por otro lado, la hipertensión induce una mayor tasa de demencia temprana (79).

La diabetes y el síndrome metabólico se asocian a aterosclerosis e infartos cerebrales, siendo la glucosa factor de toxicidad que induce la neurodegeneración y anomalías microvasculares (80). En EA se da un estado cerebral resistente a la insulina por la activación anormal del receptor (81).

La relación entre hipercolesterolemia y EA es controversial, al encontrarse estudios donde la hipercolesterolemia leve propicia el aumento de deposición de placas β A de forma temprana independiente del genotipo APoE (82), y el uso de estatinas reduce los cambios neuropatológicos de EA (83). En cambio, otros estudios indican no encontrar cambios en el riesgo de demencia (84).

Estudios indican un mayor riesgo de EA con clínica en fase temprana asociado a la obesidad en la mediana edad (85). Sin embargo, la “paradoja de la obesidad” es la disminución del índice de masa corporal (IMC) en la vejez antes del desarrollo de demencia, como un efecto de causalidad inverso (47).

La depresión en la mediana edad, junto con el aumento de niveles de cortisol, por estrés principalmente, y trastornos del sueño, son factores de riesgo para la demencia en la vejez, incluida EA (86,87).

- **Estilo de Vida**

Un estudio de cohortes de autopsias de Honolulu-Asia Aging Study (HAAS) reveló la relación del tabaquismo a mediana edad y el aumento de placas β A corticales (88). El hábito de fumar aumenta de 2 a 4 veces el riesgo de EA en no portadores del gen APoE ϵ 4, por ello el abandono del hábito tabáquico es una forma de prevención de demencia (89). Otro aspecto importante es la convivencia social. La soledad y el estado civil soltero o viudo (a) inducen un mayor riesgo de desarrollar demencia (90).

B. Factores Protectores

a. No Modificables

El componente genético influye en el desarrollo de EA. Estudios recientes del gen APoE alelo ϵ 2 indican que retrasa la fase clínica de EA y reduce los cambios neuropatológicos de la edad, disminuyendo el riesgo un 50% (91).

b. Modificables

- **Actividades sociales**

La interacción social puede prevenir o ralentizar el desarrollo de demencia, en cambio la limitada actividad social se asocia al riesgo de demencia (92). Sin embargo, la progresión de la enfermedad lleva a menos motivación para participar socialmente, la familia se aleja y mayor aislamiento del paciente (49).

- **Alimentación y Deporte**

Una alimentación saludable, como la dieta mediterránea (frutas, verduras, cereales integrales, pescado, aceite de oliva) es un factor preventivo protector para la EA al ralentizar el depósito de placas β A, hipometabolismo cerebral, independiente del genotipo APoE y riesgo vascular (93). La adherencia a este tipo de dieta podría reducir la mortalidad en los pacientes con EA (94). El ejercicio tiene efecto neuroprotector al inducir la liberación del factor

neurotrófico derivado del cerebro, reducir cortisol y riesgo vascular (95), independiente del efecto protector de la alimentación saludable (96). Un estudio indica que la ingesta de alcohol leve a moderado (vino) en la vejez, reducen el riesgo de desarrollo de EA (efecto protector) (97), sin embargo, es evidencia científica cuestionable.

- **Educación**

El aumento de la educación provoca la disminución de la prevalencia por edad de demencia (98). Las próximas generaciones tendrán una mayor exposición a factores protectores siendo más saludables, mayor capacidad de recuperación y con una cognición más saludable que sus antecesores (49). La educación y funcionamiento cognitivo superior juegan un rol protector para EA al tener mayor tolerancia de cambio neuropatológico antes del desarrollo de demencia. Esta capacidad se considera como una “reserva cognitiva” (99).

3.1.6. Fisiopatología

La fisiopatología de la EA es incierta y con múltiples controversias. Para explicar la etiología, se han formulado diferentes teorías e hipótesis como la hipótesis colinérgica, la hipótesis Tau y la hipótesis de la cascada amiloidea (7).

A. Hipótesis colinérgica

A inicios del desarrollo de EA se da una disfunción del sistema colinérgico, mediada por el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Este neurotransmisor juega un rol importante en la función cognitiva: disminución de ACh y nAChR y aumento de acetilcolinesterasa (AChE), traduciéndose en el déficit de memoria (100).

B. Hipótesis Tau

La proteína Tau se encuentra en las neuronas intracelular y participa en la regulación del crecimiento externo de neuritas, transporte axonal y estabilidad de microtúbulos (101). Esta proteína es producida por el gen del cromosoma 17, y en EA se presentan 3 isoformas y 4 repeticiones (102). En EA, la proteína Tau se hiperfosforila anormalmente, provocando la formación de filamentos helicoidales y ovillos neurofibrilares, provocando inestabilidad de los microtúbulos y muerte celular (102)

(Figura 1.5). Estas formaciones se diseminan neurona a neurona desde la corteza entorrinal hasta el hipocampo y neocorteza (103). Este proceso neuropatológico es inducido por la proteína βA como un efecto sinérgico de disfunción neuronal (104).

C. Hipótesis de la Cascada Amiloidea

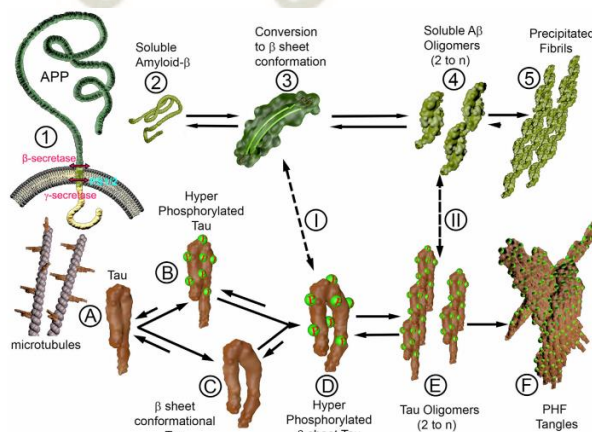
Esta es la hipótesis más importante de la EA, donde la acumulación de la proteína βA (36 a 43 aminoácidos), se encuentra en el centro de la etiopatogenia (105). La APP es una proteína de transmembrana tipo 1, que en el sistema nervioso central, presenta un proceso de división a través de dos vías (10):

Vía no amiloidogénica: donde la enzima α -secretasa escinde la APP, generando un producto secretado extracelular sAPPa y un fragmento C83 de 83 aminoácidos C-terminal unido a la membrana. Y tras la acción de la enzima g-secretasa, la C83 produce otro fragmento p3 y abandona el dominio intracelular APP unido a la membrana (AICD) (10).

Vía amiloidogénica: donde la enzima b-secretasa (BACE-1 enzima 1 de escisión de APP sitio b) y el complejo γ -secretasa, generan un producto intracelular APP restante y varias proteínas beta-amiloide de diferentes longitudes (βA_{38} , βA_{40} , βA_{42}) y piroglutamato βA . Estas βA se liberan en LCR y posteriormente en sangre (106).

En esta patología se presenta un desequilibrio en la producción y eliminación del metabolito, produciendo la acumulación de βA en diversos estados de agregación: oligómeros (entre 2 a 6 péptidos), protofibrillas, fibrillas (que forman ensambles intermedios insolubles) y placas amiloides seniles insolubles avanzadas depositadas en diferentes áreas cerebrales (11) (Figura 1.5).

Figura 1.5. Cambios conformacionales de la proteína βA y la proteína Tau (107).

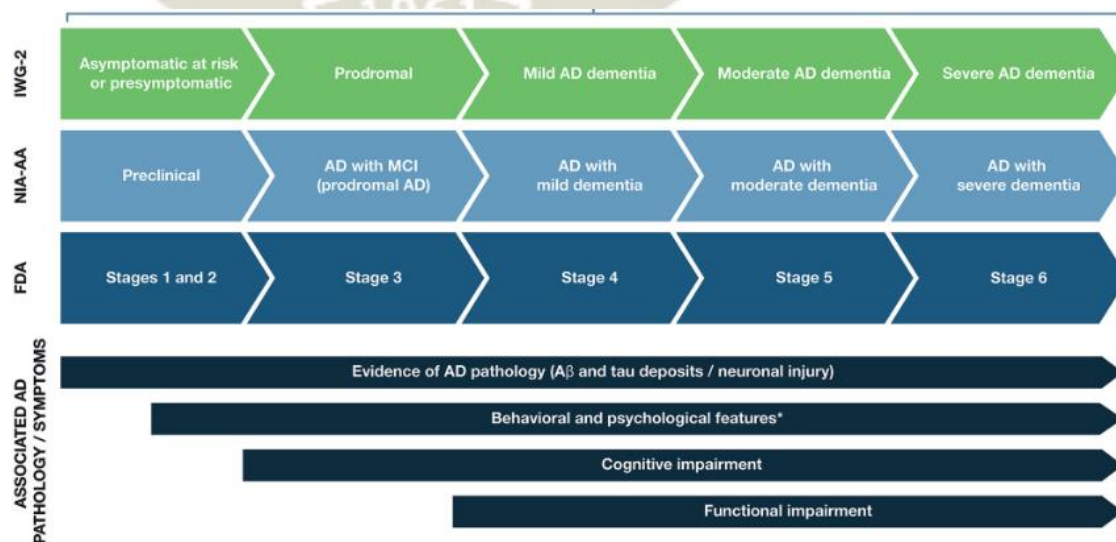


Este proceso provoca una cascada neurodegenerativa que llevan a la degeneración sináptica y pérdida neuronal, siendo la “hipótesis de la cascada amiloidea” un posible factor causal de dicha enfermedad (12). Este proceso anormal se complementa con las mutaciones genéticas de APP, PSEN1 y PSEN2 que producirían EA de inicio temprano (105). La β A42 es más hidrofóbica y con mayor predisposición a la autoagregación que la β A40 (106). Se ha demostrado que las estructuras más neurotóxicas son los oligómeros solubles y los amiloides intermedios (13). Los oligómeros solubles provocarían la disfunción sináptica en modelos animales (108), conduciendo a una nueva teoría e hipótesis fisiopatológica. El estrés oxidativo y la inflamación predisponen a la acumulación y deposición de proteína β A (109).

3.1.7. Fases de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo que pasa por diferentes etapas desde la fase preclínica asintomática hasta la última fase de demencia (2). Hay varios sistemas de clasificación (Grupo de Trabajo Internacional – IWG, Instituto Nacional sobre el Envejecimiento-Asociación de Alzheimer - NIA-AA, Administración de Alimentos y Medicamentos – FDA) con diferentes nomenclaturas resumidas en la figura 1.6, donde se centran en los cambios neuropatológicos (proteína beta-amiloide y Tau) y la clínica (déficit cognitivo, funcional y de comportamiento) (110).

Figura 1.6. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer (110).



A. Fase Preclínica

Esta fase presenta solo cambios neuropatológicos, sin la presencia de clínica, deterioro cognitivo o funcional y sin afección de la vida diaria (111). Tiene una duración de 6 a 10 años, varía según edad de aparición. Su progresión a deterioro cognitivo/conductual leve es multifactorial (112).

B. Fase Deterioro Cognitivo Leve

Se presenta con un deterioro de la memoria a corto plazo que progresa con la disminución de otros dominios cognitivos, no obstante, el paciente aún permanece independiente en su vida diaria (113). Se puede o no acompañar del deterioro conductual leve con la aparición de síntomas neuropsiquiátricos continuos. Se da en pacientes mayores de 50 años, y precede al deterioro cognitivo y la demencia (114).

C. Fase Demencial

Esta etapa progresa de leve, moderado y severo, desarrollando déficit cognitivo más grave, interfiriendo la vida diaria: dependencia y asistencia constante (20).

3.1.8. Clínica de la Enfermedad de Alzheimer

A. Síntomas Cardinales

- a. **Deterioro de la Memoria:** Es el síntoma inicial más frecuente en demencia por EA. Se produce una afectación de la memoria declarativa episódica, en el hipocampo y lóbulo temporal medial, siendo la memoria a corto plazo más afectada en EA temprana que la memoria a largo plazo (115). La memoria procedimental y aprendizaje motor (zonas subcorticales) y la memoria semántica (zonas temporales neocorticales) suelen afectarse más tardíamente (116).
- b. **Deterioro de la Función ejecutiva y juicio/resolución de problemas:** Pasan desapercibidos por el paciente (anosognosia), y se necesita el testimonio de familiares e informantes. Se presenta una progresiva incapacidad para completar tareas (117). La pérdida de conocimiento suele ser progresiva, y acompañada o no de alteraciones del comportamiento, depresivas y psicóticas (118).
- c. **Deterioro de otros dominios cognitivos:** Las deficiencias visuoespaciales aparece precozmente y las deficiencias de lenguaje aparecen tardíamente; sin embargo,

ambos progresan de forma insidiosa. Ambos pueden presentarse como síntoma inicial en las presentaciones atípicas de EA (5).

- d. Trastornos conductuales y de estado de ánimo:** Los síntomas neuropsiquiátricos son frecuentes en la etapa media y tardía de EA. Tienen un amplio espectro: apatía, falta de integración social, irritabilidad, depresión y ansiedad. Las alteraciones de comportamiento se presentan como agitación, agresión, deambulación, psicosis (alucinaciones, delirios, etc.), euforia y desinhibición (119).

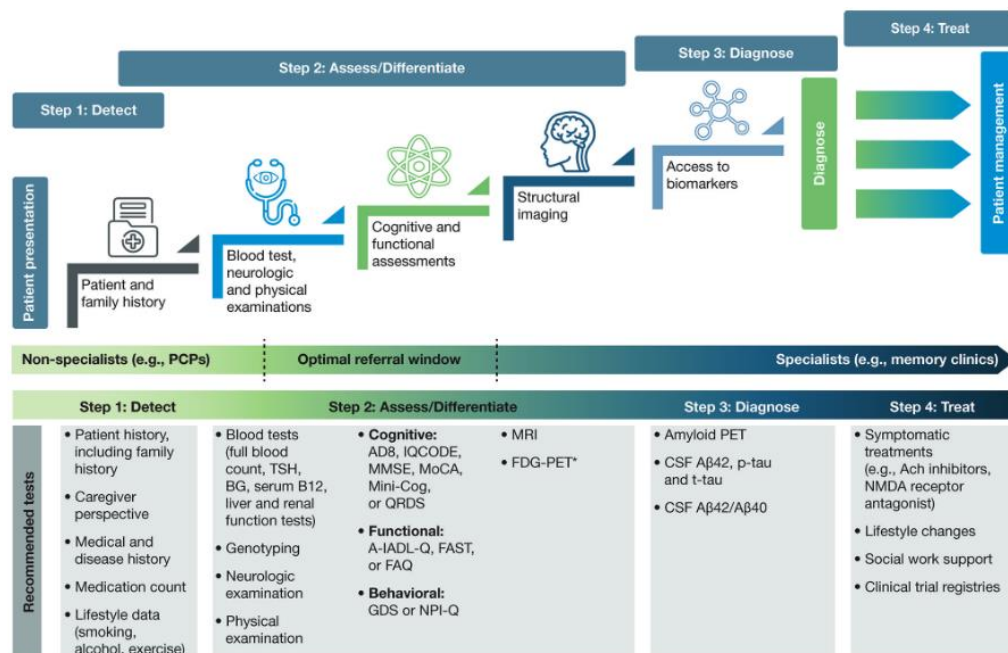
B. Otros signos y síntomas

- a. Apraxia/Dispraxia:** La ausencia o dificultad para realizar tareas motoras aprendidas aparecen en la etapa tardía de EA después del déficit de memoria y lenguaje. Se presenta progresivamente: actividades motoras complejas y dificultad en la realización de actividades de la vida diaria, provocando dependencia (120).
- b. Disfunción olfativa:** Es un síntoma común en EA de difícil detección (pruebas simples y evaluación olfativa), pero es usada como herramienta diagnóstica (121).
- c. Trastornos del sueño:** Las alteraciones de sueño-vigilia son muy frecuentes como insomnio y sueño fragmentado, se anticipan al deterioro cognitivo en pacientes con solo presencia de biomarcadores de depósito de proteína βA (122).
- d. Convulsiones:** Se presentan en 10-20% de pacientes con EA en etapas tardías. La presentación atípica presenta más convulsiones, siendo una EA de inicio temprano con patrón de herencia autosómico dominante, se presentan convulsiones de tipo focal no motora con alteración de la conciencia (lóbulo temporal medial) (123).
- e. Signos motores:** Las mioclonías y los signos motores piramidales y extrapiramidales ocurren en la etapa tardía de EA. La incontinencia y reflejos primitivos (reflejo de hocico, agarre) son más frecuentes en EA etapa tardía (124).

3.1.9. Diagnóstico

Para un diagnóstico temprano de EA, se propone una serie de pasos a seguir: 1) detectar, 2) evaluar/diferenciar, 3) diagnosticar y 4) tratar (Figura 1.7).

Figura 1.7. Infografía de las etapas del proceso de diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer (110).



Para la detección, es fundamental el reconocimiento temprano en la atención primaria de la aparición de signos y síntomas sugerentes de EA (Figura 1.8), realizando una historia clínica detallada con antecedentes familiares, factores de riesgo y protectores, polifarmacia, etc (5). Es importante el testimonio de los familiares y cuidadores para una mejor detección (125).

La evaluación clínica se centra en el examen cognitivo neurológico de la población adulta mayor (118). Para ello se emplean diferentes escalas de medición tanto para evaluar el dominio cognitivo (AD8 Ascertain Dementia 8, IQCODE Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly, MMSE MiniMental State Examination, MoCA Montreal Cognitive Assessment, Mini-Cog General Practitioner Assessment of Cognition, QRDS Quick Dementia Rating System), el dominio funcional (A-IADL-Q Amsterdam Instrumental Activities of Daily Living Questionnaire, FAST functional assessment staging test, FAQ Functional Activities Questionnaire), y conductual (GDS global deterioration scale, NPI-Q Neuropsychiatric Inventory Questionnaire.). Estas evaluaciones deben acompañarse del examen físico, genotipificación, exámenes de laboratorio (hemograma, función tiroidea, glucosa, vitamina B12, función hepática y lipídica)

e imagenología (resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa FDG-PET) (110).

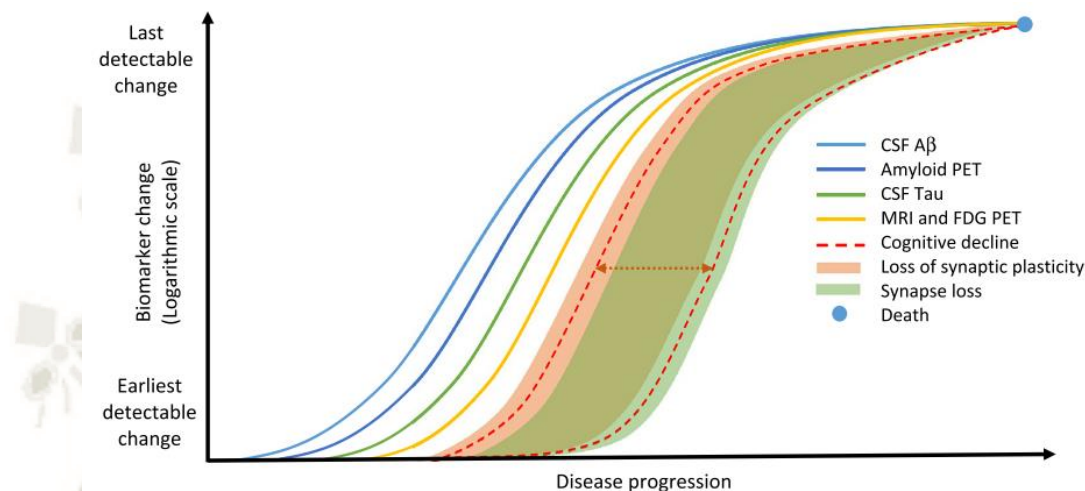
Figura 1.8. 2011 Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer. Criterios clínicos básicos para la probable demencia de la enfermedad de Alzheimer (5).

2011 Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer	
Se puede hacer un diagnóstico de demencia de EA probable cuando el paciente	
1. Cumple con los criterios para la demencia.	
2. Tiene las siguientes características	
a. Inicio insidioso: los síntomas tienen un inicio gradual durante meses o años, no repentinos durante horas o días.	
b. Historia clara de empeoramiento de la cognición por informe u observación	
c. Los déficits cognitivos iniciales y más prominentes son evidentes en la historia y el examen en una de las siguientes categorías	
i. Presentación amnésica: presentación sindrómica más común de la demencia AD; los déficits deben incluir deterioro en el aprendizaje y recuerdo de la información aprendida recientemente; también debe ser evidencia de disfunción cognitiva en al menos otro dominio cognitivo	
ii. Presentaciones no amnésicas	
1) Presentación del idioma: las deficiencias más destacadas se encuentran en la búsqueda de palabras; Deben presentarse déficits en otros dominios cognitivos	
2) Presentación visuoespacial: los déficits más prominentes se encuentran en la cognición espacial, incluida la agnosia de objetos, el reconocimiento facial deficiente, la simultagnosia y la alexia; Deben estar presentes déficits en otros dominios cognitivos	
3) Disfunción ejecutiva: los déficits más prominentes son el razonamiento, el juicio y la resolución de problemas deficientes; Deben estar presentes déficits en otros dominios cognitivos	
3. El diagnóstico de probable demencia por EA no debe aplicarse cuando hay evidencia de	
a. Enfermedad cerebrovascular concomitante sustancial, definida por un historial de accidente cerebrovascular relacionado temporalmente con la aparición o empeoramiento del deterioro cognitivo; o la presencia de infartos múltiples o extensos o carga severa de hiperintensidad de la sustancia blanca	
b. Características principales de la demencia con cuerpos de Lewy distintas de la demencia misma	
c. Características destacadas de la demencia frontotemporal variante conductual	
d. Características destacadas de afasia primaria progresiva variante semántica o afasia primaria progresiva variante no fluida o gramática	
e. Evidencia de otra enfermedad neurológica activa concurrente, o una comorbilidad médica no neurológica o el uso de medicamentos que podrían tener un efecto sustancial en la cognición.	

En el diagnóstico, se han propuesto diferentes criterios para su identificación en etapas preclínicas con el uso de biomarcadores, para el diagnóstico precoz antes de la aparición de la clínica neurodegenerativa de esta enfermedad (5). Jack y colaboradores realizaron una clasificación descriptiva independiente de la temporalidad y patogénesis, denominado sistema ATN ("A" de proteína beta-amiloide βA , "T" de Tau y "N" de Neurodegeneración), resaltando su identificación en la tomografía de emisión de positrones (PET) y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (126) (Figura 1.9). La reducción de los niveles de proteína βA en LCR es el

biomarcador que más temprano se presenta, seguido en PET, incluso antes de la aparición de la demencia (127).

Figura 1.9. Dinamismo de los biomarcadores en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer (126,127).



3.2. Anticuerpos

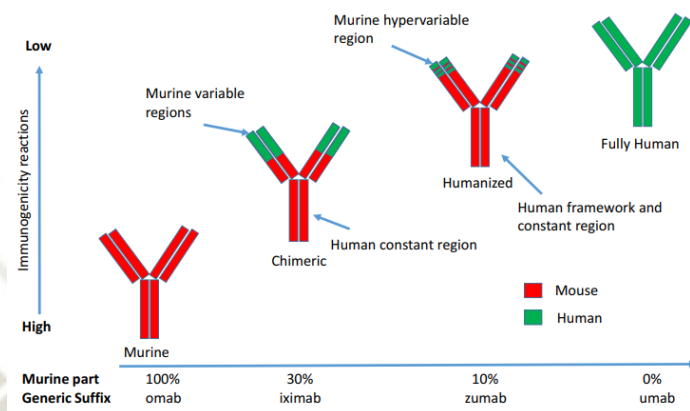
Los anticuerpos son moléculas glucoproteicas heterotetrámicas, llamadas inmunoglobulinas (128). Gracias a Landsteiner en el siglo XX, se describió los anticuerpos que actuaban contra antígenos específicos (129). Estas moléculas son producidas por las células B y plasmáticas, participando en la inmunidad humoral (130). Su estructura está compuesta por 4 cadenas, 2 ligeras (L) y 2 pesadas (H), idénticas y unidas por puentes disulfuro formando una “Y” (130). Las funciones son efectora (extremo carboxiterminal de cadena pesada o dominio constante C) y de reconocimiento y unión a antígenos (extremo aminoterminal, dominio variable V) (128). Las cadenas ligeras presentan un solo dominio C mientras que las cadenas pesadas presentan de tres a cuatro dominios. Se pueden encontrar cinco isotipos: IgA, IgD, IgE, IgM, IgG (128).

3.2.1. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se usan para el tratamiento y diagnóstico. Georges Köhler y César Milstein en 1975, lograron obtener un hibridoma al fusionar líneas celulares de mieloma con células B, el cual producía anticuerpos específicos para antígenos conocidos (131). El muromonab CD3 fue el primer mAb con licencia para la prevención del rechazo del trasplante de riñón, pero era murino y por lo tanto generó riesgo de inmunogenicidad, es por ello que la nueva generación de

anticuerpos busca ser humanizado o totalmente humano para superar la inmunogenicidad (132) (Figura 1.10).

Figura 1.10. Humanización de anticuerpos monoclonales (133).



En 2004, se aprobó el primer anticuerpo totalmente humano, adalimumab, para el tratamiento de artritis reumatoide (133).

Para la nomenclatura, desde 1995 el grupo de expertos de Denominaciones Comunes Internacionales de la OMS publica reglas de denominación para los mAb (134), siendo el último publicado en el 2017 (135). La denominación está compuesta por un prefijo, un subtema y un sufijo (Figura 1.11):

- El prefijo “random” se refiere al nombre del fármaco
- El subtema o infijo se refiere al objetivo (cardiovascular, hueso, tumor, etc). El origen del mAb desde el 2017 fue eliminado, y anteriormente se indicaba si era humanizado, quimérico, etc.
- El sufijo “mab” se refiere a anticuerpo monoclonal.

Figura 1.11. Nomenclatura de los anticuerpos monoclonales (133).

Prefix	Substem A	Meaning	Substem B	Meaning	Stem
Random	a	rat	-b(a)-	bacterial	-mab
	e	hamster	-c(i)-	cardiovascular	
	i	primate	-f(u)-	fungal	
	o	mouse	-k(i)-	interleukin	
	u	human	-l(i)-	immunomodulating	
	xi	chimeric	-s(o)-	bone	
	zu	humanized	-tox(a)-	toxin	
	axo	rat/mouse hybrid	-t(u)-	tumor	
	xizu	chimeric/humanized hybrid	-v(i)-	viral	

- A. Solanezumab (LY2062430):** anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que tiene como epítipo la región media del péptido β A (residuos 16-26), siendo el sitio de nucleación para la oligomerización. Fue desarrollada por la empresa farmacéutica Eli Lilly & Co. Su objetivo es anti- β A en monómeros e inhibidor de agregación (terapia modificadora de EA leve moderada) (136).
- B. Crenezumab (MABT5102A, RG7412):** anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 que tiene como epítipo la región media del péptido β A (residuos 16-24), tanto para oligómeros, fibrillas y placas, con una afinidad hacia los oligómeros solubles hasta 10 veces, siendo el principal componente de la neurotoxicidad. Fue desarrollada por la empresa farmacéutica Genentech y Roche. Su objetivo es anti- β A en oligómeros y bloqueador/estimular desagregación de β A (terapia modificadora de EA) (137).
- C. Gantenerumab (O4909832, RG14502):** anticuerpo monoclonal completamente humano IgG1 con epítipo en la región N-terminal (péptido 8 y 9) y central (péptido 24) del péptido β A de las fibrillas. Fue desarrollada por la empresa farmacéutica Roche. Su objetivo es anti- β A en fibrillas con mayor afinidad y especificidad (terapia modificadora de EA) (138).

3.2.2. Anticuerpos de cadena pesada (HCAb)

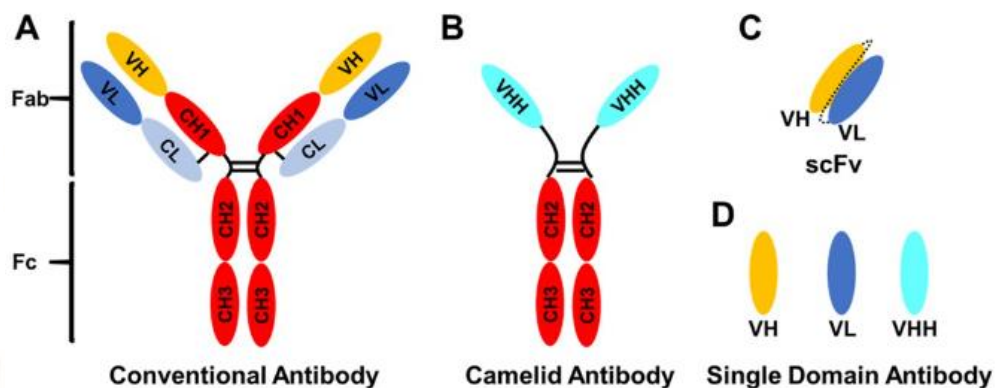
Los anticuerpos de cadena pesada (HCAb) se encuentran exclusivamente en camélidos (camello, dromedario, llama), los cuales se caracterizan por no presentar las cadenas ligeras como los anticuerpos convencionales conocidos (139). Además, se unen al antígeno solo por un único dominio variable VHH (139). El descubrimiento de esta molécula abrió campo en la inmunología molecular y la ingeniería de anticuerpos (140).

3.2.2.1. Nanocuerpos

Los nanocuerpos son aquellos dominios variables (VHH) de los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos (HCAb), que son sintetizados por camélidos (camellos, llamas y dromedarios) (139). Estos dominios VHH reconocen los antígenos mediante un dominio único (sdAb) de ~130 aminoácidos (~14kDa) siendo el fragmento natural más pequeño disponible, con alta afinidad y

especificidad (141,142). Son anticuerpos IgG que carecen de cadenas ligeras y del dominio constante (CH1) de las cadenas pesadas (143) (Figura 1.12).

Figura 1.12. Estructura general de los fragmentos de anticuerpo (139).



Los VHH son más hidrofílicos que los IgG convencionales, siendo solubles en ausencia de cadena ligera (139). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR regiones de Ab que interactúan con antígeno) de VHH son más largas (~16-18 hasta 25 aminoácidos) que VH convencional (~12 aminoácidos), como CDR1 y CDR3 (17). Este mayor tamaño compensa la ausencia de tres CDR de la cadena ligera, teniendo una superficie de interacción más grande para los antígenos, además, permite una mayor variedad de conformaciones de CDR (143).

3.3. Bioinformática

3.3.1. Definición

La biología computacional o bioinformática es una disciplina y tecnología de plataforma que tienen como objetivo el análisis e interpretación de datos biológicos (19), formulando criterios biológicos aplicados en el área experimental. Gracias al Proyecto Genoma Humano en los años 70, esta ciencia se ha abierto campo en el área de las biomédicas (144). A través de esta ciencia, se busca la investigación interdisciplinaria entre las ciencias informáticas y las ciencias experimentales de la vida como la biología y biomédica (bioquímica, biología celular, biología del desarrollo, genética, genómica, fisiología) teniendo como fundamento las matemáticas, la física, la química, la estadística, entre otras (19). El fundamento de

esta disciplina es la generación de evidencia científica basada en principios físico-químicos a través del uso de bases de datos, aplicando métodos bioinformáticos para la solución de dilemas de las ciencias biológicas, y la predicción de modelos estructurales de moléculas biológicas y complejos de interacción en procesos celulares para comprender su funcionamiento a través de representaciones de los sistemas biológicos, mediante el uso de herramientas computacionales (145).

3.3.2. Herramientas computacionales

Mediante el uso de software y hardware, la bioinformática procesa el gran tamaño de información biológica (minería de datos), la velocidad de cálculos y el empleo eficiente de tiempo (146). Las herramientas computacionales son los programas informáticos y las diferentes bases de datos disponibles en línea utilizados en bioinformática, que son aplicados en el análisis de secuencias de ADN y proteínas, utilizados en centros de investigación, laboratorios biomédicos, industrias farmacéuticas y centros de bioinformática (19). Estos recursos necesitan de sistemas operativos y lenguajes de programación para su aplicación, teniendo el sistema operativo Linux, y lenguajes de programación como Python, Java, C, C++, etc (146). Para la adaptabilidad de los usuarios e investigadores del sistema operativo de Windows, se habilitó el Subsistema de Windows para Linux (WSL) y el programa Ubuntu que proporciona la interface de programación y uso de comandos como en el sistema operativo Linux (147).

La información biológica utilizada en la bioinformática se encuentra disponible en línea para toda la comunidad (148). Para la evaluación genómica y de nucleótidos, se emplea la International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), donde se incluye las bases de datos del DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), National Center for Biotechnology Information (NCBI), etc (149). Para las investigaciones en proteínas, se tienen las bases de datos de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), UniProt, etc (150). En algunos casos, el investigador no encuentra la información que necesita, y para ello emplea el método del secuenciamiento lineal masivo (151).

3.3.3. Diseño, obtención y modelamiento de proteínas

El conocimiento y predicción de la estructura de una proteína en su forma tridimensional, posibilita la comprensión del mecanismo de acción y participación molecular en los sistemas biológicos (152). Para la predicción de la estructura proteica (PSP) se emplean dos metodologías: modelado basado en plantillas (TBM) y predicción de estructura de novo, que se sustentan en bases de datos de secuencias y estructuras (153). Para la obtención de la estructura computacional con resolución se emplean métodos como cristalografía de rayos X, criomicroscopía electrónica, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), los cuales serán almacenados en bases de datos (154). La teoría del PSP es el descubrimiento del estado nativo de las proteínas en forma de estructuras tridimensionales, en condiciones fisiológicas “in vivo” (155). Para la búsqueda conformacional de estos modelos estructurales, se usan los métodos de Monte Carlo (MC) y la Dinámica Molecular (MD) (153).

