



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la inmunogenicidad de tres especies patogénicas
del péptido Beta amiloide en ratones**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MIRYAM NAVA CATORCE



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ

VOCAL: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: Profesor: GOHAR GEVORGYAN

1er. SUPLENTE: Profesor: AURORA LARA NUÑEZ

2° SUPLENTE: Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología,
Laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan.**

ASESOR DEL TEMA: DRA. GOHAR GEVORGYAN_____

SUSTENTANTE: MIRYAM NAVA CATORCE_____

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS

Porque ser quien me acompañó siempre en este largo camino y sabe todo lo que esto significa para mí.

A MIS PADRES. Aún no existen las palabras adecuadas con las cuales agradecer todo lo que han hecho por mí, son un ejemplo de trabajo y perseverancia ante las situaciones más difíciles. Gracias por estar ahí siempre y ayudarme a cumplir éste objetivo.

A MI HERMANO FERNANDO. Porque siempre tuviste fé en mí, siempre hemos estado el uno para el otro y espero que así sea para toda la vida.

A LA DRA. GOHAR GEVORGYAN. Una gran persona con quién es más que un gusto trabajar, gracias por brindarme la oportunidad y la confianza para formar parte de su grupo de trabajo.

A MI JURADO. Por su tiempo y valiosa cooperación en la realización y revisión de este trabajo.

Agradezco la valiosa colaboración del Técnico Académico Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

Agradezco la colaboración de la MVZ. Georgina Díaz Herrera y del MVZ. Jorge García Rebollar del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su valioso apoyo en el manejo de los animales utilizados durante la realización de este trabajo.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LABORATORIO. Yéssica, Luis, Roxanna, Paulina, Melissa, Adriana, Dulce, Susana y sobre todo a Gonzálo, porque sin su compañía, paciencia y apoyo esto no hubiera sido posible.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS. Sobre todo a Tania, la hermana que nunca tuve, por animarme a seguir adelante en los días difíciles y por hacer más corta la espera de los días buenos.

A MIS PROFESORES. Sobre todo a mi tutora en el Servicio Social, María de los Ángeles Martínez, una gran profesora y persona, por la oportunidad de colaborar con ella y a la Dra. Pilar Rius por el apoyo en los últimos meses de la licenciatura.

Índice

Resumen	1
Abreviaturas	3
Figuras	4
Tablas	4
1. Introducción	5
1.1. Enfermedad de Alzheimer	5
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo	6
1.1.2. Neuropatología y patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer	8
1.1.2.1. Lesiones patológicas: marañas neurofibrilares y placas amiloides	9
1.2. Proteína precursora amiloide	11
1.2.1. Péptido beta amiloide	12
1.2.1.1. Péptido de longitud completa	15
1.2.1.2. Péptidos amino-truncados/modificados: $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$	16
1.3. Estrategias para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer	19
1.3.1. Inmunoterapia para la Enfermedad de Alzheimer	21
1.3.1.1. Mecanismos de eliminación del $A\beta$ por anticuerpos anti- $A\beta$ específicos	22
1.3.1.2. Inmunoterapia activa contra la Enfermedad de Alzheimer	23
1.3.1.3. Inmunoterapia pasiva contra la Enfermedad de Alzheimer	24
2. Antecedentes	27
3. Hipótesis	29
4. Objetivo general	29
4.1. Objetivos particulares	29
5. Materiales y Métodos	30
5.1. Material biológico	30
5.2. Metodología	30
5.2.1. Protocolo de inmunización	30
5.2.2. Obtención de sueros	30
5.2.3. Evaluación de la reactividad de los sueros anti- $A\beta$ mediante ELISA	31
5.2.4. Determinación del título de anticuerpos de los sueros anti- $A\beta$ mediante ELISA	31
5.2.5. Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas G presentes en los sueros anti- $A\beta$ mediante ELISA	32
5.2.6. Evaluación de la reactividad de los sueros anti- $A\beta$ mediante Western blot	33
6. Resultados	34
6.1. Evaluación de la reactividad de los sueros anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$ mediante ELISA	34
6.2. Determinación del título de anticuerpos de los sueros anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$	35
6.3. Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas G presentes en los sueros anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$	38
6.4. Evaluación de la reactividad cruzada de los sueros anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$ mediante ELISA	39
6.5. Evaluación de la reactividad cruzada de los sueros anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$ mediante Western blot	41
7. Discusión de resultados	44
8. Conclusiones	50

9. Perspectivas	51
10. Referencias	52

51
52

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza clínicamente por pérdida de memoria y proceso demencial progresivo. Dos lesiones principales son características de la EA y en la actualidad siguen siendo examinadas postmortem para el diagnóstico definitivo de la enfermedad: depósitos extracelulares en regiones específicas de placas amiloides o placas neuríticas, que son el resultado de la agregación del péptido Beta amiloide (A β), y neurofibrillas intracelulares (marañas neurofibrilares) conformadas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada. Es importante mencionar que se han identificado múltiples factores involucrados en la etiología de la EA, y esto requiere de múltiples acercamientos para el desarrollo de terapéuticos. Tomando en cuenta los resultados de estudios previos que reportaban que la acumulación de agregados del péptido A β en el cerebro juega un papel importante en la neuropatología de la EA y el hallazgo de que entre los compuestos capaces de destruir las fibrillas, protofibrillas y oligómeros de A β , o de prevenir la agregación del péptido están los anticuerpos anti-A β , diferentes grupos de investigadores inmunizaron ratones transgénicos con el péptido A β y demostraron la disminución de la carga amiloide en el cerebro de los animales, así como mejora conductual. Los resultados alentadores de estos ensayos constituyeron las bases para el desarrollo de estudios clínicos en humanos. Sin embargo, los primeros ensayos clínicos demostraron complicaciones severas y fueron suspendidos. Debido al alarmante incremento de casos de EA en el mundo, varios laboratorios están desarrollando diferentes protocolos de inmunización con el fin de ofrecer un tratamiento protector sin efectos secundarios.

Existen varias formas del péptido A β , entre ellas, los péptidos A β amino-truncados/modificados que han mostrado ser más tóxicos y agregarse más rápido *in vitro* que el péptido completo, así como acumularse en etapas tempranas de la enfermedad, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos, por lo que son considerados como “las semillas” o iniciadores del proceso patológico de la agregación de A β . Es por esto, que los péptidos A β amino-truncados/modificados deben ser considerados como eficientes blancos terapéuticos en futuros protocolos de inmunoterapia para la EA. Por su parte, el

péptido de longitud completa $A\beta_{1-42}$ ha sido señalado como la forma más amiloidogénica y patológica de $A\beta$, además de ser considerado como el componente mayoritario de las placas seniles observadas en el cerebro de pacientes con EA.

Es por esto, que los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$, fueron considerados para evaluar la respuesta inmune humoral que inducen en ratones de la cepa BALBc/AnN y establecer si los anticuerpos producidos son capaces de reconocer a determinadas especies de $A\beta$, lo que posteriormente podría permitir su aplicación. En el 2009, nuestro grupo de trabajo reportó que los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ inducidos en conejos, reconocen de manera específica al péptido $A\beta_{pE3-42}$, y posteriormente en el 2010, se reportó que la inmunización de conejos con el péptido $A\beta_{pE11-42}$ produce anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ capaces de reconocer a las tres especies del péptido estudiadas. El objetivo de este estudio fue la evaluación de la respuesta inmune inducida por estos péptidos en ratones con el fin de determinar si existe un comportamiento parecido al observado en conejos. Tomando en cuenta que los estudios pre-clínicos se están llevando a cabo en ratones transgénicos, los resultados obtenidos en este trabajo son de gran importancia para el desarrollo de nuevos protocolos de inmunización con el péptido $A\beta$.

Abreviaturas.

Abreviatura	Significado
EA	Enfermedad de Alzheimer
A β	Péptido beta amiloide
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
sAPP α	Fragmento soluble α de APP
C83	Fragmento carboxilo-terminal 83
AICD	Dominio intracelular de APP
sAPP β	Fragmento soluble β de APP
C99	Fragmento carboxilo-terminal 99
BACE	Beta secretasa
LTP	Potenciales de larga duración
A β ₁₋₄₀	Péptido beta amiloide 1-40
A β ₁₋₄₂	Péptido beta amiloide 1-42
SNC	Sistema nervioso central
NEP	Neprilisina
IDE	Enzima degradadora de la insulina
BHE	Barrera hematoencefálica
RAGE	Receptor de productos de la glicosilación avanzada
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LRP-1	Proteína-1 relacionada al receptor de LDL
A β _{pE3-42}	Péptido beta amiloide piroglutamado 3-42
A β _{pE11-42}	Péptido beta amiloide piroglutamado 11-42
QC	Glutaminil ciclasa
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
COX	Enzima ciclooxigenasa
NMDA	n-metil-D-aspartato
Fc	Fracción cristalizable
FcR	Receptor de la Fc
IGIV	Inmunoglobulinas intravenosas
FDA	Food and Drug Administration
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund

Figuras

1. Formación de las placas amiloides en la Enfermedad de Alzheimer.
2. Representación esquemática del procesamiento de APP.
3. Formación de A β piroglutamado.
4. Mecanismos de eliminación de A β por anticuerpos específicos.
5. Reactividad de los sueros de ratones de la cepa BALBc/AnN.
6. Curvas de titulación de los sueros inmunes anti-A β .
7. Evaluación de subclases de IgG presentes en los sueros anti-A β .
8. Reactividad de los sueros anti-A β frente a tres variantes del péptido A β .
9. Evaluación de la reactividad del suero anti-A β_{1-42} mediante Western blot.
10. Evaluación de la reactividad del suero anti-A β_{pE3-42} mediante Western blot.
11. Evaluación de la reactividad del suero anti-A $\beta_{pE11-42}$ mediante Western blot.

Tablas.

1. Título de anticuerpos de los sueros inmunes anti-A β .

1. Introducción.

1.1. Enfermedad de Alzheimer.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por deterioro cognitivo y pérdida de la memoria que fue descrita por primera vez por el neuropatólogo germano Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer 1907 y Goedert *et al.*, 2006).

La EA es una condición heterogénea, que difiere en la edad de inicio, sintomatología clínica, extensión y distribución de los cambios patológicos, presencia o ausencia de mutaciones germinales, o de otros muchos factores de riesgo (Castellani *et al.*, 2008).

En el curso de la EA, según el National Institute of Aging en los Estados Unidos, los signos y síntomas que aparecen de manera más temprana, son problemas de memoria, dificultad para encontrar palabras adecuadas y juicio escaso. Conforme la enfermedad progresa la pérdida de memoria empeora y cambios en otras habilidades cognitivas se hacen evidentes, se presentan trastornos en la personalidad, cambios en el estado de ánimo y les toma más tiempo de lo normal realizar tareas cotidianas; posteriormente, se presentan problemas de lenguaje, de razonamiento, de reconocimiento de familiares y amigos, incapacidad para aprender nuevas cosas, alucinaciones y paranoia; eventualmente los pacientes pierden la capacidad de comunicarse, se observa una disminución del peso corporal, además de la pérdida del control de esfínteres, entre otras cosas. Finalmente, los pacientes mueren debido a una infección o a un fallo respiratorio (www.nia.nih.gov).

El curso de la enfermedad es insidioso y se estima que los pacientes con EA pueden llegar a vivir por encima de 20 años después de que han sido diagnosticados con la enfermedad, sin embargo, la media de supervivencia es de 5 a 10 años después del diagnóstico inicial (Walsh *et al.*, 1990).

En la actualidad, se sabe que la patología de la EA incluye la acumulación del péptido beta amiloide (A β) y de la proteína tau hiperfosforilada, inflamación, estrés oxidativo, pérdida sináptica y neuronal, y decline cognitivo (Querfurth y

LaFerla, 2010). Por más de dos décadas, la hipótesis de la cascada amiloide ha sido la hipótesis cardinal en la descripción de la secuencia de eventos de la etiología de la EA. Esta hipótesis considera a la deposición de A β como el evento central de la patología de la enfermedad y que las marañas neurofibrilares, muerte celular, daño vascular y demencia ocurren como una consecuencia de ello.

Es por todo lo anterior, que éste desorden neurodegenerativo multifactorial asociado a la edad, representa uno de los mayores retos en materia de salud pública que necesita desesperadamente del desarrollo de innovadores y eficaces terapéuticos (Medeiros *et al.*, 2012).

1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo.

La EA es la forma de demencia más común y aunque su prevalencia es mucho más alta en la población adulta, permanece como la forma de demencia más frecuente también en personas con edades por debajo de los 65 años (Harvey *et al.*, 2003).

Más de 35 millones de personas son afectadas por la EA alrededor del mundo, entre ellos 5.5 millones tan solo en los Estados Unidos, y se espera que estos números se cuadrupliquen para el 2050 (Hebert *et al.*, 2003). En México, al 2010 se estimó un aproximado de 350 mil pacientes con ésta enfermedad según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Múltiples estudios han sugerido que la EA tiene una etiología compleja, con factores ambientales y genéticos que influyen la patogénesis de la enfermedad; se estima que más del 98% de los casos, que presentan una edad de inicio por encima de los 65 años, padecen la EA de tipo esporádica, que solo ha logrado ser asociada de manera robusta con la herencia del alelo ϵ 4 de la apolipoproteína E (APOE), mientras que el porcentaje restante de los casos, que presentan una edad de inicio de la enfermedad por debajo de los 65 años, padecen un tipo de EA que está asociado con mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP) y las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), la llamada enfermedad de Alzheimer familiar (EAF) (Rogaeva *et al.*, 2006).

En cuanto a la Enfermedad de Alzheimer esporádica, se ha encontrado que la presencia de uno o dos alelos $\epsilon 4$ correlaciona de manera dosis dependiente con la densidad relativa de placas amiloides (Schmechel *et al.*, 1993). Aunque se ha encontrado que la presencia del alelo no es suficiente para causar la enfermedad, actúa como un factor de riesgo (el riesgo aumenta más de 12 veces en la población APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ y cerca de 3 veces en la población APOE $\epsilon 3/\epsilon 4$ comparado con el genotipo APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$) y como modificador de la edad de inicio de la enfermedad (alrededor de los 70 años para la población $\epsilon 4/\epsilon 4$ y por encima de los 90 años para la población $\epsilon 2/\epsilon 3$), sin embargo, más de la mitad de los casos con EA esporádica no poseen el alelo APOE $\epsilon 4$, lo que indica que factores adicionales están involucrados en la enfermedad (Roses, 1996; Roses, 1998).

Por otro lado, en la EAF los pacientes con mutaciones en el gen de la APP presentan una edad de inicio de la enfermedad entre los 30 y 65 años. La mutación patológica más frecuente es la sustitución Val717Ile, la cual se encuentra en aproximadamente 50% de las familias con EA asociada a APP, mientras que las mutaciones en el gen de la PS1 representan del 18-50% de todos los casos de EAF y son responsables de las formas más severas de la enfermedad con una edad de inicio entre los 16 y los 65 años. En contraste con la PS1, las mutaciones en el gen de PS2 son raras y están asociadas con edades de inicio de la enfermedad mayores a los 40 años (Rogaeva *et al.*, 2006). En las familias con mutaciones en estos genes, la enfermedad es transmitida de manera autosómica dominante a los descendientes, mientras que el alelo APOE $\epsilon 4$ actúa tan solo como un factor de riesgo para la EA, no obstante, el efecto patológico común de todos estos factores genéticos es la alteración del procesamiento de la APP y el favorecimiento de la deposición de A β (Rogaeva *et al.*, 2002; Tandon *et al.*, 2000).

Además de los factores genéticos antes mencionados, existen otros factores de riesgo no genéticos que han sido asociados con la enfermedad, tales como haber sufrido un traumatismo craneal, padecer diabetes tipo II, hipertensión o hipercolesterolemia en edades tempranas, obesidad, ser fumador, así como tener deficiente actividad física e intelectual (Ballard *et al.*, 2011).

