



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE
EPÍTOPOS/MIMOTOPOS DEL PEPTIDO BETA
AMILOÍDE PIROGLUTAMADO 11-42 PARA LA
INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

ROXANNA PÉREZ GARMENDIA



Tutor: Tutor: DRA. GOAR GEVORGYAN MARKOSIAN

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Gokar Gevorgyan Markosian en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Gokar Gevorgyan Markosian	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. José Raúl Mena y del Dr. José Luis Luna Muñoz, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de inmunohistoquímica.

Se reconoce la asesoría en el análisis estadístico de la Dra. Tzipe Govezesky.

Se reconoce la asesoría técnica del Biól. Exp. Gonzalo Acero en todos los experimentos realizados en este trabajo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (358081) y PAEP-UNAM (IN200907, IN209610-3).

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Edda Lydia Sciutto Conde	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Angélica Zepeda Rivera	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Gladis del Carmen Frago González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
▪ MANIFESTACIONES CLINICAS.....	4
▪ EPIDEMIOLOGÍA.....	5
▪ PATOLOGÍA MACROSCÓPICA.....	6
▪ PATOLOGÍA MICROSCÓPICA.....	7
▪ MARAÑAS NEUROFIBRILARES.....	7
▪ PLACAS NEURITICAS.....	8.
▪ BETA AMILOIDE.....	10
▪ BETA AMILOIDE INTRACELULAR.....	15
▪ HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.....	17
▪ OLIGÓMEROS.....	21
▪ ESPECIES AMINO TRUNCADAS.....	23
▪ PÉPTIDO BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	25
▪ TRATAMIENTO.....	27
▪ TRATAMIENTOS SINTOMÁTICOS.....	28.
▪ TRATAMIENTOS DE PROGRESIÓN.....	28.
▪ INMUNOTERAPIA.....	31
▪ MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA.....	33
▪ INMUNOTERAPIA ACTIVA.....	35
▪ INMUNOTERAPIA PASIVA.....	37
▪ INMUNOTERAPIA ACTIVA VS PASIVA.....	39

▪ ENSAYOS CLÍNICOS ACTUALES.....	40
▪ MAPEO DE EPÍTOPOS.....	42
▪ DESCUBRIMIENTO DE EPÍTOPOS.....	44
▪ VACUNAS DE EPÍTOPO.....	45
▪ VENTAJAS DE LAS VACUNAS DE EPÍTOPOS.....	45
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	47
OBJETIVO-----	47
OBJETIVO PARTICULAR-----	48
METODOLOGÍA-----	49
▪ TITULACIÓN DEL SUERO MEDIANTE ELISA.....	49
▪ PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DEL SUERO ANTI BA P (E) 11-42.....	50
▪ TITULACIÓN PURIFICADO MEDIANTE ELISA.....	50
▪ ELISA DE COMPETENCIA.....	51
▪ WESTERN BLOT.....	52
▪ DOT BLOT.....	52
▪ XTT.....	53
▪ MAPEO DE EPÍTOPOS.....	53
▪ AMPLIFICACIÓN.....	53
▪ PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO.....	54
▪ TITULACIÓN DEL ELUIDO.....	54
▪ EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA.....	55
▪ OBTENCIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA.....	55
▪ ELISA DE COMPETENCIA.....	56

▪ WESTERN BLOT DE COMPETENCIA.....	56
------------------------------------	----

RESULTADOS-----57

▪ EVALUACIÓN DEL SUERO ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	57
▪ PURIFICACIÓN DE LAS IMUOGLOBULINAS DEL SUERO ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	62
▪ EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	63
▪ ELISA DE COMPETENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	65
▪ EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE AGREGACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BETA AMILOIDE 1-42, P(E) 3-42 Y P(E)11-42 POR LOS ANTICUERPOS ANTI BETA AMILOIDE P(E)11-42.....	66
▪ DOT BLOT.....	67
▪ RECONOCIMIENTO DE LOS DEPOSITOS DE BETA AMILOIDE EN CEREBRO HUMANO POR LOS ANTICUERPOS ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	70
▪ ENSAYO DE NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR OLIGÓMEROS DE BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	73
▪ ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE P (E) 11-42 POR LOS ANTICUERPOS ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	74
▪ BIOPANNING.....	75
▪ EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES CON EL SUERO ANTI BETA AMILOIDE P (E) 11-42.....	77
▪ SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS BIOSELECCIONADAS.....	77
▪ ELISA DE COMPETENCIA.....	80
▪ WESTERN BLOT DE COMPETENCIA.....	81

DISCUSIÓN-----83
CONCLUSIONES-----90
REFERENCIAS-----91
ARTICULO PUBLICADO-----103

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
β A	Beta amiloide
APP	Proteína precursora del amiloide
PS	Presenilina
kDa	kilodaltones
fMoles	fento moles
APOE	Apolipoproteína E
AICD	Dominio citoplásmico carboxilo terminal de la Proteína precursora del amiloide
ACE	Enzima convertidora de la angiotensina
LRP1	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
NMDA	N-metil-D-aspartato
RAGE	Receptor para los productos de glicosilación avanzados
BACE	Beta secretasa
DHA	Ácido Docosahexonoico
CAA	Angiopatía amiloide cerebral
dBAC	N ⁶ , 2'-O-dibutiriladenosina 3',5-monofosfato cíclico.
DMSO	Dimetil sulfóxido anhídrido
dPBS	Buffer salino de fosfatos modificado por Dulbecco
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
IgG	Inmunoglobulina
pE	Piroglutamato
SFB	Suero bovino fetal
TBS	Tris buffer salino
WB	Western Blot

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores, es un trastorno neurodegenerativo y progresivo caracterizado por la pérdida de memoria, aprendizaje, percepción espacio temporal, pérdida de la autovalía y funcionalidad.