3.3.4. Mecánica Molecular y Dinámica Molecular

La mecánica molecular (MM) pertenece al modelado molecular matemático donde plasma las moléculas en forma de esferas unidas por resortes, aplicados dentro de un sistema, con energía cambiante en contraste de la resistencia de las partículas, al inicio y al final de una simulación de desenvolvimiento de las moléculas dependiente del tiempo (156). La simulación de Dinámica Molecular (SDM) es una simulación molecular computacional mediante el uso de la bioinformática que permite explorar el espacio conformacional de péptidos y proteínas y su interacción en medios nativos para predicciones físico-químicas de interacciones moleculares (157). La SDM, mediante ecuaciones de velocidad y de acuerdo con la fuerza física ejercida en cada partícula, permite efectuar un evento biológico en pequeños tiempos de integración, bajo el concepto de una simulación (153). Este procedimiento inicia con una configuración molecular, continúa con la descripción de las interacciones atómicas y el modelamiento, posteriormente se ejecuta una simulación y muestra el análisis de la trayectoria (158). Tras realizar este procedimiento, hay diferentes cálculos de análisis de la calidad estructural de las trayectorias como:

- Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD): es una medida que resulta de la diferencia de valores estimados y valores observados, siendo dos coordenadas atómicas superpuestas (159).
- Fluctuación cuadrática media (RMSF): es una medida del desplazamiento de un átomo, molécula, residuos, en relación con estructura de referencia (160).
- Radio de giro (R_g): es la raíz cuadrada media de la distancia de los elementos de dispersión desde el centro de una masa en donde se muestra sin cambios en la inercia rotacional alrededor de un eje del centro de masa (161).

3.3.5. Análisis bioinformático

El concepto de Big Data cobra importancia en el manejo de gran cantidad de información en el área de la bioinformática (162). La minería de datos es la metodología empleada para el análisis de este volumen exponencial de información a través del empleo de software y servidores en línea orientados a las investigaciones biológicas, dentro de ellas se encuentra el área de medicina (163). Este análisis permite replicar su metodología por su alta calidad y confiabilidad, siendo empleado en múltiples investigaciones en la actualidad (19). Dentro de los servidores utilizados en la presente investigación se encuentran PockDrug, PatchDock/FireDock, Ramachandran – RAMPAGE y ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.3.6. Bioinformática clínica

Actualmente, la bioinformática abarca nuevas áreas de las ciencias médicas de la mano de las tecnologías ómicas (164). Esta nueva área es el futuro de la investigación de las ciencias biomédicas, presentando una conexión con la medicina personalizada de precisión o medicina genómica (145).

Esta área se encuentra orientada a la medicina clínica en busca de estrategias de diagnóstico a través del uso de biomarcadores genéticos y estrategias de tratamiento a través del desarrollo de nuevos fármacos (19). Dentro de las aplicaciones en la ciencia médica se encuentra el análisis de genomas, determinación estructural de proteínas a partir de la genómica, acoplamiento o docking molecular (interacciones

ligando-receptor como en la farmacología computacional) y la dinámica molecular (para mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades) (165).

3.4. Análisis de antecedentes investigativos

A nivel internacional

Autor: Zhi-Ting Sun, Chi Ma, Guang-Jian Li, Xiang-Yu Zheng, Yi-Tong Hao, Yu Yang, y Xu Wang.

Título: *Aplicación de fragmentos de anticuerpos contra βA con énfasis en la aplicación combinada con nanopartículas en la enfermedad de Alzheimer.*

Resumen: “La EA es la más común de los trastornos neurodegenerativos. El péptido βA juega un rol importante en la patogénesis, al producir un desequilibrio entre la producción y eliminación de esta proteína, provocando cambios clínicos de neurodegeneración y demencia. Las últimas investigaciones tuvieron como objetivo el uso de la inmunoterapia en EA con anticuerpos monoclonales, sin embargo, no se encontraron beneficios o se vieron efectos adversos. No obstante, tres fragmentos de anticuerpos (scFv, Fab y de dominio único) presentaron mejores ventajas. Además, las nanopartículas juegan el rol de portadores ya que facilitan la entrada de fármacos por la barrera hematoencefálica, importante para el tratamiento. Sun y colaboradores realizan una revisión de la aplicación combinada de nanopartículas y fragmentos de anticuerpos contra la proteína βA tanto para el diagnóstico y tratamiento de EA” (166).

Autores: Massih Khorvash, Nick Blinov, Carol Ladner-Keay, Jie Lu, Judith M. Silverman, Ebrima Gibbs, Yu Tian Wang, Andriy Kovalenko, David Wishart, Neil R. Cashman.

Título: *Interacciones moleculares entre el anticuerpo 5E3 específico del oligómero monoclonal y sus aditivos beta amiloides.*

Resumen: “La proteína βA en su forma oligomérica (βAO) se considera la más neurotóxica en la EA. Sin embargo, las interacciones moleculares entre anticuerpos específicos y la proteína βAO aún se desconocen. Khorvash y colaboradores realizan el estudio de la interacción de un anticuerpo monoclonal m5E3 (fragmento variable Fv5E3) y el epítipo estructural de la proteína βAO mediante simulaciones de dinámica

molecular y acoplamiento. Se vio una alta afinidad por la proteína β AO, pero una baja afinidad con monómeros u fibrillas de la β A. Este estudio proporciona la base de conocimiento para propiciar la mutagénesis del anticuerpo m5E3 para mejorar su especificidad y afinidad, así como la capacidad de desagregar la proteína β AO y protofilamentos” (167).

Autores: Kazuma Murakami, Maki Tokuda, Takashi Suzuki, Yumi Irie, Mizuho Hanaki, Naotaka Izuo, Yoko Monobe, Ken-ichi Akagi, Ryotaro Ishii, Harutsugu Tatebe, Takahiko Tokuda, Masahiro Maeda, Toshiaki Kume, Takahiko Shimizu y Kazuhiro Irie.

Título: *Anticuerpo monoclonal con especificidad conformacional para un confórmero tóxico de amiloide β 42 y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer*

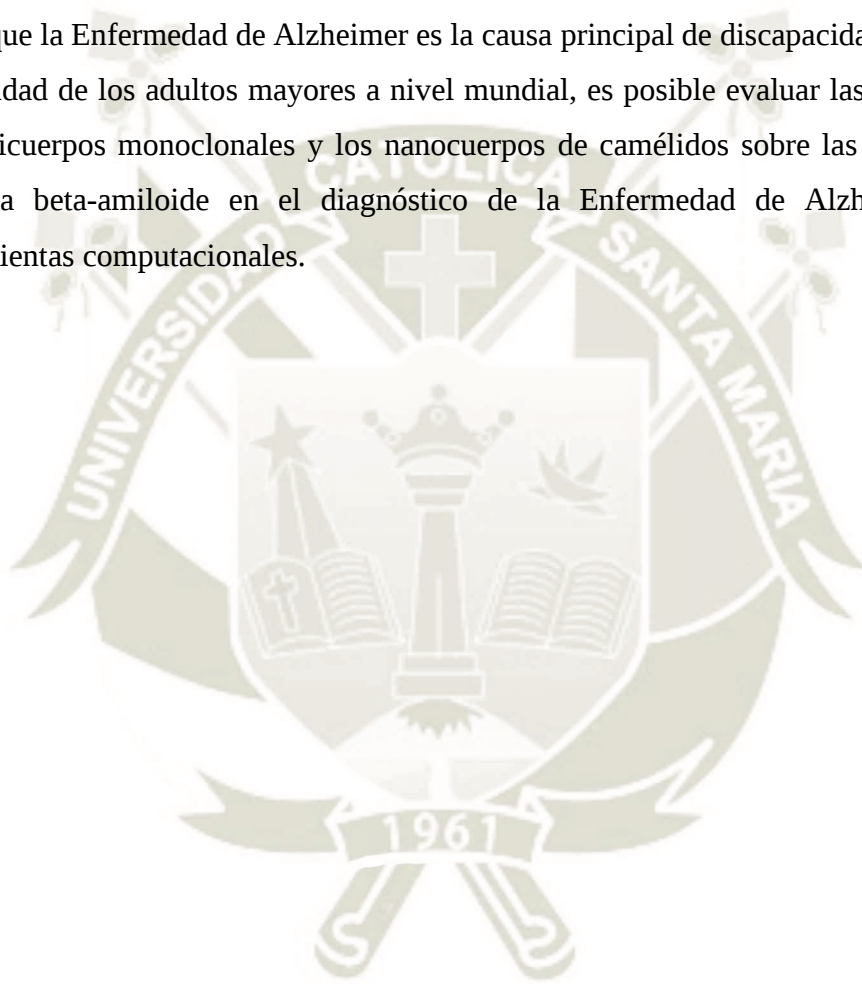
Resumen: “La proteína beta-amiloide (β A42) sufre un proceso de oligomerización en la fase temprana de la EA, sin embargo, los anticuerpos específicos para la forma monomérica y fibrilar de la proteína pueden realizar un sobrediagnóstico. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de anticuerpos específicos para la forma oligomérica neurotóxica de la proteína β A42 para el diagnóstico precoz de la EA. El anticuerpo 24B3 (giro en Glu22 y Asp23) reconoce dímero β A42 que forma oligómeros más estables y neurotóxicos que el monómero. Este anticuerpo reconoce la neurotoxicidad, mientras que el 4G8 y 82E1 no logran reconocer. Además, la proporción de β A42 (detectada por ELISA sándwich mediante los anticuerpos 24B3 y 82E1) en líquido cefalorraquídeo en EA fue significativamente mayor que el grupo control. Finalmente, Murakami y colaboradores concluyen que el anticuerpo 24B3 puede ser un candidato para el diagnóstico y tratamiento de la EA” (168).

4. Hipótesis

Alternativa Ha: Existe interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.

Nula Ho: No existe interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.

Dado que la Enfermedad de Alzheimer es la causa principal de discapacidad, dependencia y mortalidad de los adultos mayores a nivel mundial, es posible evaluar las interacciones de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos sobre las estructuras de la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.





CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación

1.1. Técnicas

1.1.1. Obtención y Preparación de las Estructuras

En el presente estudio, se realizará la búsqueda de estructuras de la proteína beta-amiloide en la base de datos del Protein Data Bank (RCSB-PDB), seleccionando aquellas que contengan las formas de monómero, trímero, tetramero, pentámero y estructura fibrilar. Además, se realizará la búsqueda de los anticuerpos monoclonales seleccionados: Solanezumab, Crenezumab y Gantenerumab. Y finalmente se realizará la búsqueda de los nanocuerpos de camélidos, seleccionando aquellos pertenecientes a la Llama, Vicuña y Camello.

Todas estas estructuras serán visualizadas y analizadas a través del programa UCSF Chimera, para su preparación previa antes de la Dinámica Molecular.

1.1.2. Simulación de Dinámica Molecular

En la presente estudio, se realizará simulaciones de dinámica molecular de 10 ns en el programa GROMACS v.5.0.5 de las estructuras de la proteína beta-amiloide, los tres anticuerpos monoclonales y los tres nanocuerpos monoclonales, utilizando el campo de fuerza OPLSAA (169) para las proteínas y modelo de agua SPC216 (170). Las simulaciones de dinámica molecular se realizarán bajo el colectivo canónico NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante).

La temperatura será constante a $T=309.65\text{K}$ ($36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) mediante el acoplamiento a un termostato de Nose-Hoover, con un tiempo de acoplamiento de $t=0.01\text{ps}$ (171). Se utilizará un paso de integración de 2ps. Las interacciones de Lennard-Jones se calcularán utilizando un punto de corte de 10 Å. Se ubicará la proteína en el centro de una caja cúbica con 1.5 Å del centro de la proteína a los alrededores, se adicionarán moléculas de agua llegando a contener ~40,000 átomos. Así mismo se añadirán iones para neutralizar cada sistema. Se realizará una minimización de energía a 200 000 ps (picosegundos) usando el algoritmo de descenso más bajo, seguida por una simulación de dinámica molecular de 10 ns (nanosegundos) con restricciones armónicas en los átomos pesados de las proteínas para equilibrar agua e iones.

1.1.3. Análisis de la Dinámica Molecular

Posteriormente, se realizará el análisis de la convergencia mediante RMSD (root-mean-square deviation), RMSF (root-mean-square fluctuation) y el radio de giro. Finalmente, las trayectorias e imágenes serán examinadas con el programa UCSF Chimera.

1.1.4. Predicción de la Drogabilidad

Para la identificación de los bolsillos o pockets se utilizará el servidor PockDrug, que predice la drogabilidad (valor de modulación de un blanco mediante la interacción con un posible agente terapéutico). Los archivos PDB de los anticuerpos monoclonales que actuarán como receptores, se cargarán en el servidor y se seleccionará el método *“Druggability prediction using proteins”* para estimar el bolsillo utilizando una distancia umbral de 5.5 Å.

1.1.5. Acoplamiento Molecular

Los archivos de salida del proceso de simulación de dinámica molecular, de cada proteína, anticuerpo monoclonal y nanocuerpo serán convertidos (de archivo *.gro a *.pdb) serán utilizados para los acoplamientos en el servidor Patchdock (Algoritmo de acoplamiento molecular basado en principios de complementariedad de forma). Se realizarán 24 acoplamientos anticuerpo/nanocuerpo-proteína. Posterior al docking, se realizará el refinamiento en FireDock (Fast Interaction Refinement in Molecular Docking) de 1000 candidatos como blancos terapéuticos. Finalmente, se considerará el primer modelo estructural del refinamiento como el mejor candidato, así como datos sobre la energía global, interacciones de Van de Waals atractivo/repulsivo, energía de contacto atómico y enlaces de hidrógenos.

1.1.6. Validación de Estructuras

Las validaciones de las estructuras obtenidas se harán por medio del diagrama de Ramachandran – RAMPAGE, con el cual se hallará el número de residuos de la

región favorecida, de la región permitida y de la región atípica. Por otro lado, se utilizará el programa ProSA (Protein Structure Analysis-Server) para las proteínas beta-amiloide, los tres anticuerpos monoclonales y los tres nanocuerpos. Con ello, se obtendrá de cada uno: la calidad general del modelo (a través de un Z-score), calidad del modelo local y la posición de la secuencia.

1.2. Instrumentos

a. Software

- **GROMACS v.5.0.5.** Es un paquete de software de código abierto, que permite realizar simulaciones de dinámica molecular, basados en ecuaciones de movimiento newtoniano para sistemas de partículas (moléculas bioquímicas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) y sus interacciones enlazadas y no enlazadas (simulaciones de sistemas biológicos) (158).
- **UCSF CHIMERA-1.11.2.** Es un software de visualización interactiva de estructuras biomoleculares y datos afines, utilizado para el análisis y función estructural, tanto para la densidad, ensamblaje, trayectoria, acoplamientos y alineaciones de secuencias; generando archivos de imagen y video de alta calidad (172).

b. Servidores

- **Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB-PDB).** (Disponible en: <https://www.rcsb.org/>). Es un recurso de datos digitales disponibles públicamente de la estructura, función y evolución tridimensional de macromoléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos y ensamblajes) (173), utilizados en la investigación y educación de la biología básica, biomedicina, biotecnología y energía (174). Este servidor forma parte del Banco Mundial de Datos de Proteínas (wwPDB), permitiendo una mejor gestión de datos en base a los principios FAIR (Encontrable-Accesible-Interoperable-Reusable-Computable) (175).

- **Pocket Druggability Prediction (PockDrug).** (Disponible en: <http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/>). Es un recurso digital en línea que otorga la predicción computacional de la capacidad de formación de bolsillos de proteínas para unirse a moléculas mediante la combinación de propiedades (hidrofobicidad, geometría y aromaticidad); siendo parte de la fase de identificación del potencial farmacológico de una macromolécula (176). Además, este servidor proporciona herramientas para el análisis y caracterización de los bolsillos obtenidos de la proteína utilizada (177).
- **PatchDock.** (Disponible en: <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). Es un recurso digital en línea que permite el acoplamiento molecular de dos moléculas proteína-proteína o proteína-ligando (proteínas, ADN, péptidos, fármacos) mediante la utilización de algoritmos de complementariedad de formas (178). Tras el análisis, otorga un listado de complejos potenciales ordenados en base a criterios específicos físico-químicos. A través de este servidor, se puede identificar parches geométricos de la superficie de las moléculas (cóncavos, convexos y planos) que posteriormente son utilizados para el agrupamiento, filtrado y puntuación de complementariedad de los complejos de acoplamiento resultantes (179).
- **FireDock.** (Disponible en: <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>). Este es un servidor web complementario al PatchDock, otorga un refinamiento energético de las interacciones moleculares, basado en la flexibilidad y puntuación de los mejores resultados obtenidos a través de algoritmos rápidos de acoplamiento de cuerpo rígido. Estas soluciones se basan en diferentes criterios como la superficies de contacto, interacciones de Van-der-Waals, energía libre de enlace, electrostática, energía de contacto atómico, siendo esta la más importante para ver la espontaneidad del complejo de unión resultante (180).
- **Ramachandran Plot Assessment RAMPAGE.** (Disponible en: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Este recurso permite generar un diagrama de Ramachandran, que contiene regiones favorecidas,

permitidas y atípicas, que se interpretan para la validación geométrica y la calidad estereoquímica de la estructura analizada (181).

- **Protein Structure Analysis-Server ProSA.** (Disponible en: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at>). Este servidor permite determinar el pliegue nativo de una proteína tanto para modelos experimentales como teóricos, mediante el reconocimiento de errores. ProSA es utilizado en el refinamiento, predicción y modelado de estructuras proteicas, brindando un puntaje de calidad y una visualización tridimensional de los elementos erróneos de la proteína analizada (182).

1.3. Materiales de verificación

- Workstation con memoria RAM de 64 GB, 3 discos duros de 01, 04 y 06 TB y procesador E7 3.0GHz; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080.
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5, UCSF Chimera.
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assessment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

2. Campo de Verificación

2.1. Ámbito

La presente investigación se realizará de manera virtual y con el apoyo del WorkStation del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular – CIIM de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.

2.2. Temporalidad

La presente investigación se llevará a cabo en el periodo comprendido entre julio del 2021 y marzo del 2022.

2.3. Unidades de estudio

El estudio utilizará estructuras moleculares (proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos) que serán obtenidos de la base de datos del Protein Data Bank.

Criterios de selección

- **Criterios de Inclusión**

- Estructuras completas.
- El menor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica.

- **Criterios de Exclusión**

- Estructuras incompletas.
- El mayor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica.

3. Estrategias de Recolección de Datos

3.1. Organización

- Mediante la base de datos Protein Data Bank, se utilizará los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos.
- Se harán preparaciones de las estructuras para el acoplamiento específico de las diferentes estructuras de la proteína beta-amiloide y los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos mediante el software UCSF Chimera.
- Se emplearán técnicas de dinámica molecular utilizando el software Gromacs v.5.0.5 para las simulaciones.
- Para el análisis de las estructuras, se utilizarán los servidores PockDrug y Patchdock/FireDock para identificar los bolsillos (pockets) y realizar el acoplamiento molecular, respectivamente.
- Para la validación de las estructuras utilizadas, se usará el servidor del Diagrama de Ramachandran (RAMPAGE Plot Assessment de la Universidad de Duke) y el servidor ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.2. Recursos

3.2.1. Humanos

- Investigador
- Asesores

3.2.2. Institucionales

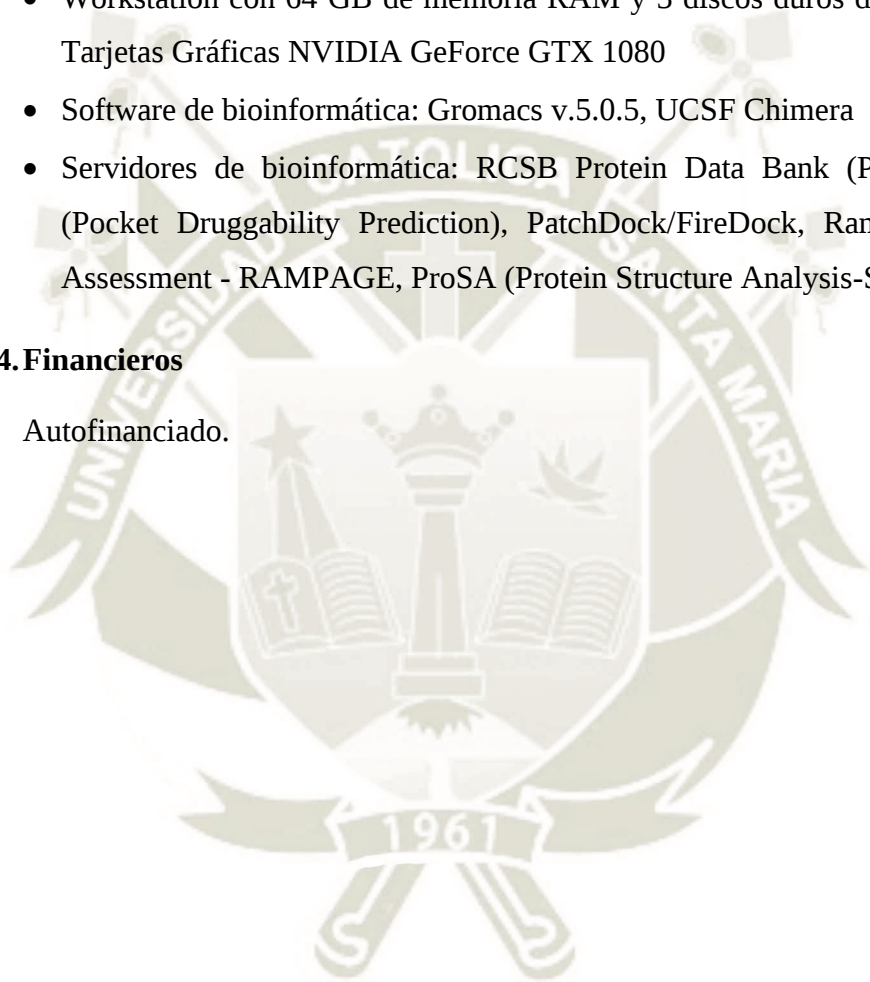
- Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María.
- Centro de Investigación en Ingeniería Molecular – CIIM.

3.2.3. Materiales

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5, UCSF Chimera
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assessment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.2.4. Financieros

Autofinanciado.



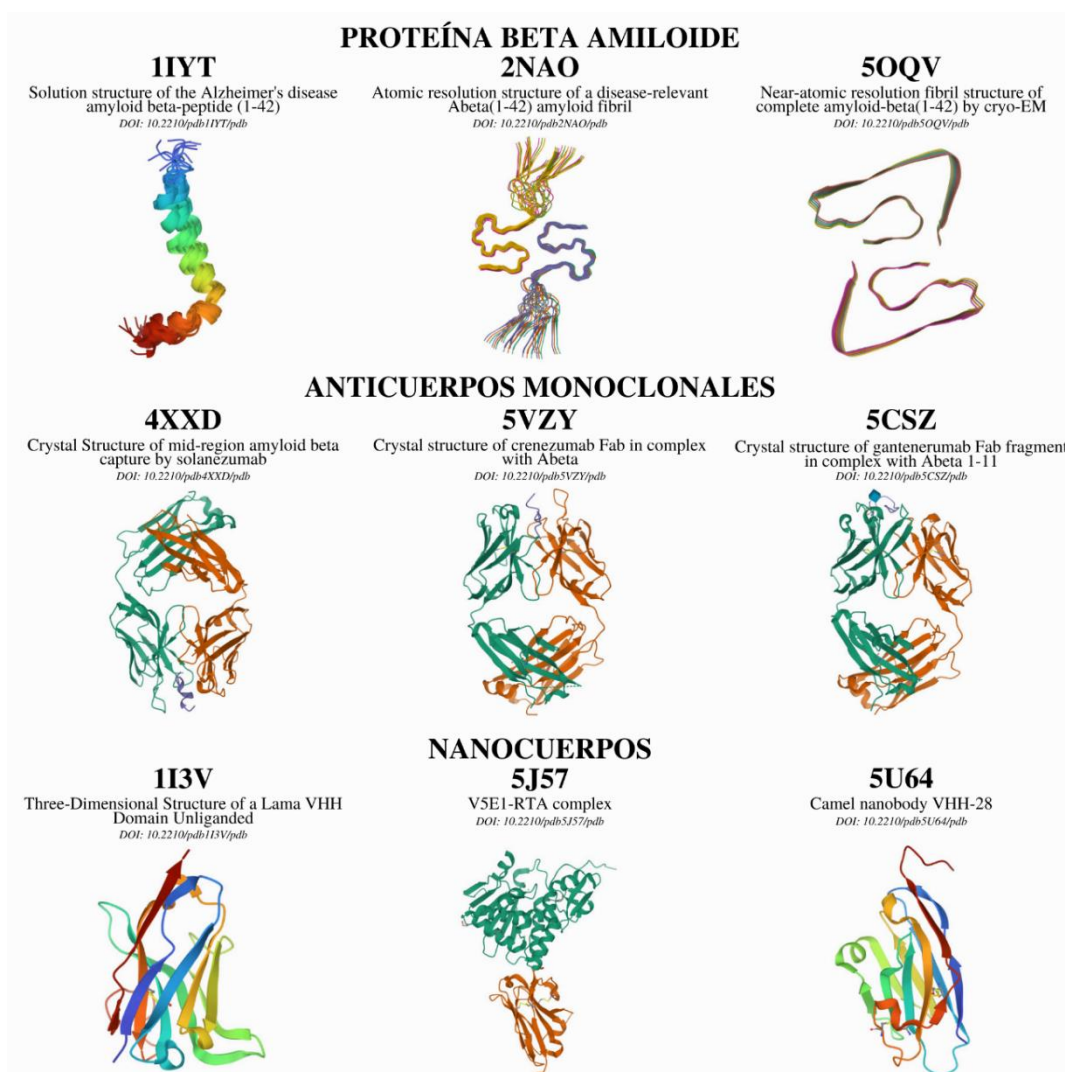


CAPÍTULO III: RESULTADOS

1. Estructuras Moleculares

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Figura 3.1. Estructuras obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (PDB)



Para la presente investigación, se utilizaron estructuras moleculares de la base de datos Protein Data Bank (PDB <https://www.rcsb.org/>) (ver Figura 3.1). Para la proteína beta amiloide y sus diferentes formas, se seleccionaron los modelos 1IYT, 2NAO y 5OQV. Para los anticuerpos monoclonales, se seleccionaron los modelos 4XXD (Solanezumab), 5VZY (Crenezumab), 5CSZ (Gantenerumab). Para los nanocuerpos, se seleccionaron los modelos 1I3V (Llama), 5J57 (Vicuña) y 5U64 (Camello).

**EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA
BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tabla 3.1. Información de las estructuras utilizadas de Protein Data Bank (PDB).

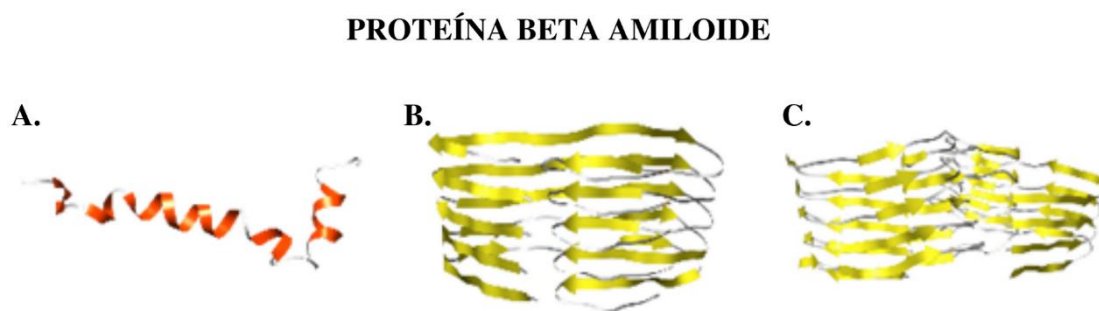
Estructura General	Estructura Específica	PDB* code	Fuente	Método	Resolución
Proteína B amiloide	Monómero	1IYT	Crescenzi et al, 2002	Solución NMR [†]	---
	Trímero	2NAO	Walti et al, 2016	Solución NMR	---
	Tetrámero	5OQV	Gremer et al, 2017	Microscopía Electrónica	4 Å [‡]
	Pentámero	5OQV	Gremer et al, 2017	Microscopía Electrónica	4 Å
	Estructura Fibrilar	5OQV	Gremer et al, 2017	Microscopía Electrónica	4 Å
Anticuerpos Monoclonales	Solanezumab	4XXD	Crespi et al, 2015	Difracción de rayos X	2.41 Å
	Crenezumab	5VZY	Ultsch et al, 2016	Difracción de rayos X	2.32 Å
	Gantenerumab	5CSZ	Bohrmann et al, 2012	Difracción de rayos X	1.8 Å
Nanocuerpos	Llama	1I3V	Spinelli et al, 2001	Difracción de Rayos X	2.03 Å
	Vicuña	5J57	Rudolph et al, 2017	Difracción de Rayos X	1.7 Å
	Camello	5U64	Koch et al, 2017	Difracción de Rayos X	3.3 Å

*PDB: Protein Data Bank. [†]NMR: Resonancia Magnética Nuclear. [‡]Å: Angstrom.

El modelo 5OQV es una estructura fibrilar compuesta por dos protofilamentos cada uno de 4 y 5 cadenas de proteína β A-42 (monómero de 42 aminoácidos), este modelo estructural fue obtenido por el método de crio-microscopía electrónica (Cryo-EM), presentó una resolución de 4 Å, así mismo este modelo fue usado para el análisis como oligómero (pentámero y tetrámero). El modelo 1IYT representa al monómero obtenido por RMN, al igual que el modelo 2NAO para el trímero. En cambio, los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos fueron obtenidos por difracción de rayos X. Las estructuras obtenidas presentan una resolución menor a 5Å, dando una media a alta fidelidad del modelo estructural en el método de obtención (ver Tabla 3.1).

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Figura 3.2. Análisis de la Proteína Beta Amiloide (monómero, oligómero y estructura fibrilar).

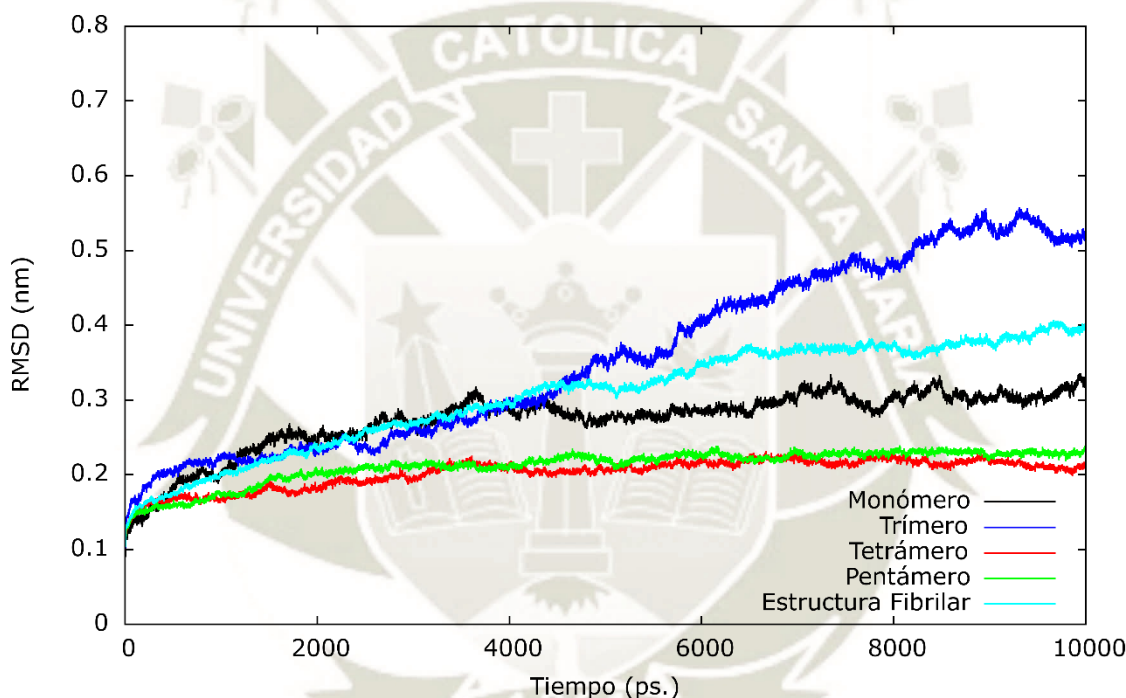


En la Figura 3.2, se presenta las proteínas obtenidas culminada la simulación de dinámica molecular bajo la representación gráfica de cintas, de color naranja las alfas hélices y color amarillo las láminas beta. El monómero de β A-42 expresa una estructura en forma de resorte, conformada mayormente por alfas hélices (Figura 3.2A), mientras que el oligómero y la estructura fibrilar (2 oligómeros de 5 β A y 4 β A) compuestas por láminas beta, los cuales son responsables de la formación de puentes de hidrógeno paralelos y los que hacen posible la fuerte estabilidad (Figura 3.2B y 2.2C).

2. Análisis de la Dinámica Molecular

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

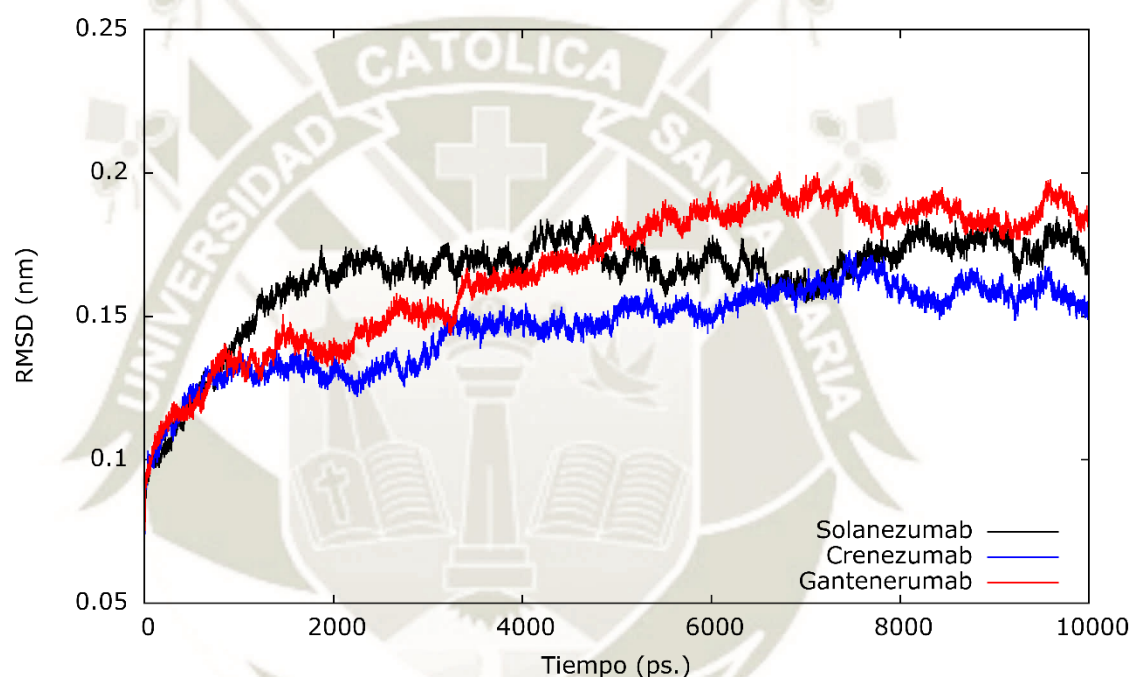
Figura 3.3. RMSD de la Dinámica Molecular de la Proteína Beta-Amiloide.