1.1.2. Neuropatología y patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.

La EA se caracteriza patológicamente por atrofia cortical, muerte neuronal, neuroinflamación, pérdida sináptica, y la acumulación de dos lesiones patológicas: marañas neurofibrilares y placas seniles (Holtzman *et al.*, 2011). Las marañas neurofibrilares se depositan dentro de las neuronas y están compuestas de la proteína tau hiperfosforilada, mientras que las placas seniles se forman en el espacio extracelular y están compuestas del péptido beta amiloide (Hardy y Selkoe, 2002). Sin embargo, varios estudios han reportado que el péptido amiloide puede depositarse también de manera intracelular así como en vasos (Gouras *et al.*, 2005).

Se cree que las alteraciones en el procesamiento de la APP son el detonante clave de la patogénesis de la EA, aún por encima de la formación de marañas neurofibrilares, y existen varias líneas de evidencia que soportan esta hipótesis (Kayed *et al.*, 2003; Lansbury, 1992; Lansbury, 1999). Un punto que constituye uno de los mayores argumentos a favor de la hipótesis amiloide, es la observación del inicio de la patología de la EA de manera prematura en pacientes con Síndrome de Down. La APP está localizada en el cromosoma 21q, por lo que los pacientes con Síndrome de Down, quienes poseen una trisomía del cromosoma 21, desarrollan invariablemente la enfermedad (Tanzi y Bertram, 2005), sin embargo, los individuos con trisomía 21 que presenten una ruptura en el brazo largo del cromosoma 21 (21q) no desarrollan la enfermedad (Prasher *et al.*, 1998). Otro argumento es la observación de que las estrategias dirigidas a disminuir la acumulación de A β disminuyen también la cantidad de marañas neurofibrilares así como otras alteraciones relacionadas con la EA, mientras que las estrategias dirigidas a disminuir la fosforilación de tau no afectan a los agregados amiloides y consecuencias relacionadas.

Numerosos estudios han encontrado diversas mutaciones asociadas con la EAF de inicio temprano, estas mutaciones han sido halladas en el gen de la APP en el cromosoma 21q (Bertram y Tanzi, 2008), en el gen de la PS1 en el cromosoma 14q, y en el gen de PS2 localizado en el cromosoma 1q (Bertram *et al.*, 2010). Todas estas mutaciones influyen el metabolismo y producción

de A β , incrementando la cantidad del péptido y conduciendo al desarrollo de la EAF (Koffie *et al.*, 2011).

Además de lo antes mencionado, se ha encontrado que los cerebros de pacientes con EA se caracterizan por un decremento en el número de neuronas en las cortezas límbica y de asociación (Jack *et al.*, 2010), así mismo se observan déficits metabólicos que llevan a la muerte neuronal en los lóbulos temporal y parietal (Lantos *et al.*, 1992; Mann *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). A nivel macroscópico, los cerebros de pacientes con EA se observan con surcos ensanchados y giros angostos, además de dilatación ventricular, adicionalmente presentan una pérdida de más del 35% del peso en comparación con los cerebros de personas sanas, debido principalmente a la atrofia cerebral causada por la pérdida de neuronas y las conexiones entre éstas (Castellani *et al.*, 2010; Weiner and Frenkel, 2006).

1.1.2.1. Lesiones patológicas: marañas neurofibrilares y placas amiloides.

Como ya se ha mencionado antes, la EA comprende la acumulación de dos lesiones patológicas que son las marañas neurofibrilares y las placas amiloides. Las marañas neurofibrilares se forman en las neuronas por la acumulación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada. La proteína tau es abundante en las neuronas, pero está presente en todas las células nucleadas; en los axones, se encuentra unida a microtúbulos estabilizándolos y favoreciendo el transporte vesicular (Querfurth y LaFerla, 2010). Las marañas neurofibrilares se localizan principalmente en las neuronas piramidales y de la corteza cerebral, aunque también pueden ser encontradas en estructuras más profundas incluyendo el cerebro medio y el hipotálamo (Braak and Braak, 1991). Morfológicamente, las marañas neurofibrilares consisten de numerosos pares de filamentos helicoidales, cada uno de estos filamentos mide aproximadamente 10 nm de diámetro y se han encontrado asociados además a neuritas distróficas (Wisniewski *et al.*, 1976; Braak *et al.*, 1986). Tal como se menciona en un artículo de Castellani *et al.* se han identificado además algunos otros componentes de estas marañas neurofibrilares, tales como elementos del citoesqueleto, moléculas inflamatorias, aductos de estrés oxidativo, elementos

relacionados con proteasas y moléculas amiloidogénicas tales como APP, etc (Castellani *et al.*, 2010).

Durante la neurodegeneración, tau está anormalmente fosforilada y el incremento en su fosforilación puede resultar en su separación de los microtúbulos y posterior secuestro para la formación de marañas neurofibrilares. Se piensa que la pérdida de la función normal de tau, combinada con una tóxica ganancia de función, podría comprometer el transporte axonal y contribuir a la degeneración sináptica (Castellani *et al.*, 2010).

El término amiloide, es un término utilizado para nombrar a una variedad de proteínas que se agregan para formar fibrillas extracelulares que tienen un tamaño de entre 7 a 10 nm, y que poseen características estructurales comunes, incluyendo una conformación en forma de hoja β y la habilidad de unirse a colorantes tales como el rojo Congo.

Las placas amiloides son lesiones extracelulares que se han encontrado en el cerebro de pacientes con EA, cuya unidad constituyente principal es el péptido A β , que es un derivado del corte proteolítico de APP. En un análisis realizado al A β aislado de dichas placas, se observó que el péptido es capaz de unirse al rojo Congo y que produce birrefringencia bajo un plano de luz polarizada después de su tinción con dicho colorante (Wisniewski *et al.*, 1989; Castellani *et al.*, 2010).

Estas placas amiloides se observan en el sistema límbico (especialmente en el hipocampo) y en las cortezas de asociación en el cerebro de pacientes con EA. Estos depósitos extracelulares pueden ser de dos tipos: difusos y compactos. Las placas difusas representan la lesión cerebral temprana en la EA, están formadas en su mayoría por oligómeros de A β , tienden a ser heterogéneas en su tamaño y se ha propuesto, pero no probado, que estos depósitos difusos pueden progresar a depósitos compactos. Por otra parte, las placas compactas o neuríticas son lesiones extracelulares que miden de 10 a 50 μ m de diámetro y están conformadas principalmente de fibrillas del péptido. Estas fibrillas amiloides son estructuras formadas por la agregación del péptido amiloide (figura 1) y poseen características bioquímicas tales como ser insolubles en

detergentes, tener un alto contenido de hojas β , resistencia a proteasas, etc. El núcleo de las placas neuríticas está formado por filamentos de $A\beta$ y se encuentra rodeado por neuritas distróficas (principalmente axones), además de microglia activada (Castellani *et al.*, 2010).

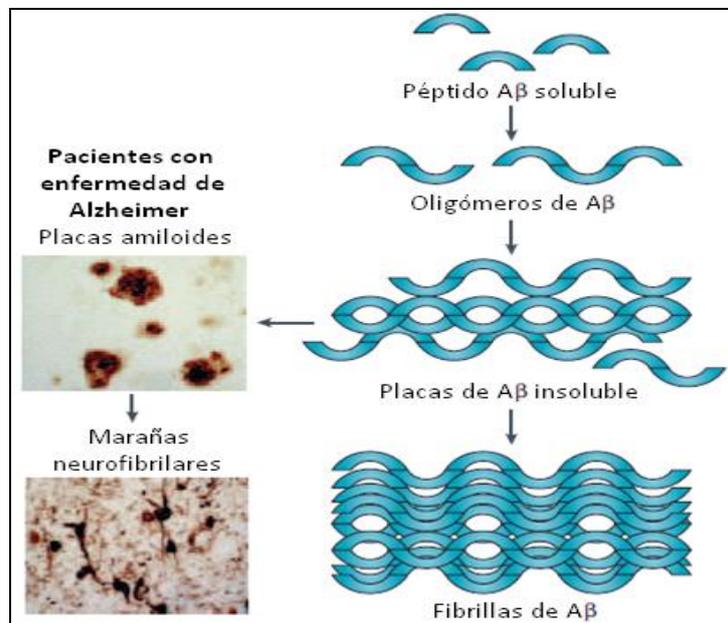


Figura 1. Formación de las placas amiloides en la Enfermedad de Alzheimer. El péptido $A\beta$ se polimeriza para formar oligómeros, los cuales se pliegan para formar fibrillas en conformación β plegada de las cuales están conformadas las placas amiloides compactas. Las placas amiloides han sido asociadas a cambios patológicos alrededor de las neuronas que eventualmente conducen a su muerte. Modificado de Weiner and Frenkel, 2006.

Es importante mencionar que se ha encontrado que existe una pobre correlación entre los déficits cognitivos y la carga de placas amiloides, lo que podría ser el reflejo de una diferencia en la vulnerabilidad a los efectos tóxicos de diferentes formas de agregados del péptido $A\beta$ o atribuirse de igual manera a diferencias cuantitativas o cualitativas en la presencia de especies particulares de $A\beta$ (Moore *et al.*, 2012). No obstante, se ha demostrado que los oligómeros solubles de $A\beta_{1-42}$ correlacionan mejor con la disfunción cognitiva en pacientes con EA (Naslund *et al.*, 2000).

1.2. Proteína precursora amiloide.

La proteína precursora amiloide (APP) es una glicoproteína integral de membrana tipo I de 120 kDa, codificada en el exón 19 del cromosoma 21q21

(Vetrivel *et al.*, 2006; Wilquet *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2003). Filogenéticamente, la APP es una proteína altamente conservada y es constitutivamente expresada por varias células además de las neuronas (Bush *et al.*, 1993), tales como plaquetas, linfocitos periféricos, leucocitos así como también células endoteliales y del músculo liso (Ling *et al.*, 2003; Miklossy, 2011). Además de éstas, otras células localizadas en el cerebro tales como astrositos y microglia, expresan APP y liberan cantidades variables de A β (Ling *et al.*, 2003).

Como ya se ha mencionado, la APP es ampliamente expresada en la superficie celular de neuronas y contiene una pequeña porción citoplasmática, una porción transmembranal y un dominio extracelular relativamente largo. El corte enzimático de APP resulta en la producción de fragmentos amiloidogénicos y no amiloidogénicos, dependiendo de si el procesamiento genera la formación del péptido A β o no (Gustaw *et al.*, 2008).

La función celular de APP aún no está completamente resuelta, sin embargo, se cree que podría funcionar como receptor para el transporte intracelular de vesículas sinápticas a través de la interacción con cinesinas y microtúbulos (Kamal *et al.*, 2001). La APP también ha sido implicada en la adhesión celular y en la migración de neuronas recién diferenciadas en la corteza cerebral (Weiner and Frenkel, 2006).

1.2.1. Péptido beta amiloide.

El péptido A β es un péptido de 4 kDa que se forma del corte secuencial de la APP por la β - y la γ -secretasa (Hardy y Selkoe, 2002). Durante el procesamiento de APP (figura 2), en la vía no amiloidogénica, la α -secretasa corta a la APP dentro del dominio de A β lo que lleva a la formación de un fragmento soluble de APP (sAPP α) y un fragmento carboxilo-terminal anclado a la membrana C83. La subsecuente acción de la γ -secretasa libera dos péptidos no patogénicos: p3 y AICD (dominio intracelular de APP). Mientras que en la vía amiloidogénica, el corte de APP por la β -secretasa lleva a la formación del fragmento soluble sAPP β y el fragmento carboxilo-terminal C99, el cual es entonces cortado por la γ -secretasa para producir los péptidos AICD y A β (Claeysen *et al.*, 2012).

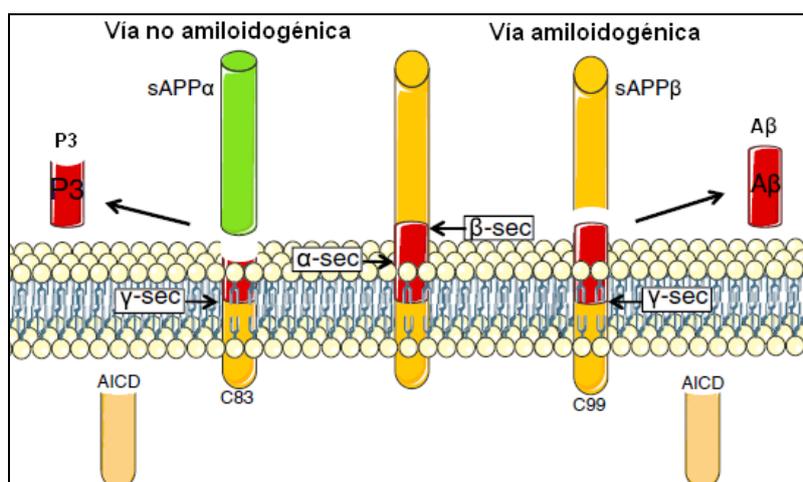


Figura 2. Representación esquemática del procesamiento de APP por las diferentes proteasas: α -, β - y γ -secretasa. Modificado de Claeysen *et al.*, 2012).

La β -secretasa es una aspartil-proteasa transmembranal de la cual se han identificado dos formas: BACE1 y BACE2, siendo la primera la que se expresa en mayor cantidad en el cerebro. Por otra parte, la γ -secretasa es un complejo constituido por cuatro subunidades: PEN-2, APH-1, Nicastrina y PS1 y/o PS2, siendo estas últimas la subunidad catalítica del complejo (Claeysen *et al.*, 2012).

El péptido A β es un péptido de naturaleza anfifílica y bajo ciertas condiciones puede tener un mal plegamiento, esto genera su asociación con otros péptidos mal plegados formando estructuras ricas en hojas β , típicas de los agregados amiloides. Este péptido puede encontrarse en diferentes formas que van desde monómeros a oligómeros solubles, protofibrillas y fibrillas, las cuales finalmente se agregan para formar placas amiloides (Koffie *et al.*, 2011).

Los oligómeros de A β son especialmente tóxicos, ya que inhiben la inducción de potenciales de larga duración (LTP) los cuales están implicados en la formación de la memoria, efecto que culmina con depresión sináptica y daño en redes neuronales (Palop and Mucke, 2010). El mecanismo detallado por el que los oligómeros de A β median la disfunción sináptica es bastante complejo, se ha propuesto que los oligómeros de A β pueden inducir la deshomeostasis del calcio, detonando la activación de caspasas y calcineurinas, además es capaz de modular la actividad de receptores sinápticos excitatorios, infundiendo una

cascada de eventos moleculares que culminan con la inhibición de LTP y pérdida sináptica (Koffie *et al.*, 2011).

El mecanismo primario por el cual A β es capaz de inducir toxicidad aún no es totalmente claro, ya que se ha encontrado además que A β es capaz de interactuar con una gran variedad de proteínas en la membrana, algunas de las cuales están involucradas en la síntesis de proteínas, así como en la organización del citoesqueleto, etc (Manzoni *et al.*, 2011). Se cree que los efectos tóxicos de A β inician con la disrupción de la integridad membranal por la formación directa de poros en la membrana de células neuronales o promoviendo el adelgazamiento de la bicapa lipídica que lleva a una pérdida de la homeostasis iónica (Johnson *et al.*, 2011).

Por otro lado, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que A β posee actividad antioxidante: las formas monoméricas de A β_{1-40} y A β_{1-42} han mostrado actuar como protectores contra la toxicidad oxidativa inducida por hierro y cobre en cultivos de neuronas (Zou *et al.*, 2002). Además se ha encontrado que en concentraciones fisiológicas (en el orden de nanomoles) los monómeros de A β_{1-40} y A β_{1-42} son capaces de proteger a lipoproteínas de la oxidación en el fluido cerebroespinal y en plasma. Es probable que el mecanismo por el cual A β inhibe la oxidación sea a través de su unión a iones metálicos, actuando como un secuestrador de radicales libres (Kontush *et al.*, 2001).