En 1907 Alois Alzheimer describió dos alteraciones patológicas en el cerebro de una paciente con demencia. Las dos lesiones son características de la EA y en la actualidad siguen siendo examinadas postmortem para su diagnóstico certero de ésta. La primera es la presencia de depósitos extracelulares en regiones cerebrales específicas, los cuales referimos como placas amiloides y son el resultado de la agregación de la proteína Beta amiloide (β A). La segunda lesión, consiste en fibrillas intracelulares conformadas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada asociada a microtúbulos.

El péptido β A presenta entre 38 y 43 aminoácidos de longitud con gran heterogeneidad en sus extremos amino y carboxilo terminal. Históricamente los péptidos β A 1-42/1-40 han sido el foco de interés para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, se ha reconocido la presencia de especies amino-truncadas en cerebros de los pacientes. Estas especies se han descrito en 35% de los pacientes con la EA, en los que representan más del 60% de las especies del péptido. En estudios de pacientes con síndrome de Down que desarrollan la EA se han encontrado dos principales especies de β A: β A (1-42) y las formas amino truncadas β A (3-42) y (11-42). Estas especies truncadas además presentan una modificación postraducciona, la ciclización del glutamato del extremo amino terminal, formando así p (E) 3-42 y p (E) 11-42. Esta modificación está mediada por la enzima glutamil ciclasa, la cual se encuentra sobreexpresada en pacientes con EA. Estudios anteriores demuestran que esta modificación le confiere al péptido β A resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares. Otros estudios *in vitro* han demostrado que las variantes β A xx-42 son más fibrilogénicas y se agregan más rápidamente que el péptido de longitud completa β A 1-42. La pérdida del extremo amino terminal de la proteína β A favorece su agregación, lo cual, en conjunto con su resistencia a la degradación por aminopeptidasas extracelulares, promueve la acumulación de la especie piroglutamada 11-42 para actuar como centro de nucleación para otras variantes del β A.

Debido al rápido incremento en la incidencia de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, se espera que en las próximas décadas se convierta en un problema social, económico y humano importante. Es por ello que es importante trabajar en el desarrollo de terapias eficientes. A través de una amplia gama de estudios *in vitro* y del estudio de inmunoterapia en modelos animales se demostró que la inmunoterapia es una estrategia efectiva para reducir los niveles del péptido β A así como para promover mejoría en la función cognitiva. Sin embargo se ha demostrado que la inmunización con el péptido β A 1-42 induce la generación de anticuerpos dirigidos hacia la porción aminoterminal del péptido, los cuales son capaces de incrementar la frecuencia y severidad de microhemorragias además de que no reconocen a las especies aminotruncadas del péptido β A.

En el presente trabajo analizamos las propiedades inmunoquímicas de los anticuerpos anti- β A p (E) 11-42 producidos en conejo. Estos anticuerpos reconocen a las 3 principales especies del péptido β A encontrados en el cerebro de los pacientes con EA: el péptido β A 1-42 de longitud completa, y las especies amino truncadas β A p(E)3-42 y β A p(E)11-42. Además demostramos que los anticuerpos anti- β A p (E) 11-42 son capaces de: 1) reconocer los agregados amiloides presentes en cortes de cerebros de pacientes con EA y 2) inhibir la citotóxicidad inducida por el péptido β A p (E) 11-42 en células de neuroblastoma IMR-32 diferenciadas.

Finalmente identificamos que el péptido β A p (E) 11-42 posee dos epítopos de células B, uno correspondiente a la porción aminoterminal del péptido (residuos de aminoácidos 11-28) y el segundo a la porción central (residuos de aminoácidos 19-26).

Estos resultados son de gran importancia para el diseño de inmunógenos capaces de reconocer a las especies amino truncadas del péptido β A, ya que hasta el momento la mayoría de las estrategias inmunoterapéuticas se han enfocado en el epítipo amino terminal, (EFRH), del péptido de longitud completa, porción ausente en las especies amino truncadas. El reconocimiento de las 3 principales especies del péptido β A presentes en cerebros humanos podrá aumentar la eficiencia de la inmunoterapia ya que solamente el 0.1% de los anticuerpos presentes en el torrente sanguíneo pasan a Sistema Nervioso Central.

INTRODUCCIÓN

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EPÍTOPOS/MIMÓTOPOS DEL PEPTIDO BETA AMILOÍDE PIROGLUTAMADO 11-42 PARA LA INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Demencia es el término utilizado para describir la pérdida de las capacidades intelectuales dentro del dominio cognitivo, incluida la memoria, el lenguaje, la ejecución de funciones y la percepción espacio-temporal. Es una alteración tan severa que puede resultar en la pérdida de la capacidad de realizar tareas diarias. Sin embargo, la demencia no puede ser considerada como una enfermedad por sí sola, sino como un síndrome resultante de una amplia gama de enfermedades. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores, es un trastorno neurodegenerativo y progresivo caracterizado por sus manifestaciones clínicas y hallazgos neuropatológicos (LaFerla, 2007).