En la Figura 3.3., se presenta el análisis de Diferencia Media Cuadrática (RMSD) para la estabilidad molecular de los modelos de proteínas β A-42 estudiados tras la simulación de Dinámica Molecular. En su mayoría exhiben un razonable equilibrio después de los 10 ns de cálculo. El RMSD del pentámero y tetrámero de β A-42 logran el equilibrio a partir de 2 ns, sin embargo, el monómero, trímero y la estructura fibrilar de β A-42 se mantienen inestables aún en el tiempo que se les dio de cálculo, debido a la fuerte inestabilidad por la presencia de alfa hélices en el esqueleto y para el caso de la estructura fibrilar de β A-42 debido a que las coordenadas de las posiciones iniciales fueron a causa de la alta resolución (4Å) por microscopía electrónica, por lo que sería necesario el aumento de tiempo a la trayectoria de simulación.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

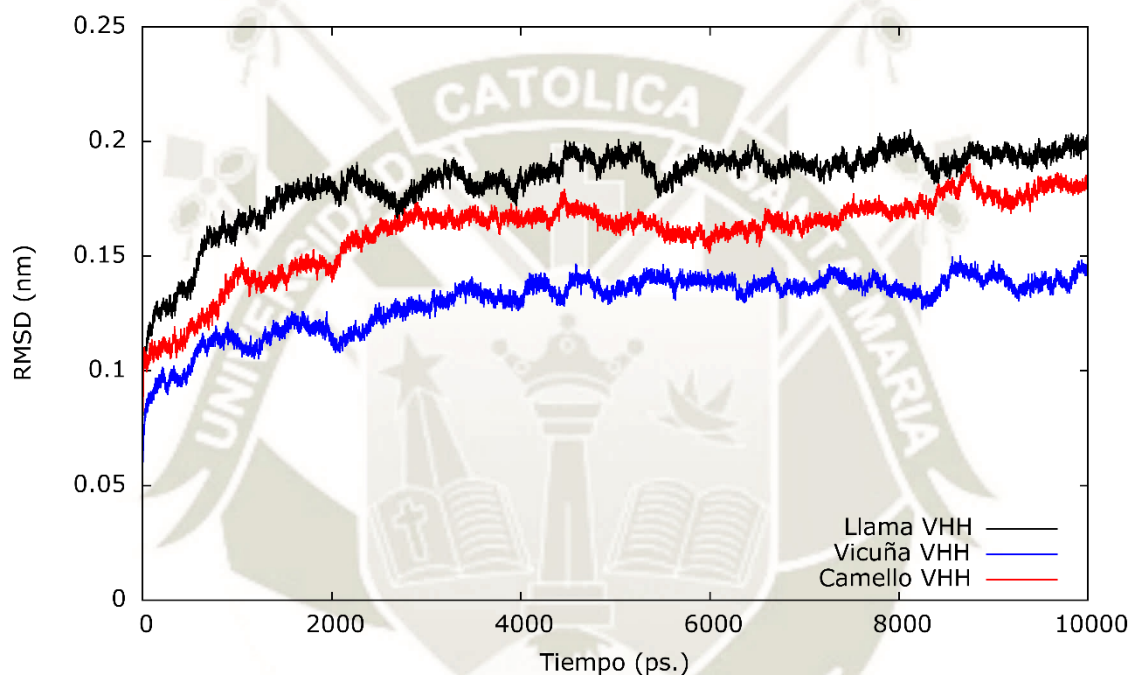
Figura 3.4. RMSD de la Dinámica Molecular de los Anticuerpos Monoclonales contra la Proteína Beta-Amiloide.



En la Figura 3.4., se presenta el análisis de Diferencia Media Cuadrática (RMSD) para la estabilidad molecular de los modelos de anticuerpos monoclonales estudiados tras la simulación de Dinámica Molecular, los cuales logran el equilibrio a partir de 2 ns.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

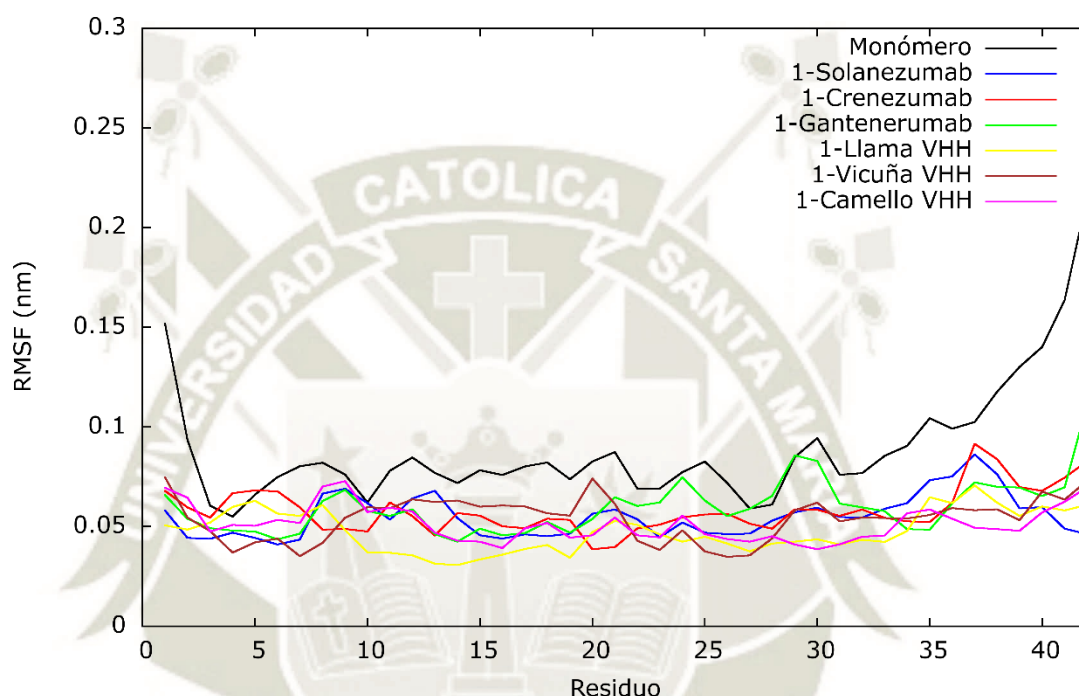
Figura 3.5. RMSD de la Dinámica Molecular de los Nanocuerpos contra la Proteína Beta-Amiloide.



En la Figura 3.5., se presenta el análisis de Diferencia Media Cuadrática (RMSD) para la estabilidad molecular de los modelos de nanocuerpos estudiados tras la simulación de Dinámica Molecular, los cuales logran el equilibrio a partir de 1 ns, requiriendo un menor tiempo de dinámica para su estabilidad que los anticuerpos monoclonales.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

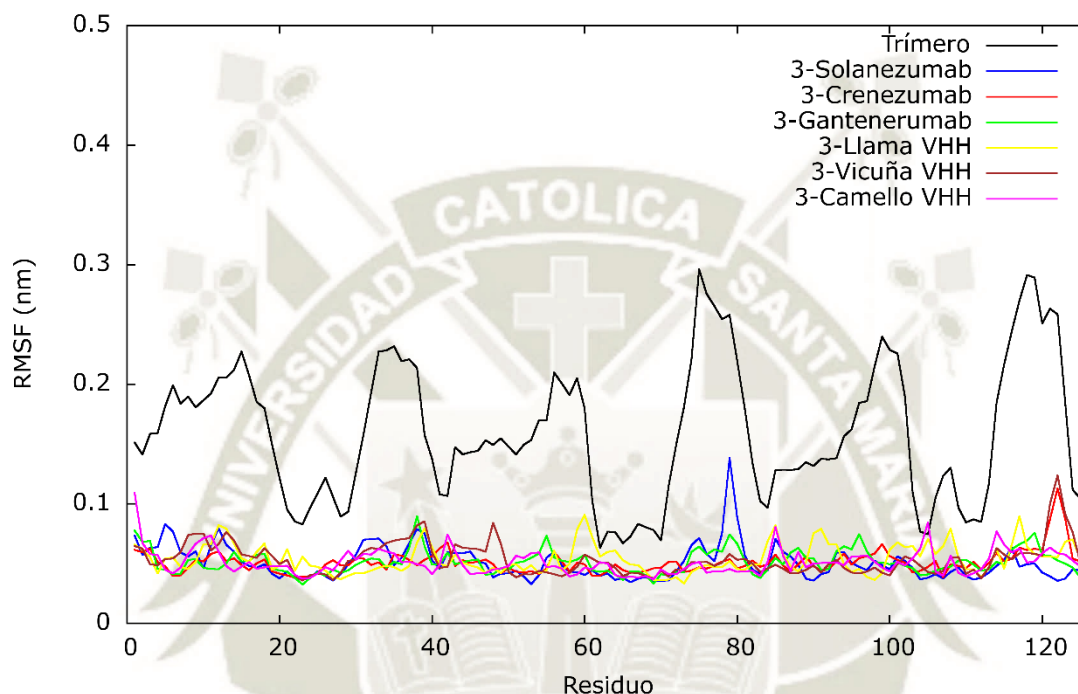
Figura 3.6. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Monómero.



En la Figura 3.6 se observa las gráficas de las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) por residuo del Monómero donde se verifica las fluctuaciones en el sitio activo: Solanezumab con residuos Lys16 (0.04 nm), Ser26 (0.05 nm); Crenezumab con Lys16 (0.05 nm), Val24 (0.05 nm), Gantenerumab con Ser8 Gly9 (0.06 nm), Val24 (0.06 nm). En este caso, se presentan mayores fluctuaciones en los extremos de la proteína, pero sin alterar la estructura general.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

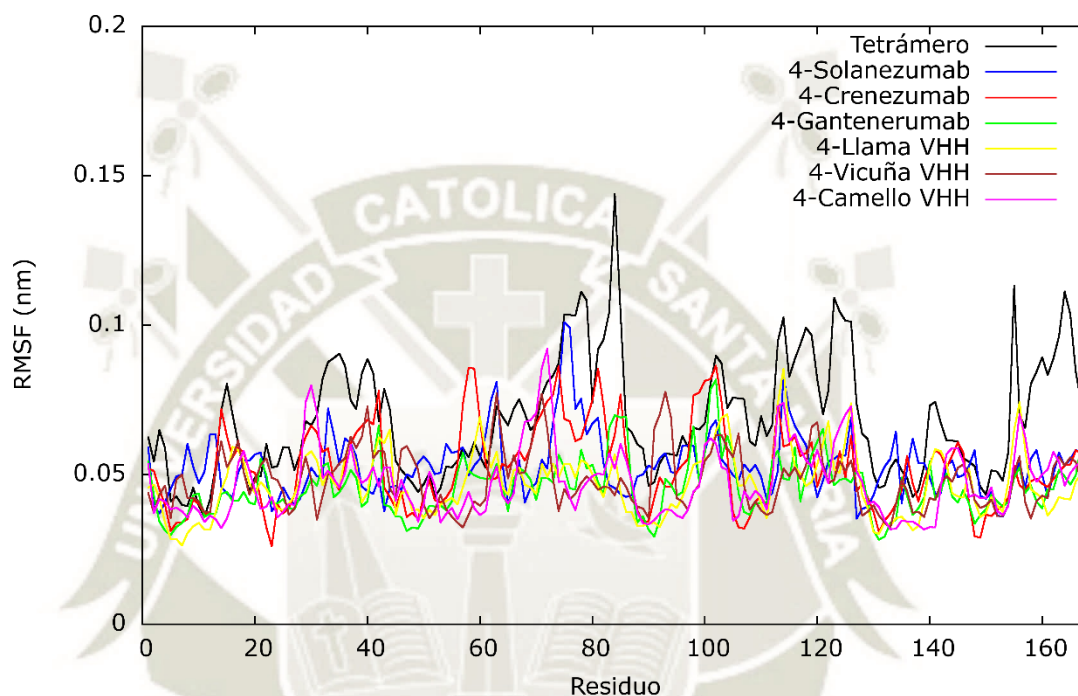
Figura 3.7. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Trímero.



En la Figura 3.7 se presenta las gráficas de las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) por residuo del Trímero donde se presentan mayores fluctuaciones en el trímero sin acoplamiento entre los residuos 70 al 90 y 110 al 120, por lo tanto, las interacciones tipo Van-der-Waals ayudan a la estabilidad de la proteína, observando fluctuación reducida en las estructuras acopladas.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

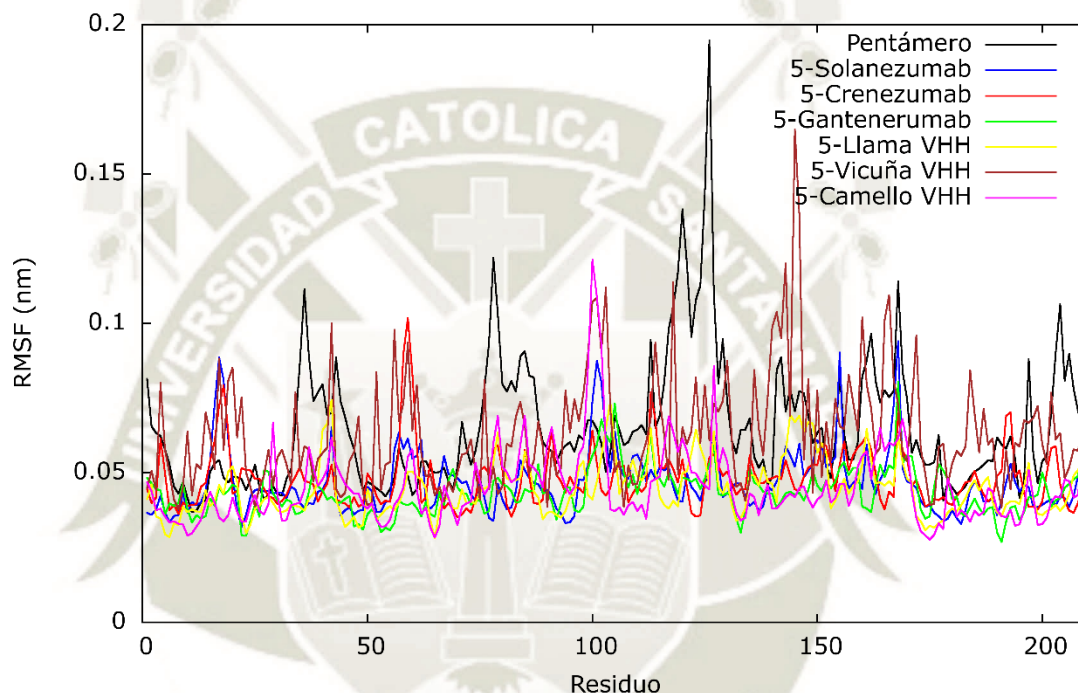
Figura 3.8. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Tetrámero.



En la Figura 3.8 se presenta las gráficas de las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) por residuo del Tetrámero donde se observa una mayor estabilidad estructural de la proteína que las anteriores estructuras. Adicionalmente, se presenta mayores fluctuaciones entre los residuos 70 al 90, 110 al 120 coincidiendo con el trímero, añadiendo otro aumento de fluctuación en el extremo del tetrámero.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

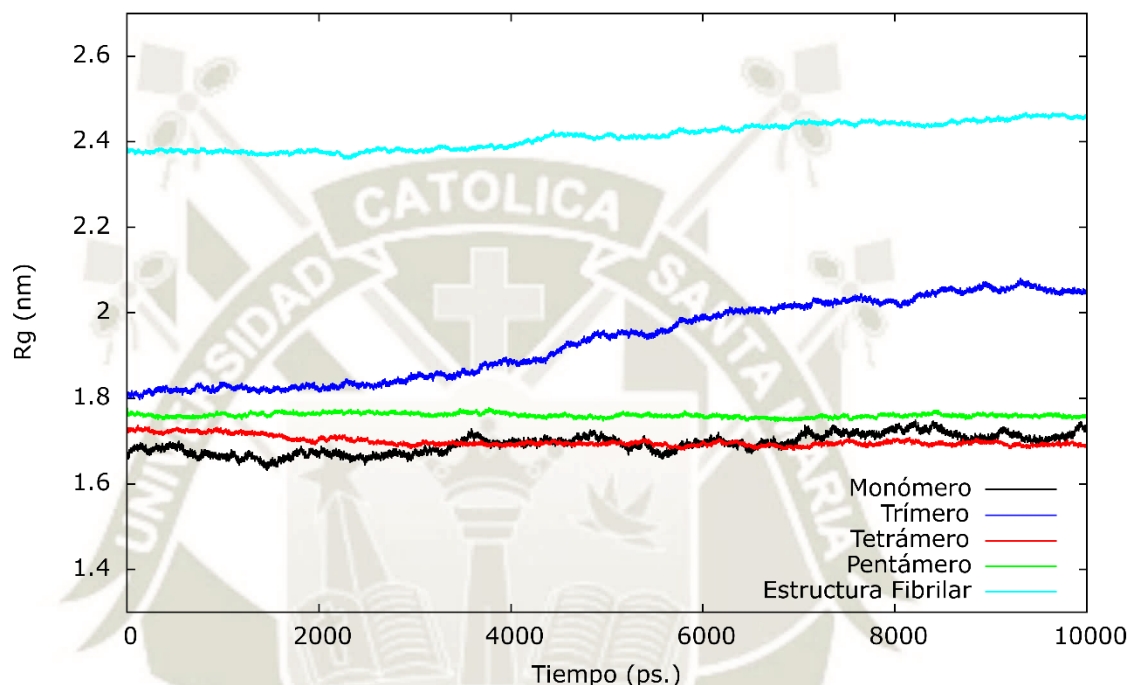
Figura 3.9. Fluctuación RMS de la Dinámica Molecular del Pentámero.



En la Figura 3.9 se presenta las gráficas de las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) por residuo del Pentámero. De igual forma que el pentámero, se presenta una mayor estabilidad estructural que las estructuras del monómero y trímero. Además, se observa un mayor rango de fluctuación entre los residuos 110 al 130 coincidiendo con el trímero y tetrámero, añadiendo otros aumentos de fluctuación entre los residuos 30 al 50, 70 al 90. De igual forma, gracias al acoplamiento con los anticuerpos y nanocuerpos, otorgan una mayor estabilidad estructural, teniendo fluctuaciones reducidas al presentar interacciones de tipo Van-der-Waals.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

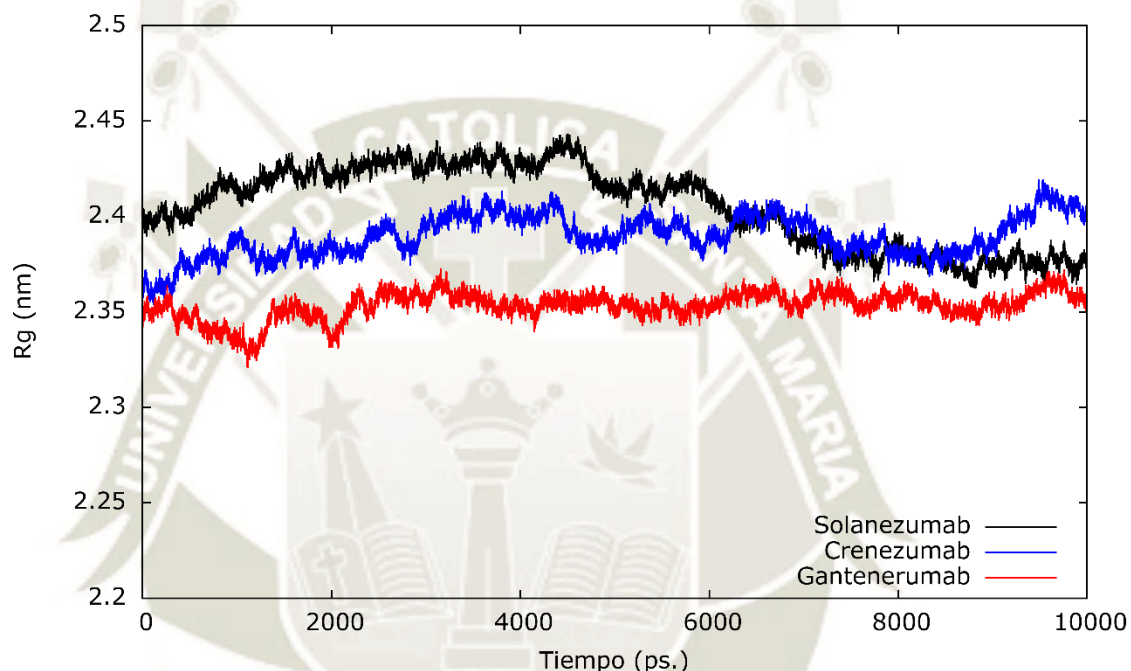
Figura 3.10. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de la Proteína Beta-Amiloide.



El radio de giro (RG) de las proteínas β A-42 con respecto al tiempo de simulación se muestra en la Figura 3.10. Esto mostró que el RG de la estructura fibrilar fue significativamente más bajo en las orientaciones finales ($p < 0.05$), lo cual probablemente se debe a la presencia de láminas beta en los diferentes modelos estructurales, por otro lado, el monómero y trímero presentaron una notable diferencia, este hallazgo sugiere que la configuración del monómero y trímero sufre diversas fluctuaciones en el tiempo de simulación, así como también debido a la presencia de alfa hélices en su dominio.

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

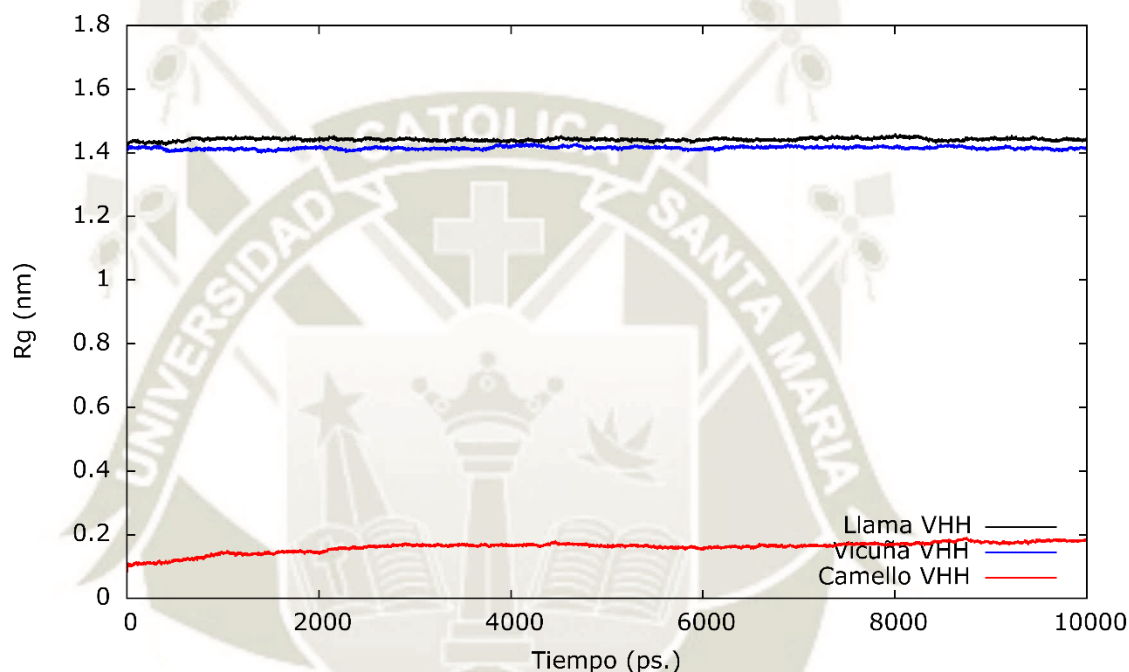
Figura 3.11. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de los Anticuerpos Monoclonales contra la Proteína Beta-Amiloide.



En cuanto a la Figura 3.11, se muestra el cálculo de Radio de Giro de la dinámica molecular de los anticuerpos monoclonales contra la proteína β A-42, donde el RG de los anticuerpos monoclonales para todo el proceso fue significativamente más bajo en todas las orientaciones finales ($p < 0.05$).

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Figura 3.12. Radio de Giro de la Dinámica Molecular de los Nanocuerpos contra la Proteína Beta-Amiloide.



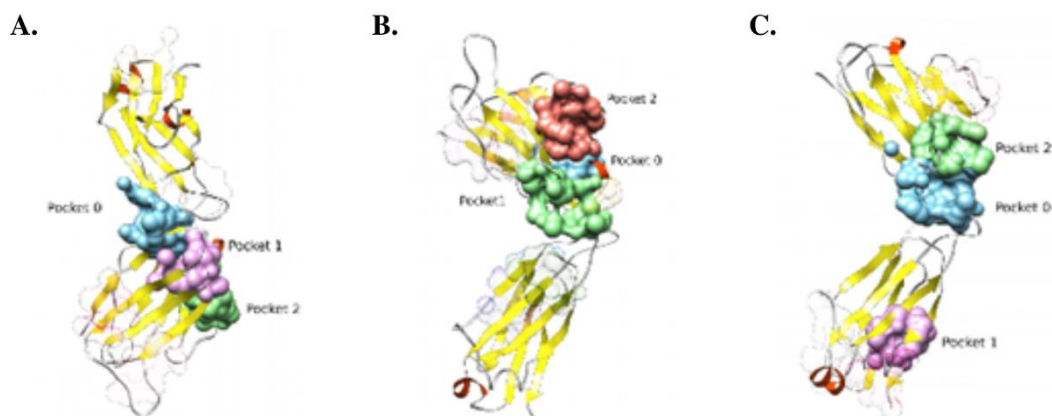
Finalmente, en la Figura 3.12, se muestra el cálculo de Radio de Giro de la dinámica molecular de los nanocuerpos contra la proteína β A42, donde el RG de Llama VHH y Vicuña VHH no permite cambios conformacionales con la proteína β A42.

3. Predicción de los Sitios Activos

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Figura 3.13. Predicción de los Sitios Activos de los Anticuerpos Monoclonales mediante el servidor PockDrug: Pocket.

ANTICUERPOS MONOCLONALES



Mediante el servidor PockDrug se realizó la predicción de sitios activos de los anticuerpos monoclonales. Estas proteínas presentan en su estructura láminas beta y alfas hélices, así mismo la presencia de dos dominios altamente estables, así como la presencia de cavidades, bolsillos o pockets, con una alta probabilidad de drogabilidad, teniendo en cuenta que para Solanezumab el pocket 0 (Figura 3.13A), Crenezumab el pocket 0 (Figura 3.13B), Gantenerumab el pocket 0 y pocket 1 (Figura 3.13C) son los pockets más importantes, los cuales normalmente son los blancos de acción.

4. Acoplamiento Molecular

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tabla 3.2. Resultados de los Acoplamientos realizados en PatchDock/ FireDock.

Acoplamientos Moleculares	Proteína Beta-Amiloide			
	Monómero	Trímero	Tetrámero	Pentámero
	Energía atómica de contacto (Kcal / mol)			
S*	-16.59	-13.36	-14.75	-7.11
C†	-8.67	-11.63	-9.35	-12.46
G‡	-11.63	-17.15	-15.41	-5.26
L§	-8.33	-16.47	-12.54	-5.61
V ¹	-11.08	-15.76	-3.12	-16.89
Ca¶	-7.07	-6.42	-9.47	-8.4

*S: Solanezumab. †C: Crenezumab. ‡G: Gantenerumab. §L: Llama VHH. ¹V: Vicuña VHH. ¶Ca: Camello VHH.

El acoplamiento molecular de los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos contra las formas de proteína β A-42 mediante el análisis de interacción molecular en el servidor PatchDock/FireDock se muestran en la Tabla 3.2, donde se presentan los mejores lugares de acción de los ligandos. Para todos los sistemas, los acoplamientos se dieron de forma espontánea con un valor de energía de contacto atómica (ACE) entre -3.12 y -17.15 kcal/mol.

5. Validación de Estructuras

EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tabla 3.3. Resultados obtenidos de Ramachandran y ProSA server.

Estructura		RAMACHANDRAN			Pro SA* Server
		Residuos en Regiones Favorecidas	Residuos en regiones permitidas	Residuos fuera de la región	Z- Score
Proteína Beta- Amiloide	Monómero	33 (84.6%)	5 (12.8%)	1 (2.6%)	-0.45
	Trímero	91 (77.8%)	21 (17.9%)	5 (4.3%)	0.86
	Tetrámero	129 (82.7%)	23 (14.7%)	4 (2.6%)	0.35
	Pentámero	159 (81.5%)	31 (15.9%)	5 (2.6%)	-0.02
Anticuerpos Monoclonales	Solanezumab	199 (95.7%)	8 (3.8%)	1 (0.5%)	-6.22
	Crenezumab	195 (93.8%)	10 (4.8%)	3 (1.4%)	-6.11
	Gantenerumab	200 (95.2%)	10 (4.8%)	0 (0.0%)	-6.87
Nanocuerpos	Llama	116 (92.1%)	9 (7.1%)	1 (0.8%)	-5.02
	Vicuña	110 (90.9%)	8 (6.6%)	3 (2.5%)	-5.9
	Camello	97 (92.4%)	6 (5.7%)	2 (1.9%)	-3.04

Pro SA: Protein Structure Analysis-Server

Los datos estadísticos de refinamiento y validación del modelo estructural se dan en la Tabla 3.3. Para las proteínas β A-42, el porcentaje de residuos en regiones favorecidas fueron aceptables, sin embargo, entre 12.8 - 17.9 % de los residuos se ubicaron en regiones permitidas y 2.6 - 4% fuera de la región y un Z-Score de -0.45 a 0.86, siendo un valor alto para una estructura nativa típica, por lo que se debe a la baja cantidad de datos disponibles sobre modelos estructurales de β A-42 reportados en las bases de datos. Los modelos estructurales de los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos mostraron un alto porcentaje de aceptación en los residuos en regiones favorecidas y bajos porcentajes en regiones permitidas y residuos fuera de la región, con un Z-Score $\sim$ -6.00 el cual es un rango de conformaciones nativas. Finalmente, se puede inferir que las proteínas del estudio in silico pueden existir en la naturaleza como modelos estructurales.



CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Con el pasar de los años, la enfermedad de Alzheimer va incrementando exponencialmente a nivel mundial, afectando a millones de personas (1,2). Esta patología ocasiona un problema de salud pública, afectando la economía y la carga social por ser una enfermedad discapacitante, dependiente y de alta mortalidad en adultos mayores (39).

Esta enfermedad se ve afectada por factores modificables (47) como no modificables, destacando el componente genético que representa el 70% de los factores de riesgo para EA (55). La combinación de mutaciones genéticas aumentaría el riesgo de sufrir esta patología.

La proteína βA forma parte de la hipótesis de la cascada amiloidea, considerada la principal causa de esta patología (105). Según esta teoría, la proteína βA se produce tras la escisión proteolítica de una glicoproteína llamada proteína precursora de amiloide (APP) por la acción de la enzima γ -secretasa produciendo proteínas βA de diferentes longitudes ($\beta A38$, $\beta A40$, $\beta A42$) depositándose principalmente en la región del hipocampo y neocorteza, y posteriormente su liberación en el líquido cefalorraquídeo y en sangre (106).

Dentro de la fisiopatología de esta enfermedad neurodegenerativa se encuentra el desorden metabólico de producción y eliminación de proteína βA extracelular tras un mal plegamiento, que se acumula en diferentes estados de agregación (oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas seniles) (11); acompañado del depósito de proteína tau intracelular que se acumula en ovillos neurofibrilares (103).

Dentro de las diferentes longitudes de proteína βA producidas, la $\beta A42$ es más estructurada por la formación de β -horquilla en sus aminoácidos 31-34 y 38-41, reduciendo la flexibilidad de su extremo C-terminal (183). Junto con su mayor capacidad hidrofóbica, tiene una mayor predisposición a la autoagregación amiloidea que las demás estructuras (106).

Dada la importancia de la proteína $\beta A42$ en el desarrollo de esta enfermedad por su capacidad de formar estados de agregación, esta investigación resalta la comprensión de estas estructuras. Para este estudio, se obtuvo estructuras de proteínas $\beta A42$ que hayan sido trabajadas experimentalmente; las cuales fueron: 1ITY (184) (Monómero), 2NAO (185) (Trímero), 5OQV (186) (Tetrámero, Pentámero y estructura fibrilar) (ver Figura 3.1). Es importante destacar que la βA se encuentra intrínsecamente no estructurada por lo tanto para su obtención experimental no puede cristalizarse con métodos comunes (183) para su conocimiento estructural. En la investigación, se obtuvo las estructuras a través de métodos de solución de resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica (ver Tabla 3.1). Las estructuras obtenidas por NMR,

difracción de rayos X o microscopía electrónica facilitaron el estudio; puesto que, en el caso de no tener este tipo de estructuras, se hubiera recurrido al modelamiento de estructuras; que, si bien es una herramienta útil, no se tiene la misma certeza como una de las mencionadas.