Con respecto a la eliminación de A β , es probable que esta se encuentre mediada por múltiples procesos incluyendo el mantenimiento de la homeostasis vascular de A β entre el sistema nervioso central (SNC) y la periferia, la fagocitosis por la microglía y la degradación enzimática. Con respecto a este último proceso, se ha comprobado la participación de dos enzimas en la degradación del péptido amiloide: la neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de la insulina (IDE). Por otro lado, en cuanto a la homeostasis vascular de péptido, se sabe que el transporte de A β ocurre a través de la barrera hematoencefálica (BHE): el paso de A β del plasma hacia el cerebro está mediado por el receptor de productos de la glicosilación avanzada (RAGE por sus siglas en inglés), mientras que el flujo inverso ocurre a través de la proteína-1 relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL),

LRP-1, por lo que la alteración del transporte de A β a través de la BHE o el daño en la vasculatura contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Scott Miners *et al.*, 2011; Storkebaum *et al.*, 2011).

1.2.1.1. Péptido de longitud completa.

Como ya se ha mencionado, el péptido amiloide proviene del corte proteolítico de la APP por la β - y la γ -secretasa y dependiendo del sitio de corte de esta última, se producen péptidos A β de diferentes longitudes variando de los 38 a los 43 aminoácidos (Hardy y Selkoe, 2002). La forma más abundante en condiciones normales es el péptido compuesto de 40 aminoácidos A β_{1-40} (90%), mientras que una menor cantidad (10%) posee 2 aminoácidos más (el péptido A β_{1-42}). Adicionalmente, se han encontrado en cantidades pequeñas péptidos de menor tamaño tales como A β_{1-34} , A β_{1-37} , A β_{1-38} , A β_{1-39} , etc, aunque pocos reportes han logrado cuantificar los niveles de estos péptidos en el cerebro (Wang *et al.*, 1996).

Diversas investigaciones han mostrado que A β_{1-42} es la forma más amiloidogénica y ha sido implicada como la principal forma patológica de A β (Younkin SG, 1998), siendo los oligómeros de éste péptido los más tóxicos. Con base en varias líneas de investigación, se ha encontrado que A β_{1-42} es el componente inicial y mayoritario de las placas seniles y es capaz de agregarse más rápido que A β_{1-40} debido a que es más hidrofóbico (Castellani *et al.*, 2010; Jarrett *et al.*, 1993).

Se sabe que el péptido A β_{1-42} se deposita principalmente en el parénquima cerebral de los pacientes con EA, mientras que A β_{1-40} se ha asociado principalmente con la angiopatía amiloide cerebral, en la cual el A β_{1-40} se deposita en las paredes de las arterias que irrigan el cerebro (Weiner and Frenkel, 2006).

Cabe mencionar que además del péptido de longitud completa, pueden ser generadas formas truncadas en el extremo amino del péptido que son resultado de un procesamiento alternativo de la APP o de la proteólisis de A β_{1-}

1.2.1.2. Péptidos amino-truncados/modificados: $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$.

Existen varias formas del péptido beta amiloide, entre ellas, los péptidos $A\beta$ amino-truncados/modificados. Aunque el significado patológico de las especies $A\beta$ amino-truncadas/modificadas no ha sido totalmente explicado, estudios recientes han demostrado que estas formas más cortas de $A\beta$ se agregan más rápidamente *in vitro* y son más tóxicas que el péptido completo (Youssef *et al.*, 2007; D'Arrigo *et al.*, 2009). En estudios anteriores ha sido demostrado también que los péptidos $A\beta$ amino-truncados/modificados se acumulan en el cerebro de pacientes con EA esporádica, en pacientes con EAF en etapas tempranas y en el cerebro de pacientes con Síndrome de Down, y se consideran como "las semillas" o iniciadores del proceso patológico de la agregación del $A\beta$ (Mori *et al.*, 1992; Wirths *et al.*, 2010).

Dentro de los péptidos $A\beta$ amino-truncados/modificados se encuentran los péptidos $A\beta$ piroglutamados, los cuales han ganado considerable atención como potenciales participantes en la patología de la EA debido a su abundancia en el cerebro de pacientes con esta enfermedad. En un artículo importante publicado por Sergeant y colaboradores se ha demostrado que la mayoría de las especies de $A\beta$ que se agregan en las primeras etapas de la EA, inclusive antes de la aparición de los síntomas clínicos, son péptidos amino-truncados (Sergeant *et al.*, 2003). De las formas amino-truncadas/modificadas, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ son las que han sido más estudiadas y se cree que son especies claves involucradas en el inicio de la formación de agregados amiloides (Moore *et al.*, 2012).

En el 2000, Russo y colaboradores mostraron que en los casos con una mutación en la PS1, se genera una más alta proporción entre las especies $A\beta_{pE3-42}/A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{pE11-42}/A\beta_{1-42}$ en comparación con casos de EA esporádica (Russo *et al.*, 2000). Por su parte, usando técnicas de inmunoprecipitación en combinación con espectrometría de masas, Portelius y colaboradores encontraron que $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{4-42}$ son las fracciones dominantes en la corteza e hipocampo de pacientes con EA (Portelius *et al.*, 2010). Es por esto que se propone que dentro de las especies $A\beta$ amino-

truncadas/modificadas, $A\beta_{pE3-42}$ representa la fracción dominante en el cerebro de pacientes con EA (Saïdo *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que los oligómeros de $A\beta_{pE3-42}$ se acumulan en etapas tempranas de la enfermedad, por lo que se ha propuesto que el reconocimiento de oligómeros de $A\beta_{pE3-42}$ por anticuerpos específicos para el péptido, podría ser útil como herramienta en el diagnóstico y tratamiento de la EA (Wirths *et al.*, 2010).

La formación del péptido $A\beta_{pE3-42}$ (figura 3) comprende un proceso de múltiples pasos, que comienzan a ocurrir después de que la β - y la γ -secretasa realizan el corte de APP y $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$ han sido liberados, y que requiere de la remoción de los dos primeros aminoácidos, aspartato y alanina, para exponer el glutamato en la tercera posición hacia el extremo amino-terminal de $A\beta$. Subsecuentemente, el glutamato es modificado a piroglutamato por una reacción de deshidratación catalizada por la actividad de la glutaminil ciclasa (QC) (Jawhar *et al.*, 2011).

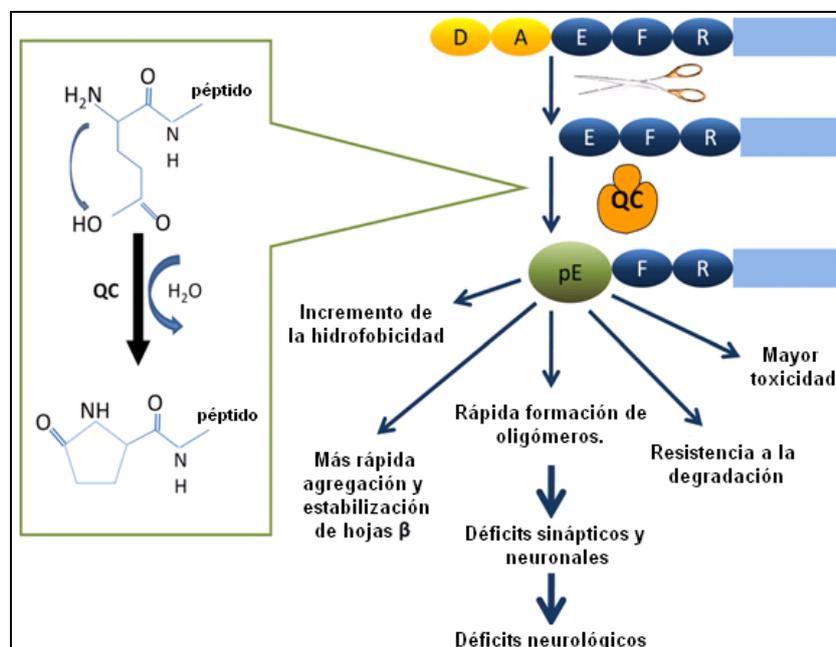


Figura 3. Formación de $A\beta$ piroglutamado. La remoción de los dos primeros aminoácidos es un prerrequisito para la formación del anillo lactámico. Las propiedades bioquímicas del péptido se ven afectadas con severas consecuencias patológicas. Modificado de Jawhar *et al.*, 2011.

La QC pertenece a la familia de las acetiltransferasas metal-dependientes que convierten a la glutamina (o alternativamente el glutamato) en piroglutamato con la liberación de amonio (o agua). La presencia de la QC ha sido encontrada en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y en gránulos secretorios (Schilling *et al.*, 2003; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009; Fischer and Spiess, 1987; Cynis *et al.*, 2008), la cual es secretada de manera constitutiva y regulada, y que está involucrada en la maduración de hormonas peptídicas tales como orexina A, gastrina, neurotensina y hormonas liberadoras de gonadotropina y tirotropina (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011).

En 1995 Saido y colaboradores sugirieron que los dos primeros aminoácidos que deben ser removidos para la formación del $A\beta_{pE3-42}$, son cortados por peptidasas. Catorce años después Sevalle y colaboradores sugirieron que la aminopeptidasa A podría ser quien removiera el aspartato de la secuencia de $A\beta$ (Saido *et al.*, 1995; Sevalle *et al.*, 2009).

He y Barrow reportaron que los péptidos piroglutamados en el tercer aminoácido, muestran un incremento en la formación de hojas β y más alta propensión a la agregación comparados con péptidos $A\beta$ de longitud completa, y se ha sugerido que esto es producto de la pérdida de tres grupos cargados, lo que facilita y estabiliza la formación de hojas β por una reducción en el nivel de repulsión de cargas entre los filamentos (He y Barrow, 1999).

Por otra parte, se sabe que el péptido $A\beta_{pE11-42}$ es generado por el corte de la β -secretasa en un sitio alternativo dentro de APP (β'), que se encuentra entre los residuos 10 y 11 de tirosina y glutamato respectivamente así, se genera primero el péptido $A\beta_{11-42}$ quedando expuesto el glutamato en la posición 11, después de lo cual, la QC cataliza la formación del piroglutamato de la misma manera que lo hace en $A\beta_{pE3-42}$ para así, finalmente generar el $A\beta_{pE11-42}$ (Schilling *et al.*, 2004).

Se estima que las especies amino-truncadas/modificadas pueden llegar a representar hasta el 60% del total del $A\beta$ presente en el cerebro de pacientes con EA, la mayoría de estas especies terminan en el aminoácido 42 del péptido

A β de longitud completa y en menor proporción en el aminoácido 40 (Delacourte *et al.*, 2002; Sergeant *et al.*, 2003).

1.3. Estrategias para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Una de las metas primordiales de la investigación sobre la EA es el desarrollo de terapéuticos capaces de mejorar los síntomas y prevenir la enfermedad. Debido a que se han identificado múltiples factores involucrados en la etiología de la EA, se requiere también de múltiples acercamientos para el desarrollo de nuevos terapéuticos. Los esfuerzos iniciales están centrados en el desarrollo de métodos para reducir la carga amiloide y una amplia variedad de alternativas para reducir la deposición de A β se han descrito: estas alternativas incluyen la reducción de la producción de A β , el incremento de la degradación del péptido amiloide, prevención de la formación de agregados y/o disolución de las fibrillas amiloides formadas, y el incremento de la velocidad de eliminación de A β del cerebro (Morgan, 2006).

Una de las aproximaciones que ha mostrado tener considerable éxito en modelos murinos y que ha sugerido tener beneficios en pruebas humanas es la inmunoterapia anti-A β . Schenk fue el primero en mostrar el potencial de la inmunización activa para la reducción de agregados amiloides en 1999 (Morgan D, 2006). El hallazgo de que la inmunización activa con A β ₁₋₄₂ podría reducir marcadamente la cantidad de A β en un modelo animal dio pie a la realización de un estudio clínico por la compañía farmacéutica Elan, en el que el péptido sintético A β ₁₋₄₂ (AN1792) más el adyuvante QS21 o saponina (inductor de una respuesta tipo T_H1) fue administrado a individuos con EA; en la fase I del estudio, se observó seguridad y tolerabilidad a múltiples inyecciones de AN1792 más QS21 por parte de los participantes, con una respuesta de anticuerpos contra A β ₁₋₄₂ en más de la mitad de la población estudiada. En la fase 2 del estudio 372 pacientes con EA se designaron aleatoriamente a dos grupos para recibir un placebo o el péptido amiloide más saponina, sin embargo el 6% de los pacientes tratados con el péptido en presencia del adyuvante desarrollaron síntomas consistentes con meningoencefalitis, lo que llevó a la detención abrupta del estudio clínico. El efecto adverso fue asociado a una respuesta inflamatoria de células T contra

A β en el cerebro, además se observó la infiltración de células T CD4⁺ y CD8⁺ en el cerebro de los pacientes tratados con el inmunógeno en presencia de saponina (Weiner and Frenkel, 2006).

Otra de las alternativas es el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) dirigidos a combatir los mecanismos inflamatorios involucrados en la enfermedad. El principal objetivo de éstos fármacos es inhibir la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) que media la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas, las cuales son componentes cruciales del proceso pro-inflamatorio (Yasojima *et al.*, 1999).

En la actualidad, los inhibidores de la acetilcolinesterasa y memantina se han aprobado para mejorar la cognición de pacientes con EA. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa interfieren con la degradación de la acetilcolina por éstas enzimas, permitiendo que el neurotransmisor permanezca por más tiempo en el espacio sináptico. Mientras que la memantina es un antagonista del receptor de n-metil-D-aspartato (NMDA) que funciona como receptor para el neurotransmisor glutamato, cuya producción excesiva puede dañar las células y eventualmente llevar a la muerte neuronal (ADEAR, 2011). Sin embargo, cabe mencionar que los efectos de estos tratamientos son limitados (Delrieu *et al.*, 2011).

Otro blanco importante en el tratamiento de la EA es la proteína tau hiperfosforilada. Se ha observado que la inmunoterapia contra A β resulta en una indirecta y muy limitada reducción de los agregados de tau en neuritas distróficas, lo que muestra la importancia de desarrollar una terapia separada que tenga como blanco directo a tau. Se ha observado en modelos murinos, que la inmunización con tau fosforilada deriva en una reducción de los agregados de la proteína en el cerebro y disminuye la progresión de la formación de marañas neurofibrilares (Sigurdsson *et al.*, 2008). Así mismo, la inmunización pasiva con anticuerpos contra tau pueden reducir la patología de esta proteína y el daño funcional (Boutajangout *et al.*, 2011), no obstante estos resultados aún deben ser confirmados en estudios realizados en humanos.

1.3.1. Inmunoterapia para la Enfermedad de Alzheimer.

Como ya se ha mencionado, el péptido A β representa un importante blanco molecular para la intervención en la EA. Además varios tipos de inmunoterapia para la enfermedad, tomando como referencia al péptido amiloide, se encuentran bajo investigación (Delrieu *et al.*, 2011).

Con la finalidad de estimular la eliminación de placas amiloides se han desarrollado técnicas de inmunización activa y pasiva; la inmunización activa implica la administración directa del péptido A β intacto o de partes del mismo que pueden estar conjugadas a proteínas acarreadoras, mientras que la inmunización pasiva comprende el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales o fragmentos recombinantes de anticuerpos dirigidos contra epítomos específicos de A β (Solomon, 2006).