La EA es el desorden degenerativo progresivo más común ya que afecta alrededor de 20 millones de personas en el mundo (INNN, 2009). Como primer síntoma se observa la pérdida de la memoria seguido por desorientación temporal, pérdida verbal y cambios de personalidad (Feldman, 2007)

Aproximadamente un 2% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer desarrollan la enfermedad en edades tempranas, 30-50 años de edad. A ésta se le ha designado enfermedad Temprana o Familiar (FAD) y está asociada con mutaciones en genes como los de la Proteína precursora del amiloide (APP), y las presenilinas 1 y 2 (PS1 Y PS2). El 98% restante de los pacientes con la EA la desarrollan a partir de los 65 años de edad, a esta forma se le conoce como Enfermedad Tardía o esporádica (Lippa, 1996). Las enfermedades familiar y la esporádica no sólo se distinguen por la edad de su manifestación, sino también por sus diferencias clínicas. Los pacientes con EA familiar se caracterizan por desarrollar una mayor discapacidad en atención, lenguaje, funciones ejecutivas así como percepción espacio-visual. Esos pacientes también presentan un déficit mayor de norepinefrina y acetilcolina, así como una mayor atrofia cortical e hipometabolismo en las cortezas temporal y parietal. Por otro lado, los

pacientes que manifiestan la enfermedad esporádica desarrollan un mayor déficit en memoria episódica y un mayor grado de lesión en la corteza temporal media (Ravinovicini, 2010)

MANIFESTACIONES CLINICAS

A grandes rasgos la memoria se divide en dos grupos: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Esta última a su vez se divide en memoria explícita y en memoria implícita.

La memoria implícita abarca las sensaciones, capacidades y habilidades que se recuerdan de manera inconsciente. La memoria explícita es aquella que permite el recuerdo de personas, hechos, lugares y cosas mediante un esfuerzo consciente y deliberado. Esta memoria utiliza el hipocampo, corteza temporal y diencéfalo (Morgado, 2005).

A su vez la memoria explícita se divide en memoria episódica y en memoria semántica. La memoria episódica es aquella mediante la cual se recuerdan acontecimientos y experiencias personales, esta memoria depende principalmente del hipocampo y de la corteza temporal, mientras que la memoria semántica es aquella mediante la cual se recuerdan conocimientos aprendidos, y depende de la corteza temporal (Martínez-Castillo, 2001).

La pérdida de memoria característica de los pacientes con EA se manifiesta como pérdida de la memoria episódica lo que resulta en un déficit progresivo en la capacidad de aprender y retener nueva información verbal y no verbal así como la incapacidad de recordar eventos de memoria a largo plazo tales como actividades autobiográficas (Feldman, 2007). Los pacientes con EA presentan dificultad para almacenar la información nueva, es por ello que tienden a olvidar rápidamente la información recientemente aprendida. Otro de los síntomas de dichos pacientes en la aparición de intrusiones, es decir errores en los cuales la información previamente aprendida se evoca cuando el sujeto intenta aprender nuevo material. Durante el curso de la enfermedad los pacientes desarrollan déficit en la memoria semántica, es decir, pérdida de conocimiento relativo a hechos históricos, geográficos, aritméticos y de acceso al léxico

Los pacientes que presentan la EA se caracterizan por desarrollar amnesia, esto es un reflejo de la deficiencia en el funcionamiento del hipocampo y corteza entorrinal, afectando principalmente al sistema colinérgico (Martínez-Castillo, 2001).

Los pacientes con EA manifiestan diferentes etapas durante el desarrollo de la enfermedad:

- ⤴ ETAPA AMNÉSICA. Se manifiesta durante los 2 o 3 primeros años de la enfermedad y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, desorientación espacial e ineficiencia para realizar actividades de la vida diaria, además de frecuentes alteraciones en el estado de ánimo, agitación e hiperactividad, apatía, depresión y perplejidad.
- ⤴ ETAPA CONFUSIONAL. Ésta se caracteriza por un deterioro rápido y progresivo de las funciones intelectuales apareciendo síntomas focales como: apraxia, afasia, agnosia y acalculia. El mayor déficit se observa en la memoria de evocación. Se observan alteraciones en la postura y en la marcha y pueden aparecer síntomas como alucinaciones o delirios.
- ⤴ ETAPA DEMENCIAL.- Se caracteriza por un alto deterioro en la conducta intelectual y motora, aparece incontinencia urinaria y fecal entre otros síntomas severos como rigidez, hemiplasia y reflejos patológicos (Aveleyra, 1998)

EPIDEMIOLOGÍA

Conforme los países han incrementado su edad poblacional, la demencia se ha convertido en un problema de salud pública en personas mayores de 65 años. En Estados Unidos, alrededor del 10% de la población de dicha edad presenta algún tipo de demencia, siendo la Enfermedad de Alzheimer la principal causa de ella. Su prevalencia ha aumentado de manera exponencial en función de la edad poblacional. Sin embargo existen otros tipos de demencia tales como demencia de cuerpos de Lewis, demencia frontotemporal, demencia de Parkinson y demencia vascular.