El extremo C-terminal hidrofóbico del β A42 es el componente clave que desencadena la transformación de estructura helicoidal α a una lámina β , que provocaría la autoagregación de proteínas β A causantes de la enfermedad de Alzheimer (187) así como se muestra en la Figura 3.2, dándole un mayor equilibrio y estabilidad al formar oligómeros como el pentámero y tetrámero observados en el cálculo RMSD y RG de la Figura 3.3 y 3.10. respectivamente. Adicionalmente, las interacciones tipo Van-der-Waals ayudan a la estabilidad de la proteína, observándose fluctuaciones reducidas en el trímero estudiado (ver Figura 3.7.). A medida que se produce la autoagregación de proteínas β A, se muestra una mayor estabilidad estructural, principalmente en el tetrámero y pentámero, como se verifica en el análisis de fluctuaciones RMS de las Figuras 3.8. y 3.9. Los residuos 17 y 35 del extremo C-terminal deben girar 180 grados para darle la flexibilidad estructural que permitiría el ensamblaje de las formas de agregación amiloidea (188). Los residuos 15-42 adoptarían la forma de hoja β cruzada en forma de herradura doble con cadenas laterales hidrofóbicas, mientras que los residuos 1-14 estarían ordenados en conformación de cadena β , siendo considerado el epítipo principal y el fragmento neurotóxico que se agrega más rápido para la formación de placas seniles (183).

Las estructuras más neurotóxicas son los oligómeros solubles y amiloides intermedios al diseminarse a nivel cerebral y unirse a diferentes moléculas del espacio extracelular gracias a su solubilidad, en contraste con las fibrillas que son más grandes e insolubles. La formación de oligómeros que aparece tempranamente en el proceso de depósito β A42, inicialmente provocan la disfunción sináptica y deterioro de la memoria, que resulta finalmente en el deterioro de la función cerebral (16,106). A nivel clínico se observa la pérdida de memoria, deterioro cognitivo progresivo y de la personalidad, a consecuencia de la acumulación y depósito de β A tras el periodo de inflamación y estrés oxidativo que producen neurotoxicidad (109).

La simulación de dinámica molecular es el análisis del tiempo en el que una proteína se desarrolla, buscando su forma estructural más acorde a la realidad, para ello se le da ciertos parámetros como temperatura, presión, entre otros; esto puede corroborarse mediante ciertos diagramas o pruebas estadísticas como el RMSD, RMSF y el radio de giro (158). En el presente estudio, estos datos validaron las evoluciones de las proteínas trabajadas, (ver Figura 3.3 a

Figura 3.12) corroborando su buena calidad general y validación de estructuras (ver Tabla 3.3) para pasar al siguiente paso: el acoplamiento molecular.

Los avances en el área de la bioinformática, terapia génica y protocolos de detección se encuentran con mayor potencial en las enfermedades neurodegenerativas (139). Para aumentar la solubilidad y/o afinidad, se realizan ciclos iterativos de mutagénesis y selecciones de las proteínas. Además, se usan métodos computacionales para optimizar las afinidades de unión. Estas herramientas permiten un mejor control de las tasas de activación y un ajuste fino de las funciones físico-químicas (139).

Las nuevas investigaciones en la enfermedad de Alzheimer se orientan hacia una esperanzadora ruta, la inmunológica (107). Y bajo este campo se vienen dando distintos enfoques tanto en el desarrollo de tratamientos por su capacidad de ataque y estimulación inmunitaria en el huésped, como en el reconocimiento como posible utilización diagnóstico. Un fuerte enfoque en el manejo de la EA, dentro de los que incluye este estudio, es a nivel de la prevención, gracias a la utilización de anticuerpos y nanocuerpos, que podría utilizarse como herramienta diagnóstica hasta la aplicación de vacunas (189).

Actualmente, múltiples investigaciones están buscando un diagnóstico temprano presintomático, centrándose en la reducción y neutralización de los oligómeros β A. Es por ello que en el presente estudio se busca elucidar los acoplamientos entre anticuerpos/nanocuerpos contra las proteínas β A en sus diferentes formas, para posteriormente ser utilizados como nuevas herramientas diagnósticas.

A partir del descubrimiento de los anticuerpos monoclonales (mAbs), desde que Jerne, Köhler y Milstein describieron la técnica de cultivo celulares, que permite la producción de un anticuerpo específico, se han logrado desarrollar más de 250 terapias con anticuerpos monoclonales para distintos tipos de enfermedades (infecciosas, oncológicas, inmunológicas, entre otras) que actualmente se encuentran en fases de ensayo clínico (15). A través de su aplicación parenteral, los anticuerpos alcanzan sus objetivos extracelulares que se encuentran en mayor concentración (190).

Desde el tiempo en que se publicó el desarrollo de los mAbs, se vienen estudiando a estos para la EA, inicialmente como blanco contra los ovillos neurofibrilares y luego contra los β A (191–194). Existen hipótesis que explican los efectos de eliminación de los β A a nivel cerebral por medio de los mAbs: una de ellas es la unión de los mAbs a los péptidos de β A en la placa senil,

ayudando a desestabilizar las interacciones de los β A, bloqueando su ensamblaje (190,195); otra es la unión de los anticuerpos a la placa, promoviendo su fagocitosis mediante células microgliales mediadas por receptores Fc (196); y por otro lado está la unión de los anticuerpos a moléculas de β A circulantes presentes en el plasma, en este caso no atraviesan la barrera hemato-encefálica, dando lugar a una gradiente de concentración que va a resultar en un flujo de β A desde el cerebro al plasma, se le denomina sumidero periférico (peripheral sink effect) (197).

En la presente investigación, se obtuvo los mAbs: 4XXD (198) (Solanezumab), 5VZY (199) (Crenezumab), 5CSZ (138) (Gantenerumab) (ver Figura 3.1. y 3.13), que tuvieron equilibrio y estabilidad molecular tras la SDM (en el análisis RMSD de la Figura 3.4.), además el RG fue significativamente más bajo en las orientaciones finales ($p < 0.05$) no permitiendo cambios conformacionales (ver Figura 3.11.). En el acoplamiento molecular, las energías atómicas de contacto se presentaron en un rango que va desde -5.26 Kcal/mol (interacción entre el pentámero y gantenerumab) hasta -17.15 Kcal/mol (interacción entre el trímero y gantenerumab). Todos los valores se encuentran dentro de un rango aceptable de espontaneidad de los procesos de interacción molecular (ver Tabla 3.2). Estos potenciales ayudan a reconocer los diferentes mecanismos que se tienen en distintos niveles de oligomerización de los β A con los mAbs, a encontrar zonas específicas donde interactúan las proteínas, las cuales pueden ayudar en el diseño de futuros objetivos de la aplicación de la inmunología en la enfermedad de Alzheimer.

Numerosos epítomos de β A se encuentran expuestos y disponibles para el acoplamiento con los mAbs. En caso del Solanezumab, su epítomo se encuentra en la región media del péptido (residuos 16-26), siendo el sitio de la oligomerización (136). Crenezumab tiene como epítomo la región media con los residuos 16-24 teniendo afinidad por los oligómeros (137). Y finalmente Gantenerumab tiene como epítomo la región N-terminal (residuo 8-9) y central (residuo 24) y se dirige a las placas β A (138), verificado en la Figura 3.6 de RMSF.

Diversos trabajos preliminares revelaron que los anticuerpos monoclonales anti- β A eran capaces de prevenir la fibrilación de péptidos β A, interrumpiendo la formación de fibrillas e impidiendo la neurotoxicidad dependiente de las mismas (200). Además revelaron que los anticuerpos generados en ratones contra β A pueden marcar las placas amiloides en las secciones cerebrales humanas, facilitando dicha intervención inmune en humanos (201) viendo la

posibilidad diagnóstica. Se ha visto que las inyecciones periféricas de mAbs podrían reducir la carga y el comportamiento de la placa, mediante la generación de una respuesta humoral (202). Los nanocuerpos también llamados anticuerpos de dominio único de cadena pesada (VHH), se denominan así por su tamaño (~14 kD), siendo los dominios IgG terminal de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (203). Al ser estas estructuras producidas naturalmente en camélidos, les da estabilidad al plegarse correctamente a su objetivo (141). Hay funciones de los fragmentos de anticuerpos modificados en el diagnóstico in vivo e in vitro como cofactores en cristalografía para el desarrollo de herramientas diagnósticas (143).

Estas moléculas conservan la región variable Fv que otorga especificidad, afinidad y propiedad hidrofílica (solubles en ausencia de cadena ligera), y al no tener los dominios Fc disminuyen las respuestas inflamatorias (142). A pesar de sus ventajas observadas, actualmente no hay ensayos clínicos de nanocuerpos para la enfermedad de Alzheimer (<https://clinicaltrials.gov/>) (190).

Los anticuerpos de un solo dominio, como son los nanocuerpos de camélido se aplican en citosol, así como extracelular. Su función es modular y prevenir la formación de fibrillas amiloides maduras gracias a su capacidad de estabilizar las protofibrillas tanto péptidos desagregados como oligómeros (203). Estas herramientas buscan prevenir la agregación, eliminar depósitos tisulares preexistentes y disminuyendo la citotoxicidad (203).

En el estudio, se obtuvo los VHH: 1I3V (204) (Llama), 5J57 (205) (Vicuña), 5U64 (206) (Camello) (ver Figura 3.1), que tuvieron equilibrio y estabilidad molecular en menor tiempo que los anticuerpos monoclonales, tras la SDM (en el análisis RMSD de la Figura 3.5.), además el RG demuestra que la Llama VHH y Vicuña VHH no permiten cambios conformacionales (ver Figura 3.12.). En el acoplamiento molecular, las energías atómicas de contacto se presentaron en un rango que va desde -3.12 Kcal/mol (interacción entre el tetrámero y Vicuña VHH) hasta -16.89 Kcal/mol (interacción entre el pentámero y vicuña VHH). Estos valores se encuentran dentro del rango de espontaneidad de los procesos de interacción molecular (ver Tabla 3.2), permitiendo el acoplamiento en diferentes formas de oligómeros de β A con los VHH.

Los nanocuerpos pueden administrarse como terapia génica, directamente en el cerebro o mediante un vector viral, por su capacidad para ingresar al cerebro desde la periferia y dirigirse a células específicas. Habicht y colaboradores investigaron VHH específico para las proteínas β A desde el 2007 (203). A partir de ese año, se produjeron más estudios acerca de la

inmunología tanto terapéutica como diagnóstica, teniendo un auge potencial en la enfermedad de Alzheimer. Actualmente, la nanomedicina juega un rol importante en la inmunodetección gracias a la capacidad de estas estructuras de atravesar la barrera hematoencefálica (18).

Habicht estudio el nanocuerpo B10AP que tiene un epítipo común en diferentes fibrillas de β A como 1-40, 1-42 residuos, derivadas de la proteína A amiloide sérica o de cadenas ligeras de Ig, teniendo todos diferente secuenciación polipeptídica. Además, el epítipo en estructuras fibrilares no solo se ubica en los extremos sino en el lado de la fibrilla, distribuyéndose uniformemente en las fibrillas. A pesar que se une débilmente a los oligómeros de β A, el nanocuerpo B10AP pueden unirse a diferentes formas de fibrillas, desde sus la forma de protofibrilla (203).

Otros estudios se orientan a la acción enzimática de la cascada amiloidea. Sierks y colaboradores, mostraron nanocuerpos que bloquean el sitio de escisión de la β -secretasa provocando el aumento de la escisión de la α - secretasa. Estos nanocuerpos pueden cruzar la barrera hematoencefálica, y ser participe del proceso intracelular (207).

Actualmente, las investigaciones buscan la aplicación intracelular al ver una alta especificidad anticuerpo/antígeno y orientación frente a variantes o modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas objetivo. Los intracuerpos actúan bloqueando funciones intracelulares (190). Estudios se observa la eliminación de proteínas celulares por intracuerpos para objetivos relevantes como la proteína β A. Los intracuerpos inhiben las interacciones proteína-proteína (fosforilación, mal plegamiento patógeno y escisión proteolítica) así como redirigiendo antígenos a los organelos celulares (139).

Las pruebas in silico permite analizar el acoplamiento entre proteínas, realizando la simulación de la dinámica molecular, regulando las propiedades físico-químicas. En las enfermedades neurodegenerativas, se presenta un mal plegamiento de proteínas, ocasionando estrés proteostático en las células. Al usar nanocuerpos y anticuerpos, se debe controlar el plegamiento, sino se podría exacerbar la toxicidad celular, por eso es importante su control de selección (139). Los métodos de detección de los cambios conformacionales de las estructuras, en este caso la proteína β A, son relevantes para el diagnóstico clínico, investigación básica y la terapia de enfermedades como es la EA (203).

A través de los estudios in silico, los nanocuerpos pueden dirigirse a formas modificadas de proteínas y sus epítipos conformacionales, teniendo una especificidad precisa y afinidades de

unión a objetivos más efectivos, así como control de las tasas de activación y desactivación. Los estudios en enfermedades neurodegenerativas están en continuo desarrollo por los diferentes enfoques de selección y optimización molecular. El pase de la barrera hematoencefálica fue un hito en el desarrollo de la neuroinmunoterapia (139) abriendo paso al área del diagnóstico, ampliando el campo de oportunidades para los pacientes con Enfermedad de Alzheimer al ser diagnosticados en etapas más tempranas.

Es importante considerar la modulación de proteínas A β al ser el desencadenante inicial y productor del avance de la cascada patógena; para utilizarla como objetivo diagnóstico-terapéutico. Varios estudios de terapias con anticuerpos contra β A fracasaron en los ensayos clínicos en humanos a pesar de tener resultados exitosos a nivel experimental in vitro o en animales (208), atribuyendo a la falta de modulación de la proteínas. Para entender más las causas de estos fracasos se vienen desarrollando estudios como el presente, donde se busca entender los mecanismos físico-químicos a nivel molecular. Diferentes investigaciones teóricas indican que los casos genéticos podrían tratarse en etapas tempranas, así como en el futuro un diagnóstico mucho más temprano, gracias al conocimiento estructural de las proteínas β A (139). La identificación de la proteína β A, la determinación de sus estructuras y diferentes formas de agregación tendrán un rol importante en la mitigación de la clínica y progresión de EA (183). Finalmente, reconociendo los anticuerpos monoclonales (solanezumab, crenezumab, gantenerumab) y los nanocuerpos (llama, vicuña, camello) y las diferentes formas de presentación de la proteína β A (monómero, trímero, tetramero, pentámero y estructura fibrilar); gracias al empleo de herramientas de la química y biología computacional, se pudo comprender el comportamiento de los diferentes modelos proteicos antes y después de un proceso de interacción molecular.



CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- PRIMERA** En la presente investigación, se obtiene las diferentes formas de proteína beta-amiloide (monómero, trímero, tetramero, pentámero y estructura fibrilar), estructuras de los anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Crenezumab y Gantenerumab) y nanocuerpos de camélidos (Llama VHH, Vicuña VHH, Camello VHH) a través de la base de datos Protein Data Bank. Todas las estructuras presentan una resolución menor a 5Å. La fidelidad de los modelos estructurales es media a alta por su método de obtención.
- SEGUNDA** Se realiza la minimización y optimización de las estructuras en un medio celular simulado a través de herramientas computacionales (software Gromacs), logrando la estabilidad molecular y capacidad estructural optimizada de los modelos estudiados.
- TERCERA** Se evalúa la simulación de dinámica molecular de los anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (Llama, Vicuña, Camello) frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide, logrando que la interacción otorgue una mayor estabilidad estructural a las formas de la proteína beta-amiloide, principalmente en el tetramero y pentámero, teniendo fluctuaciones reducidas menores a 0.1 nm e interacciones de tipo Van-der-Waals, que no permiten cambios conformacionales, según el análisis de RMSF y radio de giro (RG). El RG de la estructura fibrilar es significativamente más bajo ($p < 0.05$) y se explica por la presencia de láminas beta; en cambio la inestabilidad del monómero y trímero se explica por la presencia de alfa hélices.
- CUARTA** Al analizar los sitios activos de los anticuerpos monoclonales, se identifican los bolsillos de alta afinidad que corresponden a los blancos de acción molecular, a través del servidor de predicción de drogabilidad. Se verifica el sitio activo de los anticuerpos monoclonales con el monómero, a través del análisis de RMSF.

- QUINTA** El análisis de las interacciones moleculares de los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos contra las formas de proteína beta-amiloide, a través de las herramientas computacionales, demuestra que se dan de forma espontánea con un valor de energía atómica entre -3.12 y -17.15 kcal/mol.
- SEXTA** La calidad general y validación de las estructuras de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales y nanocuerpos, presentan un alto porcentaje de aceptación en los residuos en regiones favorecidas y bajos porcentajes en regiones permitidas y residuos fuera de la región, junto con un Z-score ~ -6.00 que pertenece a rangos de conformaciones nativas, verificando así su existencia en la naturaleza como modelos estructurales.
- SÉPTIMA** Finalmente, se concluye que en la evaluación in silico, sí existe interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide. Estas interacciones abren el campo de la inmunología para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

RECOMENDACIONES

- PRIMERA** Se recomienda incrementar el tiempo de cálculo de la dinámica molecular para futuros ensayos con el objetivo de obtener un mayor análisis de los comportamientos moleculares.
- SEGUNDA** Se recomienda la investigación continua del empleo de nanocuerpos contra la proteína beta-amiloide para ampliar el conocimiento acerca de los epítomos del objetivo que será aplicado en futuras investigaciones.
- TERCERA** Se recomienda replicar los estudios in silico con el objetivo de profundizar en la evaluación de la proteína beta-amiloide, para que posteriormente los métodos diagnósticos se apliquen in vivo e in situ en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer.
- CUARTA** Se recomienda profundizar en estudios exploratorios in silico que permite predecir y simular comportamientos estructurales, así como analizar las propiedades físico-químicas de modelos estructurales que serán herramientas potenciales para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Jun 16];17(3):327–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33756057/>
2. Patterson C. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers [Internet]. Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK. 2018 Sep [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>
3. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2021 Jun 16];1(1):a006189. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
4. Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Hari-Raj A, Dincer A, Flores S, et al. Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jun 16];17(3):241–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29397305/>
5. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2021 Jun 16];7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
6. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2021 Jun 16];8(1):1–13. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2011.10.007>
7. Bloom GS. Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2021 Jun 16];71(4):505–8. Available from: <https://jamanetwork.com/>

8. Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, Bennett DA, Shah RC, et al. Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* [Internet]. 2010 Aug 31 [cited 2021 Jun 16];75(9):786–91. Available from: <https://n.neurology.org/content/75/9/786>
9. De La Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. Vol. 88, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2014. p. 548–59.
10. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, et al. Complement activation by β -amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 Nov 1 [cited 2021 Jun 16];89(21):10016–20. Available from: <https://www.pnas.org/content/89/21/10016>
11. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H. Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. Vol. 140, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2017. p. 176–92.
12. Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. Vol. 588, *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier; 2014. p. 641–52.
13. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. Vol. 64, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2018. p. S567–610.
14. Rios-Romenets S, Giraldo-Chica M, López H, Piedrahita F, Ramos C, Acosta-Baena N, et al. The Value of Pre-Screening in the Alzheimer's Prevention Initiative (API) Autosomal Dominant Alzheimer's Disease Trial. *J Prev Alzheimer's Dis* 2017 51 [Internet]. 2017 Nov 7 [cited 2022 Apr 3];5(1):49–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.14283/jpad.2017.44>
15. Ribatti D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. Vol. 161, *Immunology Letters*. Elsevier; 2014. p. 96–9.
16. Xu L, Cao H, Huang C, Jia L. Oriented immobilization and quantitative analysis simultaneously realized in sandwich immunoassay via his-tagged nanobody. *Molecules* [Internet]. 2019 May 16 [cited 2021 Jun 17];24(10):1890. Available from: www.mdpi.com/journal/molecules

17. Siontorou CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2022 Apr 3];8:4215. Available from: [/pmc/articles/PMC3818023/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818023/)
18. Asefy Z, Hoseinnejhadd S, Ceferov Z. Nanoparticles approaches in neurodegenerative diseases diagnosis and treatment. *Neurol Sci* 2021 427 [Internet]. 2021 Apr 12 [cited 2022 Apr 3];42(7):2653–60. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10072-021-05234-x>
19. Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics [Internet]. Vol. 324, *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 2002 [cited 2021 Mar 23]. p. 1018–22. Available from: [/pmc/articles/PMC1122955/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1122955/)
20. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 14, *Alzheimer’s and Dementia*. Elsevier Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 22]. p. 535–62. Available from: [/pmc/articles/PMC5958625/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29814125/)
21. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 22];7(3):280–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514248/>
22. ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenheilkunde* [Internet]. 1907 [cited 2021 Jun 21];18:177–9. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008335947>
23. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer’s 1907 paper, “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde.” *Clin Anat* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 21];8(6):429–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8713166/>
24. Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 1998 Jun [cited 2021 Jun 23];248(3):111–22.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9728729/>

25. Kraepelin E. *Psychiatrie: ein kurzes Lehrbuch für Studierende und Aerzte*. 1893 [cited 2021 Jun 23]; Available from: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=hww1AQAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=kraepelin+psychiatrie+ein+lehrbuch+für+studierende+und+ärzte&ots=OOzIpB3ZAF&sig=9V5RNbIZ7XfiE3xr1JIJ5gW1gh4>
26. Katzman R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. *Arch Neurol* [Internet]. 1976 Apr 1 [cited 2021 Jun 23];33(4):217–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/574311>
27. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's disease: Past, present, and future. Vol. 23, *Journal of the International Neuropsychological Society*. Cambridge University Press; 2017. p. 818–31.
28. Matthews FE, Stephan BCM, Robinson L, Jagger C, Barnes LE, Arthur A, et al. A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies i and II. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Apr 19 [cited 2021 Jun 21];7(1):1–8. Available from: www.nature.com/naturecommunications
29. Wu YT, Fratiglioni L, Matthews FE, Lobo A, Breteler MMB, Skoog I, et al. Dementia in western Europe: Epidemiological evidence and implications for policy making. Vol. 15, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2016. p. 116–24.
30. James BD, Leurgans SE, Hebert LE, Scherr PA, Yaffe K, Bennett DA. Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. *Neurology* [Internet]. 2014 Mar 25 [cited 2021 Jun 23];82(12):1045–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24598707/>
31. Tinetti ME, McAvay GJ, Murphy TE, Gross CP, Lin H, Allore HG. Contribution of individual diseases to death in older adults with multiple diseases. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2012 Aug [cited 2021 Jun 23];60(8):1448–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22734792/>
32. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis; The global prevalence of dementia: A

- systematic review and metaanalysis. 2013 [cited 2021 Jun 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
33. Garre-Olmo J. Epidemiology of alzheimer's disease and other dementias. Vol. 66, Revista de Neurologia. Revista de Neurologia; 2018. p. 377–86.
34. Minsa atiende en lo que va del año 3,700 casos de demencia en adulto mayor | Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/29972-minsa-atiende-en-lo-que-va-del-ano-3-700-casos-de-demencia-en-adulto-mayor>
35. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú | Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru>
36. Custodio N, García A, Montesinos R, Escobar J, BendeZú L. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: estudio puerta a puerta. An la Fac Med [Internet]. 2008;69:233–8. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000400003&nrm=iso
37. Contreras C, Condor I, Atencio J, Atencio M. Prevalencia de demencia y funcionalidad en una clínica geriátrica de Huancayo, Perú, 2016-2017. An la Fac Med [Internet]. 2019 Mar 27 [cited 2021 Jun 26];80(1):51–5. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832019000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
38. Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, et al. Author response: Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology [Internet]. Vol. 91, Neurology. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2021 Jun 23]. p. 373–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126885/>
39. Nichols E, Szeoke CEI, Vollset SE, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdela J, et al. Global,

- regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 Jan 1;18(1):88–106.
40. Lin PJ, D'Cruz B, Leech AA, Neumann PJ, Sanon Aigbogun M, Oberdhan D, et al. Family and Caregiver Spillover Effects in Cost-Utility Analyses of Alzheimer's Disease Interventions. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Jun 28];37(4):597–608. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40273-019-00788-3>
 41. Yu H, Wang X, He R, Liang R, Zhou L. Measuring the caregiver burden of caring for community-residing people with Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2015 Jul 8;10(7).
 42. Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, Llanero Luque M, López de Silanes de Miguel C, Prieto Jurczynska C. Report by the Spanish Foundation of the Brain on the social impact of Alzheimer disease and other types of dementia. Vol. 36, *Neurologia. Spanish Society of Neurology*; 2021. p. 39–49.
 43. Gil R, Arroyo-Anlló EM. Alzheimer's Disease and Face Masks in Times of COVID-19. *J Alzheimer's Dis.* 2021 Jan 1;79(1):9–14.
 44. Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, et al. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Jun 22];13(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.07.150>
 45. El-Hayek YH, Wiley RE, Khoury CP, Daya RP, Ballard C, Evans AR, et al. Tip of the Iceberg: Assessing the Global Socioeconomic Costs of Alzheimer's Disease and Related Dementias and Strategic Implications for Stakeholders. Vol. 70, *Journal of Alzheimer's Disease.* IOS Press; 2019. p. 321–39.
 46. Cantarero-Prieto D, Leon PL, Blazquez-Fernandez C, Juan PS, Cobo CS. The economic cost of dementia: A systematic review. *Dementia* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Jun 22];19(8):2637–57. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1471301219837776>
 47. Serrano-Pozo A, Growdon JH. Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? Vol. 67, *Journal of Alzheimer's Disease.* IOS Press; 2019. p. 795–819.

48. Nelson PT, Schmitt FA, Lin Y, Abner EL, Jicha GA, Patel E, et al. Hippocampal sclerosis in advanced age: Clinical and pathological features. *Brain* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2021 Jun 26];134(5):1506–18. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/134/5/1506/285355>
49. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. Vol. 390, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017. p. 2673–734.
50. Larson EB. Prospects for delaying the rising tide of worldwide, late-life dementias [Internet]. Vol. 22, *International Psychogeriatrics*. NIH Public Access; 2010 [cited 2021 Jun 27]. p. 1196–202. Available from: [/pmc/articles/PMC3164829/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2164829/)
51. Satizabal CL, Beiser AS, Chouraki V, Chêne G, Dufouil C, Seshadri S. Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Feb 11 [cited 2021 Jun 27];374(6):523–32. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1504327>
52. Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, Au R, McNulty K, White R, et al. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease: The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology* [Internet]. 1997 [cited 2021 Jun 28];49(6):1498–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9409336/>
53. Scheyer O, Rahman A, Hristov H, Berkowitz C, Isaacson RS, Diaz Brinton R, et al. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2018;5(4):225–30.
54. Neu SC, Pa J, Kukull W, Beekly D, Kuzma A, Gangadharan P, et al. Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Jun 27];74(10):1178–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846757/>
55. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 377, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2011 [cited 2021 Jun 28]. p. 1019–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371747/>
56. Naj AC, Schellenberg GD. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's

- disease: An overview [Internet]. Vol. 174, American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics. Blackwell Publishing Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 5–26. Available from: [/pmc/articles/PMC6179157/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209629/)
57. Guerreiro R, Brás J, Hardy J. XSNapShot: Genetics of alzheimer's disease [Internet]. Vol. 155, Cell. Elsevier B.V.; 2013 [cited 2021 Jun 28]. p. 968-968.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209629/>
 58. Sierksma A, Escott-Price V, De Strooper B. Translating genetic risk of Alzheimer's disease into mechanistic insight and drug targets [Internet]. Vol. 370, Science. American Association for the Advancement of Science; 2020 [cited 2021 Jun 28]. p. 61–6. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/370/6512/61>
 59. Geiger JT, Ding J, Crain B, Pletnikova O, Letson C, Dawson TM, et al. Next-generation sequencing reveals substantial genetic contribution to dementia with Lewy bodies. Neurobiol Dis [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Jun 28];94:55–62. Available from: [/pmc/articles/PMC4983488/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209629/)
 60. Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, et al. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. Neurology [Internet]. 2003 Jan 28 [cited 2021 Jun 27];60(2):235–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12552037/>
 61. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KAB, Weber JL, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. Science (80-) [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 27];269(5226):970–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7638621/>
 62. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GAP, St. George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid β protein gene: CDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science (80-) [Internet]. 1987 [cited 2021 Jun 27];235(4791):880–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2949367/>
 63. George-Hyslop PS, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Nat Genet [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 27];2(4):330–4. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1303289/>
64. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* (80-) [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 27];258(5082):668–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1411576/>
 65. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (1716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum Mol Genet* [Internet]. 1997 Nov [cited 2021 Jun 27];6(12):2087–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9328472/>
 66. Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2021 Jun 27];83(3):253–60. Available from: <https://n.neurology.org/content/83/3/253>
 67. Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and γ -secretase activity [Internet]. Vol. 93, *Journal of Neurochemistry*. J Neurochem; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 769–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15857382/>
 68. Woloizin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacanà E, Sunderland T, et al. Participation of Presenilin 2 in apoptosis: Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* (80-) [Internet]. 1996 Dec 6 [cited 2021 Jun 27];274(5293):1710–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8939861/>
 69. Renbaum P, Levy-Lahad E. Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: Presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1998 [cited 2021 Jun 27];54(9):910–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9791533/>
 70. Oyama F, Cairns NJ, Shimada H, Oyama R, Titani K, Ihara Y. Down's Syndrome: Up-Regulation of β -Amyloid Protein Precursor and τ mRNAs and Their Defective Coordination. *J Neurochem* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jun 27];62(3):1062–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8113792/>
 71. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*

- [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2021 Jun 27];63(2):168–74. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/209307>
72. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (80-) [Internet]. 1993 [cited 2021 Jun 27];261(5123):921–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8346443/>
 73. Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PWF, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 association with dementia in a population-based study: The Framingham Study. *Neurology* [Internet]. 1996 [cited 2021 Jun 27];46(3):673–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8618665/>
 74. Ritchie K, Carrière I, Ritchie CW, Berr C, Artero S, Ancelin ML. Designing prevention programmes to reduce incidence of dementia: Prospective cohort study of modifiable risk factors. *BMJ* [Internet]. 2010 Aug 14 [cited 2021 Jun 27];341(7768):336. Available from: <http://www.bmj.com/>
 75. Song X, Mitnitski A, Rockwood K. Age-related deficit accumulation and the risk of late-life dementia. *Alzheimer's Res Ther* [Internet]. 2014 Sep 18 [cited 2021 Jun 26];6(5–8):1–13. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13195-014-0054-5>
 76. White L, Petrovitch H, Hardman J, Nelson J, Davis DG, Ross GW, et al. Cerebrovascular pathology and dementia in autopsied Honolulu-Asia Aging Study participants. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. New York Academy of Sciences; 2002 [cited 2021 Jun 27]. p. 9–23. Available from: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04794.x>
 77. Santacruz KS, Sonnen JA, Pezhouh MK, Desrosiers MF, Nelson PT, Tyas SL. Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: The nun study and the adult changes in thought study. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2021 Jun 27];70(10):832–40. Available from: www.jneuropath.com
 78. Snowdon DA. Brain Infarction and the Clinical Expression of Alzheimer Disease<subtitle>The Nun Study</subtitle>. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1997 Mar 12 [cited 2021 Jun 27];277(10):813. Available from:

- <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/414570>
79. Adelman S, Blanchard M, Rait G, Leavey G, Livingston G. Prevalence of dementia in African-Caribbean compared with UK-born White older people: Two-stage cross-sectional study. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 Jun 27];199(2):119–25. Available from: www.haringey.gov.uk
 80. Qiu C, Sigurdsson S, Zhang Q, Jonsdottir MK, Kjartansson O, Eiriksdottir G, et al. Diabetes, markers of brain pathology and cognitive function: The Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2021 Jun 27];75(1):138–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.24063>
 81. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. Vol. 5, *Lancet Neurology*. Elsevier; 2006. p. 64–74.
 82. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* [Internet]. 2003 Jul 22 [cited 2021 Jun 27];61(2):199–205. Available from: <https://n.neurology.org/content/61/2/199>
 83. Li G, Larson EB, Sonnen JA, Shofer JB, Petrie EC, Schantz A, et al. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2007 Aug 28 [cited 2021 Jun 27];69(9):878–85. Available from: <https://n.neurology.org/content/69/9/878>
 84. Li G, Shofer JB, Kukull WA, Peskind ER, Tsuang DW, Breitner JCS, et al. Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: A community-based cohort study. *Neurology* [Internet]. 2005 Oct 11 [cited 2021 Jun 27];65(7):1045–50. Available from: <https://n.neurology.org/content/65/7/1045>
 85. Chuang YF, An Y, Bilgel M, Wong DF, Troncoso JC, O'Brien RJ, et al. Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia, neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Jun 27];21(7):910–5. Available from: www.nature.com/mp

86. Wu KY, Lin KJ, Chen CH, Chen CS, Liu CY, Huang SY, et al. Diversity of neurodegenerative pathophysiology in nondemented patients with major depressive disorder: Evidence of cerebral amyloidosis and hippocampal atrophy. *Brain Behav* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];8(7):1016. Available from: <https://doi.org/10.1002/brb3.1016>
87. Shi L, Chen SJ, Ma MY, Bao YP, Han Y, Wang YM, et al. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. Vol. 40, *Sleep Medicine Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 4–16.
88. Tyas SL, White LR, Petrovitch H, Ross GW, Foley DJ, Heimovitz HK, et al. Mid-life smoking and late-life dementia: The Honolulu-Asia Aging study. *Neurobiol Aging*. 2003 Jul 1;24(4):589–96.
89. Zhong G, Wang Y, Zhang Y, Guo JJ, Zhao Y. Smoking is associated with an increased risk of dementia: A meta-analysis of prospective cohort studies with investigation of potential effect modifiers. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2021 Jun 27];10(3):e0118333. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118333>
90. Sommerlad A, Ruegger J, Singh-Manoux A, Lewis G, Livingston G. Marriage and risk of dementia: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jun 27];89(3):231–8. Available from: <http://www>.
91. Shinohara M, Kanekiyo T, Yang L, Linthicum D, Shinohara M, Fu Y, et al. APOE2 eases cognitive decline during Aging: Clinical and preclinical evaluations. *Ann Neurol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Jun 27];79(5):758–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.24628>
92. Kuiper JS, Zuidersma M, Oude Voshaar RC, Zuidema SU, van den Heuvel ER, Stolk RP, et al. Social relationships and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. Vol. 22, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 39–57.
93. Berti V, Walters M, Sterling J, Quinn CG, Logue M, Andrews R, et al. Mediterranean diet

- and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. *Neurology* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2021 Jun 27];90(20):E1789–98. Available from: <https://n.neurology.org/content/90/20/e1789>
94. Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology* [Internet]. 2007 Sep 11 [cited 2021 Jun 27];69(11):1084–93. Available from: <https://n.neurology.org/content/69/11/1084>
 95. Young J, Angevaren M, Rusted J, Tabet N. Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment [Internet]. Vol. 2015, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2015 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005381.pub4/full>
 96. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2009 Aug 12 [cited 2021 Jun 27];302(6):627–37. Available from: <https://jamanetwork.com/>
 97. Luchsinger JA, Tang MX, Siddiqui M, Shea S, Mayeux R. Alcohol Intake and Risk of Dementia. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2021 Jun 27];52(4):540–6. Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1532-5415.2004.52159.x>
 98. Langa KM, Larson EB, Crimmins EM, Faul JD, Levine DA, Kabeto MU, et al. A comparison of the prevalence of dementia in the United States in 2000 and 2012. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Jun 26];177(1):51–8. Available from: <https://jamanetwork.com/>
 99. Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. Vol. 11, *The Lancet Neurology*. Elsevier; 2012. p. 1006–12.
 100. Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. Vol. 61, *Progress in Neurobiology*. Pergamon; 2000. p. 75–111.
 101. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The Many Faces of Tau. Vol. 70, *Neuron*. Cell Press; 2011. p. 410–26.

102. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010 Dec 10;7(8):656–64.
103. Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC, et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Oct 14 [cited 2021 Jun 29];111(41):E4376–85. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1411649111
104. Ittner LM, Götz J. Amyloid- β and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Jun 29];12(2):67–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn2967>
105. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 28];359(6393):322–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/359322a0>
106. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2021 Jun 28];34:185–204. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
107. Wisniewski T, Goñi F. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. Vol. 85, *Neuron*. Cell Press; 2015. p. 1162–76.
108. Lesné SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, et al. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Jun 28];136(5):1383–98. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/136/5/1383/285958>
109. Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: Inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. Vol. 363, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2004. p. 1139–46.
110. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 28];1–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.14283/jpad.2021.23>

111. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. Vol. 9, The Lancet Neurology. Elsevier; 2010. p. 1118–27.
112. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. Alzheimer's Dement [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];15(7):888–98. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
113. Kazim SF, Iqbal K. Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: Emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 11, Molecular Neurodegeneration. BioMed Central Ltd.; 2016 [cited 2021 Jun 28]. p. 50. Available from: <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>
114. Ismail Z, Agüera-Ortiz L, Brodaty H, Cieslak A, Cummings J, Fischer CE, et al. The Mild Behavioral Impairment Checklist (MBI-C): A Rating Scale for Neuropsychiatric Symptoms in Pre-Dementia Populations. J Alzheimer's Dis. 2017 Jan 1;56(3):929–38.
115. Markowitsch HJ, Staniloiu A. Amnesic disorders [Internet]. Vol. 380, The Lancet. Elsevier B.V.; 2012 [cited 2021 Jun 28]. p. 1429–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503117/>
116. Mortamais M, Ash JA, Harrison J, Kaye J, Kramer J, Randolph C, et al. Detecting cognitive changes in preclinical Alzheimer's disease: A review of its feasibility [Internet]. Vol. 13, Alzheimer's and Dementia. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 468–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27702618/>
117. Barrett AM, Eslinger PJ, Ballentine NH, Heilman KM. Unawareness of cognitive deficit (cognitive anosognosia) in probable AD and control subjects. Neurology [Internet]. 2005 Feb 22 [cited 2021 Jun 28];64(4):693–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15728294/>
118. Harwood DG, Sultzer DL, Wheatley M V. Impaired insight in Alzheimer disease: Association with cognitive deficits, psychiatric symptoms, and behavioral disturbances.

- Neuropsychiatry, Neuropsychol Behav Neurol [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2021 Jun 28];13(2):83–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/10780626>
119. Peters KR, Rockwood K, Black SE, Bouchard R, Gauthier S, Hogan D, et al. Characterizing neuropsychiatric symptoms in subjects referred to dementia clinics. Neurology [Internet]. 2006 Feb [cited 2021 Jun 28];66(4):523–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16505306/>
 120. Sarazin M, Stern Y, Berr C, Riba A, Albert M, Brandt J, et al. Neuropsychological predictors of dependency in patients with Alzheimer disease. Neurology [Internet]. 2005 Mar 22 [cited 2021 Jun 28];64(6):1027–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15781821/>
 121. Quarmley M, Moberg PJ, Mechanic-Hamilton D, Kabadi S, Arnold SE, Wolk DA, et al. Odor Identification Screening Improves Diagnostic Classification in Incipient Alzheimer's Disease. J Alzheimer's Dis [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 28];55(4):1497–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27886011/>
 122. Ju YES, Lucey BP, Holtzman DM. Sleep and Alzheimer disease pathology-a bidirectional relationship [Internet]. Vol. 10, Nature Reviews Neurology. Nat Rev Neurol; 2014 [cited 2021 Jun 28]. p. 115–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366271/>
 123. Vessel KA, Tartaglia MC, Nygaard HB, Zeman AZ, Miller BL. Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance [Internet]. Vol. 16, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 311–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28327340/>
 124. Portet F, Scarmeas N, Cosentino S, Helzner EP, Stern Y. Extrapyrmidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study. Arch Neurol [Internet]. 2009 Sep [cited 2021 Jun 28];66(9):1120–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752301/>
 125. Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: Review. JAMA - J Am Med Assoc [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2021 Jun 28];322(16):1589–99. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2753376>
 126. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking

- pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Vol. 12, *The Lancet Neurology*. 2013. p. 207–16.
127. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 231–55.
 128. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Vol. 26, *Neurología*. 2011. p. 301–6.
 129. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune Haemolysis Associated with Donath-Landsteiner Antibodies. *Acta Haematol* [Internet]. 1982 [cited 2022 Apr 28];68(4):268–77. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/206992>
 130. Kaufmann SHE. Immunology's coming of age [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Jul 1]. p. 684. Available from: www.frontiersin.org
 131. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* [Internet]. 1975 Aug 1 [cited 2021 Jun 30];256(5517):495–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/256495a0>
 132. Wilde MI, Goa KL. Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection. *Drugs* [Internet]. 1996 [cited 2022 Apr 28];51(5):865–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8861551/>
 133. Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, et al. Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):85–99.
 134. Kopp-Kubel S. International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 30];73(3):275–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10484444/>
 135. Parren PWHI, Carter PJ, Plückthun A. Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more [Internet]. Vol. 9, *mAbs*. Taylor and Francis Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 30]. p. 898–906. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kmab20>
 136. van Dyck CH. Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls

- and Promise. Vol. 83, Biological Psychiatry. Elsevier USA; 2018. p. 311–9.
137. Cummings JL, Cohen S, Van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, et al. A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2021 Jul 1];90(21):E1889–97. Available from: <https://n.neurology.org/content/90/21/e1889>
 138. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al. Gantenerumab: A novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimer's Dis*. 2012 Jan 1;28(1):49–69.
 139. Messer A, Butler DC. Optimizing intracellular antibodies (intrabodies/nanobodies) to treat neurodegenerative disorders. Vol. 134, *Neurobiology of Disease*. Academic Press Inc.; 2020.
 140. Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. Vol. 79, *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2001. p. 261–96.
 141. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* [Internet]. 2009 Apr 13 [cited 2021 Jul 1];11(3):500–15. Available from: <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.34602>.
 142. Lauwereys M, Ghahroudi MA, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2021 Jul 1];17(13):3512–20. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/17.13.3512>
 143. Pain C, Dumont J, Dumoulin M. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. Vol. 111, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2015. p. 82–106.
 144. Boguski MS. Bioinformatics - A new era. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1998 Nov 1 [cited 2021 Mar 23];16(SUPPL.1):1–3. Available from: <http://www.cell.com/article/S0167779998001255/fulltext>
 145. Molitor R, Sturn A, Maurer M, Trajanoski Z. New trends in bioinformatics: From genome

- sequence to personalized medicine. Vol. 38, Experimental Gerontology. Elsevier Inc.; 2003. p. 1031–6.
146. Fourment M, Gillings MR. A comparison of common programming languages used in bioinformatics. BMC Bioinformatics [Internet]. 2008 Feb 5 [cited 2021 Mar 24];9(1):1–9. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2105-9-82>
 147. Morais D, Roesch LFW, Redmile-Gordon M, Santos FG, Baldrian P, Andreote FD, et al. BTW-Bioinformatics Through Windows: An easy-to-install package to analyze marker gene data. PeerJ. 2018;2018(7).
 148. Chang J, Zhu X. Bioinformatics Databases: Intellectual Property Protection Strategy*. J Intellect Prop Rights [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 28];15:447–54. Available from: www.manupatra.com
 149. Arita M, Karsch-Mizrachi I, Cochrane G. The international nucleotide sequence database collaboration. Nucleic Acids Res [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2022 Apr 28];49(D1):D121. Available from: [/pmc/articles/PMC7778961/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/)
 150. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow G V., et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. Nucleic Acids Res [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2022 Apr 28];49(D1):D437–51. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D437/5992282>
 151. Chen C, Huang H, Wu CH. Protein bioinformatics databases and resources. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. Humana Press Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 24]. p. 3–39. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6783-4_1
 152. Westbrook JD, Burley SK. How Structural Biologists and the Protein Data Bank Contributed to Recent FDA New Drug Approvals [Internet]. Vol. 27, Structure. Cell Press; 2019 [cited 2021 Mar 24]. p. 211–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.007>
 153. Geng H, Chen F, Ye J, Jiang F. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins. Vol. 17, Computational and Structural

- Biotechnology Journal. Elsevier B.V.; 2019. p. 1162–70.
154. Chiu W. What Does Electron Cryomicroscopy Provide that X-Ray Crystallography and NMR Spectroscopy Cannot? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet]. 1993 Jun 28 [cited 2021 Mar 24];22(1):233–55. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bb.22.060193.001313>
 155. Epstein CJ, Goldberger RF, Anfinsen CB. The Genetic Control of Tertiary Protein Structure: Studies With Model Systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 1963 Jan 1 [cited 2021 Mar 24];28(0):439–49. Available from: <http://symposium.cshlp.org/content/28/439>
 156. Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD, Jr. Molecular Mechanics. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2022 Apr 28];20(20):3281. Available from: [/pmc/articles/PMC4026342/](http://pmc/articles/PMC4026342/)
 157. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Shaw DE. How fast-folding proteins fold. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2021 Mar 24];334(6055):517–20. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/334/6055/517>
 158. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.
 159. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*. 2012;857:231–57.
 160. Martínez L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. Kleinjung J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2021 Mar 24];10(3):e0119264. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119264>
 161. Rudin A, Choi P. Practical Aspects of Molecular Weight Measurements. In: *The Elements of Polymer Science & Engineering*. Elsevier; 2013. p. 89–148.
 162. Kaisler S, Armour F, Espinosa JA, Money W. Big data: Issues and challenges moving forward. *Proc Annu Hawaii Int Conf Syst Sci*. 2013;995–1004.

163. Aljawarneh S, Anguera A, Atwood JW, Lara JA, Lizcano D. Particularities of data mining in medicine: lessons learned from patient medical time series data analysis. *Eurasip J Wirel Commun Netw* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Apr 28];2019(1):1–29. Available from: <https://jwcn-urasipjournals.springeropen.com/articles/10.1186/s13638-019-1582-2>
164. Rana M. Bioinformatics Shape Personalized Medicine: A Perspective. Vol. 12, *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*. 2020.
165. Payghan P V., Bera I, Bhattacharyya D, Ghoshal N. Computational studies for structure-based drug designing against transmembrane receptors: PLGICs and class a GPCRs. *Front Phys*. 2018 Sep 25;6(SEP):52.
166. Sun ZT, Ma C, Li GJ, Zheng XY, Hao YT, Yang Y, et al. Application of Antibody Fragments Against A β With Emphasis on Combined Application With Nanoparticles in Alzheimer's Disease [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [cited 2021 Jun 25]. Available from: [/pmc/articles/PMC8100690/](https://pmc/articles/PMC8100690/)
167. Khorvash M, Blinov N, Ladner-Keay C, Lu J, Silverman JM, Gibbs E, et al. Molecular interactions between monoclonal oligomer-specific antibody 5E3 and its amyloid beta cognates. *PLoS One*. 2020 May 1;15(5).
168. Murakami K, Tokuda M, Suzuki T, Irie Y, Hanaki M, Izuo N, et al. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. *Sci Rep*. 2016 Jul 4;6.
169. Gunsteren WF V. Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. VDF Hochschulverlag AG ander ETH Zürich, Zürich. Switzerland. 1996 Jan 1;1–1042.
170. Berendsen H, Postma JPM, van Gunsteren W, Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: *Intermol Forces*. 1981. p. 331–42.
171. Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* [Internet]. 1998 Aug 31 [cited 2022 Jan 16];81(8):3684. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.448118>

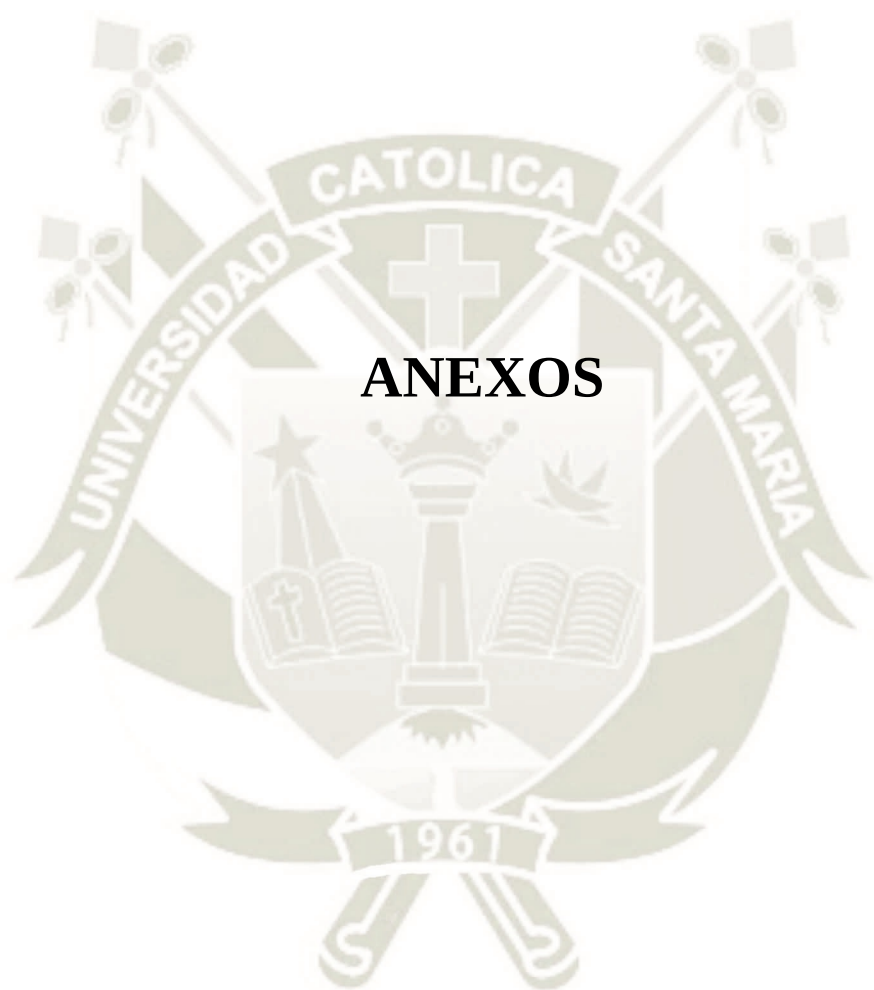
172. Huang CC, Meng EC, Morris JH, Pettersen EF, Ferrin TE. Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul 1;42(W1).
173. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank [Internet]. Vol. 28, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 2000 [cited 2021 Jun 24]. p. 235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592235/>
174. Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, et al. RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2021 Jun 24];47(D1):D464–74. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D464/5144139>
175. Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJ, Appleton G, Axton M, Baak A, et al. Comment: The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2021 Jun 24];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978244/>
176. Hussein HA, Borrel A, Geneix C, Petitjean M, Regad L, Camproux AC. PockDrug-Server: A new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];43(W1):W436–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/43/W1/W436/2467926>
177. Borrel A, Regad L, Xhaard H, Petitjean M, Camproux AC. PockDrug: A model for predicting pocket druggability that overcomes pocket estimation uncertainties. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2015 Apr 27 [cited 2021 Jun 24];55(4):882–95. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci5006004>
178. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient unbound docking of rigid molecules. In: *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* [Internet]. Springer Verlag; 2002 [cited 2021 Jun 24]. p. 185–200. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-45784-4_14
179. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock:

- Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];33(SUPPL. 2):W363–7. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl_2/W363/2505698
180. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins Struct Funct Bioinforma* [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2021 Mar 24];69(1):139–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21495>
 181. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, De Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins Struct Funct Genet* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2021 Jun 24];50(3):437–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.10286>
 182. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];35(SUPPL.2):407–10. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W407/2920938
 183. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Apr 2];38(9):1205. Available from: [/pmc/articles/PMC5589967/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589967/)
 184. Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, Salvadori S, D'Ursi AM, Temussi PA, et al. Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1–42) in an apolar microenvironment. *Eur J Biochem* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2022 Apr 1];269(22):5642–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1033.2002.03271.x>
 185. Wälti MA, Ravotti F, Arai H, Glabe CG, Wall JS, Böckmann A, et al. Atomic-resolution structure of a disease-relevant $A\beta(1-42)$ amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2022 Apr 1];113(34):E4976–84. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1600749113
 186. Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, et al. Fibril structure of amyloid- $\beta(1-42)$ by cryo-electron microscopy. *Science* [Internet]. 2017 Oct 6 [cited 2022 Mar 27];358(6359):116–9. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1257578>

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882996/>
187. Mirza Z, Pillai V, Kamal M. Protein interactions between the C-terminus of A β -peptide and phospholipase A2--a structure biology based approach to identify novel Alzheimer's therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2014 Sep 19 [cited 2022 Apr 2];13(7):1224–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25230229/>
 188. Goldsbury C, Green J. Time-lapse atomic force microscopy in the characterization of amyloid-like fibril assembly and oligomeric intermediates. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 2];299:103–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980598/>
 189. Alves RPS, Yang MJ, Batista MT, Ferreira LCS. Alzheimer's disease: is a vaccine possible? *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2014 [cited 2022 Mar 27];47(6):438. Available from: [/pmc/articles/PMC4086169/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24086169/)
 190. Marschall ALJ, Dübel S. Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm? *Comput Struct Biotechnol J*. 2016 Jan 1;14:304–8.
 191. Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, et al. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* [Internet]. 1982 [cited 2022 Mar 27];298(5869):84–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6178036/>
 192. Wang GP, Grundke-Iqbal I, Kascsak RJ, Iqbal K, Wisniewski HM. Alzheimer neurofibrillary tangles: monoclonal antibodies to inherent antigen(s). *Acta Neuropathol* [Internet]. 1984 Dec [cited 2022 Mar 27];62(4):268–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6730905/>
 193. Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Kim KS, Wisniewski HM. Immunoreactivity of neuronal lipofuscin with monoclonal antibodies to the amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging* [Internet]. 1989 [cited 2022 Mar 27];10(2):125–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2657463/>
 194. Stern RA, Otvos L, Trojanowski JQ, Lee VMY. Monoclonal antibodies to a synthetic peptide homologous with the first 28 amino acids of Alzheimer's disease beta-protein

- recognize amyloid and diverse glial and neuronal cell types in the central nervous system. *Am J Pathol* [Internet]. 1989 [cited 2022 Mar 27];134(5):973. Available from: [/pmc/articles/PMC1879896/?report=abstract](#)
195. Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Apr 15 [cited 2022 Mar 27];94(8):4109. Available from: [/pmc/articles/PMC20576/](#)
 196. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Jul 17 [cited 2022 Mar 27];98(15):8850–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11438712/>
 197. Boada-Rovira M. Strategies for the treatment of Alzheimer's disease: The “ad continuum” concept. *Rev Neurol*. 2001;32(11):1074–84.
 198. Crespi GAN, Hermans SJ, Parker MW, Miles LA. Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Apr 16 [cited 2022 Mar 27];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25880481/>
 199. Ultsch M, Li B, Maurer T, Mathieu M, Adolfsson O, Muhs A, et al. Structure of Crenezumab Complex with A β Shows Loss of β -Hairpin. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2022 Mar 27];6(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep39374>
 200. Geylis V, Steinitz M. Immunotherapy of Alzheimer's disease (AD): from murine models to anti-amyloid beta (Abeta) human monoclonal antibodies. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2006 Jan [cited 2022 Mar 27];5(1):33–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16338209/>
 201. Zhang Y, He JS, Wang X, Wang J, Bao FX, Pang SY, et al. Administration of amyloid- β 42 oligomer-specific monoclonal antibody improved memory performance in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2011 [cited 2022 Mar 27];23(3):551–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21297277/>

202. Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. Modified immunotherapies against Alzheimer's disease: toward safer and effective amyloid clearance. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 27];21(4):1065–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21504118/>
203. Habicht G, Haupt C, Friedrich RP, Hortschansky P, Sachse C, Meinhardt J, et al. Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A protofibrils. 2007 [cited 2022 Apr 2]; Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
204. Spinelli S, Tegoni M, Frenken L, Van Vliet C, Cambillau C. Lateral recognition of a dye hapten by a llama VHH domain. *J Mol Biol*. 2001 Aug 3;311(1):123–9.
205. Rudolph MJ, Vance DJ, Cassidy MS, Rong Y, Mantis NJ. Structural analysis of single domain antibodies bound to a second neutralizing hot spot on ricin toxin's enzymatic subunit. *J Biol Chem* [Internet]. 2017 Jan 20 [cited 2022 Apr 2];292(3):872–83. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820402674/fulltext>
206. Koch K, Kalusche S, Torres JL, Stanfield RL, Danquah W, Khazanehdari K, et al. Selection of nanobodies with broad neutralizing potential against primary HIV-1 strains using soluble subtype C gp140 envelope trimers. *Sci Reports* 2017 71 [Internet]. 2017 Aug 21 [cited 2022 Apr 2];7(1):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-08273-7>
207. He P, Xin W, Schulz P, Sierks MR. Bispecific Antibody Fragment Targeting APP and Inducing α -Site Cleavage Restores Neuronal Health in an Alzheimer's Mouse Model. *Mol Neurobiol* 2019 5611 [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2022 Mar 31];56(11):7420–32. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-019-1597-z>
208. Toyn J. What lessons can be learned from failed Alzheimer's disease trials? *Expert Rev Clin Pharmacol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2022 Mar 27];8(3):267–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25860157/>



ANEXOS

ANEXO 1: PROYECTO DE TESIS

Universidad Católica de Santa María

“IN SCIENTIA ET FIDE ERIT FORTITUDO NOSTRA”

Facultad de Medicina Humana

Programa Profesional de Medicina Humana



Proyecto de Investigación

“EVALUACIÓN IN SILICO DE INTERACCIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y NANOCUERPOS DE CAMÉLIDOS SOBRE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”

Bachiller:

Maria Gracia Alvarez Valdivia

Proyecto de Investigación para optar el
Título Profesional de Médico Cirujano

Asesor: Dr. Cesar Augusto Núñez Bernal

Arequipa - Perú

2021

Autor responsable:

- Correo electrónico: mariagravalvarez@gmail.com
- Teléfono: +51 959 990 776

ÍNDICE

1. PREÁMBULO	104
2. PLANTEAMIENTO TEÓRICO	105
2.1. Problema de Investigación	105
2.1.1. Enunciado del Problema	105
2.1.2. Descripción del Problema	105
2.1.2.1. Área del Conocimiento	105
2.1.2.2. Análisis de Variables	105
2.1.2.3. Interrogantes Básicas	107
2.1.2.4. Tipo de Investigación	108
2.1.2.5. Diseño de Investigación	108
2.1.2.6. Nivel de Investigación	108
2.2. Justificación del Problema	108
2.1.1. Justificación Científica	108
2.1.2. Justificación social	109
2.1.3. Contemporánea	109
2.1.4. Originalidad	109
2.1.5. Factibilidad	109
2.1.6. Justificación personal	110
2.2. Marco conceptual	110
2.2.1. Enfermedad de Alzheimer	110
2.2.1.1. Definición	110
2.2.1.2. Historia	110
2.2.1.3. Epidemiología	111
2.2.1.4. Impacto	113
2.2.1.4.1. Impacto Psicosocial	113
2.2.1.4.2. Impacto Socioeconómico	113
2.2.1.5. Factores	114
2.2.1.6. Fisiopatología	119
2.2.1.7. Fases de la Enfermedad de Alzheimer	121
2.2.1.8. Clínica de la Enfermedad de Alzheimer	122
2.2.1.9. Diagnóstico	123
2.2.2. Anticuerpos	126
2.2.2.1. Anticuerpos Monoclonales	126

2.2.2.2.	Anticuerpos de cadena pesada (HCAb)	128
2.2.2.2.1.	Nanocuerpos	128
2.2.3.	Bioinformática	129
2.2.3.1.	Definición	129
2.2.3.2.	Herramientas computacionales	130
2.2.3.3.	Diseño, obtención y modelamiento de proteínas	131
2.2.3.4.	Mecánica Molecular y Dinámica Molecular	131
2.2.3.5.	Análisis bioinformático	132
2.2.3.6.	Bioinformática clínica	132
2.3.	Análisis de antecedentes investigativos	133
2.4.	Objetivos	134
2.4.1.	Objetivo General:	134
2.4.2.	Objetivos Específicos:	135
2.5.	Hipótesis	135
3.	PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	136
3.1.	Técnicas, instrumentos y materiales de verificación	136
3.1.1.	Técnicas	136
3.1.1.1.	Obtención y Preparación de las Estructuras	136
3.1.1.2.	Simulación de Dinámica Molecular	136
3.1.1.3.	Análisis de la Dinámica Molecular	137
3.1.1.4.	Predicción de la Drogabilidad	137
3.1.1.5.	Acoplamiento Molecular	137
3.1.1.6.	Validación de Estructuras	137
3.1.2.	Instrumentos:	138
3.1.3.	Materiales:	140
3.1.4.	Cuadro de coherencias	140
3.2.	Campo de verificación	142
3.2.1.	Ubicación espacial:	142
3.2.2.	Ubicación temporal:	142
3.2.3.	Unidades de estudio:	142
	Criterios de selección	142
3.3.	Estrategia de Recolección de datos	143
3.3.1.	Organización	143
3.3.2.	Recursos	143

3.3.2.1. Humanos	143
3.3.2.2. Institucionales	143
3.3.2.3. Materiales	144
3.3.2.4. Financieros	144
3.3.3. Validación de los instrumentos	144
3.4. Consideraciones éticas	144
4. PRESUPUESTO	144
5. CRONOGRAMA DE TRABAJO	145
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146



1. PREÁMBULO

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia a nivel mundial (60-80%) (1). La prevalencia mundial de demencia es de 50 millones de personas y se proyecta que se triplicarán los casos para el 2050, siendo el 60% de países en vías de desarrollo (2).

La EA es un desorden neurológico progresivo irreversible que se produce por la atrofia de la corteza cerebral y pérdida de neuronas a nivel cortical y subcortical (3), que luego de 20 años recién se evidencia la sintomatología (4), cuya etapa final es la demencia (5). A nivel patológico se produce la acumulación de placas amiloides o seniles, que provoca la acumulación de ovillos neurofibrilares a partir de filamentos de proteínas Tau fosforiladas asociados a microtúbulos (6,7). Así mismo, los factores de riesgo no modificables son edad avanzada, historia familiar y genética (8); junto con la alteración en los neurotransmisores, estrés oxidativo, resistencia a la insulina, etc (9). El componente de las placas seniles son los péptidos de beta amiloides (β A) (36 a 43 aminoácidos), producidos a partir de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) gracias a procesos enzimáticos (10). La proteína β A es un producto metabólico natural; sin embargo, un desequilibrio entre la producción y metabolización, produce la agregación de péptidos y acumulación en oligómeros y fibrillas (11), siendo la “hipótesis de la cascada amiloidea” un factor causal de EA (12).

Al no existir un tratamiento modificador de la enfermedad, estudios de investigación tienen el objetivo de buscar diagnósticos accesibles más temprano (presintomático), siendo el enfoque de la Iniciativa de Prevención del Alzheimer (API). Para ellos, existen nuevas investigaciones de inmunodetección con nanocuerpos (13) y el uso de anticuerpos monoclonales (14). Únicamente, los estudios experimentales no son suficientes, aunque ayudan a tener propiedades en un promedio de espacio y tiempo. Los estudios mediante simulaciones computacionales exploran situaciones a diferente tiempo y escala de longitud, y complementan experimentos en laboratorio (15).

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar las interacciones moleculares de tres anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y tres nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) con las estructuras de la proteína beta-amiloide, en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

2. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

a. Problema de Investigación

i. Enunciado del Problema

Evaluación in silico de interacciones de anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos sobre la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

ii. Descripción del Problema

1. Área del Conocimiento

- a. Área general: Ciencias de la Salud
- b. Área específica: Medicina Humana
- c. Especialidad: Ingeniería Biomédica
- d. Línea: Neurología

2. Análisis de Variables

	Variable	Indicador	Unidad / Categoría	Escala
Obtención de estructuras	Proteína beta amiloide (monómero)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Proteína beta amiloide (trímero)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Proteína beta amiloide (tetramero, pentámero y estructura fibrilar)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Anticuerpo monoclonal (Solanezumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta

	Anticuerpo monoclonal (Gantenerumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Anticuerpo monoclonal (Crenezumab)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Llama)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Vicuña)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Nanocuerpo (Camello)	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
Simulación de dinámica molecular	Número de moléculas	Presencia de moléculas	Átomos	Cuantitativa discreta
	Volumen	Volumen de distribución	L/kg	Cuantitativa continua de razón
	Temperatura	Directo	Grados Celsius (C°)	Cuantitativa continua de intervalo
	Tiempo de optimización	Directo	Nanosegundos (ns)	Cuantitativa discreta
Análisis de las interacciones moleculares	Desviación de la raíz cuadrada media	RMSD (root-mean-square deviation)	RMSD (nm)/ Tiempo (ps)	Cuantitativa continua de razón
	Fluctuación cuadrática media	RMSF (root-mean-square fluctuation)	RMSF (nm)/ residuos (aminoácidos)	Cuantitativa continua de razón

	Radio de giro	Distancia del radio de giro	Radio de giro (nm)/Tiempo (ps)	Cuantitativa continua de razón
	Sítios activos	Presencia de sitios activos	Número de sitios activos	Cuantitativa discreta
	Interacciones de Van-der-Waals	Energía atómica de contacto	Kcal/mol ⁻¹ – kJ/mol ⁻¹	Cuantitativa continua de razón
	Número de residuos de la región favorecida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Número de residuos de la región permitida	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Número de residuos de la región atípica	Presencia de proteína	Residuos (aminoácidos)	Cuantitativa discreta
	Calidad general del modelo estructural	Directo	Z-Score	Cuantitativa continua de intervalo

3. Interrogantes Básicas

1. ¿Cuál es la capacidad estructural y estabilidad molecular de los diferentes modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello); tras su obtención, minimización y optimización?
2. ¿Cuál es el efecto de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello) frente a los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, mediante simulación de dinámica molecular?

3. ¿Cuáles son los sitios activos para los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab)?
4. ¿Cómo serán las interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello) con los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide?
5. ¿Cómo es la calidad general y la validación de los diferentes modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, de los anticuerpos monoclonales (mAb) (Solanezumab, Gantenerumab y Crenezumab) y los nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña y camello)?

2.1.2.4. Tipo de Investigación

Investigación descriptiva básica

2.1.2.5. Diseño de Investigación

Experimental

2.1.2.6. Nivel de Investigación

Nivel experimental in silico exploratorio

2.2. Justificación del Problema

2.2.1. Justificación Científica

La presente investigación busca explorar una nueva rama diagnóstica y terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, utilizando como blanco la proteína beta-amiloide, metabolito natural considerado el principal factor causal en la fisiopatología de esta demencia. Para ello, el uso de anticuerpos monoclonales como parte de la inmunoterapia pasiva, es la orientación terapéutica más reciente de los estudios farmacológicos específicos de EA. Asimismo, el empleo de nanocuerpos o anticuerpos homodiméricos de cadena pesada producidos en camélidos naturalmente (VHH), demuestran propiedades superiores tanto en el peso molecular, solubilidad, estabilidad, penetración de la barrera hematoencefálica, etc. En consecuencia, el presente estudio brindará la visualización e interacción de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos con el blanco objetivo de la proteína beta-amiloide,

aportando en el conocimiento de las bases físico-químicas que nos permite las herramientas computacionales de la bioinformática.

2.1.2. Justificación social

El aumento de la población de edad avanzada en nuestra región y en América Latina, ha potenciado la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en los últimos años. Al ser una enfermedad neurodegenerativa progresiva incurable, es de vital importancia el diagnóstico temprano, el seguimiento continuo y la búsqueda de tratamientos más específicos y efectivos.

2.1.3. Contemporánea

La pandemia de COVID-19 ha desatendido las principales enfermedades crónicas de los adultos mayores pertenecientes a centro de atención residencial, provocando un infradiagnóstico y abandono de tratamiento de las enfermedades más frecuentes, siendo la principal demencia la enfermedad de Alzheimer.

2.1.4. Originalidad

La presente investigación busca dar importancia al área de la neuroinmunología en el curso de la enfermedad de Alzheimer, al comparar la visualización diagnóstica y la interacción molecular terapéutica tanto de anticuerpos monoclonales como nanocuerpos frente a la proteína beta-amiloide, fomentando la innovación tecnológica en el área de las enfermedades neurodegenerativas, a través de un estudio preliminar exploratorio.

2.1.5. Factibilidad

En el contexto de la pandemia por COVID-19, el área de la investigación ha resaltado el empleo de las herramientas computacionales bioinformáticas como parte de la adaptación virtual de los estudios, dando una fácil aplicación, mejor accesibilidad y reducción de tiempos empleados para el análisis de interacciones moleculares en la bioinformática clínica.