La primera demostración de que los anticuerpos contra el péptido A β podrían ser útiles modificando la deposición amiloide vino de los estudios *in vitro* realizados por Solomon y su grupo de colaboradores, quienes encontraron que los anticuerpos anti-A β podrían prevenir la formación de fibrillas y aún más importante, que estos anticuerpos podrían disgregar las fibrillas ya formadas y proteger a las neuronas de la toxicidad inducida por A β (Solomon *et al.*, 1997). En un trabajo subsecuente de este grupo, se identificó al epítomo EFRH en la posición 3-6 de A β como un blanco crítico para el reconocimiento de los anticuerpos (Solomon, 2006).

En la actualidad, los anticuerpos monoclonales han emergido como una nueva clase de fármacos sobre todo para el tratamiento contra diversos tipos de cáncer y enfermedades inmunológicas, así como también para la EA. Actualmente, varios anticuerpos monoclonales y vacunas con el péptido amiloide o fragmentos de este se encuentran en diversas fases de estudios clínicos (Reichert, 2008; Delrieu *et al.*, 2011).

1.3.1.1. Mecanismos de eliminación del A β por anticuerpos anti-A β específicos.

Se han postulado tres mecanismos para explicar la forma en la que los anticuerpos reducen la deposición de A β en el cerebro (Figura 3):

1°. Disgregación directa: este mecanismo implica la existencia de un efecto directo de los anticuerpos sobre A β , que lleva a la disolución de las fibrillas amiloides o a la neutralización de los oligómeros de A β (Klyubin *et al.*, 2005).

2°. Fagocitosis mediada por la microglia: los anticuerpos específicos para A β se unen al péptido así como al receptor Fc de la microglia (FcR) por medio de la fracción cristalizable de la molécula de inmunoglobulina (Fc). En consistencia con esto, encontraron células de microglia activada alrededor de las placas de A β después de la administración de anticuerpos anti-A β (Wilcock *et al.*, 2004).

3°. Hipótesis del consumo periférico: postula que la administración de anticuerpos anti-A β en periferia resulta en la salida de A β del cerebro al plasma. Esta hipótesis se sustenta en hallazgos realizados por investigadores, quienes observaron una rápida mejora en la cognición en animales después de una inyección intravenosa de anticuerpos y un incremento en las concentraciones plasmáticas de A β . Aunado a esto, se encontró que un anticuerpo monoclonal específico para el dominio central de A β , que no se une a las placas amiloides, fue capaz de reducir la carga amiloide cerebral; tales hallazgos indican que la administración intravenosa de anticuerpos anti-A β modifica el equilibrio de A β entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma, promoviendo la salida del péptido hacia la circulación (DeMattos *et al.*, 2001).

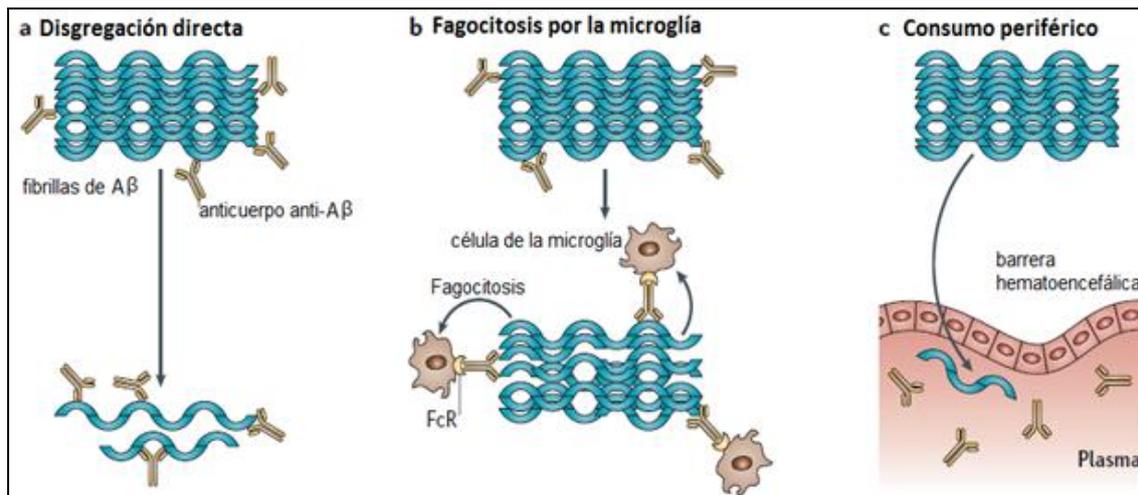


Figura 4. Mecanismos de eliminación de A β por anticuerpos específicos. **a** disolución de fibrillas amiloides por unión de los anticuerpos. **b** fagocitosis del complejo anticuerpo-A β mediada por el receptor Fc (FcR) de la microglia. **c** el secuestro del A β circulante provoca la salida de A β del cerebro al plasma. Modificado de Weiner y Frenkel, 2006.

Los tres mecanismos no son excluyentes uno del otro y es probable que ocurran de manera simultánea bajo ciertas condiciones, dependiendo en parte del sistema experimental que sea estudiado (Weiner y Frenkel, 2006).

1.3.1.2. Inmunoterapia activa contra la Enfermedad de Alzheimer.

La inmunoterapia activa comprende la administración de una sustancia exógena para estimular al sistema inmune con la finalidad de que se monte una respuesta (Brody y Holtzman, 2008). Como ya se ha mencionado antes, el primero en demostrar el potencial de reducción de agregados amiloides de la inmunización activa fue Schenk en 1999, al observar una disminución en el número y densidad de los depósitos amiloides en el cerebro de ratones transgénicos inmunizados con el péptido A β_{1-42} (Schenk *et al.*, 1999). Posteriormente, otros tres grupos independientes de investigadores inmunizaron ratones transgénicos con el péptido A β y demostraron la disminución de la carga amiloide en el cerebro de animales, así como mejora conductual (Brody y Holtzman, 2008; Morgan, 2011).

Debido al alarmante incremento de casos de la EA en el mundo y a los resultados preliminares obtenidos en modelos animales, las compañías farmacéuticas comenzaron ensayos clínicos sin datos suficientes acerca de la

inmunización con el péptido A β . Estos primeros ensayos (realizados entre 2001-2002) fueron detenidos debido a que el 6% de los pacientes desarrollaron síntomas de meningoencefalitis (Weiner y Frenkel, 2006). Desde entonces, varios laboratorios están desarrollando diferentes protocolos de inmunización con el fin de ofrecer un tratamiento protector sin efectos secundarios.

Actualmente, se realizan varios estudios clínicos, entre ellos se destacan tres estudios de inmunización activa en fase II: el primero de ellos con ACC-001 que consiste del péptido A β_{1-7} , realizado por Elan and Wyeth; el segundo con CAD106 que consiste de un fragmento amino-terminal de A β (A β_{1-6}) acoplado a un acarreador sin adyuvante adicional, realizado por Immunodrug, Cytos Biotechnology y Novartis; y el tercero es el ensayo de Affiris que está probando péptidos cortos (de 6 aminoácidos) que simulan el extremo amino-terminal de A β : dos de estos, AD01 y AD02, llamados también “affitopos”. Estos ya han sido administrados con hidróxido de aluminio como adyuvante. Sumados a éstos, se encuentran United Biomedical que está realizando un estudio en fase I con UB311, que consiste del fragmento A β_{1-14} y Merck que realiza también la fase I del estudio clínico con V950 (Delrieu *et al.*, 2011).

1.3.1.3. Inmunoterapia pasiva contra la Enfermedad de Alzheimer

La inmunización pasiva contra la EA, se refiere a la administración de anticuerpos monoclonales o policlonales, así como fragmentos recombinantes de anticuerpos dirigidos contra epítomos específicos del péptido A β (Solomon B, 2006). Una de las ventajas de éste acercamiento es que elimina la necesidad de que el paciente monte una respuesta inmune contra el péptido A β , sin embargo se requiere de la administración continua del anticuerpo.

Las investigaciones de Bard y DeMattos demostraron que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales específicos contra fragmentos del péptido A β , fue efectiva en la eliminación del péptido del cerebro y mejoró los déficits en la memoria en un modelo murino de la EA. Estas investigaciones confirmaron además que los anticuerpos circulantes fueron capaces de cruzar

la BHE y unirse a los depósitos de A β en el cerebro (Bard *et al.*, 2000; DeMattos *et al.*, 2001).

Estudios posteriores mostraron que la inyección intrahipocampal de anticuerpos anti-A β en ratones, no solo redujo las placas amiloides extracelulares, sino que además redujo la acumulación intracelular de A β y de marañas neurofibrilares en un modelo triple transgénico en el cual, el ratón posee transgenes que codifican para la APP, PS1 y la proteína tau, y que por lo tanto es capaz de desarrollar placas amiloides y marañas neurofibrilares (Oddo *et al.*, 2004).

Desde hace algún tiempo y con el propósito de abatir la baja capacidad de los anticuerpos para atravesar la BHE, se han ingeniado métodos para reducir el tamaño de los anticuerpos monoclonales manteniendo su actividad biológica. El resultado son los fragmentos recombinantes scFvs, que contienen solo las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos sin la región constante Fc y que exhiben propiedades anti-agregantes similares a las de los anticuerpos completos (Frenkel *et al.*, 2000; Frenkel and Solomon, 2002). Se ha mostrado además que la inmunización pasiva con los anticuerpos carentes de la región Fc puede prevenir la activación de la microglia y así, atenuar la neuroinflamación (Solomon B, 2006).

En la fase II de un estudio clínico que realizaron Élan y Wyeth con un anticuerpo monoclonal dirigido a la región amino-terminal del A β (Bapineuzumab), se encontró que el anticuerpo mostró ser seguro y eficaz especialmente en el grupo de pacientes con EA no portadores del alelo APOE4, y actualmente se realiza la fase III de este estudio (Salloway *et al.*, 2009). Otro ejemplo es el Solanezumab, un anticuerpo monoclonal contra A β ₁₃₋₂₈ que reconoce un epítipo en la región central del péptido, el cual se une selectivamente al A β soluble y que presenta menos eventos adversos en el SNC que Bapineuzumab. En la actualidad la fase III del estudio clínico con Solanezumab está en proceso (Siemers *et al.*, 2010). Además de estos, existen otros anticuerpos monoclonales contra A β , por ejemplo PF-04360365 dirigido a la región carboxilo-terminal de A β ₁₋₄₀ (específicamente a A β ₃₃₋₄₀), MABT5102A

que se une con alta afinidad a monómeros, oligómeros y fibrillas, GSK933776A dirigido hacia la región amino-terminal y Gantenerumab. Estos dos últimos se encuentran en estudios clínicos fase I y II, respectivamente (Delrieu *et al.*, 2011).

Una estrategia interesante y que se aplica en estudios clínicos actualmente es la administración de preparaciones intravenosas compuestas de un conjunto de inmunoglobulinas (IGIV), las cuales están ya aprobadas por la FDA para el tratamiento de otras condiciones patológicas y que podrían ser benéficas en el tratamiento de la EA como lo han mostrado algunos trabajos preliminares (Magga *et al.*, 2010). Una de las hipótesis es que las IGIV contienen una cantidad, aunque baja, de anticuerpos anti-A β . Algunas de las ventajas de las IGIV son que éstas cuentan con un largo historial clínico de ser generalmente seguras y toleradas por los pacientes, además de que evitan los altos costos asociados con la producción de anticuerpos monoclonales (Dodel *et al.*, 2010).

2. Antecedentes.

- La especie $A\beta_{1-42}$ es la forma más amiloidogénica del péptido $A\beta$ y se ha implicado como la principal forma patológica, siendo los oligómeros los más tóxicos (Younkin SG, 1998).
- Diversos estudios han demostrado que $A\beta_{1-42}$ es el componente mayoritario de las placas seniles y es capaz de agregarse más rápido que otras formas del péptido debido a que es más hidrofóbico (Castellani *et al.*, 2010; Jarrett *et al.*, 1993).
- En el 2010, Portelius y colaboradores encontraron que $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{4-42}$ son las fracciones dominantes en la corteza e hipocampo de pacientes con EA (Portelius *et al.*, 2010).
- Se estima que las especies amino-truncadas/modificadas $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ representan cerca de la mitad del total del $A\beta$ presente en el cerebro de pacientes con EA (He y Barrow, 1999).
- Saido y colaboradores propusieron que dentro de las especies $A\beta$ amino-truncadas/modificadas, $A\beta_{pE3-42}$ representa la fracción dominante en el cerebro de pacientes con EA (Saido *et al.*, 1995).
- Los péptidos $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ son las especies amino-truncadas/modificadas que han sido más estudiadas y se cree que son especies claves involucradas en el inicio de la formación de agregados amiloides (Moore *et al.*, 2012).
- Se ha encontrado que los oligómeros de $A\beta_{pE3-42}$ se acumulan en etapas tempranas de la enfermedad, por lo que se ha propuesto que el reconocimiento de oligómeros de $A\beta_{pE3-42}$ por anticuerpos específicos para el péptido, podría ser útil como herramienta en el diagnóstico y tratamiento de la EA (Wirhns *et al.*, 2010).

- Los anticuerpos anti-A β_{pE3-42} inducidos en conejos reconocen de manera específica a diferentes agregados del péptido A β_{pE3-42} (Acero *et al.*, 2009)
- En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, se encontró que los anticuerpos anti-A $\beta_{pE11-42}$ producidos en conejos son capaces de reconocer a diferentes especies del péptido A β , entre ellas los oligómeros de los péptidos A β_{1-42} , A β_{pE3-42} y A $\beta_{pE11-42}$ (Pérez-Garmendia *et al.*, 2010).

3. Hipótesis.

Los anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} generados a través de la inmunización de ratones de la cepa BALBc/AnN con los tres péptidos amiloides A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42} en presencia de adyuvante de Freund, serán capaces de reconocer a una o varias especies del péptido beta amiloide, como ha sido mostrado antes por nuestro grupo de trabajo para el caso de los anticuerpos anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} inducidos en conejos.

4. Objetivo general.

Comparar la respuesta inmune humoral inducida por tres péptidos amiloides: A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42} en ratones de la cepa BALBc/AnN.

4.1. Objetivos particulares.

- Generar sueros inmunes anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} en ratones de la cepa BALBc/AnN.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} frente al péptido correspondiente.
- Determinar el título de anticuerpos de los sueros inmunes anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}.
- Identificar las subclases de inmunoglobulinas presentes en los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}.
- Evaluar la reactividad de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} frente a las tres variantes del péptido amiloide.
- Determinar los tipos de agregados del péptido amiloide que son reconocidos por los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} mediante Western Blot.

5. Materiales y Métodos.

5.1. Material biológico.

- 12 ratones de la cepa BALBc/AnN de 8 semanas de edad.

5.2. Metodología.

5.2.1. Protocolo de inmunización.

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de 3 ratones cada uno, los cuales fueron sometidos a tratamientos diferentes: grupo 1 - Adyuvante; grupo 2 - $A\beta_{1-42}$ + Adyuvante; grupo 3 - $A\beta_{pE3-42}$ + Adyuvante; grupo 4 - $A\beta_{pE11-42}$ + Adyuvante.

Cada uno de los ratones fue inmunizado por vía intraperitoneal; en la primera inmunización se les administraron 20 μ g del péptido $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ o $A\beta_{pE11-42}$ (AnaSpec, CA) según el caso, en presencia de buffer salino de fosfatos (PBS) como vehículo hasta completar un volumen de 100 μ L y adyuvante completo de Freund 1:1 vol/vol. Los ratones pertenecientes al grupo Adyuvante (grupo control) se administraron con PBS y adyuvante completo de Freund 1:1 vol/vol. Posteriormente, todos los ratones recibieron 3 refuerzos cada 10 días según el tratamiento asignado, sustituyendo el adyuvante completo de Freund por adyuvante incompleto de Freund.

Todos los ratones se sangraron al tercer o cuarto día después de cada refuerzo y finalmente se sangraron a blanco 3 días después de la última administración.