La enfermedad de Alzheimer es la causante del 50% de las demencias diagnosticadas a nivel mundial. La demencia es el tercer problema de salud en países desarrollados, siendo solamente superada por enfermedades cardiovasculares y cáncer. Actualmente alrededor de 10,700 personas al año son diagnosticadas con demencia y se ha observado un incremento notable paralelo a la edad, incrementando 0.9% en las personas de entre 55 y 64 años, 25.2 en personas de entre 80 y 84 años de edad y 97.2 en personas de entre 85 y 95 años de edad.

La enfermedad de Alzheimer afecta alrededor de 20 millones de personas en el mundo (6 millones en Estados Unidos, 5-6 millones de Asia y 2-4 millones en Latinoamérica) (Osuna, 2006)

En nuestro país se ha estimado que existen 350,000 personas afectadas con la EA, de las cuales, mueren alrededor de 2.030 anualmente. En Estados Unidos mueren aproximadamente 100,000 personas por dicha enfermedad siendo así la cuarta causa de muerte en el país (INNN).

PATOLOGÍA MACROSCÓPICA

En los estudios postmortem de los pacientes con enfermedad de Alzheimer se ha encontrado que hay una reducción en el volumen cerebral (Ruiloba,2006). Sin embargo la característica macroscópica más llamativa encontrada en los pacientes con EA es la atrofia cerebral, la cual, es el resultado del estrechamiento de los giros cerebrales, el ensanchamiento de los surcos, alargamiento de los ventrículos y pérdida de la sustancia negra. Dicha atrofia suele ser más acusada al inicio en la corteza cerebral, principalmente en la corteza entorrinal y parahipocampal, y es seguido por alteraciones en la corteza frontal, temporal y occipital (Arango,2003). El volumen de los ganglios basales y el hipocampo se reduce en un 20% con la edad. Estudios recientes sugieren que la reducción en volumen se debe en su mayoría a la pérdida de sustancia blanca más que a la pérdida de la corteza. La sustancia cortical se pierde entre los 20 y 50 años de edad mientras que la sustancia blanca se pierde entre los 70 y 90 años (Ruiloba,2006).

PATOLOGÍA MICROSCÓPICA.

En 1907 Alois Alzheimer describió dos alteraciones patológicas en el cerebro de una paciente con demencia. Las dos lesiones son características de la EA y en la actualidad siguen siendo examinadas postmortem para el diagnóstico correcto de ésta. La primera es la presencia de depósitos extracelulares del péptido β A en regiones cerebrales específicas, a las que se le denomina placas amiloides y son el resultado de la agregación de la proteína BA. La segunda, consiste en neurofibrillas intracelulares conformadas por agregados de la proteína asociada a microtúbulos tau hiperfosforilada. Ambas lesiones se presentan años antes de la manifestación de la demencia (LaFerla, 2007).

Las regiones cerebrales afectadas en los pacientes con Alzheimer presentan cambios no específicos tales como activación de la microglía, reactivación de la gliosis así como muerte neuronal. Esta última varía aproximadamente de un 60% en la capa de células piramidales del hipocampo hasta menos del 50% en núcleos basales, corteza frontal y temporal (Feldman, 2007). También se ha observado, por medio de microscopía electrónica, la reducción en el número de sinapsis así como en la inmunoreactividad de las proteínas sinápticas (Almeida, 2005). Esta pérdida correlaciona con la disfunción cognitiva en pacientes con EA (Masliah, 2005). Sin embargo los cambios más característicos observados en los cerebros de los pacientes con la EA son la presencia de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares.

MARAÑAS NEUROFIBRILARES

Las marañas neurofibrilares son filamentos intracelulares anormales que desplazan a los orgánulos citoplásmicos. Estas se encuentran principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo y están ausentes en las neuronas de giro dentado (Duyckaerts, 2009). En el caso de las células piramidales del hipocampo tienden a abarcar el cuerpo neuronal y la dendrita apical, por lo cual se presentan en forma de flama. En el caso de las células del núcleo basal, las marañas se observan redondeadas. En el hipocampo, se han observado marañas persistentes aún tras la muerte celular. Estas marañas neurofibrilares consisten en hebras de proteína entrelazadas generando una

estructura de doble hélice (filamentos helicoidales pareados) compuesta principalmente, por la proteína Tau hiperfosforilada. Esta es una proteína constitutiva asociada a microtúbulos que se encuentra abundantemente en neuronas. Su función biológica es la de estabilizar el ensamblaje y polimerización de los microtúbulos para mantener la integridad estructural del citoesqueleto (Nelson, 2009). La hiperfosforilación de tau altera sus propiedades de unión a los microtúbulos favoreciendo la formación de los filamentos helicoidales pareados en las neuritas y cuerpos celulares lo que resulta en el impedimento de transporte celular, lo cual culmina en la muerte celular (Nagy, 2005) En las placas amiloides, tau se encuentra truncada en la región aminoterminal. Durante el desarrollo de la patología tau se relocaliza progresivamente. Inicialmente tau se acumula en el soma, posteriormente se redistribuye a dendritas y axones y finalmente se localiza en la corona de las placas amiloides, conformadas por las neuritas distróficas de las células dañadas (Duyckaerts, 2009). A diferencia de las placas amiloides las marañas neurofibrilares se encuentran presentes en otras enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Parkinson postencefalitis y panencefalitis aguda.