2.1.6. Justificación personal

Personalmente, mediante el presente estudio pretendo impulsar este tipo de investigaciones para consolidar conocimientos en el área científica y social, colaborando en la salud pública de la población de edad avanzada de nuestra región que aqueja la enfermedad de Alzheimer, dando luz a la reciente tecnología biomédica terapéutica y diagnóstica con el empleo de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos, como la llama y la vicuña, auquénidos de nuestro país.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Enfermedad de Alzheimer

2.2.1.1. Definición

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo irreversible del deterioro cognitivo cuya etapa final es la demencia y la muerte (5). Este desorden neurológico está considerado como parte de un síndrome de demencia amnésica multidominio, refiriendo un conjunto de cambios neuropatológicos que se caracteriza por presentar una acumulación de placas amiloides o seniles, y como consecuencia la acumulación de ovillos neurofibrilares formados a partir de filamentos de proteínas Tau altamente fosforiladas asociados a microtúbulos (6,7), provocando cambios morfológicos como la atrofia de la corteza cerebral y pérdida de neuronas a nivel cortical y subcortical (3). La EA es la principal demencia en adultos mayores, que inicia 20 o más años antes de que aparezcan los síntomas (4).

Es importante resaltar que la ausencia del síndrome de demencia amnésica multidominio no descarta la presencia de cambios neuropatológicos de EA, y viceversa; por lo tanto, la definición de esta entidad clínico-patológica aún sigue en cuestionamiento gracias a los nuevos avances en el diagnóstico preclínico de EA a través de biomarcadores (16,17).

2.2.1.2. Historia

En 1906 en un asilo en Frankfurt (Alemania), el psiquiatra y neuropatólogo Alöis Alzheimer, descubrió una condición de demencia en una paciente de 51 años

(Auguste Deter), que presentaba deterioro progresivo de la memoria, lenguaje, desorientación, delirios y cambios psicosociales (18,19) (Figura 1). Tras su muerte, Alzheimer realizó una autopsia encontrando atrofia cerebral difusa y “cambios particulares en grupos de células corticales” a través de la histología (placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y angiopatía amiloide) siendo la primera caracterización de esta demencia (20). En 1910, su mentor Emil Kraepelin acuñó el término “Enfermedad de Alzheimer” a este trastorno neurodegenerativo presenil (menores de 65 años) en su escrito *Handbook of Psychiatry* (21), y la comunidad médica utiliza este apelativo hasta el día de hoy. El estudio de Blessed y colaboradores fue el primero en correlacionar las características clínicas y los cambios histopatológicos cerebrales de EA. Posteriormente, las investigaciones de Katzman en 1976, mostraron que la EA senil y presenil eran histopatológicamente parecidas, siendo esta enfermedad la cuarta causa de muerte en adultos mayores en esa época (22).

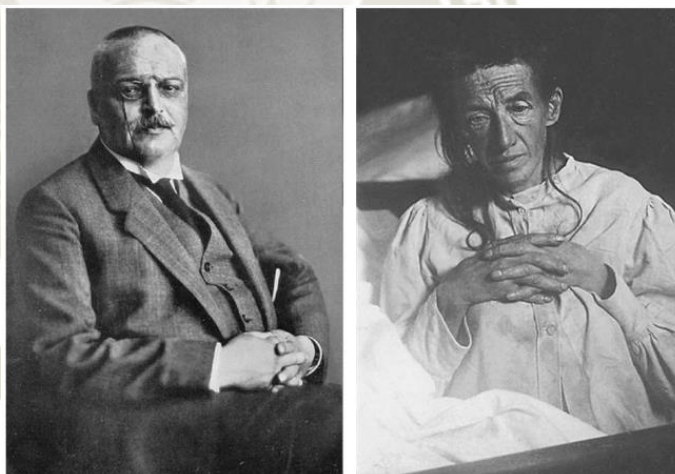


Figura 1. Fotografía de Alöis Alzheimer (izquierda) y su paciente Auguste Deter (derecha) (23).

2.2.1.3. Epidemiología

La EA es la principal causa de demencia a nivel mundial (60-80%) (1). Actualmente la prevalencia mundial de demencia es de 50 millones de personas y se proyecta que se triplicarán los casos para el 2050 (2).

En los países occidentales, se observa una disminución de la incidencia de demencia en hombres, gracias a los niveles de educación, prevención y

tratamiento de los factores de riesgo de enfermedad vascular (24,25). Por otro lado, en los países en vías de desarrollo y bajos niveles socioeconómicos, se presentan el 60% de casos de demencia, debido al aumento del grupo etario de adultos mayores y aumento de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y patologías cardiovasculares (2).

La mortalidad por EA aumentó un 145% entre el 2000 y 2017, siendo la quinta causa de muerte en mayores de 65 años en EE.UU., debido a un mayor registro de defunciones y prevalencia de EA en adultos mayores (1). La mortalidad es debida a la vulnerabilidad y mayor riesgo que conlleva la demencia frente a otros trastornos como infecciones, que finalmente ocasionan la muerte (26,27).

En Latinoamérica, en los últimos 10 años, se ha reporta una alta prevalencia de demencia (6.2-12.1%) en mayores de 65 años, y se proyecta que se cuadruplique la cifra para el 2050 (28) (Figura 2). Existen varios estudios, donde se observa una amplia fluctuación de las tasas de prevalencia, que pueden ser atribuidos a los diferentes criterios de diagnóstico de demencia.

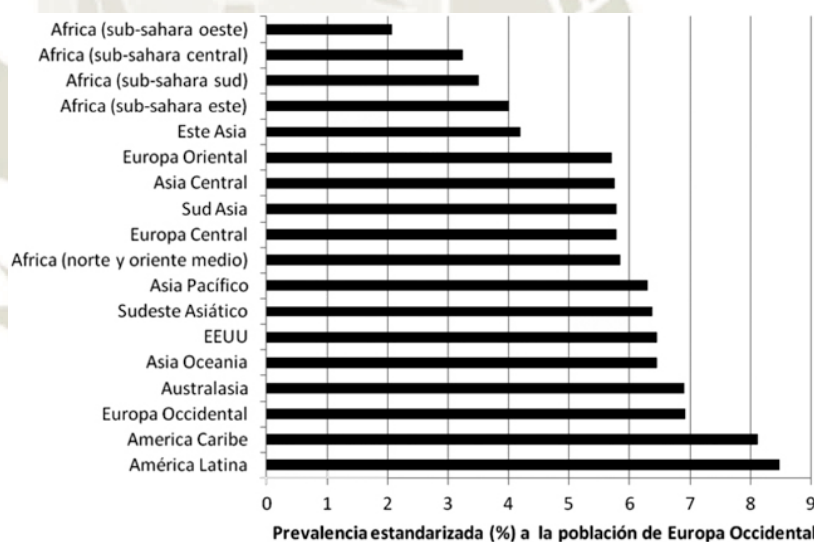


Figura 2. Prevalencia de demencia en mayores de 60 años (28,29).

En el Perú, actualmente no existe estadística acerca de la prevalencia e incidencia de demencia; sin embargo, en el 2014 MINSA reporta 5 mil casos de demencia, incluyendo EA, de 1.2 millones de adultos mayores (30), y en el 2019 reporta 200 mil casos de EA en pacientes mayores de 60 años (31). En Lima en 2008, un estudio en 1532 individuos presentó una prevalencia de 6.85% de demencia,

siendo EA en un 56.2%, incrementándose con la edad, el sexo femenino y bajo nivel educativo (32). En Huancayo, un estudio del 2016-2017, la prevalencia de demencia fue de 9.9% (33).

Las tasas de incidencia y prevalencia de EA son variables gracias a los biomarcadores de detección, el diagnóstico del deterioro cognitivo leve y la búsqueda de terapias modificadoras de la enfermedad, permitiendo la inclusión de etapas más tempranas de EA (16,34).

2.2.1.4. Impacto

2.2.1.4.1. Impacto Psicosocial

La EA es la causa principal de discapacidad, dependencia y mortalidad de los adultos mayores a nivel mundial (35). La familia y el cuidador son la piedra angular en el seguimiento, tratamiento y soporte de estos pacientes, evitando el internamiento y manteniéndolo en comunidad (36). El apoyo social y familiar median los factores del paciente con EA y la carga del cuidador (37). No obstante, ellos sufren consecuencias físicas, psicológicas (ansiedad y depresión), sociales y económicas directos (costo de medicamentos) e indirectos (pago de servicios) que deben afrontar solos (38). La coyuntura actual por la pandemia COVID-19, ha traído cambios sustanciales en nuestra vida, que afectaría a los pacientes con EA. El uso de mascarilla, provocando la dificultad de reconocimiento de personas, generando angustia y poca familiaridad en el paciente, que conduce a la poca integración social y soledad en el adulto mayor (39).

2.2.1.4.2. Impacto Socioeconómico

Entre el 2010 y 2015, a nivel mundial se vio un incremento de los costos de la demencia en 35%, siendo un gasto de US\$ 818 mil millones, 1.1% del Producto Bruto Interno (PBI) mundial (40). Los costos sociales representan una porción del costo total (41) (Figura 3), y se calculan los costos con el diagnóstico. A medida que progresa la enfermedad, incrementan costos (42).

Los costos directos se enfocan en los cuidados sociales (cuidadores, centros de día, hogares y asilos), tratamiento (medicamentos), y cuidados médicos

(junto con la comorbilidad asociada) (1). Sin embargo, existen costos no medibles u ocultos como indirectos (pérdida de productividad, cuidado informal, etc.), finanzas del hogar (reducción de ahorros, explotación financiera, costos de bolsillo, desempleo, etc.) que aparecen desde la fase preclínica y van aumentando conforme progresa la patología (41).

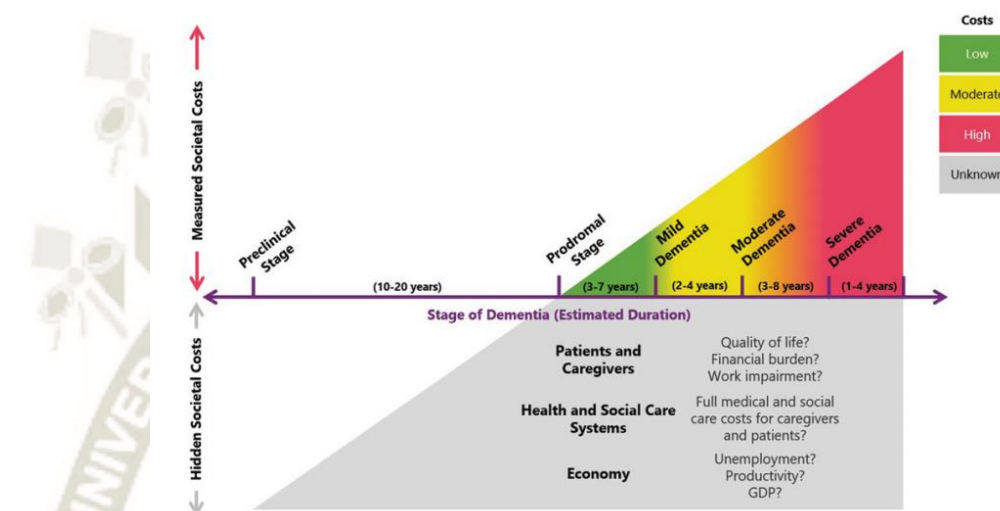


Figura 3. Punta del iceberg: evaluación de los costos socioeconómicos globales de la enfermedad de Alzheimer y las demencias relacionadas e implicaciones estratégicas para las partes interesadas (41).

2.2.1.5. Factores

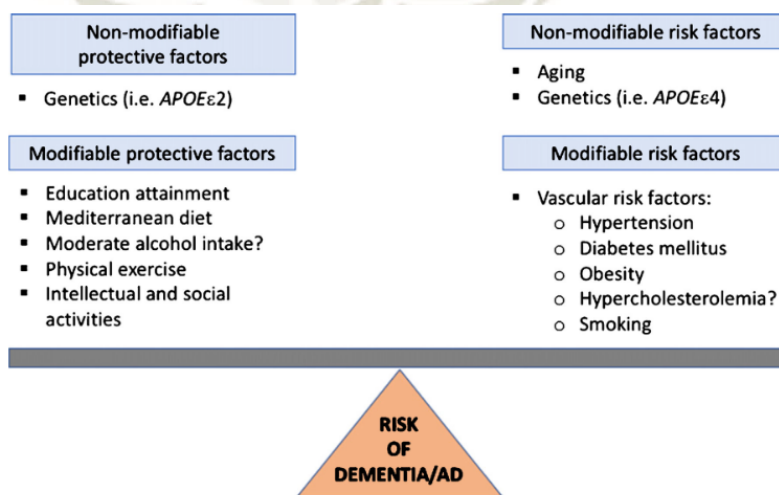


Figura 4. Esquema del riesgo de Demencia y Enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo y protectores, tanto modificables como no modificables (43).

A. Factores de Riesgo

a. No Modificables

- **Edad**

Este trastorno es considerado una enfermedad de la edad avanzada al presentarse el doble de casos cada cinco años de edad desde los 65 años (2). La prevalencia de EA aumenta con la edad, con 3% de 65 a 75 años, 17% de 75 a 84 años, y 32% en mayores de 84 años (1); a partir de los 90 años se produce una disminución debido a la esclerosis del hipocampo (44). La edad acompañada de la neuropatología, comorbilidad y presentación clínica; aumenta su potencial como factor de riesgo, debido al aumento de la esperanza de vida (45). Si la reserva cerebral se da a una edad más temprana, gracias a la educación y actividad intelectual, la resiliencia cognitiva (cambios neuropatológicos sin demencia) mejora, reduciendo la tasa de demencia en la vejez (46,47).

- **Género**

Los dos tercios de la población afectada por la EA son mujeres y solo un tercio son varones. A los 65 años, los varones tienen 6.3% y las mujeres 12% de riesgo de por vida de desarrollar EA (48). Esta prevalencia se explica por la reducción de estrógenos en la menopausia (49), así como la presencia de APoE $\epsilon 4$ (50).

- **Genéticos**

Los factores genéticos corresponden al 70 % de los factores de riesgo para EA (51). Para su identificación se empleó estrategias: estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), estudio de genes candidatos y análisis de ligamiento (52). GWAS reportó 20 factores genéticos que intervienen en la inflamación, metabolismo del colesterol y vías de reciclaje de vesículas endosomales (53). La combinación de mutaciones genéticas potencia el riesgo poligénico de EA, duplicando la predicción de casos por casualidad (54). Otros estudios de secuenciación de próxima generación revelan otros factores genéticos de alto riesgo, pero baja frecuencia, contribuyendo en la patogénesis de EA (55).

c) Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano: Presenta una herencia autosómica dominante, siendo una forma atípica familiar de presentación entre los 30 y 60 años (1.5-2% de casos). Clínicamente se identifica al presentar una demencia con disfunción visual de orden superior, ejecutiva y déficit de lenguaje (56). A través del análisis de ligamiento se identificaron regiones de los cromosomas 1, 14 y 21, con el descubrimiento de tres genes involucrados en EA (57–60).

- **Gen precursor de la proteína amiloide (APP):** en el cromosoma 21q, que codifica el producto APP, provoca la producción del péptido βA de la vía amiloidogénica (61). Se asocian 30 mutaciones, 10-15% de EA familiar de inicio temprano (56), con edad promedio de 49 años (62).
- **Gen de presenilina 1 (PSEN1):** en el cromosoma 14q, codifica la proteína transmembrana PSEN1, que es partícipe del complejo proteico de escisión de la γ -secretasa, aumentando la liberación de péptidos βA_{42} (63). Se asocian 150 mutaciones, 50% de EA familiar de inicio temprano, con edad promedio de 43 años (62).
- **Gen de presenilina 2 (PSEN2):** en el cromosoma 1q, codifica la proteína PSEN2, promoviendo la apoptosis y la neurodegeneración (64). Se asocian 20 mutaciones, la más rara en EA familiar de inicio temprano (65).
- **Trisomía 21:** síndrome de Down, presenta una copia adicional del gen APP (cromosoma 21 brazo largo), que produce aumento en la producción de proteína APP, presentando cambios neuropatológicos y clínicos de EA entre los 40 y 50 años (66).

d) Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío: Es la forma típica esporádica de EA. Se presenta en 58-79% y en mayores de 60 años, donde influyen factores genéticos y ambientales, siendo más compleja y poligénica (67).

- **Gen Apolipoproteína E (APoE):** Este gen polimórfico se encuentra en el cromosoma 19, y codifica una proteína portadora de lípidos unido a lipoproteínas de baja densidad hacia células del organismo, permitiendo la reparación de sitios de lesión. Presenta tres alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$; siendo la última la de mayor riesgo para EA esporádico de inicio tardío (68). El

gen APoE se ha identificado en 50-60% de casos EA (20-25% de adultos mayores sanos). Un alelo representa de dos a tres veces más probabilidad de EA y dos alelos hasta 8 a 12 veces más probabilidad (69). La eliminación del alelo puede reducir la incidencia de EA hasta 7%, en relación a la fracción atribuible de la población (70).

b. Modificables

• Médicos

La presentación de comorbilidades con EA propicia el desarrollo de demencia mixta por la falta de resiliencia (cambios neuropatológicos sin demencia) y reparación (71). Este tipo de demencia se caracteriza por la presencia de placas y ovillos junto con infartos microvasculares que producen el deterioro cognitivo, también se puede presentar en la demencia vascular y el daño cerebrovascular es frecuente en EA (72,73). La EA con infartos lacunares por afecciones cerebrovascular, presenta una clínica más severa de deterioro cognitivo que los casos de EA sin lesiones cerebrovasculares (74). Por otro lado, la hipertensión induce una mayor tasa de demencia temprana (75).

La diabetes y el síndrome metabólico se asocian a aterosclerosis e infartos cerebrales, siendo la glucosa factor de toxicidad que induce la neurodegeneración y anomalías microvasculares (76). En EA se da un estado cerebral resistente a la insulina por la activación anormal del receptor (77).

La relación entre hipercolesterolemia y EA es controversial, al encontrarse estudios donde la hipercolesterolemia leve propicia el aumento de deposición de placas β A de forma temprana independiente del genotipo APoE (78), y el uso de estatinas reduce los cambios neuropatológicos de EA (79). En cambio, otros estudios indican no encontrar cambios en el riesgo de demencia (80).

Estudios indican un mayor riesgo de EA con clínica en fase temprana asociado a la obesidad en la mediana edad (81). Sin embargo, la “paradoja de la obesidad” es la disminución del índice de masa corporal (IMC) en la vejez antes del desarrollo de demencia, como un efecto de causalidad inverso (43).

La depresión en la mediana edad, junto con el aumento de niveles de cortisol, por estrés principalmente, y trastornos del sueño, son factores de riesgo para la demencia en la vejez, incluida EA (82,83).

- **Estilo de Vida**

Un estudio de cohortes de autopsias de Honolulu-Asia Aging Study (HAAS) reveló la relación del tabaquismo a mediana edad y el aumento de placas β A corticales (84). El hábito de fumar aumenta de 2 a 4 veces el riesgo de EA en no portadores del gen APoE ϵ 4, por ello el abandono del hábito tabáquico es una forma de prevención de demencia (85). Otro aspecto importante es la convivencia social. La soledad y el estado civil soltero o viudo (a) inducen un mayor riesgo de desarrollar demencia (86).

B. Factores Protectores

a. No Modificables

El componente genético influye en el desarrollo de EA. Estudios recientes del gen APoE alelo ϵ 2 indican que retrasa la fase clínica de EA y reduce los cambios neuropatológicos de la edad, disminuyendo el riesgo un 50% (87).

b. Modificables

- **Actividades sociales**

La interacción social puede prevenir o ralentizar el desarrollo de demencia, en cambio la limitada actividad social se asocia al riesgo de demencia (88). Sin embargo, la progresión de la enfermedad lleva a menos motivación para participar socialmente, la familia se aleja y mayor aislamiento del paciente (45).

- **Alimentación y Deporte**

Una alimentación saludable, como la dieta mediterránea (frutas, verduras, cereales integrales, pescado, aceite de oliva) es un factor preventivo protector para la EA al ralentizar el depósito de placas β A, hipometabolismo cerebral, independiente del genotipo APoE y riesgo vascular (89). La adherencia a este tipo de dieta podría reducir la mortalidad en los pacientes con EA (90). El ejercicio tiene efecto neuroprotector al inducir la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro, reducir cortisol y riesgo vascular (91),

independiente del efecto protector de la alimentación saludable (92). Un estudio indica que la ingesta de alcohol leve a moderado (vino) en la vejez, reducen el riesgo de desarrollo de EA (efecto protector) (93), sin embargo, es evidencia científica cuestionable.

- **Educación**

El aumento de la educación provoca la disminución de la prevalencia por edad de demencia (94). Las próximas generaciones tendrán una mayor exposición a factores protectores siendo más saludables, mayor capacidad de recuperación y con una cognición más saludable que sus antecesores (45). La educación y funcionamiento cognitivo superior juegan un rol protector para EA al tener mayor tolerancia de cambio neuropatológico antes del desarrollo de demencia. Esta capacidad se considera como una “reserva cognitiva” (95).

2.2.1.6. Fisiopatología

La fisiopatología de la EA es incierta y con múltiples controversias. Para explicar la etiología, se han formulado diferentes teorías e hipótesis como la hipótesis colinérgica, la hipótesis Tau y la hipótesis de la cascada amiloidea (7).

A. Hipótesis colinérgica

A inicios del desarrollo de EA se da una disfunción del sistema colinérgico, mediada por el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Este neurotransmisor juega un rol importante en la función cognitiva: disminución de ACh y nAChR y aumento de acetilcolinesterasa (AChE), traduciéndose en el déficit de memoria (96).

B. Hipótesis Tau

La proteína Tau se encuentra en las neuronas intracelular y participa en la regulación del crecimiento externo de neuritas, transporte axonal y estabilidad de microtúbulos (97). Esta proteína es producida por el gen del cromosoma 17, y en EA se presentan 3 isoformas y 4 repeticiones (98). En EA, la proteína Tau se hiperfosforila anormalmente, provocando la formación de filamentos helicoidales y ovillos neurofibrilares, provocando inestabilidad de los microtúbulos y muerte celular (98) (Figura 5). Estas formaciones se diseminan neurona a neurona desde la corteza

entorrinal hasta el hipocampo y neocorteza (99). Este proceso neuropatológico es inducido por la proteína βA como un efecto sinérgico de disfunción neuronal (100).

C. Hipótesis de la Cascada Amiloidea

Esta es la hipótesis más importante de la EA, donde la acumulación de la proteína βA (36 a 43 aminoácidos), se encuentra en el centro de la etiopatogenia (101). La APP es una proteína de transmembrana tipo 1, que en el sistema nervioso central, presenta un proceso de división a través de dos vías (10):

Vía no amiloidogénica: donde la enzima α -secretasa escinde la APP, generando un producto secretado extracelular sAPPa y un fragmento C83 de 83 aminoácidos C-terminal unido a la membrana. Y tras la acción de la enzima γ -secretasa, la C83 produce otro fragmento p3 y abandona el dominio intracelular APP unido a la membrana (AICD) (10).

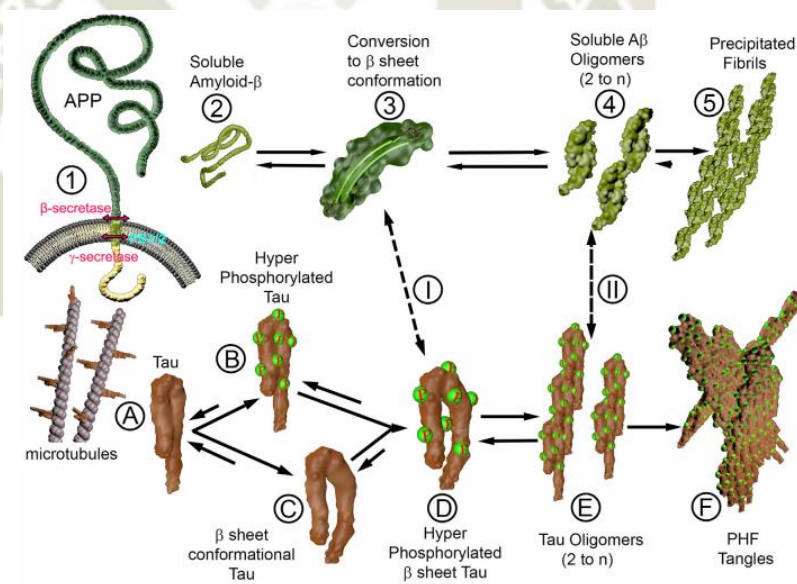


Figura 5. Cambios conformacionales de la proteína βA y la proteína Tau (102).

Vía amiloidogénica: donde la enzima β -secretasa (BACE-1 enzima 1 de escisión de APP sitio b) y el complejo γ -secretasa, generan un producto intracelular APP restante y varias proteínas beta-amiloide de diferentes longitudes (βA_{38} , βA_{40} , βA_{42}) y piroglutamato βA . Estas βA se liberan en LCR y posteriormente en sangre (103). En esta patología se presenta un desequilibrio en la producción y eliminación del metabolito, produciendo la acumulación de βA en diversos estados de agregación: oligómeros (entre 2 a 6 péptidos), protofibrillas, fibrillas (que forman ensambles

intermedios insolubles) y placas amiloides seniles insolubles avanzadas depositadas en diferentes áreas cerebrales (11) (Figura 5).

Este proceso provoca una cascada neurodegenerativa que llevan a la degeneración sináptica y pérdida neuronal, siendo la “hipótesis de la cascada amiloidea” un posible factor causal de dicha enfermedad (12). Este proceso anormal se complementa con las mutaciones genéticas de APP, PSEN1 y PSEN2 que producirían EA de inicio temprano (101). La β A42 es más hidrofóbica y con mayor predisposición a la autoagregación que la β A40 (103). Se ha demostrado que las estructuras más neurotóxicas son los oligómeros solubles y los amiloides intermedios (104). Los oligómeros solubles provocarían la disfunción sináptica en modelos animales (105), conduciendo a una nueva teoría e hipótesis fisiopatológica. El estrés oxidativo y la inflamación predisponen a la acumulación y deposición de proteína β A (106).

2.2.1.7. Fases de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo que pasa por diferentes etapas desde la fase preclínica asintomática hasta la última fase de demencia (2). Hay varios sistemas de clasificación (Grupo de Trabajo Internacional – IWG, Instituto Nacional sobre el Envejecimiento-Asociación de Alzheimer - NIA-AA, Administración de Alimentos y Medicamentos – FDA) con diferentes nomenclaturas resumidas en la figura 6, donde se centran en los cambios neuropatológicos (proteína beta-amiloide y Tau) y la clínica (déficit cognitivo, funcional y de comportamiento) (107).

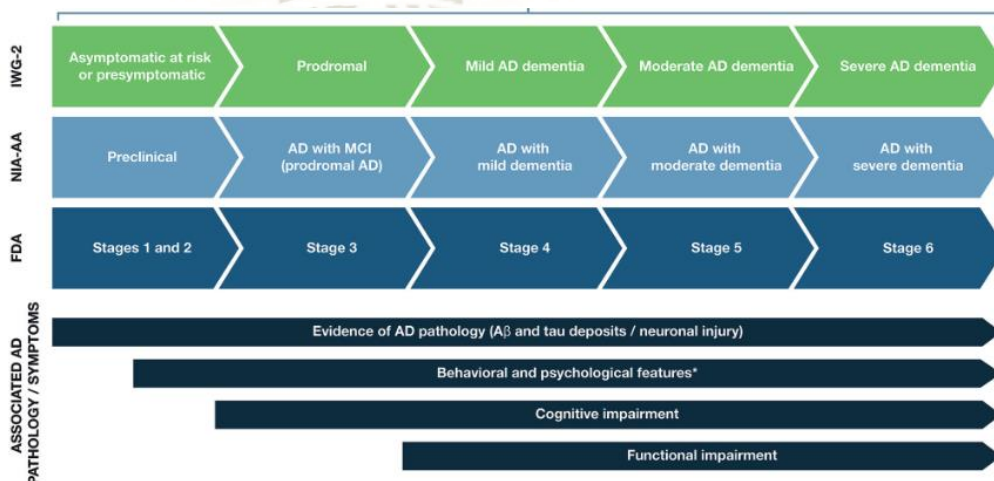


Figura 6. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer (107).

A. Fase Preclínica

Esta fase presenta solo cambios neuropatológicos, sin la presencia de clínica, deterioro cognitivo o funcional y sin afección de la vida diaria (108). Tiene una duración de 6 a 10 años, varía según edad de aparición. Su progresión a deterioro cognitivo/conductual leve es multifactorial (109).

B. Fase Deterioro Cognitivo Leve

Se presenta con un deterioro de la memoria a corto plazo que progresa con la disminución de otros dominios cognitivos, no obstante, el paciente aún permanece independiente en su vida diaria (110). Se puede o no acompañar del deterioro conductual leve con la aparición de síntomas neuropsiquiátricos continuos. Se da en pacientes mayores de 50 años, y precede al deterioro cognitivo y la demencia (111).

C. Fase Demencial

Esta etapa progresa de leve, moderado y severo, desarrollando déficit cognitivo más grave, interfiriendo la vida diaria: dependencia y asistencia constante (16).

2.2.1.8. Clínica de la Enfermedad de Alzheimer

A. Síntomas Cardinales

- e. Deterioro de la Memoria:** Es el síntoma inicial más frecuente en demencia por EA. Se produce una afectación de la memoria declarativa episódica, en el hipocampo y lóbulo temporal medial, siendo la memoria a corto plazo más afectada en EA temprana que la memoria a largo plazo (112). La memoria procedimental y aprendizaje motor (zonas subcorticales) y la memoria semántica (zonas temporales neocorticales) suelen afectarse más tardíamente (113).
- f. Deterioro de la Función ejecutiva y juicio/resolución de problemas:** Pasan desapercibidos por el paciente (anosognosia), y se necesita el testimonio de familiares e informantes. Se presenta una progresiva incapacidad para completar tareas (114). La pérdida de conocimiento suele ser progresiva, y acompañada o no de alteraciones del comportamiento, depresivas y psicóticas (115).
- g. Deterioro de otros dominios cognitivos:** Las deficiencias visuoespaciales aparece precozmente y las deficiencias de lenguaje aparecen tardíamente; sin

embargo, ambos progresan de forma insidiosa. Ambos pueden presentarse como síntoma inicial en las presentaciones atípicas de EA (5).

h. Trastornos conductuales y de estado de ánimo: Los síntomas neuropsiquiátricos son frecuentes en la etapa media y tardía de EA. Tienen un amplio espectro: apatía, falta de integración social, irritabilidad, depresión y ansiedad. Las alteraciones de comportamiento se presentan como agitación, agresión, deambulación, psicosis (alucinaciones, delirios, etc.), euforia y desinhibición (116).

B. Otros signos y síntomas

- a. Apraxia/Dispraxia:** La ausencia o dificultad para realizar tareas motoras aprendidas aparecen en la etapa tardía de EA después del déficit de memoria y lenguaje. Se presenta progresivamente: actividades motoras complejas y dificultad en la realización de actividades de la vida diaria, provocando dependencia (117).
- b. Disfunción olfativa:** Es un síntoma común en EA de difícil detección (pruebas simples y evaluación olfativa), pero es usada como herramienta diagnóstica (118).
- c. Trastornos del sueño:** Las alteraciones de sueño-vigilia son muy frecuentes como insomnio y sueño fragmentado, se anticipan al deterioro cognitivo en pacientes con solo presencia de biomarcadores de depósito de proteína βA (119).
- d. Convulsiones:** Se presentan en 10-20% de pacientes con EA en etapas tardías. La presentación atípica presenta más convulsiones, siendo una EA de inicio temprano con patrón de herencia autosómico dominante, se presentan convulsiones de tipo focal no motora con alteración de la conciencia (lóbulo temporal medial) (120).
- e. Signos motores:** Las mioclonías y los signos motores piramidales y extrapiramidales ocurren en la etapa tardía de EA. La incontinencia y reflejos primitivos (reflejo de hocico, agarre) son más frecuentes en EA etapa tardía (121).

2.2.1.9. Diagnóstico

Para un diagnóstico temprano de EA, se propone una serie de pasos a seguir: 1) detectar, 2) evaluar/diferenciar, 3) diagnosticar y 4) tratar (Figura 7).

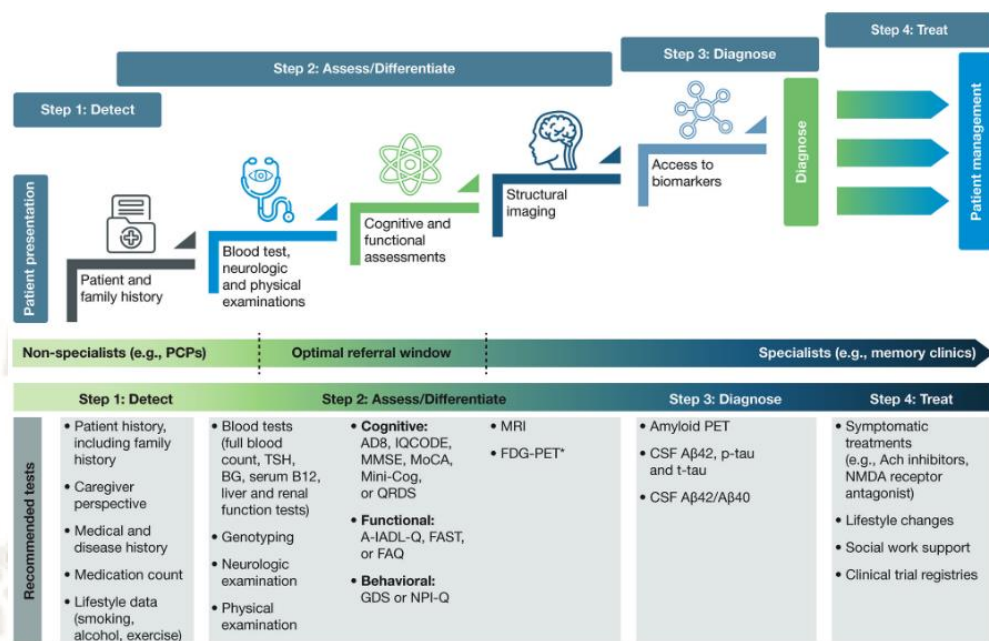


Figura 7. Infografía de las etapas del proceso de diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer (107).