5.2.2. Obtención de sueros.

La sangre total de cada uno de los ratones se centrifugó en tubos de 1.5 mL a 1500 G (5000 rpm) por 10 minutos en una microcentrífuga (Minispin Eppendorf, Alemania), el sobrenadante de cada uno de los tubos se recuperó y colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL, que se centrifugaron nuevamente a 1500 G por 10 min. Los sueros obtenidos se colocaron en tubos de 0.6 mL y se almacenaron a -20°C.

5.2.3. Evaluación de la reactividad de los sueros anti-A β mediante ELISA.

La evaluación de los sueros se llevó a cabo utilizando una placa de microtitulación de 96 pozos, la cual se sensibilizó con los péptidos sintéticos A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42} en una concentración de 2 μ g/mL en buffer de carbonatos (pH 9.6), incubando la placa toda la noche a 4°C. Posteriormente, la placa se lavó 4 veces con PBS más Tween-20 al 0.2% (PBS-Tween 0.2%) y se bloqueó con leche descremada al 2% en PBS por 1 h a 37°C. Después de esto, la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.2%, agregando después los sueros obtenidos de cada uno de los ratones en una dilución 1:100 en PBS-leche descremada al 2% más Tritón X-100 al 0.2% (PBS/leche 2%/Tritón 0.2%) que fueron incubados 1 h a 37°C. Posteriormente, la placa se lavó 4 veces más con PBS-Tween 0.2% y a continuación, la placa se incubó con un anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón, acoplado a HRP (Invitrogen, USA) y diluido 1:5000 en PBS/leche 2%/Tritón 0.2%, por 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, la placa fue lavada como se describió anteriormente y se adicionaron 100 μ L por pozo de 2,2'-azino-bis- (3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), dejando incubar la placa de 10 a 15 minutos a 37°C. Finalmente se llevó a cabo la lectura de la densidad óptica (OD) de la placa a 405 nm usando un lector de microplacas Opsys MR (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA).

5.2.4. Determinación del título de anticuerpos de los sueros anti-A β mediante ELISA.

La titulación de los sueros se llevó a cabo utilizando una placa de microtitulación de 96 pozos, la cual se sensibilizó con los péptidos sintéticos A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42} en una concentración de 2 μ g/mL en buffer de carbonatos (pH 9.6) incubando la placa toda la noche a 4°C. Posteriormente, la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.2% y se bloqueó con leche descremada al 2% en PBS por 1 h a 37°C. Después de esto, la placa se lavó 4 veces más con PBS-Tween 0.2% y se agregaron los sueros obtenidos de cada uno de los ratones en diluciones sucesivas partiendo de 1:100 hasta 1:48000 para el caso de los sueros anti-A β ₁₋₄₂ y los sueros del grupo control, y 1:100 a 1:6000 para los sueros anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}, en PBS-leche descremada

al 2% más Tritón X-100 al 0.2% (PBS/leche 2%/Tritón 0.2%). Después de la incubación por 1 h a 37°C la placa se lavó 4 veces más con PBS-Tween 0.2% y a continuación, se incubó con un anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Invitrogen, USA) diluido 1:5000 en PBS/leche 2%/Tritón 0.2% por 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, la placa se lavó como se describió anteriormente y se adicionaron 100 µL por pozo de 2,2'-azino-bis- (3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), dejando incubar la placa de 10 a 15 minutos a 37°C. Finalmente, se llevó a cabo la lectura de la densidad óptica (OD) de la placa a 405 nm usando un lector de microplacas Opsy MR (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA).

5.2.5. Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas G presentes en los sueros anti-A β mediante ELISA.

Para esto, se llevaron a cabo los experimentos de ELISA como se describe en los apartados anteriores. Los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} fueron diluidos 1:10000, 1:800 y 1:400, respectivamente en PBS/BSA 2%/Tritón 0.2% y fueron incubados 1 h a 37°C. Posteriormente, la placa se lavó 4 veces más con PBS-Tween 0.2% y a continuación, se incubó con los siguientes anticuerpos diluidos 1:5000 en PBS/BSA 2%/Tritón 0.2%: anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Invitrogen, USA), anticuerpo de conejo anti-IgG1 de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA), anticuerpo de conejo anti-IgG2b de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA), anticuerpo de conejo anti-IgG2a de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) y anticuerpo de rata anti-IgG3 de ratón acoplado a AKP (BD, USA), los cuales se incubaron a 37°C por 1 h. Transcurrido el tiempo la placa se lavó como se describió anteriormente y se adicionaron 100 µL por pozo de 2,2'-azino-bis- (3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) excepto en los pozos designados a IgG3, a los cuales se les adicionó 100 µL de buffer de dietanolamina más 0.1 mg de p-nitrofenil fosfato por pozo. La placa se dejó incubar de 10 a 15 minutos a 37°C y se llevó a cabo la lectura de la densidad óptica (OD) de la placa a 405 nm y a 450 nm, esto último para determinar además la presencia de IgG3. Se utilizó un lector de microplacas Opsy MR (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA).

5.2.6. Evaluación de la reactividad de los sueros anti-A β mediante Western blot.

En un gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 12% NuPage (Invitrogen, USA) se cargó por carril 1 μ g de los péptidos oligomerizados A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42} para obtener 3 tripletes de los péptidos en el orden mencionado, además de un marcador de peso molecular de 3.5 a 260 kDa (Novex). El gel cargado se corrió a 150 V hasta que el buffer de carga alcanzó el límite inferior del gel. Después, los péptidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 1 h a 25 V. La membrana se bloqueó toda la noche a 4°C con 2% de leche descremada en PBS. Posteriormente la membrana se lavó con PBS-leche descremada 2%-Tween 0.2% cada 5 minutos en cuatro ocasiones. Después de este tiempo, la membrana se cortó en tripletes con los tres péptidos, cada triplete se incubó con un pool de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}, diluidos 1:1000, 1:400 y 1:400 respectivamente, en PBS/leche 2%/Tritón 0.2%, toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo la membrana se lavó 4 veces cada 5 minutos con PBS-Tween 0.2%, posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Invitrogen, USA) diluido 1:5000 en PBS/leche 2%/Tritón 0.2% por 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo la membrana se lavaó como se describió anteriormente. Finalmente la placa se reveló con el kit de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA).

6. Resultados.

6.1. Evaluación de la reactividad de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} mediante ELISA.

Según el protocolo de inmunización, cada uno de los ratones de la cepa BALBc/AnN se sangró tres o cuatro días después de cada inmunización a partir de la segunda, para evaluar la producción de anticuerpos anti-A β . Cada suero recolectado fue analizado por ELISA para evaluar su capacidad de reconocer al péptido correspondiente: A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} o A β _{pE11-42}.

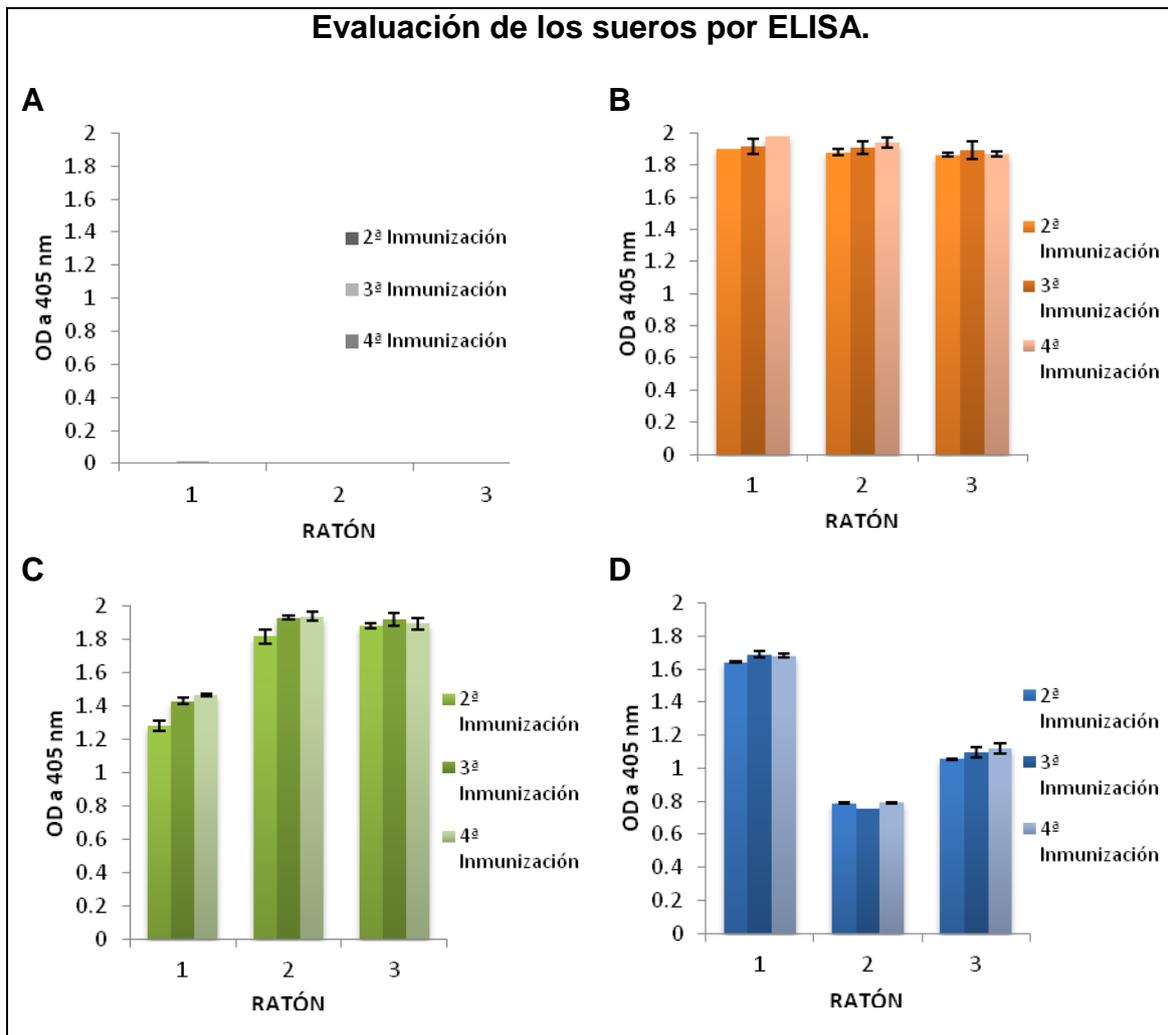


Figura 5. Reactividad de los sueros de ratones de la cepa BALBc/AnN inmunizados con A β : **A** grupo control, AF; **B** A β ₁₋₄₂ más AF; **C** A β _{pE3-42} más AF; **D** A β _{pE11-42} más AF. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. AF: adyuvante de Freund.

En el panel A de la figura 5 se observa la ausencia de reactividad del suero del grupo control frente al péptido A β en cada una de las administraciones

realizadas; la capacidad de todos los sueros de los otros tres grupos para reconocer a su antígeno a partir de la segunda inmunización se demuestra en los paneles B, C y D de la figura 5.

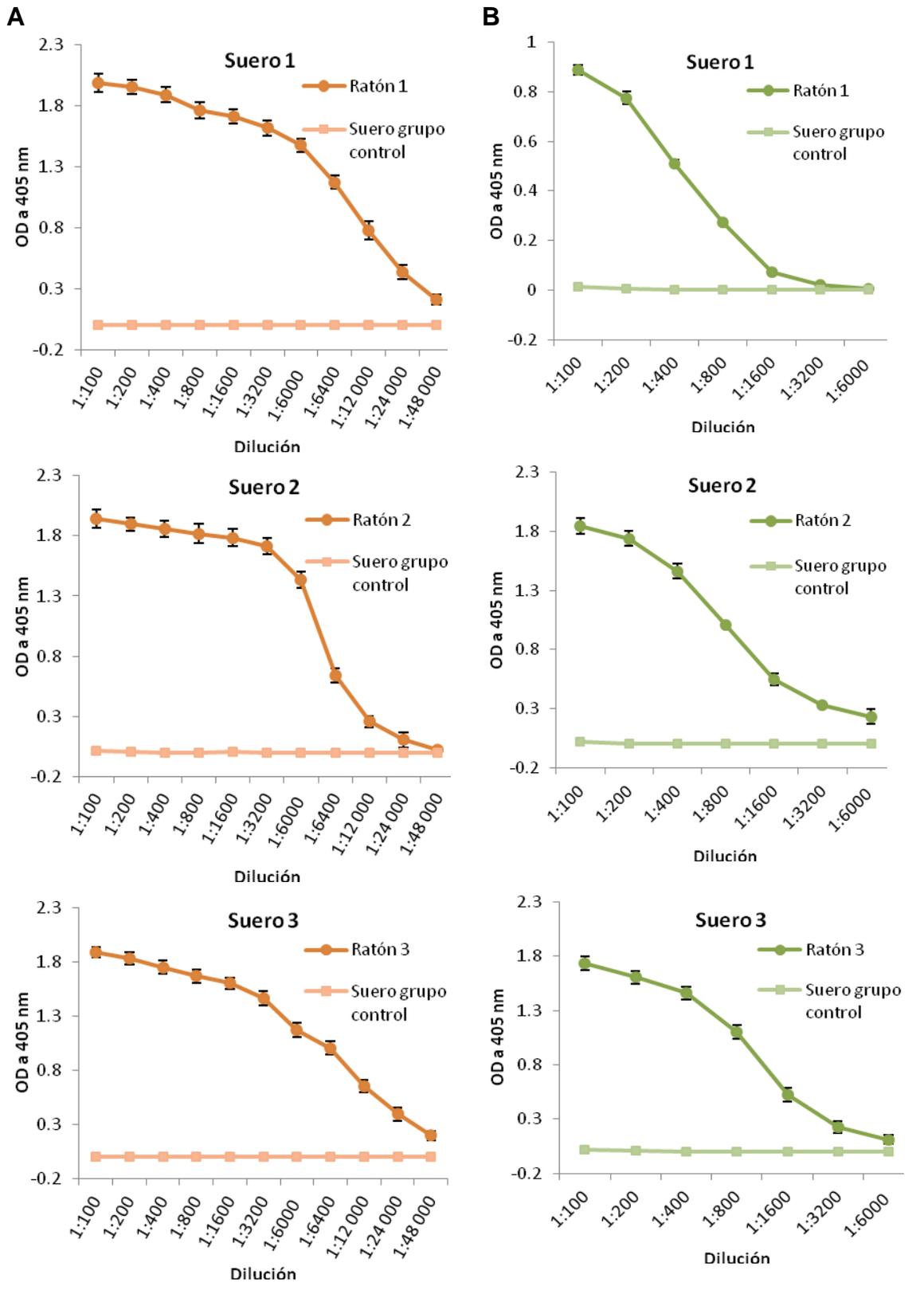
6.2. Determinación del título de anticuerpos de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}.

Al finalizar el protocolo de inmunización, tres días después de la última administración, los ratones fueron sangrados a blanco y el suero de cada uno de estos fue separado y utilizado a partir de ese momento para llevar a cabo las determinaciones posteriores.

Una vez que fue demostrado por ELISA que los sueros fueron capaces de reconocer a su antígeno, se llevó a cabo la titulación de los mismos.

En la figura 6 se presentan las curvas de titulación correspondientes a los sueros anti-A β . Los sueros del grupo control, administrado solo con adyuvante, fueron utilizados para determinar el título de anticuerpos de los sueros anti-A β .

Titulación de los sueros anti-A β por ELISA.