Las marañas neurofibrilares surgen en el sistema límbico y progresan hacia la corteza (Braak, 1994).

PLACAS AMILOIDES

Las placas amiloides o neuríticas son lesiones esféricas de aproximadamente 200 μm de diámetro conformadas por depósitos locales de amiloide extracelular. El péptido que conforma dichos depósitos es el beta amiloide (βA), péptido de aproximadamente 4 kDa con un longitud de 39-43 aminoácidos. El βA es el resultado del corte proteolítico de la proteína transmembranal conocida como Proteína Precursora del Amiloide (Haas,1993). Las placas neuríticas están asociadas a lípidos, colesterol, APOE, metales (Zn y Cu), elementos de la matriz extracelular (ICAM 1, trombospondina, heparan sulfato, alfa 1- quimi tripsina, inhibidor de serin proteasa) así como catepsina D. El núcleo de la placa neurítica, conocido como depósito focal, está conformado por agregados densos y esféricos del péptido βA de 42 aminoácidos de longitud (βA 42). Mediante análisis de espectroscopia de masas se determinó que contiene entre 50 y 100 fMoles del péptido (Rufenach,2005). Estos depósitos focales se encuentran

rodeados por células de microglía activadas (Bolmont, 2008). Su núcleo denso está separado por el halo de un anillo de péptido β A difuso, el cual, está conformado por agregados largos de entre 50-100 μ m de longitud. Finalmente el aro de péptido β A difuso se encuentra rodeado por componentes neuríticos y astrocíticos. Las neuritas que rodean el agregado amiloide corresponden a las de las neuronas en degeneración y son distróficas, por lo que se observa un alto contenido de lisosomas, mitocondrias degeneradas y filamentos helicoidales pareados (Selkoe, 2010). La presencia de la proteína asociada a microtúbulos MAP-2, evaluada a través de estudios de inmunohistoquímica, demostró el origen dendrítico de las neuritas distróficas. Es conocida como placa neurítica o placa madura al conjunto de depósito focal rodeado por β A difuso junto con la corona neurítica (Duyckaerts, 2009). Las principales regiones afectadas por estas placas son la corteza entorrinal, hipocampo y amígdala (Selkoe, 2010). Las placas neuríticas surgen en la corteza y se extienden hacia el sistema límbico (Pimplikar, 2009). Existen 5 fases de deposición del β A parenquimal; estas abarcan progresivamente las siguientes estructuras:

- ⤴ Corteza
- ⤴ Hipocampo y corteza entorrinal
- ⤴ Núcleo estriado
- ⤴ Tallo encefálico y
- ⤴ Cerebelo.

Existen otros depósitos amiloides en los pacientes con Alzheimer llamados “cotton wool”, estos están compuestos por péptido β A 1-42 y poseen pocos componentes de microglía. A diferencia de las placas neuríticas estos no están rodeados por neuritas ni astrocitos. Una de las principales características de estos depósitos es que las especies del péptido β A que los componen se encuentran truncadas en la porción aminoterminal (Duyckaerts, 2009)

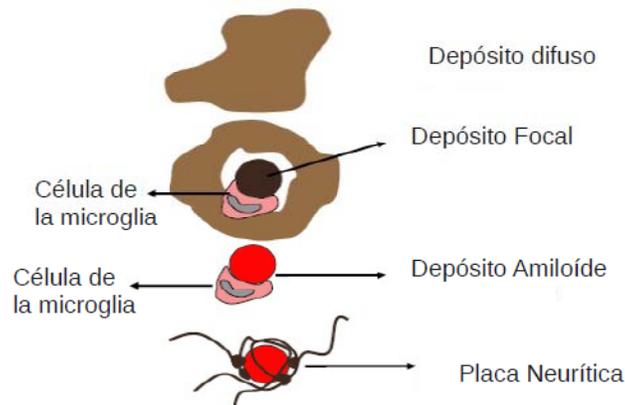


Figura 1. Proceso de formación de las placas neuríticas características de la enfermedad de Alzheimer. Tomado de Duyckaerts, 2009

Además de las placas neuríticas localizadas en la corteza frontal, en los pacientes con EA se han encontrado placas difusas, sin embargo no son características de la enfermedad dada su presencia en cerebros de adultos mayores sanos (Morris, 1996).

BETA AMILOIDE

El péptido βA es un péptido con gran heterogeneidad en sus extremos amino y carboxilo terminal. La secuencia de aminoácidos de dicho péptido fue determinada por Glenner en 1984. El βA se encuentra a bajas concentraciones como un componente normal de los fluidos biológicos, líquido cefalorraquídeo y plasma. El péptido βA , en estado monomérico, participa en una amplia gama de funciones biológicas dentro de las que se encuentran: estimulante de la proliferación celular, promotor de la adhesión celular, antioxidante, neurotrófico y neuroprotector, regulador negativo de la transmisión sináptica excitadora y quelante de iones metálicos tóxicos (Giuffrida, 2010).

En adultos mayores sanos la principal especie del péptido liberado a circulación es de 40 aminoácidos de longitud (β A 40), mientras que una pequeña proporción, 10%, corresponde a la variante de 42 residuos, β A 42. La variante β A 42 es más hidrofóbica, más tóxica y posee una mayor capacidad de fibrilación. El β A 42 es la forma más abundante en las placas amiloides encontradas en los cerebros de los pacientes con la EA (LaFerla, 2007).