Para la detección, es fundamental el reconocimiento temprano en la atención primaria de la aparición de signos y síntomas sugerentes de EA (Figura 8), realizando una historia clínica detallada con antecedentes familiares, factores de riesgo y protectores, polifarmacia, etc (5). Es importante el testimonio de los familiares y cuidadores para una mejor detección (122).

La evaluación clínica se centra en el examen cognitivo neurológico de la población adulta mayor (115). Para ello se emplean diferentes escalas de medición tanto para evaluar el dominio cognitivo (AD8 Ascertain Dementia 8, IQCODE Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly, MMSE MiniMental State Examination, MoCA Montreal Cognitive Assessment, Mini-Cog General Practitioner Assessment of Cognition, QRDS Quick Dementia Rating System), el dominio funcional (A-IADL-Q Amsterdam Instrumental Activities of Daily Living Questionnaire, FAST functional assessment staging test, FAQ Functional Activities Questionnaire), y conductual (GDS global deterioration scale, NPI-Q Neuropsychiatric Inventory Questionnaire.). Estas evaluaciones deben acompañarse del examen físico, genotipificación, exámenes de laboratorio (hemograma, función tiroidea, glucosa, vitamina B12, función

hepática y lipídica) e imagenología (resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa FDG-PET) (107).

2011 Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer	
Se puede hacer un diagnóstico de demencia de EA probable cuando el paciente	
1.	Cumple con los criterios para la demencia.
2.	Tiene las siguientes características
a.	Inicio insidioso: los síntomas tienen un inicio gradual durante meses o años, no repentinos durante horas o días.
b.	Historia clara de empeoramiento de la cognición por informe u observación
c.	Los déficits cognitivos iniciales y más prominentes son evidentes en la historia y el examen en una de las siguientes categorías
i.	Presentación amnésica: presentación sindrómica más común de la demencia AD; los déficits deben incluir deterioro en el aprendizaje y recuerdo de la información aprendida recientemente; también debe ser evidencia de disfunción cognitiva en al menos otro dominio cognitivo
ii.	Presentaciones no amnésicas
1)	Presentación del idioma: las deficiencias más destacadas se encuentran en la búsqueda de palabras; Deben presentarse déficits en otros dominios cognitivos
2)	Presentación visuoespacial: los déficits más prominentes se encuentran en la cognición espacial, incluida la agnosia de objetos, el reconocimiento facial deficiente, la simultagnosia y la alexia; Deben estar presentes déficits en otros dominios cognitivos
3)	Disfunción ejecutiva: los déficits más prominentes son el razonamiento, el juicio y la resolución de problemas deficientes; Deben estar presentes déficits en otros dominios cognitivos
3.	El diagnóstico de probable demencia por EA no debe aplicarse cuando hay evidencia de
a.	Enfermedad cerebrovascular concomitante sustancial, definida por un historial de accidente cerebrovascular relacionado temporalmente con la aparición o empeoramiento del deterioro cognitivo; o la presencia de infartos múltiples o extensos o carga severa de hiperintensidad de la sustancia blanca
b.	Características principales de la demencia con cuerpos de Lewy distintas de la demencia misma
c.	Características destacadas de la demencia frontotemporal variante conductual
d.	Características destacadas de afasia primaria progresiva variante semántica o afasia primaria progresiva variante no fluida o gramática
e.	Evidencia de otra enfermedad neurológica activa concurrente, o una comorbilidad médica no neurológica o el uso de medicamentos que podrían tener un efecto sustancial en la cognición.

Figura 8. 2011 Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer. Criterios clínicos básicos para la probable demencia de la enfermedad de Alzheimer (5).

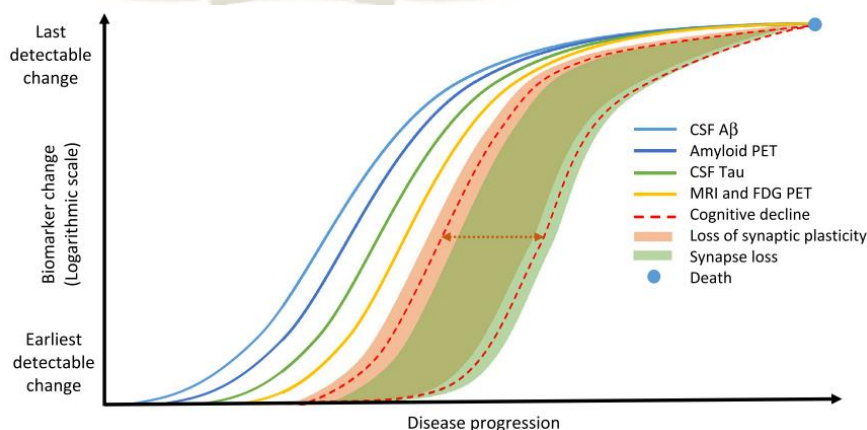


Figura 9. Dinamismo de los biomarcadores en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer (123,124).

En el diagnóstico, se han propuesto diferentes criterios para su identificación en etapas preclínicas con el uso de biomarcadores, para el diagnóstico precoz antes de la aparición de la clínica neurodegenerativa de esta enfermedad (5). Jack y colaboradores realizaron una clasificación descriptiva independiente de la temporalidad y patogénesis, denominado sistema ATN ("A" de proteína beta-amiloide βA , "T" de Tau y "N" de Neurodegeneración), resaltando su identificación en la tomografía de emisión de positrones (PET) y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (123) (Figura 9). La reducción de los niveles de proteína βA en LCR es el biomarcador que más temprano se presenta, seguido en PET, incluso antes de la aparición de la demencia (124).

2.2.2. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas glucoproteicas heterotetrámicas, llamadas inmunoglobulinas (125). Gracias a Landsteiner en el siglo XX, se describió los anticuerpos que actuaban contra antígenos específicos (126). Estas moléculas son producidas por las células B y plasmáticas, participando en la inmunidad humoral (127). Su estructura está compuesta por 4 cadenas, 2 ligeras (L) y 2 pesadas (H), idénticas y unidas por puentes disulfuro formando una "Y" (127). Las funciones son efectora (extremo carboxiterminal de cadena pesada o dominio constante C) y de reconocimiento y unión a antígenos (extremo aminoterminal, dominio variable V) (125). Las cadenas ligeras presentan un solo dominio C mientras que las cadenas pesadas presentan de tres a cuatro dominios. Se pueden encontrar cinco isotipos: IgA, IgD, IgE, IgM, IgG (125).

2.2.2.1. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se usan para el tratamiento y diagnóstico. Georges Köhler y César Milstein en 1975, lograron obtener un hibridoma al fusionar líneas celulares de mieloma con células B, el cual producía anticuerpos específicos para antígenos conocidos (128). El muromonab CD3 fue el primer mAb con licencia para la prevención del rechazo del trasplante de riñón, pero era murino y por lo tanto generó riesgo de inmunogenicidad, es por ello que la nueva generación de anticuerpos busca ser humanizado o totalmente humano para superar la inmunogenicidad (129) (Figura 10).

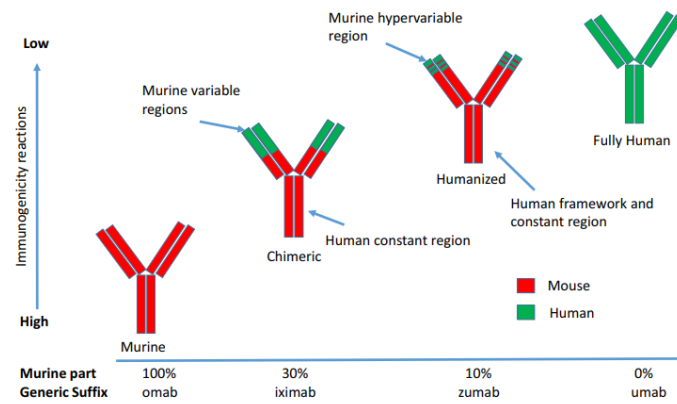


Figura 10. Humanización de anticuerpos monoclonales (130).

En 2004, se aprobó el primer anticuerpo totalmente humano, adalimumab, para el tratamiento de artritis reumatoide (130).

Para la nomenclatura, desde 1995 el grupo de expertos de Denominaciones Comunes Internacionales de la OMS publica reglas de denominación para los mAb (131), siendo el último publicado en el 2017 (132). La denominación está compuesta por un prefijo, un subtema y un sufijo (Figura 11):

- El prefijo “random” se refiere al nombre del fármaco
- El subtema o infijo se refiere al objetivo (cardiovascular, hueso, tumor, etc). El origen del mAb desde el 2017 fue eliminado, y anteriormente se indicaba si era humanizado, quimérico, etc.
- El sufijo “mab” se refiere a anticuerpo monoclonal

Prefix	Substem A	Meaning	Substem B	Meaning	Stem
Random	a	rat	-b(a)-	bacterial	-mab
	e	hamster	-c(i)-	cardiovascular	
	i	primate	-f(u)-	fungal	
	o	mouse	-k(i)-	interleukin	
	u	human	-l(i)-	immunomodulating	
	xi	chimeric	-s(o)-	bone	
	zu	humanized	-tox(a)-	toxin	
	axo	rat/mouse hybrid	-t(u)-	tumor	
	xizu	chimeric/humanized hybrid	-v(i)-	viral	

Figura 11. Nomenclatura de los anticuerpos monoclonales (130).

A. Solanezumab (LY2062430): anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que tiene como epítotope la región media del péptido β A (residuos 16-26), siendo el sitio de nucleación para la oligomerización. Fue desarrollada por la empresa

farmacéutica Eli Lilly & Co. Su objetivo es anti- β A en monómeros e inhibidor de agregación (terapia modificadora de EA leve moderada) (133).

B. Crenezumab (MABT5102A, RG7412): anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 que tiene como epítotope la región media del péptido β A (residuos 16-24), tanto para oligómeros, fibrillas y placas, con una afinidad hacia los oligómeros solubles hasta 10 veces, siendo el principal componente de la neurotoxicidad. Fue desarrollada por la empresa farmacéutica Genentech y Roche. Su objetivo es anti- β A en oligómeros y bloqueador/estimular desagregación de β A (terapia modificadora de EA) (134).

C. Gantenerumab (O4909832, RG14502): anticuerpo monoclonal completamente humano IgG1 con epítotope en la región N-terminal (péptido 8 y 9) y central (péptido 24) del péptido β A de las fibrillas. Fue desarrollada por la empresa farmacéutica Roche. Su objetivo es anti- β A en fibrillas con mayor afinidad y especificidad (terapia modificadora de EA) (135).

2.2.2.2. Anticuerpos de cadena pesada (HCAb)

Los anticuerpos de cadena pesada (HCAb) se encuentran exclusivamente en camélidos (camello, dromedario, llama), los cuales se caracterizan por no presentar las cadenas ligeras como los anticuerpos convencionales conocidos (136). Además, se unen al antígeno solo por un único dominio variable VHH (136). El descubrimiento de esta molécula abrió campo en la inmunología molecular y la ingeniería de anticuerpos (137).

2.2.2.2.1. Nanocuerpos

Los nanocuerpos son aquellos dominios variables (VHH) de los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos (HCAb), que son sintetizados por camélidos (camellos, llamas y dromedarios) (136). Estos dominios VHH reconocen los antígenos mediante un dominio único (sdAb) de ~130 aminoácidos (~14kDa) siendo el fragmento natural más pequeño disponible, con alta afinidad y especificidad (138,139). Son anticuerpos IgG que carecen de cadenas ligeras y del dominio constante (CH1) de las cadenas pesadas (140) (Figura 12).

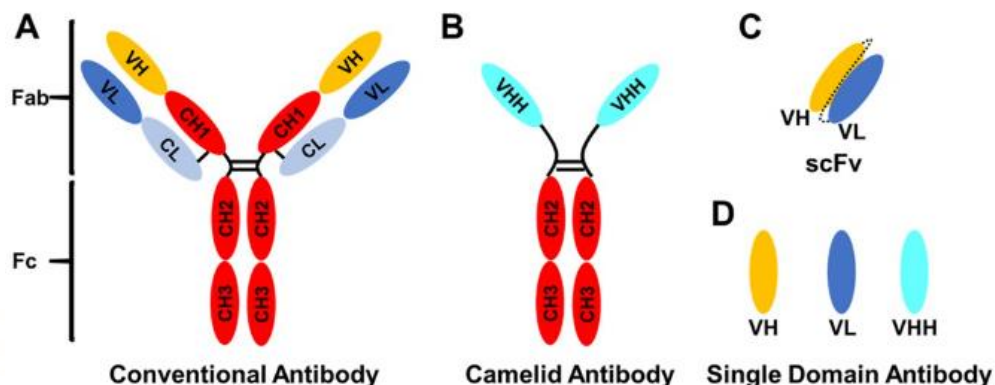


Figura 12. Estructura general de los fragmentos de anticuerpo (136).

Los VHH son más hidrofílicos que los IgG convencionales, siendo solubles en ausencia de cadena ligera (136). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR regiones de Ab que interactúan con antígeno) de VHH son más largas (~16-18 hasta 25 aminoácidos) que VH convencional (~12 aminoácidos), como CDR1 y CDR3 (141). Este mayor tamaño compensa la ausencia de tres CDR de la cadena ligera, teniendo una superficie de interacción más grande para los antígenos, además, permite una mayor variedad de conformaciones de CDR (140).

2.2.3. Bioinformática

2.2.3.1. Definición

La biología computacional o bioinformática es una disciplina y tecnología de plataforma que tienen como objetivo el análisis e interpretación de datos biológicos (15), formulando criterios biológicos aplicados en el área experimental. Gracias al Proyecto Genoma Humano en los años 70, esta ciencia se ha abierto campo en el área de las biomédicas (142). A través de esta ciencia, se busca la investigación interdisciplinaria entre las ciencias informáticas y las ciencias experimentales de la vida como la biología y biomédica (bioquímica, biología celular, biología del desarrollo, genética, genómica, fisiología) teniendo como fundamento las matemáticas, la física, la química, la estadística, entre otras (15). El fundamento de esta disciplina es la generación de evidencia científica basada en principios físico-químicos a través del uso de bases de datos, aplicando métodos bioinformáticos para la solución de dilemas de las ciencias biológicas,

y la predicción de modelos estructurales de moléculas biológicas y complejos de interacción en procesos celulares para comprender su funcionamiento a través de representaciones de los sistemas biológicos, mediante el uso de herramientas computacionales (143).

2.2.3.2. Herramientas computacionales

Mediante el uso de software y hardware, la bioinformática procesa el gran tamaño de información biológica (minería de datos), la velocidad de cálculos y el empleo eficiente de tiempo (144). Las herramientas computacionales son los programas informáticos y las diferentes bases de datos disponibles en línea utilizados en bioinformática, que son aplicados en el análisis de secuencias de ADN y proteínas, utilizados en centros de investigación, laboratorios biomédicos, industrias farmacéuticas y centros de bioinformática (15). Estos recursos necesitan de sistemas operativos y lenguajes de programación para su aplicación, teniendo el sistema operativo Linux, y lenguajes de programación como Python, Java, C, C++, etc (144). Para la adaptabilidad de los usuarios e investigadores del sistema operativo de Windows, se habilitó el Subsistema de Windows para Linux (WSL) y el programa Ubuntu que proporciona la interface de programación y uso de comandos como en el sistema operativo Linux (145).

La información biológica utilizada en la bioinformática se encuentra disponible en línea para toda la comunidad (146). Para la evaluación genómica y de nucleótidos, se emplea la International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), donde se incluye las bases de datos del DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), National Center for Biotechnology Information (NCBI), etc (147). Para las investigaciones en proteínas, se tienen las bases de datos de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), UniProt, etc (148). En algunos casos, el investigador no encuentra la información que necesita, y para ello emplea el método del secuenciamiento lineal masivo (149).

2.2.3.3. Diseño, obtención y modelamiento de proteínas

El conocimiento y predicción de la estructura de una proteína en su forma tridimensional, posibilita la comprensión del mecanismo de acción y participación molecular en los sistemas biológicos (150). Para la predicción de la estructura proteica (PSP) se emplean dos metodologías: modelado basado en plantillas (TBM) y predicción de estructura de novo, que se sustentan en bases de datos de secuencias y estructuras (151). Para la obtención de la estructura computacional con resolución se emplean métodos como cristalografía de rayos X, criomicroscopía electrónica, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), los cuales serán almacenados en bases de datos (152). La teoría del PSP es el descubrimiento del estado nativo de las proteínas en forma de estructuras tridimensionales, en condiciones fisiológicas “in vivo” (153). Para la búsqueda conformacional de estos modelos estructurales, se usan los métodos de Monte Carlo (MC) y la Dinámica Molecular (MD) (151).

2.2.3.4. Mecánica Molecular y Dinámica Molecular

La mecánica molecular (MM) pertenece al modelado molecular matemático donde plasma las moléculas en forma de esferas unidas por resortes, aplicados dentro de un sistema, con energía cambiante en contraste de la resistencia de las partículas, al inicio y al final de una simulación de desenvolvimiento de las moléculas dependiente del tiempo (154). La simulación de Dinámica Molecular (SDM) es una simulación molecular computacional mediante el uso de la bioinformática que permite explorar el espacio conformacional de péptidos y proteínas y su interacción en medios nativos para predicciones físico-químicas de interacciones moleculares (155). La SDM, mediante ecuaciones de velocidad y de acuerdo con la fuerza física ejercida en cada partícula, permite efectuar un evento biológico en pequeños tiempos de integración, bajo el concepto de una simulación (151). Este procedimiento inicia con una configuración molecular, continúa con la descripción de las interacciones atómicas y el modelamiento, posteriormente se ejecuta una simulación y muestra el análisis de la trayectoria (156). Tras realizar este procedimiento, hay diferentes cálculos de análisis de la calidad estructural de las trayectorias como:

- Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD): es una medida que resulta de la diferencia de valores estimados y valores observados, siendo dos coordenadas atómicas superpuestas (157).
- Fluctuación cuadrática media (RMSF): es una medida del desplazamiento de un átomo, molécula, residuos, en relación con estructura de referencia (158).
- Radio de giro (R_g): es la raíz cuadrada media de la distancia de los elementos de dispersión desde el centro de una masa en donde se muestra sin cambios en la inercia rotacional alrededor de un eje del centro de masa (159).

2.2.3.5. Análisis bioinformático

El concepto de Big Data cobra importancia en el manejo de gran cantidad de información en el área de la bioinformática (160). La minería de datos es la metodología empleada para el análisis de este volumen exponencial de información a través del empleo de software y servidores en línea orientados a las investigaciones biológicas, dentro de ellas se encuentra el área de medicina (161). Este análisis permite replicar su metodología por su alta calidad y confiabilidad, siendo empleado en múltiples investigaciones en la actualidad (15). Dentro de los servidores utilizados en la presente investigación se encuentran PockDrug, PatchDock/FireDock, Ramachandran – RAMPAGE y ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

2.2.3.6. Bioinformática clínica

Actualmente, la bioinformática abarca nuevas áreas de las ciencias médicas de la mano de las tecnologías ómicas (162). Esta nueva área es el futuro de la investigación de las ciencias biomédicas, presentando una conexión con la medicina personalizada de precisión o medicina genómica (143).

Esta área se encuentra orientada a la medicina clínica en busca de estrategias de diagnóstico a través del uso de biomarcadores genéticos y estrategias de tratamiento a través del desarrollo de nuevos fármacos (15). Dentro de las aplicaciones en la ciencia médica se encuentra el análisis de genomas, determinación estructural de proteínas a partir de la genómica, acoplamiento o docking molecular (interacciones ligando-receptor como en la farmacología

computacional) y la dinámica molecular (para mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades) (163).

2.3. Análisis de antecedentes investigativos

A nivel internacional

Autor: Zhi-Ting Sun, Chi Ma, Guang-Jian Li, Xiang-Yu Zheng, Yi-Tong Hao, Yu Yang, y Xu Wang.

Título: Aplicación de fragmentos de anticuerpos contra β A con énfasis en la aplicación combinada con nanopartículas en la enfermedad de Alzheimer.

Resumen: “La EA es la más común de los trastornos neurodegenerativos. El péptido β A juega un rol importante en la patogénesis, al producir un desequilibrio entre la producción y eliminación de esta proteína, provocando cambios clínicos de neurodegeneración y demencia. Las últimas investigaciones tuvieron como objetivo el uso de la inmunoterapia en EA con anticuerpos monoclonales, sin embargo, no se encontraron beneficios o se vieron efectos adversos. No obstante, tres fragmentos de anticuerpos (scFv, Fab y de dominio único) presentaron mejores ventajas. Además, las nanopartículas juegan el rol de portadores ya que facilitan la entrada de fármacos por la barrera hematoencefálica, importante para el tratamiento. Sun y colaboradores realizan una revisión de la aplicación combinada de nanopartículas y fragmentos de anticuerpos contra la proteína β A tanto para el diagnóstico y tratamiento de EA” (164).

Autores: Massih Khorvash, Nick Blinov, Carol Ladner-Keay, Jie Lu, Judith M. Silverman, Ebrima Gibbs, Yu Tian Wang, Andriy Kovalenko, David Wishart, Neil R. Cashman.

Título: Interacciones moleculares entre el anticuerpo 5E3 específico del oligómero monoclonal y sus aditivos beta amiloides.

Resumen: “La proteína β A en su forma oligomérica (β AO) se considera la más neurotóxica en la EA. Sin embargo, las interacciones moleculares entre anticuerpos específicos y la proteína β AO aún se desconocen. Khorvash y colaboradores realizan el estudio de la interacción de un anticuerpo monoclonal m5E3 (fragmento variable Fv5E3) y el epítipo estructural de la proteína β AO mediante simulaciones de dinámica

molecular y acoplamiento. Se vio una alta afinidad por la proteína β AO, pero una baja afinidad con monómeros u fibrillas de la β A. Este estudio proporciona la base de conocimiento para propiciar la mutagénesis del anticuerpo m5E3 para mejorar su especificidad y afinidad, así como la capacidad de desagregar la proteína β AO y protofilamentos” (165).

Autores: Kazuma Murakami, Maki Tokuda, Takashi Suzuki, Yumi Irie, Mizuho Hanaki, Naotaka Izuo, Yoko Monobe, Ken-ichi Akagi, Ryotaro Ishii, Harutsugu Tatebe, Takahiko Tokuda, Masahiro Maeda, Toshiaki Kume, Takahiko Shimizu y Kazuhiro Irie.

Título: Anticuerpo monoclonal con especificidad conformacional para un conformero tóxico de amiloide β 42 y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

Resumen: “La proteína beta-amiloide (β A42) sufre un proceso de oligomerización en la fase temprana de la EA, sin embargo, los anticuerpos específicos para la forma monomérica y fibrilar de la proteína pueden realizar un sobrediagnóstico. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de anticuerpos específicos para la forma oligomérica neurotóxica de la proteína β A42 para el diagnóstico precoz de la EA. El anticuerpo 24B3 (giro en Glu22 y Asp23) reconoce dímero β A42 que forma oligómeros más estables y neurotóxicos que el monómero. Este anticuerpo reconoce la neurotoxicidad, mientras que el 4G8 y 82E1 no logran reconocer. Además, la proporción de β A42 (detectada por ELISA sándwich mediante los anticuerpos 24B3 y 82E1) en líquido cefalorraquídeo en EA fue significativamente mayor que el grupo control. Finalmente, Murakami y colaboradores concluyen que el anticuerpo 24B3 puede ser un candidato para el diagnóstico y tratamiento de la EA” (166).

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo General:

Evaluar las interacciones de anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos sobre las estructuras de la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

2.4.2. Objetivos Específicos:

- Obtener las estructuras de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) mediante la base de datos Protein Data Bank.
- Minimizar y optimizar las estructuras de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) mediante herramientas bioinformáticas.
- Evaluar mediante simulaciones de dinámica molecular de los anticuerpos monoclonales (Solanezumab, Gantenerumab, Crenezumab) y nanocuerpos de camélidos (llama, vicuña, camello) frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.
- Analizar los sitios activos para los anticuerpos monoclonales.
- Analizar las interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales, nanocuerpos frente a la proteína beta-amiloide mediante herramientas computacionales.
- Validar las estructuras de la proteína beta-amiloide, los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos y evaluar la calidad general de los modelos estructurales mediante servidores bioinformáticos.

2.5. Hipótesis

Alternativa H_a : Existe interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.

Nula H_0 : No existe interacciones moleculares entre los anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos frente a las estructuras de la proteína beta-amiloide.

Dado que la Enfermedad de Alzheimer es la causa principal de discapacidad, dependencia y mortalidad de los adultos mayores a nivel mundial, es posible evaluar las interacciones de los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos sobre las estructuras de la proteína beta-amiloide en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer, mediante herramientas computacionales.

3. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

3.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

3.1.1. Técnicas

3.1.1.1. Obtención y Preparación de las Estructuras

En el presente estudio, se realizará la búsqueda de estructuras de la proteína beta-amiloide en la base de datos del Protein Data Bank (RCSB-PDB), seleccionando aquellas que contengan las formas de monómero, trímero, tetramero, pentámero y estructura fibrilar. Además, se realizará la búsqueda de los anticuerpos monoclonales seleccionados: Solanezumab, Crenezumab y Gantenerumab. Y finalmente se realizará la búsqueda de los nanocuerpos de camélidos, seleccionando aquellos pertenecientes a la Llama, Vicuña y Camello.

Todas estas estructuras serán visualizadas y analizadas a través del programa UCSF Chimera, para su preparación previa antes de la Dinámica Molecular.

3.1.1.2. Simulación de Dinámica Molecular

En la presente estudio, se realizará simulaciones de dinámica molecular de 10 ns en el programa GROMACS v.5.0.5 de las estructuras de la proteína beta-amiloide, los tres anticuerpos monoclonales y los tres nanocuerpos monoclonales, utilizando el campo de fuerza OPLSAA (167) para las proteínas y modelo de agua SPC216 (168). Las simulaciones de dinámica molecular se realizarán bajo el colectivo canónico NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante).

La temperatura será constante a $T=309.65\text{K}$ ($36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) mediante el acoplamiento a un termostato de Nose-Hoover, con un tiempo de acoplamiento de $t=0.01\text{ps}$ (169). Se utilizará un paso de integración de 2ps. Las interacciones de Lennard-Jones se calcularán utilizando un punto de corte de 10 Å. Se ubicará la proteína en el centro de una caja cúbica con 1.5 Å del centro de la proteína a los alrededores, se adicionarán moléculas de agua llegando a contener ~40,000 átomos. Así mismo se añadirán iones para neutralizar cada sistema. Se realizará una minimización de energía a 200 000 ps (picosegundos) usando el algoritmo de descenso más bajo, seguida por una simulación de dinámica molecular de 10

ns (nanosegundos) con restricciones armónicas en los átomos pesados de las proteínas para equilibrar agua e iones.

3.1.1.3. Análisis de la Dinámica Molecular

Posteriormente, se realizará el análisis de la convergencia mediante RMSD (root-mean-square deviation), RMSF (root-mean-square fluctuation) y el radio de giro. Finalmente, las trayectorias e imágenes serán examinadas con el programa UCSF Chimera.

3.1.1.4. Predicción de la Drogabilidad

Para la identificación de los bolsillos o pockets se utilizará el servidor PockDrug, que predice la drogabilidad (valor de modulación de un blanco mediante la interacción con un posible agente terapéutico). Los archivos PDB de los anticuerpos monoclonales que actuarán como receptores, se cargarán en el servidor y se seleccionará el método *“Druggability prediction using proteins”* para estimar el bolsillo utilizando una distancia umbral de 5.5 Å.

3.1.1.5. Acoplamiento Molecular

Los archivos de salida del proceso de simulación de dinámica molecular, de cada proteína, anticuerpo monoclonal y nanocuerpo serán convertidos (de archivo *.gro a *.pdb) serán utilizados para los acoplamientos en el servidor Patchdock (Algoritmo de acoplamiento molecular basado en principios de complementariedad de forma). Se realizarán 24 acoplamientos anticuerpo/nanocuerpo-proteína. Posterior al docking, se realizará el refinamiento en FireDock (Fast Interaction Refinement in Molecular Docking) de 1000 candidatos como blancos terapéuticos. Finalmente, se considerará el primer modelo estructural del refinamiento como el mejor candidato, así como datos sobre la energía global, interacciones de Van-der-Waals atractivo/repulsivo, energía de contacto atómico y enlaces de hidrógenos.

3.1.1.6. Validación de Estructuras

Las validaciones de las estructuras obtenidas se harán por medio del diagrama de Ramachandran – RAMPAGE, con el cual se hallará el número de residuos de la región favorecida, de la región permitida y de la región atípica. Por otro lado,

se utilizará el programa ProSA (Protein Structure Analysis-Server) para las proteínas beta-amiloide, los tres anticuerpos monoclonales y los tres nanocuerpos. Con ello, se obtendrá de cada uno: la calidad general del modelo (a través de un Z-score), calidad del modelo local y la posición de la secuencia.

3.1.2. Instrumentos:

a. Software

- **GROMACS v.5.0.5.** Es un paquete de software de código abierto, que permite realizar simulaciones de dinámica molecular, basados en ecuaciones de movimiento newtoniano para sistemas de partículas (moléculas bioquímicas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) y sus interacciones enlazadas y no enlazadas (simulaciones de sistemas biológicos) (156).
- **UCSF CHIMERA-1.11.2.** Es un software de visualización interactiva de estructuras biomoleculares y datos afines, utilizado para el análisis y función estructural, tanto para la densidad, ensamblaje, trayectoria, acoplamientos y alineaciones de secuencias; generando archivos de imagen y video de alta calidad (170).

b. Servidores

- **Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB-PDB).** (Disponible en: <https://www.rcsb.org/>). Es un recurso de datos digitales disponibles públicamente de la estructura, función y evolución tridimensional de macromoléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos y ensamblajes) (171), utilizados en la investigación y educación de la biología básica, biomedicina, biotecnología y energía (172). Este servidor forma parte del Banco Mundial de Datos de Proteínas (wwPDB), permitiendo una mejor gestión de datos en base a los principios FAIR (Encontrable-Accesible-Interoperable-Reusable-Computable) (173).
- **Pocket Druggability Prediction (PockDrug).** (Disponible en: <http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/>). Es un recurso digital en línea que otorga la predicción computacional de la capacidad de formación de bolsillos de proteínas para unirse a moléculas mediante la combinación de propiedades (hidrofobicidad, geometría y aromaticidad); siendo parte de la fase de

identificación del potencial farmacológico de una macromolécula (174). Además, este servidor proporciona herramientas para el análisis y caracterización de los bolsillos obtenidos de la proteína utilizada (175).

- **PatchDock.** (Disponible en: <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). Es un recurso digital en línea que permite el acoplamiento molecular de dos moléculas proteína-proteína o proteína-ligando (proteínas, ADN, péptidos, fármacos) mediante la utilización de algoritmos de complementariedad de formas (176). Tras el análisis, otorga un listado de complejos potenciales ordenados en base a criterios específicos físico-químicos. A través de este servidor, se puede identificar parches geométricos de la superficie de las moléculas (cóncavos, convexos y planos) que posteriormente son utilizados para el agrupamiento, filtrado y puntuación de complementariedad de los complejos de acoplamiento resultantes (177).
- **FireDock.** (Disponible en: <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>). Este es un servidor web complementario al PatchDock, otorga un refinamiento energético de las interacciones moleculares, basado en la flexibilidad y puntuación de los mejores resultados obtenidos a través de algoritmos rápidos de acoplamiento de cuerpo rígido. Estas soluciones se basan en diferentes criterios como la superficies de contacto, interacciones de Van-der-Waals, energía libre de enlace, electrostática, energía de contacto atómico, siendo esta la más importante para ver la espontaneidad del complejo de unión resultante (178).
- **Ramachandran Plot Assessment RAMPAGE.** (Disponible en: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Este recurso permite generar un diagrama de Ramachandran, que contiene regiones favorecidas, permitidas y atípicas, que se interpretan para la validación geométrica y la calidad estereoquímica de la estructura analizada (179).
- **Protein Structure Analysis-Server ProSA.** (Disponible en: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at>). Este servidor permite determinar el pliegue nativo de una proteína tanto para modelos experimentales como teóricos, mediante el reconocimiento de errores. ProSA es utilizado en el refinamiento, predicción y modelado de estructuras proteicas, brindando un

puntaje de calidad y una visualización tridimensional de los elementos erróneos de la proteína analizada (180).

3.1.3. Materiales:

- Workstation con memoria RAM de 64 GB, 3 discos duros de 01, 04 y 06 TB y procesador E7 3.0GHz; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5, UCSF Chimera
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assessment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.1.4. Cuadro de coherencias

	Variable	Indicador y Sub Indicadores	Técnicas e Instrumentos
Obtención de estructuras	Proteína beta amiloide (monómero)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Proteína beta amiloide (trímero)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Proteína beta amiloide (tetramero, pentámero y estructura fibrilar)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Anticuerpo monoclonal (solanezumab)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Anticuerpo monoclonal (gantenerumab)	Presencia de proteína	Protein Data Bank

	Anticuerpo monoclonal (crenezumab)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Nanocuerpo (Llama)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Nanocuerpo (Vicuña)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
	Nanocuerpo (Camello)	Presencia de proteína	Protein Data Bank
Simulación de dinámica molecular	Número de moléculas	Presencia de moléculas	Gromacs v.5.0.5
	Volumen	Volumen de distribución	Gromacs v.5.0.5
	Temperatura	Directo	Gromacs v.5.0.5
	Tiempo de optimización	Directo	Gromacs v.5.0.5
Análisis de las interacciones moleculares	Desviación de la raíz cuadrada media	RMSD (root-mean-square deviation)	Gromacs, qtGrace, Gnuplot
	Fluctuación cuadrática media	RMSF (root-mean-square fluctuation)	Gromacs, qtGrace, Gnuplot
	Radio de giro	Distancia del radio de giro	Gromacs, qtGrace, Gnuplot
	Sitios activos	Presencia de sitios activos	Servidor PockDrug
	Interacciones de Van-der-Waals	Energía atómica de contacto	Servidor PatchDock/ FireDock
	Número de residuos de la región favorecida	Presencia de residuos	Diagrama de Ramachandran - RAMPAGE

	Número de residuos de la región permitida	Presencia de residuos	Diagrama de Ramachandran - RAMPAGE
	Número de residuos de la región atípica	Presencia de residuos	Diagrama de Ramachandran – RAMPAGE
	Calidad general del modelo estructural	Z-Score	Protein Structure Analysis-Server (ProSA)

3.2. Campo de verificación

3.2.1. Ubicación espacial:

La presente investigación se realizará de manera virtual y con el apoyo del WorkStation del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular – CIIM de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.