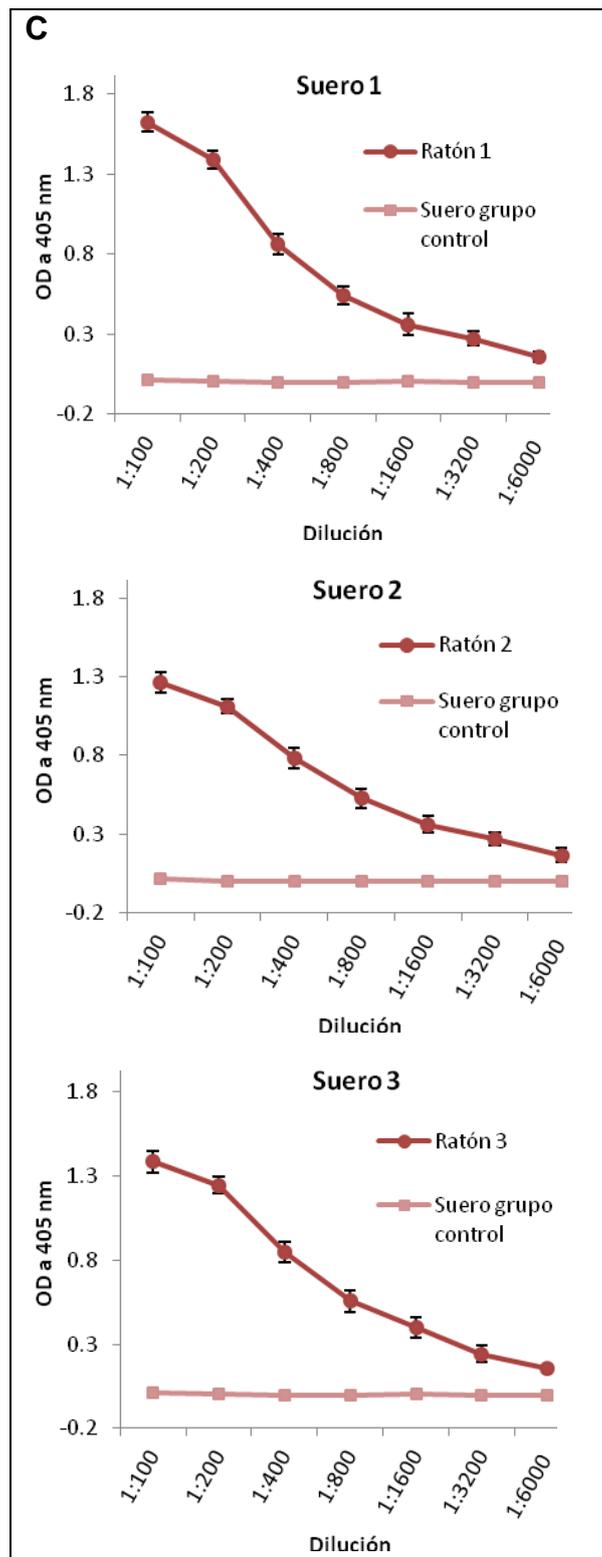


Figura 6. Curvas de titulación de los sueros inmunes anti-A β . **A** sueros anti-A β ₁₋₄₂ **B** sueros anti-A β _{pE3-42} **C** sueros anti-A β _{pE11-42}. Los valores de los sueros del grupo control se encuentran representados en la parte inferior de todas las gráficas. Se presentan los resultados de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

La tabla 1 muestra el título de anticuerpos anti-A β determinados para cada uno de los ratones. El título de anticuerpos representa la dilución en donde se observó una diferencia aproximada de 0.2 unidades de densidad óptica (OD) a 405 nm con respecto al suero control correspondiente.

Tabla 1. Título de anticuerpos de los sueros inmunes anti-A β *.

Ratón	anti-A β ₁₋₄₂	anti-A β _{pE3-42}	anti-A β _{pE11-42}
1	1:48000	1:1200	1:3200
2	1:12000	1:6000	1:3200
3	1:48000	1:3200	1:3200

*Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

6.3. Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas G presentes en los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42}.

Posteriormente, para continuar con la evaluación de los anticuerpos anti-A β obtenidos, se llevó a cabo la determinación de las subclases de inmunoglobulinas presentes en el pool constituido por los tres sueros de cada grupo experimental mediante ELISA. La figura 7 muestra los resultados obtenidos de los experimentos realizados y se observa que en los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} se encuentran IgG1 e IgG2b. Como puede apreciarse en esta gráfica, los valores de densidad óptica de las subclases de inmunoglobulinas IgG2a e IgG3 son despreciables con respecto a las demás.

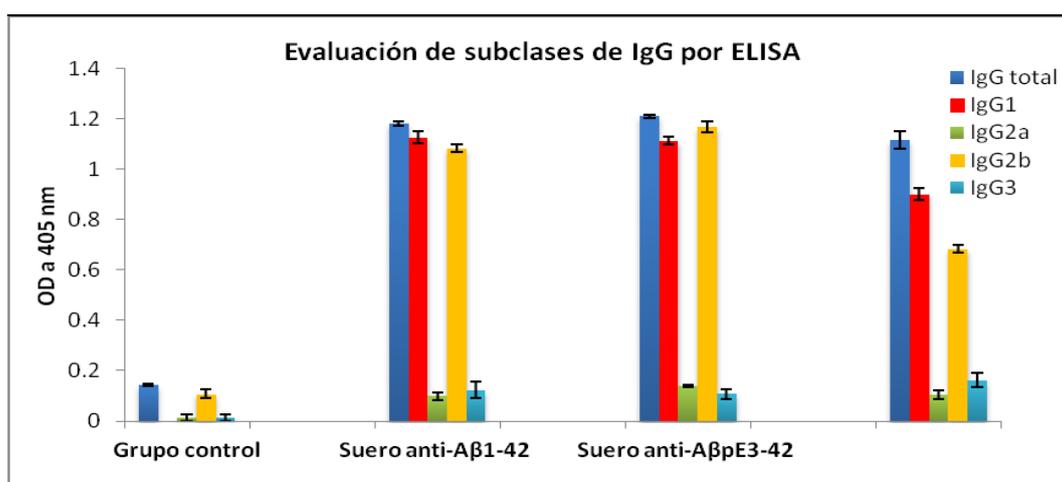
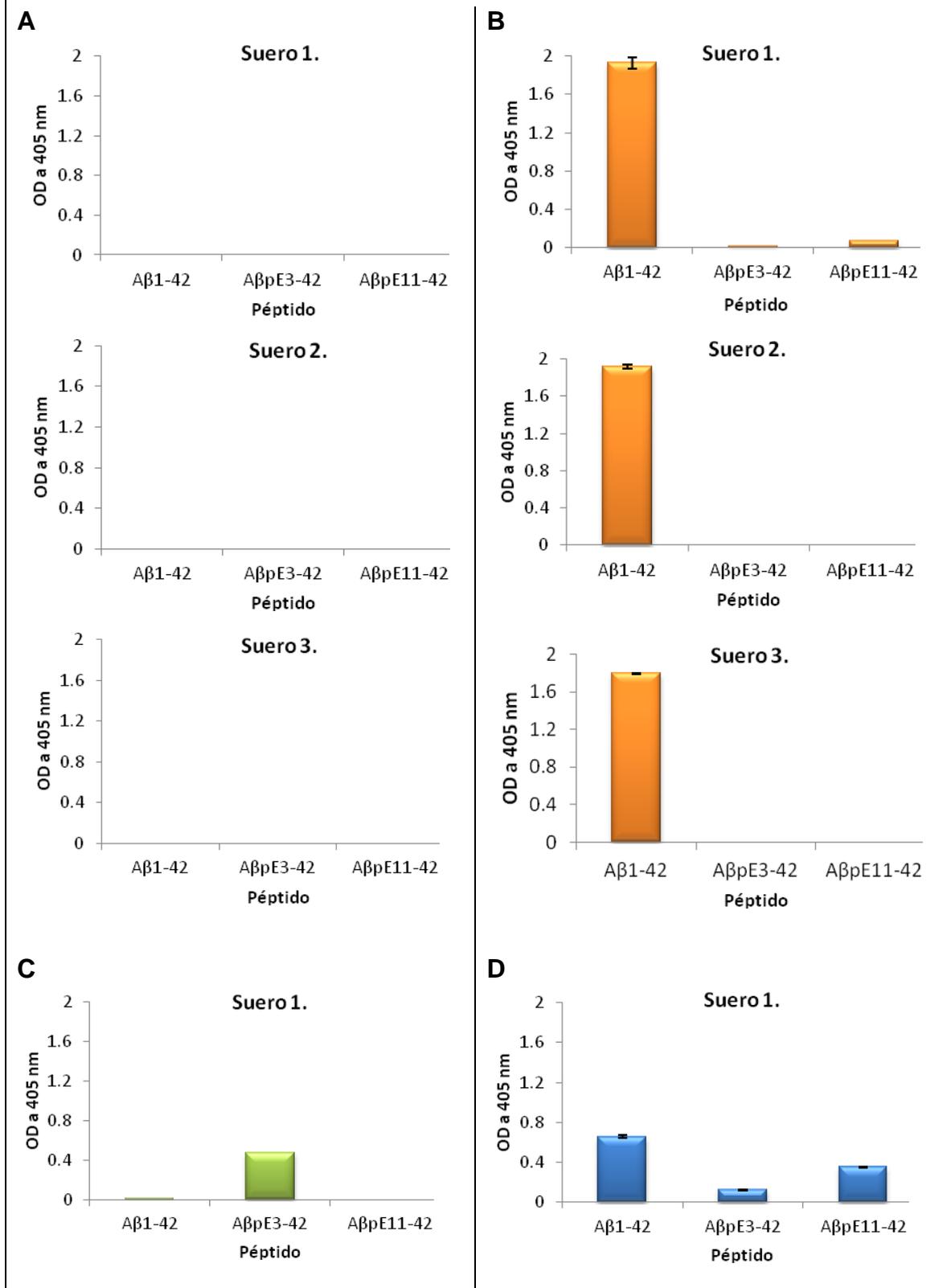


Figura 7. Evaluación de subclases de IgG presentes en los sueros anti-A β . Como control se utilizó el pool del suero de los ratones a los que se administró solo el adyuvante. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.4. Evaluación de la reactividad cruzada de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} mediante ELISA.

Una vez que se determinó que los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} fueron capaces de reconocer al antígeno correspondiente, se procedió a determinar si estos eran capaces de reconocer a las otras dos variantes del péptido estudiadas. En un primer acercamiento, la evaluación de la reactividad de los sueros anti-A β frente a diferentes péptidos amiloides se llevó a cabo mediante ELISA. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 8, en la cual se observa que los sueros anti-A β ₁₋₄₂ fueron capaces de reconocer al péptido A β ₁₋₄₂, como ya había sido mostrado antes, sin embargo, no fueron capaces de reconocer a los péptidos A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42}. En cuanto a los sueros anti-A β _{pE3-42}, se encontró que estos reconocen solo al péptido A β _{pE3-42} y no se observa reactividad frente a los péptidos A β ₁₋₄₂ y A β _{pE11-42}. Finalmente, los sueros anti-A β _{pE11-42} presentaron reactividad frente a las tres especies del péptido amiloide, es decir A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} y A β _{pE11-42}. Como control fueron utilizados los sueros del grupo administrado con adyuvante, sin embargo en ningún caso presentaron reactividad frente a ninguno de los péptidos estudiados.

Evaluación de la reactividad cruzada.



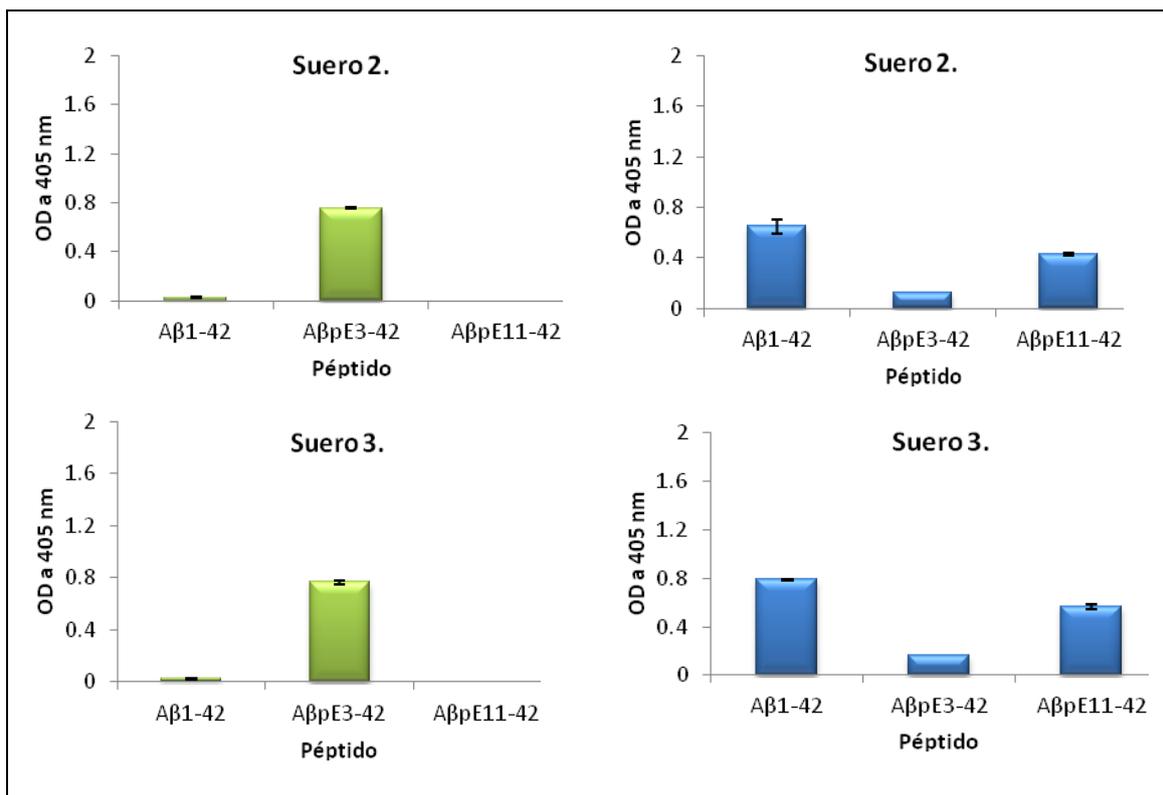


Figura 8. Reactividad de los sueros anti-A β frente a tres variantes del péptido A β . **A** sueros del grupo control **B** sueros de ratones inmunizados con el péptido A β ₁₋₄₂, **C** sueros de ratones inmunizados con A β _{pE3-42}, **D** sueros de ratones inmunizados con A β _{pE11-42}. Cada una de las barras representa el valor promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.5. Evaluación de la reactividad cruzada de los sueros anti-A β ₁₋₄₂, anti-A β _{pE3-42} y anti-A β _{pE11-42} mediante Western blot.

Una vez conocida la reactividad de los sueros anti-A β frente a las tres variantes del péptido amiloide mediante ELISA, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de los sueros inmunes para reconocer a determinados agregados del péptido amiloide. Para esto se realizaron tres Western blots, todos ellos con el pool de los sueros obtenidos de los tres ratones de cada grupo experimental. Los resultados se muestran en las figuras 9, 10 y 11.

En la figura 9 se observa la capacidad del suero anti-A β ₁₋₄₂ de reconocer a monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros del péptido A β ₁₋₄₂, así como oligómeros con un peso molecular entre los 50 y 260 kDa (carril 1), mientras que no se observó reactividad alguna frente a diferentes agregados de los

péptidos $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ (carril 2 y 3). Cabe mencionar que los monómeros del péptido de longitud completa $A\beta_{1-42}$ tienen un peso aproximado de 4.5 kDa.