El β A es el resultado del corte endoproteolítico, por la α , β y γ secretasas de la proteína precursora del amiloide o APP.

La APP puede cortarse por dos principales vías: la no amiloigénica y la amiloigénica. En la primera APP sufre un procesamiento proteolítico por la α -secretasa, a 83 aminoácidos del residuo carboxilo terminal, produciendo un ectodominio aminoterminal que se secretada al medio (Zhang,2011). Este dominio es conocido como α -APP y tiene un papel importante en la neuroprotección contra la toxicidad por glutamato, deprivación de factores tróficos y de glucosa (Claasen, 2009) .El fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos se retiene en la membrana plasmática y se corta por la γ -secretasa, produciendo un fragmento nombrado P3. Debido a que el corte generado en esta vía se encuentra dentro de la región del β A, el corte por la α -secretasa evita la producción del mismo (Feldman, 2007). En un inicio se consideraba que el péptido P3 era no amiloigénico, sin embargo experimentos *in vitro* han demostrado que este fragmento forma fibrillas amiloides. Estudios fisicoquímicos demuestran que la hidrofobicidad del péptido P3 favorece su agregación (Higgins, 1996). Así mismo, se ha demostrado la presencia del péptido p3 en las placas neuríticas de los pacientes con EA (Le,2001). Por lo que se ha postulado que el péptido P3 participa en el proceso de agregación característico de la enfermedad de Alzheimer.

En la vía amiloigénica, el corte inicial de APP es mediado por la β -secretasa a 99 aminoácidos del residuo carboxilo terminal (Zhang, 2011). Este corte resulta en la liberación de β -APP al espacio extracelular, dejando un fragmento de 99 aminoácidos anclado a la membrana plasmática, donde el extremo aminoterminal será el primer aminoácido del péptido β A. El corte por la γ -secretasa, entre los residuos 38 y 43, libera al β A intacto. La mayoría del péptido β A producido es de 40 aminoácidos de longitud y solo un 10% es de 42 aminoácidos. Este último es más hidrofóbico y posee una mayor tendencia a la formación de fibrillas, siendo así la forma predominante en las placas neuríticas (Feldman, 2007). Los agregados del péptido β A 42 promueven: la disfunción mitocondrial, inducción de

genes apoptóticos, formación de canales iónicos que resultan en pérdida de la homeostásis de Calcio, inducción de la Vía JNK/SAPK, activación de microglía y genes proinflamatorios, formación de especies reactivas del oxígeno, toxicidad y muerte celular (Feldman, 2007).

El procesamiento de APP por ambas vías resulta en la generación de un fragmento de 5 kDa llamado AICD (APP INTRACELLULAR DOMAIN). Este fragmento migra desde la membrana plasmática al núcleo donde interactúa con el factor de transcripción Fe65 y la acetiltransferasa de histonas Tip60. Formando un complejo proteico participa en la inducción de la expresión de genes como p53, glicógeno sintetasa quinasa, neprilisina, ACE1, ACE2 y LRP1 (McLean, 1999)

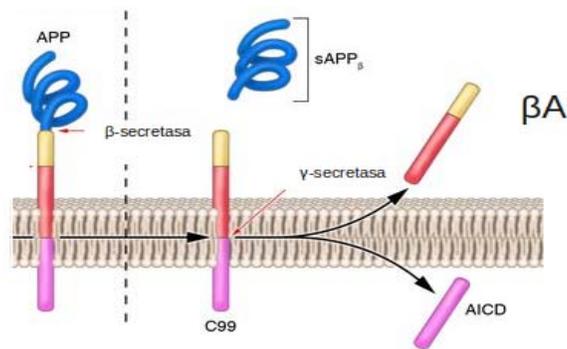


Figura 2. Procesamiento de la proteína precursora amiloidea por la β y γ - secretasa para producir el péptido β A. Tomado de Grandy,2005

El péptido β A es un péptido anfílico debido a que sus primeros 28 residuos son polares y los últimos 12 son no polares. A pH neutro la porción polar contiene 6 aminoácidos cargados positivamente y 6 negativamente, exagerando las diferencias entre las porciones terminales del péptido. Debido a su polaridad es un péptido que fácilmente se agrega (Nagy, 2005). Por otro lado los 12 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal le proveen al péptido estabilidad, lo cual favorece su proceso de oligomerización y polimerización en fibrillas.

La proteína β A, bajo condiciones específicas, es modificada de su conformación nativa a una estructura diferente, es decir presenta un desplegamiento. Esta inestabilidad promueve la asociación intermolecular que resulta en los agregados altamente ordenados en forma de estructuras B-plegadas típicos de la enfermedad (Carlo, 2010). En estudios recientes se ha demostrado que la acumulación de oligómeros es más relevante que la formación de placas en el procesos de deterioro cognitivo, es decir los oligómeros de bajo peso molecular son mas tóxicos que las fibrillas (Yanker, 2009). A través de estudios de espectroscopia infrarroja se demostró que los oligómeros poseen una estructura beta plegada antiparalela y sufren una transformación para poseer la estructura β -plegada paralela característica de las fibrillas (Selkoe, 2010). Las moléculas de BA se asocian para formar protofilamentos, resultado de péptidos enlazadas helicoidalmente en torno a su eje. Aquí las moléculas de β A están en una conformación beta-loop-beta. Los protofilamentos son ensamblajes solubles y curvilíneos de β A con un diámetro de 6-8 nm y longitud de 200nm. Estas protofibrillas se forman lentamente en solución pero desaparecen rápidamente para dar origen a las fibrillas. Es por ello que los protofilamentos son considerados intermediarios en el proceso de fibrilación (Broersen, 2010). Dos protofilamentos se empaquetan cara a cara a través del extremo carboxilo terminal para conformar las fibrillas de BA, las cuales, están formadas por betas plegadas en paralelo, en una forma altamente ordenada (Roychaudhuri,2008). Finalmente estas fibrillas se agregan para conformar las placas neuríticas.