3.2.2. Ubicación temporal:

La presente investigación se llevará a cabo en el periodo comprendido entre julio del 2021 y marzo del 2022.

3.2.3. Unidades de estudio:

El estudio utilizará estructuras moleculares (proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos) que serán obtenidos de la base de datos del Protein Data Bank

Criterios de selección

• Criterios de Inclusión

- Estructuras completas
- El menor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica.

- **Criterios de Exclusión**

- Estructuras incompletas
- El mayor tamaño en Angstroms de difracción de Rayos X, Solución de Resonancia Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica

3.3. Estrategia de Recolección de datos

3.3.1. Organización

- Mediante la base de datos Protein Data Bank, se utilizará los modelos estructurales de la proteína beta-amiloide, anticuerpos monoclonales y nanocuerpos de camélidos.
- Se harán preparaciones de las estructuras para el acoplamiento específico de las diferentes estructuras de la proteína beta-amiloide y los anticuerpos monoclonales y los nanocuerpos de camélidos mediante el software UCSF Chimera.
- Se emplearán técnicas de dinámica molecular utilizando el software Gromacs v.5.0.5 para las simulaciones.
- Para el análisis de las estructuras, se utilizarán los servidores PockDrug y Patchdock/FireDock para identificar los pockets y realizar el acoplamiento molecular, respectivamente.
- Para la validación de las estructuras utilizadas, se usará el servidor del Diagrama de Ramachandran (RAMPAGE Plot Assessment de la Universidad de Duke) y el servidor ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.3.2. Recursos

3.3.2.1. Humanos

- Investigador
- Asesores

3.3.2.2. Institucionales

- Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María
- Centro de Investigación en Ingeniería Molecular - CIIM

3.3.2.3. Materiales

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080
- Software de bioinformática: Gromacs v.5.0.5 , UCSF Chimera
- Servidores de bioinformática: RCSB Protein Data Bank (PDB), PockDrug (Pocket Druggability Prediction), PatchDock/FireDock, Ramachandran Plot Assessment - RAMPAGE, ProSA (Protein Structure Analysis-Server).

3.3.2.4. Financieros

- Autofinanciado

3.3.3. Validación de los instrumentos

La presente investigación no se requiere validación del instrumento

3.4. Consideraciones éticas

El presente estudio no representa dilemas éticos: no usará información personal específica ni muestras biológicas, no intervendrá en seres biológicos, no generará riesgo ni vulnerabilidad de los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos impartidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (181); es por ello que no requiere tener la aprobación de un comité de ética.

4. PRESUPUESTO

La presente investigación no requiere plan presupuestal

5. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividades	Julio - Agosto 2021				Setiembre – Octubre 2021				Noviembre - Diciembre 2021				Enero - Marzo 2022			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Elección del tema																
2. Revisión bibliográfica																
3. Sistematización de bibliografía																
4. Redacción del proyecto																
5. Aprobación del proyecto																
6. Ejecución																
7. Análisis e interpretación																
8. Informe final																

Fecha de inicio: 1 de Julio del 2021

Fecha probable de término: 31 de Marzo del 2022

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Jun 16];17(3):327–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33756057/>
2. Patterson C. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers [Internet]. *Alzheimer's Disease International (ADI)*: London, UK. 2018 Sep [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>
3. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2021 Jun 16];1(1):a006189. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
4. Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Hari-Raj A, Dincer A, Flores S, et al. Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jun 16];17(3):241–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29397305/>
5. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2021 Jun 16];7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
6. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2021 Jun 16];8(1):1–13. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2011.10.007>
7. Bloom GS. Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2021 Jun 16];71(4):505–8. Available from: <https://jamanetwork.com/>
8. Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, Bennett DA, Shah RC, et al. Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* [Internet]. 2010 Aug 31 [cited 2021

- Jun 16];75(9):786–91. Available from: <https://n.neurology.org/content/75/9/786>
9. De La Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. Vol. 88, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2014. p. 548–59.
 10. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, et al. Complement activation by β -amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 Nov 1 [cited 2021 Jun 16];89(21):10016–20. Available from: <https://www.pnas.org/content/89/21/10016>
 11. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H. Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. Vol. 140, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2017. p. 176–92.
 12. Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. Vol. 588, *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier; 2014. p. 641–52.
 13. Xu L, Cao H, Huang C, Jia L. Oriented immobilization and quantitative analysis simultaneously realized in sandwich immunoassay via his-tagged nanobody. *Molecules* [Internet]. 2019 May 16 [cited 2021 Jun 17];24(10):1890. Available from: www.mdpi.com/journal/molecules
 14. Ribatti D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. Vol. 161, *Immunology Letters*. Elsevier; 2014. p. 96–9.
 15. Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics [Internet]. Vol. 324, *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 2002 [cited 2021 Mar 23]. p. 1018–22. Available from: [/pmc/articles/PMC1122955/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1122955/)
 16. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 14, *Alzheimer's and Dementia*. Elsevier Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 22]. p. 535–62. Available from: [/pmc/articles/PMC5958625/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30063424/)
 17. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 22];7(3):280–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514248/>

18. ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Zentralbl Nerven Psych [Internet]. 1907 [cited 2021 Jun 21];18:177–9. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008335947>
19. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." Clin Anat [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 21];8(6):429–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8713166/>
20. Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci [Internet]. 1998 Jun [cited 2021 Jun 23];248(3):111–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9728729/>
21. Kraepelin E. Psychiatrie: ein kurzes Lehrbuch für Studirende und Aerzte. 1893 [cited 2021 Jun 23]; Available from: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=hww1AQAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=kraepelin+psychiatrie+ein+lehrbuch+für+studierende+und+ärzte&ots=OOzIpB3ZAF&sig=9V5RNbIZ7XfiE3xr1JIJ5gW1gh4>
22. Katzman R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. Arch Neurol [Internet]. 1976 Apr 1 [cited 2021 Jun 23];33(4):217–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/574311>
23. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's disease: Past, present, and future. Vol. 23, Journal of the International Neuropsychological Society. Cambridge University Press; 2017. p. 818–31.
24. Matthews FE, Stephan BCM, Robinson L, Jagger C, Barnes LE, Arthur A, et al. A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies i and II. Nat Commun [Internet]. 2016 Apr 19 [cited 2021 Jun 21];7(1):1–8. Available from: www.nature.com/naturecommunications
25. Wu YT, Fratiglioni L, Matthews FE, Lobo A, Breteler MMB, Skoog I, et al. Dementia in western Europe: Epidemiological evidence and implications for policy making. Vol. 15, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2016. p. 116–24.
26. James BD, Leurgans SE, Hebert LE, Scherr PA, Yaffe K, Bennett DA. Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. Neurology [Internet]. 2014 Mar 25

- [cited 2021 Jun 23];82(12):1045–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24598707/>
27. Tinetti ME, McAvay GJ, Murphy TE, Gross CP, Lin H, Allore HG. Contribution of individual diseases to death in older adults with multiple diseases. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2012 Aug [cited 2021 Jun 23];60(8):1448–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22734792/>
 28. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis; The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. 2013 [cited 2021 Jun 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
 29. Garre-Olmo J. Epidemiology of alzheimer’s disease and other dementias. Vol. 66, *Revista de Neurologia*. *Revista de Neurologia*; 2018. p. 377–86.
 30. Minsa atiende en lo que va del año 3,700 casos de demencia en adulto mayor | Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/29972-minsa-atiende-en-lo-que-va-del-ano-3-700-casos-de-demencia-en-adulto-mayor>
 31. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú | Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru>
 32. Custodio N, García A, Montesinos R, Escobar J, BendeZú L. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: estudio puerta a puerta. *An la Fac Med* [Internet]. 2008;69:233–8. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000400003&nrm=iso
 33. Contreras C, Condor I, Atencio J, Atencio M. Prevalencia de demencia y funcionalidad en una clínica geriátrica de Huancayo, Perú, 2016-2017. *An la Fac Med* [Internet]. 2019 Mar 27 [cited 2021 Jun 26];80(1):51–5. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832019000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 34. Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, et al. Author

- response: Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology [Internet]. Vol. 91, Neurology. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2021 Jun 23]. p. 373–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126885/>
35. Nichols E, Szeke CEI, Vollset SE, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdela J, et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 Jan 1;18(1):88–106.
 36. Lin PJ, D'Cruz B, Leech AA, Neumann PJ, Sanon Aigbogun M, Oberdhan D, et al. Family and Caregiver Spillover Effects in Cost-Utility Analyses of Alzheimer's Disease Interventions. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Jun 28];37(4):597–608. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40273-019-00788-3>
 37. Yu H, Wang X, He R, Liang R, Zhou L. Measuring the caregiver burden of caring for community-residing people with Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2015 Jul 8;10(7).
 38. Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, Llanero Luque M, López de Silanes de Miguel C, Prieto Jurczynska C. Report by the Spanish Foundation of the Brain on the social impact of Alzheimer disease and other types of dementia. Vol. 36, *Neurologia*. Spanish Society of Neurology; 2021. p. 39–49.
 39. Gil R, Arroyo-Anlló EM. Alzheimer's Disease and Face Masks in Times of COVID-19. *J Alzheimer's Dis*. 2021 Jan 1;79(1):9–14.
 40. Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, et al. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Jun 22];13(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.07.150>
 41. El-Hayek YH, Wiley RE, Khoury CP, Daya RP, Ballard C, Evans AR, et al. Tip of the Iceberg: Assessing the Global Socioeconomic Costs of Alzheimer's Disease and Related Dementias and Strategic Implications for Stakeholders. Vol. 70, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2019. p. 321–39.
 42. Cantarero-Prieto D, Leon PL, Blazquez-Fernandez C, Juan PS, Cobo CS. The economic cost of dementia: A systematic review. *Dementia* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Jun

- 22];19(8):2637–57. Available from:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1471301219837776>
43. Serrano-Pozo A, Growdon JH. Is Alzheimer’s Disease Risk Modifiable? Vol. 67, Journal of Alzheimer’s Disease. IOS Press; 2019. p. 795–819.
 44. Nelson PT, Schmitt FA, Lin Y, Abner EL, Jicha GA, Patel E, et al. Hippocampal sclerosis in advanced age: Clinical and pathological features. Brain [Internet]. 2011 May 1 [cited 2021 Jun 26];134(5):1506–18. Available from:
<https://academic.oup.com/brain/article/134/5/1506/285355>
 45. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. Vol. 390, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2017. p. 2673–734.
 46. Larson EB. Prospects for delaying the rising tide of worldwide, late-life dementias [Internet]. Vol. 22, International Psychogeriatrics. NIH Public Access; 2010 [cited 2021 Jun 27]. p. 1196–202. Available from: [/pmc/articles/PMC3164829/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2164829/)
 47. Satizabal CL, Beiser AS, Chouraki V, Chêne G, Dufouil C, Seshadri S. Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. N Engl J Med [Internet]. 2016 Feb 11 [cited 2021 Jun 27];374(6):523–32. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1504327>
 48. Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, Au R, McNulty K, White R, et al. Lifetime risk of dementia and Alzheimer’s disease: The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. Neurology [Internet]. 1997 [cited 2021 Jun 28];49(6):1498–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9409336/>
 49. Scheyer O, Rahman A, Hristov H, Berkowitz C, Isaacson RS, Diaz Brinton R, et al. Female Sex and Alzheimer’s Risk: The Menopause Connection. J Prev Alzheimer’s Dis. 2018;5(4):225–30.
 50. Neu SC, Pa J, Kukull W, Beekly D, Kuzma A, Gangadharan P, et al. Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for Alzheimer disease: A meta-analysis. JAMA Neurol [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Jun 27];74(10):1178–89. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846757/>
 51. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 377, The Lancet. Elsevier B.V.; 2011 [cited 2021 Jun 28]. p. 1019–31.

- Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371747/>
52. Naj AC, Schellenberg GD. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview [Internet]. Vol. 174, American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics. Blackwell Publishing Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 5–26. Available from: [/pmc/articles/PMC6179157/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371747/)
 53. Guerreiro R, Brás J, Hardy J. XSnapShot: Genetics of alzheimer's disease [Internet]. Vol. 155, Cell. Elsevier B.V.; 2013 [cited 2021 Jun 28]. p. 968-968.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209629/>
 54. Sierksma A, Escott-Price V, De Strooper B. Translating genetic risk of Alzheimer's disease into mechanistic insight and drug targets [Internet]. Vol. 370, Science. American Association for the Advancement of Science; 2020 [cited 2021 Jun 28]. p. 61–6. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/370/6512/61>
 55. Geiger JT, Ding J, Crain B, Pletnikova O, Letson C, Dawson TM, et al. Next-generation sequencing reveals substantial genetic contribution to dementia with Lewy bodies. Neurobiol Dis [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Jun 28];94:55–62. Available from: [/pmc/articles/PMC4983488/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209629/)
 56. Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, et al. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. Neurology [Internet]. 2003 Jan 28 [cited 2021 Jun 27];60(2):235–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12552037/>
 57. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KAB, Weber JL, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. Science (80-) [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 27];269(5226):970–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7638621/>
 58. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GAP, St. George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid β protein gene: CDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science (80-) [Internet]. 1987 [cited 2021 Jun 27];235(4791):880–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2949367/>
 59. George-Hyslop PS, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Nat Genet [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 27];2(4):330–4. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1303289/>
60. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* (80-) [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 27];258(5082):668–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1411576/>
 61. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (1716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum Mol Genet* [Internet]. 1997 Nov [cited 2021 Jun 27];6(12):2087–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9328472/>
 62. Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2021 Jun 27];83(3):253–60. Available from: <https://n.neurology.org/content/83/3/253>
 63. Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and γ -secretase activity [Internet]. Vol. 93, *Journal of Neurochemistry*. J Neurochem; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 769–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15857382/>
 64. Woloizin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacanà E, Sunderland T, et al. Participation of Presenilin 2 in apoptosis: Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* (80-) [Internet]. 1996 Dec 6 [cited 2021 Jun 27];274(5293):1710–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8939861/>
 65. Renbaum P, Levy-Lahad E. Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: Presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1998 [cited 2021 Jun 27];54(9):910–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9791533/>
 66. Oyama F, Cairns NJ, Shimada H, Oyama R, Titani K, Ihara Y. Down's Syndrome: Up-Regulation of β -Amyloid Protein Precursor and τ mRNAs and Their Defective Coordination. *J Neurochem* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jun 27];62(3):1062–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8113792/>
 67. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2021 Jun 27];63(2):168–74. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/209307>

68. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (80-) [Internet]. 1993 [cited 2021 Jun 27];261(5123):921–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8346443/>
69. Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PWF, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 association with dementia in a population-based study: The Framingham Study. *Neurology* [Internet]. 1996 [cited 2021 Jun 27];46(3):673–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8618665/>
70. Ritchie K, Carrière I, Ritchie CW, Berr C, Artero S, Ancelin ML. Designing prevention programmes to reduce incidence of dementia: Prospective cohort study of modifiable risk factors. *BMJ* [Internet]. 2010 Aug 14 [cited 2021 Jun 27];341(7768):336. Available from: <http://www.bmj.com/>
71. Song X, Mitnitski A, Rockwood K. Age-related deficit accumulation and the risk of late-life dementia. *Alzheimer's Res Ther* [Internet]. 2014 Sep 18 [cited 2021 Jun 26];6(5–8):1–13. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13195-014-0054-5>
72. White L, Petrovitch H, Hardman J, Nelson J, Davis DG, Ross GW, et al. Cerebrovascular pathology and dementia in autopsied Honolulu-Asia Aging Study participants. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. New York Academy of Sciences; 2002 [cited 2021 Jun 27]. p. 9–23. Available from: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04794.x>
73. Santacruz KS, Sonnen JA, Pezhouh MK, Desrosiers MF, Nelson PT, Tyas SL. Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: The nun study and the adult changes in thought study. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2021 Jun 27];70(10):832–40. Available from: www.jneuropath.com
74. Snowdon DA. Brain Infarction and the Clinical Expression of Alzheimer Disease<subtitle>The Nun Study</subtitle>. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1997 Mar 12 [cited 2021 Jun 27];277(10):813. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/414570>
75. Adelman S, Blanchard M, Rait G, Leavey G, Livingston G. Prevalence of dementia in African-Caribbean compared with UK-born White older people: Two-stage cross-sectional study. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 Jun 27];199(2):119–25.

Available from: www.haringey.gov.uk

76. Qiu C, Sigurdsson S, Zhang Q, Jonsdottir MK, Kjartansson O, Eiriksdottir G, et al. Diabetes, markers of brain pathology and cognitive function: The Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2021 Jun 27];75(1):138–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.24063>
77. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. Vol. 5, *Lancet Neurology*. Elsevier; 2006. p. 64–74.
78. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* [Internet]. 2003 Jul 22 [cited 2021 Jun 27];61(2):199–205. Available from: <https://n.neurology.org/content/61/2/199>
79. Li G, Larson EB, Sonnen JA, Shofer JB, Petrie EC, Schantz A, et al. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2007 Aug 28 [cited 2021 Jun 27];69(9):878–85. Available from: <https://n.neurology.org/content/69/9/878>
80. Li G, Shofer JB, Kukull WA, Peskind ER, Tsuang DW, Breitner JCS, et al. Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: A community-based cohort study. *Neurology* [Internet]. 2005 Oct 11 [cited 2021 Jun 27];65(7):1045–50. Available from: <https://n.neurology.org/content/65/7/1045>
81. Chuang YF, An Y, Bilgel M, Wong DF, Troncoso JC, O'Brien RJ, et al. Midlife adiposity predicts earlier onset of Alzheimer's dementia, neuropathology and presymptomatic cerebral amyloid accumulation. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Jun 27];21(7):910–5. Available from: www.nature.com/mp
82. Wu KY, Lin KJ, Chen CH, Chen CS, Liu CY, Huang SY, et al. Diversity of neurodegenerative pathophysiology in nondemented patients with major depressive disorder: Evidence of cerebral amyloidosis and hippocampal atrophy. *Brain Behav* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];8(7):1016. Available from: <https://doi.org/10.1002/brb3.1016>
83. Shi L, Chen SJ, Ma MY, Bao YP, Han Y, Wang YM, et al. Sleep disturbances increase

- the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. Vol. 40, Sleep Medicine Reviews. W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 4–16.
84. Tyas SL, White LR, Petrovitch H, Ross GW, Foley DJ, Heimovitz HK, et al. Mid-life smoking and late-life dementia: The Honolulu-Asia Aging study. *Neurobiol Aging*. 2003 Jul 1;24(4):589–96.
 85. Zhong G, Wang Y, Zhang Y, Guo JJ, Zhao Y. Smoking is associated with an increased risk of dementia: A meta-analysis of prospective cohort studies with investigation of potential effect modifiers. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2021 Jun 27];10(3):e0118333. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118333>
 86. Sommerlad A, Ruegger J, Singh-Manoux A, Lewis G, Livingston G. Marriage and risk of dementia: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jun 27];89(3):231–8. Available from: <http://www>.
 87. Shinohara M, Kanekiyo T, Yang L, Linthicum D, Shinohara M, Fu Y, et al. APOE2 eases cognitive decline during Aging: Clinical and preclinical evaluations. *Ann Neurol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Jun 27];79(5):758–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.24628>
 88. Kuiper JS, Zuidersma M, Oude Voshaar RC, Zuidema SU, van den Heuvel ER, Stolk RP, et al. Social relationships and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. Vol. 22, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 39–57.
 89. Berti V, Walters M, Sterling J, Quinn CG, Logue M, Andrews R, et al. Mediterranean diet and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. *Neurology* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2021 Jun 27];90(20):E1789–98. Available from: <https://n.neurology.org/content/90/20/e1789>
 90. Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology* [Internet]. 2007 Sep 11 [cited 2021 Jun 27];69(11):1084–93. Available from: <https://n.neurology.org/content/69/11/1084>
 91. Young J, Angevaren M, Rusted J, Tabet N. Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment [Internet]. Vol. 2015,

- Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2015 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005381.pub4/full>
92. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. JAMA - J Am Med Assoc [Internet]. 2009 Aug 12 [cited 2021 Jun 27];302(6):627–37. Available from: <https://jamanetwork.com/>
 93. Luchsinger JA, Tang MX, Siddiqui M, Shea S, Mayeux R. Alcohol Intake and Risk of Dementia. J Am Geriatr Soc [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2021 Jun 27];52(4):540–6. Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1532-5415.2004.52159.x>
 94. Langa KM, Larson EB, Crimmins EM, Faul JD, Levine DA, Kabeto MU, et al. A comparison of the prevalence of dementia in the United States in 2000 and 2012. JAMA Intern Med [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Jun 26];177(1):51–8. Available from: <https://jamanetwork.com/>
 95. Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. Vol. 11, The Lancet Neurology. Elsevier; 2012. p. 1006–12.
 96. Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. Vol. 61, Progress in Neurobiology. Pergamon; 2000. p. 75–111.
 97. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The Many Faces of Tau. Vol. 70, Neuron. Cell Press; 2011. p. 410–26.
 98. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. Curr Alzheimer Res. 2010 Dec 10;7(8):656–64.
 99. Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC, et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2014 Oct 14 [cited 2021 Jun 29];111(41):E4376–85. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1411649111
 100. Ittner LM, Götz J. Amyloid- β and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Jun 29];12(2):67–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn2967>
 101. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et

- al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 28];359(6393):322–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/359322a0>
102. Wisniewski T, Goñi F. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. Vol. 85, *Neuron*. Cell Press; 2015. p. 1162–76.
103. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2021 Jun 28];34:185–204. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
104. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. Vol. 64, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2018. p. S567–610.
105. Lesné SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, et al. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Jun 28];136(5):1383–98. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/136/5/1383/285958>
106. Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: Inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. Vol. 363, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2004. p. 1139–46.
107. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 28];1–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.14283/jpad.2021.23>
108. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. Vol. 9, *The Lancet Neurology*. Elsevier; 2010. p. 1118–27.
109. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];15(7):888–98. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
110. Kazim SF, Iqbal K. Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated

- neuroregeneration and synaptic repair: Emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 11, Molecular Neurodegeneration. BioMed Central Ltd.; 2016 [cited 2021 Jun 28]. p. 50. Available from: <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>
111. Ismail Z, Agüera-Ortiz L, Brodaty H, Cieslak A, Cummings J, Fischer CE, et al. The Mild Behavioral Impairment Checklist (MBI-C): A Rating Scale for Neuropsychiatric Symptoms in Pre-Dementia Populations. *J Alzheimer's Dis*. 2017 Jan 1;56(3):929–38.
 112. Markowitsch HJ, Staniloiu A. Amnesic disorders [Internet]. Vol. 380, The Lancet. Elsevier B.V.; 2012 [cited 2021 Jun 28]. p. 1429–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503117/>
 113. Mortamais M, Ash JA, Harrison J, Kaye J, Kramer J, Randolph C, et al. Detecting cognitive changes in preclinical Alzheimer's disease: A review of its feasibility [Internet]. Vol. 13, Alzheimer's and Dementia. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 468–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27702618/>
 114. Barrett AM, Eslinger PJ, Ballentine NH, Heilman KM. Unawareness of cognitive deficit (cognitive anosognosia) in probable AD and control subjects. *Neurology* [Internet]. 2005 Feb 22 [cited 2021 Jun 28];64(4):693–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15728294/>
 115. Harwood DG, Sultzer DL, Wheatley M V. Impaired insight in Alzheimer disease: Association with cognitive deficits, psychiatric symptoms, and behavioral disturbances. *Neuropsychiatry, Neuropsychol Behav Neurol* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2021 Jun 28];13(2):83–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/10780626>
 116. Peters KR, Rockwood K, Black SE, Bouchard R, Gauthier S, Hogan D, et al. Characterizing neuropsychiatric symptoms in subjects referred to dementia clinics. *Neurology* [Internet]. 2006 Feb [cited 2021 Jun 28];66(4):523–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16505306/>
 117. Sarazin M, Stern Y, Berr C, Riba A, Albert M, Brandt J, et al. Neuropsychological predictors of dependency in patients with Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2005 Mar 22 [cited 2021 Jun 28];64(6):1027–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15781821/>
 118. Quarmley M, Moberg PJ, Mechanic-Hamilton D, Kabadi S, Arnold SE, Wolk DA, et al.

- Odor Identification Screening Improves Diagnostic Classification in Incipient Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 28];55(4):1497–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27886011/>
119. Ju YES, Lucey BP, Holtzman DM. Sleep and Alzheimer disease pathology-a bidirectional relationship [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Neurology*. Nat Rev Neurol; 2014 [cited 2021 Jun 28]. p. 115–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366271/>
120. Vossel KA, Tartaglia MC, Nygaard HB, Zeman AZ, Miller BL. Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance [Internet]. Vol. 16, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 28]. p. 311–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28327340/>
121. Portet F, Scarmeas N, Cosentino S, Helzner EP, Stern Y. Extrapyrmidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study. *Arch Neurol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2021 Jun 28];66(9):1120–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752301/>
122. Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2021 Jun 28];322(16):1589–99. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2753376>
123. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Vol. 12, *The Lancet Neurology*. 2013. p. 207–16.
124. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 231–55.
125. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Vol. 26, *Neurologia*. 2011. p. 301–6.
126. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune Haemolysis Associated with Donath-Landsteiner Antibodies. *Acta Haematol* [Internet]. 1982 [cited 2022 Apr 28];68(4):268–77. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/206992>
127. Kaufmann SHE. Immunology's coming of age [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Jul 1]. p. 684. Available from: www.frontiersin.org
128. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined

- specificity. *Nature* [Internet]. 1975 Aug 1 [cited 2021 Jun 30];256(5517):495–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/256495a0>
129. Wilde MI, Goa KL. Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection. *Drugs* [Internet]. 1996 [cited 2022 Apr 28];51(5):865–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8861551/>
130. Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, et al. Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):85–99.
131. Kopp-Kubel S. International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 30];73(3):275–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/123456789/>
132. Parren PWHI, Carter PJ, Plückthun A. Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more [Internet]. Vol. 9, mAbs. Taylor and Francis Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 30]. p. 898–906. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kmab20>
133. van Dyck CH. Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. Vol. 83, *Biological Psychiatry*. Elsevier USA; 2018. p. 311–9.
134. Cummings JL, Cohen S, Van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, et al. A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2021 Jul 1];90(21):E1889–97. Available from: <https://n.neurology.org/content/90/21/e1889>
135. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al. Gantenerumab: A novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimer's Dis*. 2012 Jan 1;28(1):49–69.
136. Messer A, Butler DC. Optimizing intracellular antibodies (intrabodies/nanobodies) to treat neurodegenerative disorders. Vol. 134, *Neurobiology of Disease*. Academic Press Inc.; 2020.
137. Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. Vol. 79, *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2001. p. 261–96.
138. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci*

- [Internet]. 2009 Apr 13 [cited 2021 Jul 1];11(3):500–15. Available from: <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.34602>.
139. Lauwereys M, Ghahroudi MA, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. EMBO J [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2021 Jul 1];17(13):3512–20. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/17.13.3512>
 140. Pain C, Dumont J, Dumoulin M. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. Vol. 111, Biochimie. Elsevier B.V.; 2015. p. 82–106.
 141. Siontorou CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. Int J Nanomedicine [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2022 Apr 3];8:4215. Available from: </pmc/articles/PMC3818023/>
 142. Boguski MS. Bioinformatics - A new era. Trends Biotechnol [Internet]. 1998 Nov 1 [cited 2021 Mar 23];16(SUPPL.1):1–3. Available from: <http://www.cell.com/article/S0167779998001255/fulltext>
 143. Molitor R, Sturn A, Maurer M, Trajanoski Z. New trends in bioinformatics: From genome sequence to personalized medicine. Vol. 38, Experimental Gerontology. Elsevier Inc.; 2003. p. 1031–6.
 144. Fourment M, Gillings MR. A comparison of common programming languages used in bioinformatics. BMC Bioinformatics [Internet]. 2008 Feb 5 [cited 2021 Mar 24];9(1):1–9. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2105-9-82>
 145. Morais D, Roesch LFW, Redmile-Gordon M, Santos FG, Baldrian P, Andreote FD, et al. BTW-Bioinformatics Through Windows: An easy-to-install package to analyze marker gene data. PeerJ. 2018;2018(7).
 146. Chang J, Zhu X. Bioinformatics Databases: Intellectual Property Protection Strategy*. J Intellect Prop Rights [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 28];15:447–54. Available from: www.manupatra.com
 147. Arita M, Karsch-Mizrachi I, Cochrane G. The international nucleotide sequence database collaboration. Nucleic Acids Res [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2022 Apr 28];49(D1):D121. Available from: </pmc/articles/PMC7778961/>
 148. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow G V., et al. RCSB Protein

- Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2022 Apr 28];49(D1):D437–51. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D437/5992282>
149. Chen C, Huang H, Wu CH. Protein bioinformatics databases and resources. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 24]. p. 3–39. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6783-4_1
 150. Westbrook JD, Burley SK. How Structural Biologists and the Protein Data Bank Contributed to Recent FDA New Drug Approvals [Internet]. Vol. 27, *Structure*. Cell Press; 2019 [cited 2021 Mar 24]. p. 211–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.007>
 151. Geng H, Chen F, Ye J, Jiang F. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins. Vol. 17, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.; 2019. p. 1162–70.
 152. Chiu W. What Does Electron Cryomicroscopy Provide that X-Ray Crystallography and NMR Spectroscopy Cannot? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet]. 1993 Jun 28 [cited 2021 Mar 24];22(1):233–55. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bb.22.060193.001313>
 153. Epstein CJ, Goldberger RF, Anfinsen CB. The Genetic Control of Tertiary Protein Structure: Studies With Model Systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 1963 Jan 1 [cited 2021 Mar 24];28(0):439–49. Available from: <http://symposium.cshlp.org/content/28/439>
 154. Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD, Jr. Molecular Mechanics. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2022 Apr 28];20(20):3281. Available from: [/pmc/articles/PMC4026342/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24026342/)
 155. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Shaw DE. How fast-folding proteins fold. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2021 Mar 24];334(6055):517–20. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/334/6055/517>
 156. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to

- supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.
157. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*. 2012;857:231–57.
158. Martínez L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. Kleinjung J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2021 Mar 24];10(3):e0119264. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119264>
159. Rudin A, Choi P. Practical Aspects of Molecular Weight Measurements. In: *The Elements of Polymer Science & Engineering*. Elsevier; 2013. p. 89–148.
160. Kaisler S, Armour F, Espinosa JA, Money W. Big data: Issues and challenges moving forward. *Proc Annu Hawaii Int Conf Syst Sci*. 2013;995–1004.
161. Aljawarneh S, Anguera A, Atwood JW, Lara JA, Lizcano D. Particularities of data mining in medicine: lessons learned from patient medical time series data analysis. *Eurasip J Wirel Commun Netw* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Apr 28];2019(1):1–29. Available from: <https://jwcn-urasipjournals.springeropen.com/articles/10.1186/s13638-019-1582-2>
162. Rana M. Bioinformatics Shape Personalized Medicine: A Perspective. Vol. 12, *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*. 2020.
163. Payghan P V., Bera I, Bhattacharyya D, Ghoshal N. Computational studies for structure-based drug designing against transmembrane receptors: PLGICs and class a GPCRs. *Front Phys*. 2018 Sep 25;6(SEP):52.
164. Sun ZT, Ma C, Li GJ, Zheng XY, Hao YT, Yang Y, et al. Application of Antibody Fragments Against A β With Emphasis on Combined Application With Nanoparticles in Alzheimer's Disease [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [cited 2021 Jun 25]. Available from: [/pmc/articles/PMC8100690/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.690701/full)
165. Khorvash M, Blinov N, Ladner-Keay C, Lu J, Silverman JM, Gibbs E, et al. Molecular interactions between monoclonal oligomer-specific antibody 5E3 and its amyloid beta cognates. *PLoS One*. 2020 May 1;15(5).
166. Murakami K, Tokuda M, Suzuki T, Irie Y, Hanaki M, Izuo N, et al. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application

- toward the Alzheimer's disease diagnosis. *Sci Rep*. 2016 Jul 4;6.
167. Gunsteren WF V. Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. VDF Hochschulverlag AG ander ETH Zürich, Zürich. Switzerland. 1996 Jan 1;1–1042.
 168. Berendsen H, Postma JPM, van Gunsteren W, Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: *Intermol Forces*. 1981. p. 331–42.
 169. Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* [Internet]. 1998 Aug 31 [cited 2022 Jan 16];81(8):3684. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.448118>
 170. Huang CC, Meng EC, Morris JH, Pettersen EF, Ferrin TE. Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul 1;42(W1).
 171. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank [Internet]. Vol. 28, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 2000 [cited 2021 Jun 24]. p. 235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592235/>
 172. Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, et al. RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2021 Jun 24];47(D1):D464–74. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D464/5144139>
 173. Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IjJ, Appleton G, Axton M, Baak A, et al. Comment: The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2021 Jun 24];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978244/>
 174. Hussein HA, Borrel A, Geneix C, Petitjean M, Regad L, Camproux AC. PockDrug-Server: A new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];43(W1):W436–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/43/W1/W436/2467926>
 175. Borrel A, Regad L, Xhaard H, Petitjean M, Camproux AC. PockDrug: A model for predicting pocket druggability that overcomes pocket estimation uncertainties. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2015 Apr 27 [cited 2021 Jun 24];55(4):882–95. Available from:

- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci5006004>
176. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient unbound docking of rigid molecules. In: Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) [Internet]. Springer Verlag; 2002 [cited 2021 Jun 24]. p. 185–200. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-45784-4_14
 177. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. Nucleic Acids Res [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];33(SUPPL. 2):W363–7. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl_2/W363/2505698
 178. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. Proteins Struct Funct Bioinforma [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2021 Mar 24];69(1):139–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21495>
 179. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, De Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. Proteins Struct Funct Genet [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2021 Jun 24];50(3):437–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.10286>
 180. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2021 Jun 24];35(SUPPL.2):407–10. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W407/2920938
 181. World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. Vol. 310, JAMA - Journal of the American Medical Association. American Medical Association; 2013. p. 2191–4.