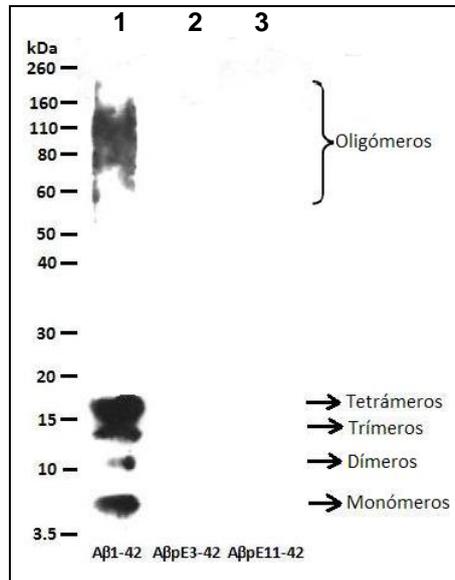


Figura 9. Evaluación de la reactividad del suero anti- $A\beta_{1-42}$ mediante Western blot. Los péptidos amiloides fueron cargados en el siguiente orden: carril 1 $\rightarrow A\beta_{1-42}$, carril 2 $\rightarrow A\beta_{pE3-42}$ y carril 3 $\rightarrow A\beta_{pE11-42}$.

Posteriormente, se realizó otro Western blot con el pool de los sueros anti- $A\beta_{pE3-42}$ el cual se muestra en la figura 10, donde se observa la capacidad de este suero de reconocer a monómeros del péptido $A\beta_{pE3-42}$ con un peso aproximado de 4.3 kDa, además de trímeros, tetrámeros, y oligómeros del mismo, estos últimos con un peso molecular entre los 35 y 160 kDa (carril 2). Sin embargo, los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ no son capaces de reconocer a diferentes agregados de los péptidos $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ (carril 1 y 3 respectivamente).

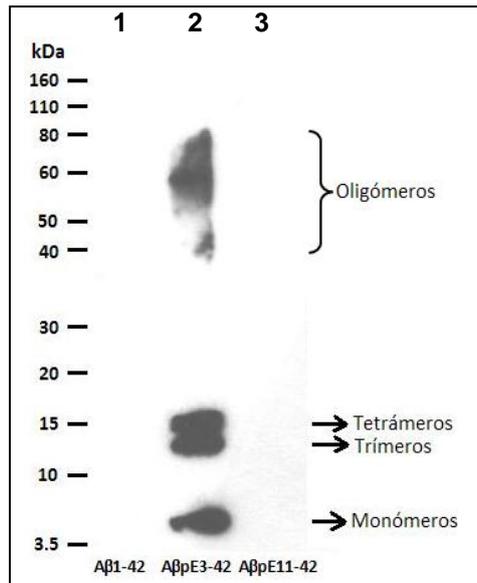


Figura 10. Evaluación de la reactividad del suero anti-A β _{pE3-42} mediante Western blot. Los péptidos amiloides fueron cargados en el siguiente orden: carril 1→A β ₁₋₄₂, carril 2→A β _{pE3-42} y carril 3→A β _{pE11-42}.

Finalmente, se realizó un Western blot con el pool de los sueros anti-A β _{pE11-42} para evaluar su capacidad de reconocer a diferentes agregados de los péptidos A β . Como puede apreciarse en la figura 11, el suero anti-A β _{pE11-42} es capaz de reconocer a monómeros de los tres péptidos A β ₁₋₄₂, A β _{pE11-42} y A β _{pE11-42} con un peso aproximado de 4.5, 4.3 y 3.3 kDa respectivamente, así como trímeros y tetrameros de estos mismos, no obstante, no es capaz de reconocer a los oligómeros de ninguna de las tres especies A β .

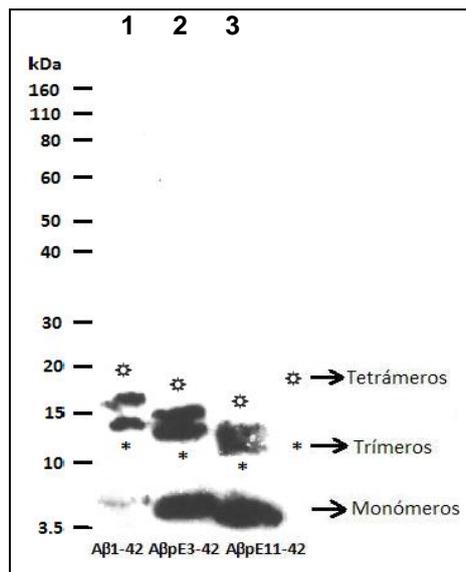


Figura 11. Evaluación de la reactividad del suero anti-A β _{pE11-42} mediante Western blot. Los péptidos amiloides fueron cargados en el siguiente orden: carril 1→A β ₁₋₄₂, carril 2→A β _{pE3-42} y carril 3→A β _{pE11-42}.

7. Discusión de resultados.

El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la respuesta inmune humoral inducida por las tres principales especies patogénicas del péptido beta amiloide $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ en ratones de la cepa BALBc/AnN, con la finalidad de generar información que pueda contribuir en el desarrollo de futuros protocolos de inmunización con el péptido $A\beta$ en ratones transgénicos para la enfermedad, así como en la identificación y caracterización de inmunógenos útiles en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Ya que el número de casos de la EA va en aumento cada año, múltiples estrategias se han propuesto para el tratamiento de este padecimiento y algunas otras se encuentran en desarrollo, todas con el propósito de prevenir, mejorar o detener el progreso de la enfermedad. Tomando en cuenta que el péptido beta-amiloide juega un papel crucial en la patología de la enfermedad, muchos de los esfuerzos enfocados al desarrollo de terapéuticos están centrados en la generación de métodos para reducir la carga amiloide. Uno de los acercamientos que han mostrado tener resultados exitosos en modelos animales y que ha sugerido tener beneficios en pruebas humanas, es la inmunoterapia contra el péptido $A\beta$ (Morgan, 2006).

En esta tesis, se demostró que la inmunización de ratones con tres variantes del péptido beta amiloide: $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ en presencia de adyuvante de Freund, induce la producción de anticuerpos anti- $A\beta$ capaces de reconocer al antígeno correspondiente. Se observó que la inmunización con el péptido $A\beta_{1-42}$ conduce a la generación del título de anticuerpos más alto en comparación con otros péptidos, por lo que se determinó que la especie más inmunogénica de las tres variantes estudiadas del péptido beta amiloide es el péptido $A\beta_{1-42}$. Adicionalmente, se demostró que los anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$ y anti- $A\beta_{pE3-42}$ son específicos y se unen únicamente a su antígeno correspondiente, mientras que los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$, además de reconocer a su antígeno, también tienen reacción cruzada con otras dos especies del péptido: $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{pE3-42}$.

En el protocolo de inmunización seguido en la realización de este trabajo, los tres péptidos amiloides fueron administrados en presencia de adyuvante de Freund, ya que se ha reportado que la inmunización de antígenos en presencia de este adyuvante potencia la activación y proliferación de linfocitos T CD4+. El adyuvante de Freund es uno de los componentes comúnmente utilizados en diversos protocolos de inmunización en modelos animales de experimentación para diversas enfermedades. Este adyuvante es utilizado en dos modalidades: el adyuvante completo de Freund (ACF) constituido esencialmente por queroseno, surfactantes y micobacterias inactivadas, y el adyuvante incompleto de Freund (AIF), cuya composición es básicamente la misma, pero sin la presencia de micobacterias (Billiau y Matthys, 2001).

El adyuvante de Freund forma una emulsión cuando se mezcla con el antígeno en medio acuoso, generando un medio viscoso en el que el antígeno queda embebido prolongando su liberación (Herbert, 1968). Se ha propuesto que tanto el ACF como el AIF actúan mediante dos mecanismos que son aceptados de manera general, el primero de ellos prolongando el tiempo de vida del antígeno en el lugar de la inyección y el segundo haciendo más efectivo el transporte del antígeno a los sitios críticos del sistema inmune, lo que resulta en la fuerte activación y proliferación de los linfocitos T CD4+ (Freund, 1956).

Se ha observado que las micobacterias presentes en el ACF son capaces de dirigir a los linfocitos T a asumir un perfil Th1, mientras que con el AIF la diferenciación de los linfocitos T tiende a asumir un perfil Th2 (Yip *et al.*, 1999). Las micobacterias presentes en el ACF inducen la expresión de citocinas tales como IFN- γ e IL-12, las cuales forman un circuito de retroalimentación que potencia la desviación hacia una respuesta de tipo Th1 de las células T CD4+. Por su parte el AIF induce la expresión de citocinas tales como el TNF- α , IL-4 e IL-6, las cuales están implicadas en la activación de linfocitos T y en la estimulación de la producción de anticuerpos (Matthys *et al.*, 2000; Mussener *et al.*, 1995; Mosmann y Coffman, 1989). Por esta razón, los protocolos de inmunización en presencia de adyuvante Freund (una primera inmunización en presencia de ACF y varias inmunizaciones subsecuentes en presencia de AIF) inducen generalmente una respuesta mixta Th1/Th2.

Nuestros resultados del análisis de subclases de inmunoglobulinas en los sueros de ratones inmunizados con los tres péptidos amiloides demuestran la predominancia de IgG1 e IgG2b, lo que indica una respuesta Th2. Estos resultados pueden atribuirse al péptido así como a la cepa de ratón utilizada en este trabajo. Hay estudios anteriores que demuestran que los ratones BALB/c presentan una tendencia a desarrollar una respuesta Th2 hacia otros inmunógenos, tales como helmintos o algunos otros alérgenos ambientales (Romagnani *et al.*, 1995; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002).

En la inmunoterapia de la EA lo deseable es la producción de anticuerpos específicos y la prevención de una respuesta pro-inflamatoria Th1. Varios grupos están desarrollando actualmente nuevos protocolos de inmunización para inducir anticuerpos y promover una respuesta Th2. Sin embargo, nosotros no consideramos importante seguir con la evaluación detallada de la respuesta Th1/Th2 en nuestros protocolos descritos, debido a que el adyuvante Freund no se puede aplicar a humanos.

Por otra parte, en este trabajo se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-A β de reconocer a tres variantes del péptido amiloide lo que podría ser de gran importancia en el desarrollo de nuevos inmunoterapeúticos para la EA.

Es importante mencionar que, en años recientes nuestro grupo de trabajo demostró que los anticuerpos anti-A β_{pE3-42} inducidos en conejos son capaces de reconocer de manera específica al péptido A β_{pE3-42} , mientras que los anticuerpos anti-A $\beta_{pE11-42}$ inducidos también en conejos, son capaces de reconocer a las tres especies patogénicas de péptido A β estudiadas en este trabajo. Por esta razón se decidió evaluar de igual manera la especificidad de anticuerpos inducidos por estos péptidos en ratones y determinar si existe un comportamiento parecido al observado en conejos (Acero *et al.*, 2009; Pérez-Garmendia *et al.*, 2010).

De manera interesante, se determinó por ELISA y Western blot que los anticuerpos anti-A β_{1-42} reconocen de manera específica a diferentes agregados del péptido A β_{1-42} . Estas observaciones están de acuerdo con los resultados reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo, así como por otros que

identificaron el epítipo inmunodominante en la región amino-terminal del péptido (EFRH). En las especies amino-truncadas $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ este epítipo no se encuentra presente, y esto puede explicar porque los anticuerpos de ratón anti- $A\beta_{1-42}$ son incapaces de reconocer a ambas especies. Sin embargo, los anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$ inducidos en conejos se unen también al péptido $A\beta_{pE3-42}$, y estas diferencias entre anticuerpos de ratón y de conejo ameritan más estudios. La identificación de epítipos mediante bibliotecas combinatorias puede ser uno de los acercamientos futuros.

Por otro lado, se determinó que los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ reconocen de manera específica al péptido $A\beta_{pE3-42}$, comportamiento que es similar al previamente observado con los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ inducidos en conejos (Acero *et al.*, 2009). Este reconocimiento específico puede ser consecuencia de la presencia de un epítipo el cual no se encuentra presente en las especies $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$. En el 2009, nuestro grupo de trabajo identificó un epítipo inmunodominante en la región amino-terminal de $A\beta_{pE3-42}$ y demostró que era reconocido por los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ inducidos en conejos pero no por los anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$ o anti- $A\beta_{pE11-42}$ (Acero *et al.*, 2009). Este epítipo podría ser el mismo en el caso de los anticuerpos inducidos en ratón, sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para confirmarlo.

Finalmente, se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ frente a las tres variantes del péptido y se determinó, que estos son capaces de reconocer a monómeros, trímeros y tetrámeros de las tres especies del péptido $A\beta$, sin embargo no reconocen a los oligómeros de alto peso molecular de ninguna de las tres especies. De manera similar en el 2010 nuestro equipo de trabajo reportó que los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ inducidos en conejos, son capaces de reconocer a los tres péptidos amiloides: $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$, con la diferencia de que los anticuerpos inducidos en conejos reconocen también a las formas oligoméricas de los tres péptidos (Pérez-Garmendia *et al.*, 2010). Con base en estas observaciones, se sugiere que es probable que las tres variantes del péptido compartan un epítipo entre sí, el cual es reconocido por los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ y que es probable que únicamente los anticuerpos inducidos en conejo sean capaces de reconocer algún epítipo conformacional en los oligómeros.

Es importante mencionar que en el trabajo de Pérez-Garmendia y colaboradores se identificaron a dos epítomos de células B dentro de la secuencia de $A\beta_{pE11-42}$, uno de ellos en la región amino-terminal y el segundo en la parte central del péptido (Pérez-Garmendia *et al.*, 2010). Los dos epitopos son compartidos por los tres péptidos, y esto puede explicar porque los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ son capaces de reconocer a las tres especies de $A\beta$.

La capacidad de los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ para reconocer a los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$, tres de las especies amiloides más importantes involucradas en patología de la EA, es una pieza clave en el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas más efectivas contra la enfermedad, ya que la administración de un solo inmunógeno ($A\beta_{pE11-42}$), o de los anticuerpos inducidos por el mismo, puede ser un acercamiento adecuado en la prevención de la formación y eliminación de agregados de varias especies amiloides.

La identificación reciente de los péptidos $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ como eficientes inmunógenos, nos proporciona mayores alternativas para el desarrollo de estrategias que nos auxilien en el tratamiento o prevención de la enfermedad, ya que inicialmente los esfuerzos estuvieron concentrados principalmente en el péptido de longitud completa, que si bien hemos visto constituye parte importante de los agregados amiloides, no significa el total del $A\beta$ acumulado en cerebro de pacientes con EA. Es por esto que es importante tomar en cuenta a las especies amino-truncadas/modificadas tales como $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$, como blancos terapéuticos más eficientes en el tratamiento de la enfermedad y más aún, en el diagnóstico y/o prevención de la misma. No obstante, debe recordarse que esta enfermedad es un padecimiento multifactorial, el cual podría requerir del uso simultáneo de varios agentes terapéuticos para prevenir, mejorar o detener la enfermedad.

Los resultados de este trabajo pueden ser útiles en el desarrollo de futuros protocolos de inmunización activa en ratones transgénicos, en los cuales se están llevando a cabo gran parte de los estudios pre-clínicos para la enfermedad; además podrían contribuir al desarrollo de agentes diagnósticos y de compuestos inmunoterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad, los

cuales actúen no solo contra la formación o eliminación de agregados del péptido de longitud completa $A\beta_{1-42}$, sino además contra agregados de los péptidos amino-truncados/modificados tales como $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$, que han mostrado ser dos de las especies de gran relevancia en el desarrollo de la patología de la EA.

8. Conclusiones.

- Los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$ son capaces de inducir la producción de anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$, anti- $A\beta_{pE3-42}$ y anti- $A\beta_{pE11-42}$ en ratones de la cepa BALBc/AnN.
- En ratones, el péptido $A\beta_{1-42}$ es el más inmunogénico de las tres especies amiloides.
- Los anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$ reconocen de manera específica al monómero y a diferentes agregados del péptido $A\beta_{1-42}$.
- Los anticuerpos anti- $A\beta_{pE3-42}$ reconocen de manera específica al monómero y a diferentes agregados del péptido $A\beta_{pE3-42}$.
- Los anticuerpos anti- $A\beta_{pE11-42}$ son capaces de reconocer a los monómeros así como a diferentes agregados de las tres especies del péptido amiloide: $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{pE3-42}$ y $A\beta_{pE11-42}$.