El proceso de agregación del β A se resume en 5 pasos: cambios conformacionales, oligomerización, nucleación, elongación y ramificación (Carlo, 2010). En el 2008 se propuso la hipótesis de trampa de desplegamiento, en la cual se postula que los oligómeros del β A interactúan con proteínas transitoriamente desplegadas a partir de hojas beta expuestas, induciendo su unión y permanencia en forma desplegada. Así mismo el β A desregula proteínas chaperonas favoreciendo así el estado desplegado de las proteínas (Gruschus,2009). Es importante recalcar que la conformación del BA varía en función de su estado de agregación. En estado monomérico la proteína se caracteriza por presentarse principalmente en conformación random coil, en estado dimérico se favorece la formación tanto de hélices alfa como de β -plegadas, y finalmente en las fibrillas las proteínas se encuentran conformadas por betas plegadas (Gruschus,2009).

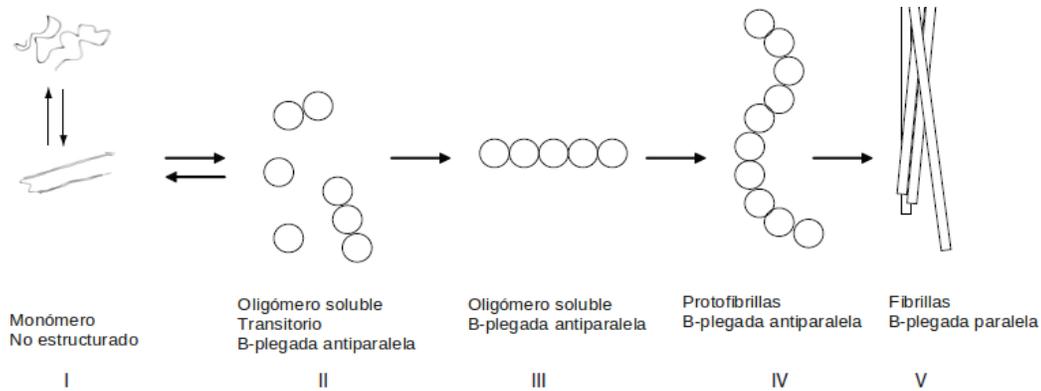


Figura 3. Plegamiento y ensamblaje de los péptidos βA , tomado de Broersen, 2010

En la actualidad sabemos que el péptido βA no solo se encuentra conformando los agregados difusos y las placas neuríticas previamente descritos, sino que también se encuentra adosado a los vasos sanguíneos donde promueve el desarrollo de la angiopatía amiloide cerebral.

La angiopatía amiloide cerebral es el resultado de la acumulación del péptido βA en los vasos sanguíneos, la cual trae como consecuencias el desarrollo de hemorragias lobulares e infartos corticales (Winkler, 2001). Esta afección se desarrolla en arteriolas, vénulas y capilares donde se acumula el péptido βA 1-40, aquí fibrillas del péptido se adosan a la membrana abluminal donde posteriormente se extienden al neuropilo perivascular (Selkoe, 2010). En estadios avanzados, el vaso sanguíneo tiene un aspecto de doble barril, lo cual favorece el desarrollo de la necrosis fibrilar (Alafuzoff, 2009). A través de estudios de ultra estructura se observó que el βA se localiza en la membrana basal dispuesta ente las células de musculo liso, lo cual incrementa el grosor de la membrana. Eventualmente las células musculares mueren y la pared arterial es completamente remplazada por βA . La acumulación del péptido en la membrana basal de los capilares induce anomalías estructurales tales como decremento en los niveles de colágeno IV, laminina y perlecan (Weller, 2008). El 24% de los pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer, no desarrollan la angiopatía amiloide cerebral, aunque un 23.5% de

pacientes con angiopatía amiloide cerebral no manifiestan la enfermedad de Alzheimer (Attems, 2005). Existen dos tipos de angiopatía amiloide cerebral:

- ⤴ La de tipo 1, la cual no involucra capilares
- ⤴ La de tipo 2, la cual involucra capilares y a la Apolipoproteína E. Esta angiopatía es causada principalmente por β A 1-42 e involucra al espacio perivascular y a la microglía.