9. Perspectivas.

Debido a que cada año los casos de la Enfermedad de Alzheimer aumentan alrededor del mundo, se están realizando múltiples esfuerzos en el desarrollo de terapéuticos para la enfermedad, muchos de estos enfocados al desarrollo de protocolos de inmunización que ofrezcan un tratamiento protector sin efectos secundarios

Durante la realización de éste trabajo se llevó a cabo la evaluación de la inmunogenicidad de tres especies patológicas del péptido beta amiloide, que como se ha visto, son de gran importancia en la Enfermedad de Alzheimer. Los resultados de este proyecto son importantes en el desarrollo de inmunógenos útiles para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, y es por esto, que se ha planteado que sería conveniente examinar la capacidad de estos anticuerpos de reconocer a los agregados del péptido amiloide presentes en el cerebro de pacientes con EA y posteriormente eliminarlos.

Uno de los enfoques que está siendo considerado de manera importante en el abatimiento de la enfermedad, es el diagnóstico temprano de esta, el cual pueda ayudar a que los síntomas clínicos de la enfermedad se retrasen, y en el mejor de los casos, se logre prevenir o frenar el progreso del padecimiento. Es por esto que es importante identificar y caracterizar herramientas que nos ayuden a obtener un diagnóstico temprano y certero de la enfermedad, campo en el que, como ha sido discutido antes, los anticuerpos anti-A β_{pE3-42} podrían tener un futuro prometedor.

10. Referencias.

- Acero G, Manoutcharian K, Vasilevko V, Munguia M.E, Govezensky T, Coronas G, Luz-Madrigal A, Cribbs D.H, and Gevorkian G. Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate modified A β -specific antibodies produced in rabbits. *J Neuroimmunol.* 2009; 213(1-2): 39–46.
- Alzheimer A: Ubereine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 1907, 64:146-148.
- Alzheimer's Disease Medications Fact Sheet. ADEAR [en línea] septiembre 2011[fecha de acceso: 17 de julio del 2012] URL disponible en: <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/medicationsfs.htm>.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet* 2011; 377: 1019–31.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med.* 2000; 6, 916–919.
- Bertram L, Tanzi RE: Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9(10):768-778.
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE: The genetics of Alzheimer's disease: back to the future. *Neuron* 2010, 68:270-281.
- Billiau A y Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune disease. *Journal of Leukoc. Biol.* 2001; 70: 849-860.
- Boutajangout A., Ingadottir J., Davies P. and Sigurdsson E. M. Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *J Neurochem*, 2011; 118(4):658-67.
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, et al. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 1986; 65:351-5.

- Braak H y Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82:239-59.
- Brody D.L. y Holtzman D.M. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008; 31, 175-193.
- Bush A.I, Beyreuther K. y Masters C.L. The beta A4 amyloid protein precursor in human circulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 695, 175-182.
- Castellani R.J; Lee H.G; Zhu X; Perry G; Smith M.A. Alzheimer's disease pathology as a host response. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008, 67, 523-531.
- Castellani RJ, Rolston RK and Smith MA. Alzheimer's Disease. *Dis Mon* 2010; 56: 484–54.
- Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Bockaert J, Giannoni P. Alzheimer culprits: Cellular crossroads and interplay. *Cellular Signalling.* 2012.
- Cynis H, Rahfeld J. U, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, Demuth H. U, y Schilling S. J. Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery *Mol. Biol.* 2008; 379, 966–980
- D'Arrigo C, Tabaton M, Perico, A. N-terminal truncated pyroglutamil β amyloid peptide A β py3-42 show faster aggregation kinetics than the full-length A β 1-42. *Biopolymers* 2009; 91, 861-873.
- Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, et al. Non overlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 2002; 59: 398–407.
- Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B. Clinical trials in Alzheimer's disease: immunotherapy approaches. *J Neurochem.* 2012; 120 Suppl 1:186-93.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; 98, 8850–8855.
- Dodel R, Neff F, Noelker C, Pul R, Du Y, Bacher M. and Oertel W. Intravenous immunoglobulins as a treatment for Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *Drugs* 2010; 70, 513-528.

- Fischer, W. H., y Spiess, J. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84, 3628–3632.
- Frenkel D, Solomon B y Benhar I, Modulation of Alzheimer's β -amyloid neurotoxicity by site-directed single chain antibody, *J. Neuroimmunol.* 2000; 106, 23–31.
- Frenkel D y Solomon B. Filamentous phage as vector mediated antibody delivery to the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99, 5675–5679.
- Freund, J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Adv. Tuberc. Res.* 1956; 7, 130–148.
- Goedert M, Spillantini MG: A century of Alzheimer's disease. *Science* 2006; 314:777-781.
- Gouras G. K., Almeida C. G. y Takahashi R. H. Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2005; 26, 1235–1244.
- Gustaw K.A, Garrett M.R, Lee H.G, Castellani R.J, Zagorski M.G, Prakasam, A.; Siedlak, S.L.; Zhu, X.; Perry, G.; Petersen, R.B.; Friedland, R.P.; Smith, M.A. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *J. Neurochem.* 2008, 106, 1350-1356.
- Hardy J y Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002, 297:353-356.
- Hartlage-Rübsamen M, Staffa K, Waniek A, Wermann M, Hoffmann T, Cynis H, Schilling S, Demuth H. U, y Rossner S. Developmental expression and subcellular localization of glutaminyl cyclase in mouse brain *Int. J. Dev. Neurosci.* 2009; 27, 825–835.
- Hartlage-Rübsamen M, Morawski M, Waniek M, Jäger C, Zeitschel U, Koch B, Cynis H, Schilling R, Schliebs R, Demuth H, Roßner S. Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-A β deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 705-719.

- Harvey R.J, Skelton-Robinson M, y Rossor M.N. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2003; 74, 1206–1209.
- He W y Barrow CJ. The A β 3-Pyroglutamyl and 11-Pyroglutamyl peptides Found in senile plaque have greater β -Sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A β . *Biochemistry* 1999; 38: 10871-7.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA: Alzheimer's disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 2003, 60:1119-1122.
- Herbert W. J. The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. *Immunology* 1968; 14, 301–318.
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM: Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 2011, 3:77sr71.
- Jack C. R, Jr., Knopman D. S, Jagust W. J, Shaw L. M, Aisen P. S, Weiner M. W, Petersen R. C y Trojanowski J. Q. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010; 9, 119-128.
- Jarrett JT, Berger EP y Lansbury PT Jr. The carboxyl terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693–7.
- Jawhar S, Wirths O, and Bayer TA. Pyroglutamate Amyloid- β (A β): A Hatchet Man in Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011; 286, 38825–38832.
- Johnson RD, Schauerte JA, Wisser KC, Gafni A, Steel DG (2011) Direct Observation of Single Amyloid- β (1-40) Oligomers on Live Cells: Binding and Growth at Physiological Concentrations. *PLoS ONE* 2011; 6: e23970.
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc J.F, Roberts E.A, Goldstein L.S. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 2001, 414, 643-648.
- Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003, 300:486-489.

- Kim EJ, Cho SS, Jeong Y, Park KC, Kang SJ, Kang E, Kim SE, Lee KH, and Na DL. Glucose metabolism in early onset versus late onset Alzheimer's disease: an SPM analysis of 120 patients. *Brain* 2005; 128, 1790–1801.
- Kim S.H, Seo S.W, Yoon D.S, Chin J, Lee B.H, Cheong H.K, Han S. H y Na D.L. Comparison of neuropsychological and FDG-PET findings between early versus late onset mild cognitive impairment: a five year longitudinal study. *Dement.Geriatr.Cogn.Disord.* 2010; 29, 213–223.
- Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ. Amyloid β protein immunotherapy neutralizes A β oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nature Med.* 2005; 11, 556–561.
- Koffie R, Hyman B, Spires-Jones T. Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:63.
- Kontush A, Berndt C, Weber W, Akopyan V, Arlt S, Schippling S, Beisiegel U. Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 119-128.
- Lansbury PT, Jr. In pursuit of the molecular structure of amyloid plaque: new technology provides unexpected and critical information. *Biochemistry* 1992, 31:6865-6870.
- Lansbury PT, Jr.: Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:3342-3344.
- Lantos P.L, Luthert P.J, Hanger D, Anderton B.H, Mullan M, y Rossor M.N. Familial Alzheimer's disease with the amyloid precursor protein position 717 mutation and sporadic Alzheimer's disease have the same cytoskeletal pathology. *Neurosci. Lett.* 1992; 137, 221–224.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; 35 1505–1535.
- Magga J, Puli L, Pihlaja R, Kanninen K, Neulamaa S, Malm T, Hartig W, Grosche J, Goldsteins G, Tanila H, Koistinaho J. y Koistinaho M. Human intravenous immunoglobulin provides protection against Abeta toxicity by

multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2010; 7, 90.

- Mann U, Mohr E, Gearing M y Chase T. Heterogeneity in Alzheimer's disease: progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles. *J. Neurol.Neurosurg.Psychiatr.* 1992; 55, 956–959.

- Manzoni C, Colombo L, Bigini P, Diana V, Cagnotto A, et al. The Molecular Assembly of Amyloid A β Controls Its Neurotoxicity and Binding to Cellular Proteins. *PLoS ONE* 2011; 6: e24909.

- Matthys P, Vermeire K, Heremans H, Billiau A. The protective effect of IFN- γ in experimental autoimmune diseases: a central role of mycobacterial adjuvant-induced myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68, 447– 454.

- Medeiros R, Chabrier M y LaFerla F. Elucidating the Triggers, Progression, and Effects of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012; 30, 1–16.

- Miklossy J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer's disease. *Expert reviews in molecular medicine.* 2011; Vol. 13; e30.

- Moore B, Chakrabarty P, Levites Y, Kukar T, Baine AM, Moroni T, Ladd T, Das P, Dickson D y Golde T. Overlapping profiles of A β peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimer's Research & Therapy* 2012, 4:18.

- Morgan D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006; 9 425–432.

- Morgan, D. Immunotherapy for Alzheimer disease. *J. Intern. Med.* 2011; 269, 54-63.

- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe D.J. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 17082-17086.

- Mosmann T. R y Coffman R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7, 145–173.

- Mussener A, Klareskog L, Lorentzen J. C, Kleinau S. TNF- α dominates cytokine mRNA expression in lymphoid tissues of rats developing collagen- and oil-induced arthritis. *Scand. J. Immunol.* 1995; 42, 128–134.

- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000; 283:1571–1577.
- Oddo S, Billings L, Kesslak J. P, Cribbs D. H. & LaFerla F. M. A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 2004; 43, 321–332.
- Palop JJ y Mucke L: Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010, 13:812-818.
- Perez-Garmendia R, Ibarra-Bracamontes V, Vasilevko V, Luna-Muñoz J, Mena R, Govezensky T, Acero G, Manoutcharian K, Cribbs D y Gevorkian G. Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: relevance for immunotherapy. *J Neuroimmunol.* 2010 15; 229(1-2).
- Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson M. K., Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B y Blennow K. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2010; 120, 185–193.
- Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EM, West RJ, Barber PC, Butler AC: Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1998, 43:380-383.
- Querfurth HW y LaFerla FM. Alzheimer's Disease: Mechanisms of Disease. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362: 329-44.
- Reichert JM. Monoclonal Antibodies as Innovative Therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2008; 9: 423-30.
- Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, y Terrazas L. Chronic Helminth Infection Induces Alternatively Activated Macrophages Expressing High Levels of CCR5 with Low Interleukin-12 Production and Th2 Biasing Ability. *Infection and Immunity*, 2002; Vol. 70, 7; 3656–3664.
- Rogaeva E, The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease, *Neuromolecular Med* 2002; 2, 1–10.

- Rogaeva E, Kawarai T y St George-Hyslop P. Genetic complexity of Alzheimer's disease: Successes and challenges. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006; 9 381–387.
- Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G. CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; Volume 57, 726-730.
- Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996; 47: 387–400.
- Roses AD, Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. The tip of the susceptibility iceberg, *Ann N Y Acad Sci* 1998; 855, 738–743.
- Russo C, Schettini G, Saido T. C, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, and Teller J. K. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 405, 531–532.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and Differential Deposition of Distinct Beta Amyloid Peptide Species, A β N3(pE), in Senile Plaques. *Neuron* 1995; 14: 457-66.
- Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer's disease. *Neurology* 2009; 73: 2061–70.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400:173–177.
- Schilling S, Niestroj A. J, Rahfeld J. U, Hoffmann T, Wermann M, Zunkel K, Wasternack C, y Demuth H. U. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 49773–49779.
- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth H. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters* 2004; 563: 191-6.

- Schmechel D.E, Saunders A.M, Strittmatter W.J, Crain B.J, Hulette C.M, Joo S.H, Pericak-Vance M.A, Goldgaber D y Roses A.D, Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90, 9649–9653.
- Scott Miners J, Morris S, Love S y Gavin Kehoe P. Accumulation of Insoluble Amyloid- β in Down's Syndrome is Associated with Increased BACE-1 and Neprilysin Activities. *Journal of Alzheimer's Disease* 2011; 23, 101–108.
- Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, et al. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry* 2003; 85: 1581–91.
- Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski M. C, Roques B y Checler F. Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 2009; 109, 248–256.
- Siemers E. R., Friedrich S., Dean R. A., Gonzales C. R., Farlow M. R., Paul S. M. y Demattos R. B. Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol* 2010; 33, 67-73.
- Sigurdsson E. M. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J Alzheimers Dis* 2008; 15, 157-168.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D y Hanan-Aharon E. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1997; 4109–4112.
- Solomon B. Alzheimer's disease immunotherapy: From in vitro amyloid immunomodulation to in vivo vaccination. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006; 9, 433–438.
- Storkebaum E, Quaegebeur A, Vikkula M y Carmeliet P. Cerebrovascular disorders: molecular insights and therapeutic opportunities. *Nature Neuroscience.* 2011; 14, 1390-1397.

- A.Tandon, E.A. Rogaeva, M. Mullan y P. St George-Hyslop, Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta amyloid and the presenilins, *Current Opinion in Neurology* 2000; 13, 377–384.
- Tanzi RE y Bertram L: Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005, 120:545-555.
- Vetrivel K.S, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 2006, 66, S69-73.
- Walsh JS, Welch HG, Larson EB. Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Ann Intern Med* 1990; 113, 429-434.
- Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS: The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 1996, 271:31894-31902.
- Weiner HL y Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease *Nat Rev Immunology* 2006; 6: 404-16.
- Whirts O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen P.J, y Milthaupt G. Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J. Neural. Transm.* 2010; 117, 86-96.
- Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. Microglial activation facilitates A β plaque removal following intracranial anti-A β antibody administration. *Neurobiol. Dis.* 2004; 15, 11–20.
- Wilquet V, De Strooper B. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004, 14, 582-588.
- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1976; 27:173-81.
- Wisniewski HM, Bancher C, Barcikowska M, et al. Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1989; 78:337-47.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer E. G. y McGeer P. L. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res.* 1999; 830, 226–236.
- Yip H. C, Karulin A. Y, Tary-Lehman M, Hesse M. D, Radeke H, Heeger P. S, Trezza R. P, Heinzl F. P, Forsthuber T, Lehmann P. V. Adjuvant-guided

type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J. Immunol.* 1999; 162, 3942– 3949.

- Younkin SG: The role of Abeta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 1998, 92:289-292.
- Youssef I, Florent-Bechard S, malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier J.-L, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T. N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol. Aging* 2007; 29, 1319-1333.
- Zou K, Gong J.S, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci.* 2002, 22, 4833-4841.
- <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html> última modificación 3 de agosto del 2010.
- www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/symptoms [fecha de acceso: 12 de julio del 2012].