Existen 3 fases de desarrollo de la angiopatía amiloide cerebral que se distinguen por la acumulación del péptido β A en los vasos sanguíneos de:

1. Corteza
2. Hipocampo, cerebelo y mesencéfalo
3. ganglios basales, tálamo, pons y médula oblonga.

BETA AMILOIDE INTRACELULAR

Como otras proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas, el péptido β A también se acumula dentro de las neuronas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Lemere, 2010). La identificación de este péptido como el principal componente de las placas seniles características de la EA llevó a pensar que la deposición del β A extracelular inducía la muerte neuronal. Esta hipótesis fue principalmente respaldada por estudios que evidenciaban el papel neurotóxico del β A oligomérico en cultivos primarios de neuronas (Takahashi, 2004), y de forma secundaria por el incremento de β A extracelular en pacientes con la enfermedad (Selkoe, 2010). Sin embargo, los estudios de toxicidad han brindado resultados poco consistentes. En estudios en ratones transgénicos se observó que hay disfunción sináptica previa a la deposición del β A extracelular, por lo que ésta no puede explicar por sí solo el desarrollo de la enfermedad. Así, se ha visto que el β A intracelular tiene un papel importante en la

deficiencia de la fisiología neuronal, así como en la pérdida neuronal (LaFerla,2007).

La primera evidencia del β A intracelular se reportó en 1989 (Grundke-Iqbal, 1989) pero fue hasta 1996, en un análisis detallado de diversas líneas neuronales, cuando se encontró en lisados celulares una relación de 3:1 de beta amiloide β A40: β A42, mientras que los análisis de las formas secretadas fue de 1:20 (Turner, 1996). El β A intracelular, β A42, se acumula en regiones vulnerables en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, lo cual, puede reflejar un evento temprano en el progreso de la patología. El β A intraneuronal se encuentra principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo y en la corteza entorrinal. Así mismo se observó que conforme aumenta la disfunción cognitiva y la formación de agregados extracelulares, los depósitos intracelulares de β A decrecientan (Wirhth, 2004), lo que sugiere que los agregados del péptido β A se forman intracelularmente y posteriormente son liberados al espacio extracelular donde formaran las placas amiloides.

En los cerebros de ratones transgénicos 3xTg-AD se observó que en estadios tempranos, previos a la deposición extracelular de β A, hay una fuerte inmunoreactividad intraneuronal de éste péptido. En estos estadios se presenta una pérdida en el número de terminales sinápticas, y muerte neuronal, así como una disfunción cognitiva significativa. Es decir que las alteraciones fisiológicas y neuríticas se observan previas a la generación de los agregados extracelulares, lo cual propone que el β A intracelular tiene una papel importante en el desarrollo de la patología (Gouras, 2010)

Hipotéticamente existen 5 vías que resultan en la producción y acumulación del β A intracelular (Li,2007):

1. El péptido β A insoluble formado en el retículo endoplásmico se reconoce como un péptido mal plegado y se trasloca al citoplasma para su degradación. Debido a deficiencias en el proteosoma, resultado de la edad y de la interacción con el β A, se genera una degradación deficiente del péptido lo que resulta en su agregación.
2. La Internalización del β A extracelular a través de endosomas. Debido a que el péptido aumenta la permeabilidad de la membrana lisosomal, el β A sale desde la vesícula hacia el citoplasma.
3. La salida pasiva del β A a través de los componentes de la vía secretora.

4. La difusión pasiva del β A extracelular desde la membrana plasmática hacia el citoplasma.
5. La entrada del β A a través de la interacción con el receptor α 7- nicotínico de acetilcolina

El β A intracelular se encuentra en una relación dinámica con el β A extracelular. En ratones transgénicos 3x Tg-AD la administración de un anticuerpo anti- β A reduce primero el reservorio extracelular del péptido y posteriormente el intracelular. Dos semanas después el reservorio de β A intracelular se ha restablecido, mientras que tarda alrededor de un mes en restablecerse el pool extracelular (Billings, 2005). Lo que sugiere que los agregados del péptido β A intracelular y extracelular se encuentran en equilibrio.

Estas evidencias ayudaron a postular un modelo en donde el β A intracelular se acumula y oligomeriza dentro de vesículas en las neuritas. Esta agregación promueve la degeneración de dichas neuritas, por lo cual el β A es liberado al exterior celular. Una vez allí se induce la formación de las placas características de la enfermedad así como la degeneración de las neuronas vecinas. Este último fenómeno se debe a la capacidad del β A de fungir como prión donde aumenta la agregación así como el mal plegamiento del péptido en neuronas adyacentes (Gouras,2005). De igual manera se le ha atribuido un papel del β A en la generación de las marañas neurofibrilares, ya que las neuronas que desarrollan agregados intracelulares de péptido β A, desarrollan dichas marañas (Billings,2005). Se ha observado en ratones transgénicos que previo a la presencia de β A extracelular, en las neuronas inmunoreactivas para β A hay una relocalización de la proteínas tau hiperfosforilada desde los axones a las neuritas (Takahashi,2010). Por lo cual se plantea que el β A intracelular tiene un papel fundamental en el desarrollo de las marañas neurofibrilares.

HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.

La hipótesis de la cascada amiloidea fue propuesta por Selkoe en los inicios de los años 90.

Selkoe y Hardy postularon en 1992: “ Nuestra hipótesis dicta que es la deposición del péptido β A, el principal

componente de las placas neuríticas, es el agente causal de la enfermedad de Alzheimer. Siendo la formación de marañas neurofibrilares, la muerte neuronal, el daño vascular y la demencia efecto directo de su deposición” (Hardy, 1992).

Dicha hipótesis marca que cuando existe un desbalance entre la síntesis (aumento) y la degradación (disminución) del péptido βA , se favorece su agregación, principalmente de βA 42, lo cual conlleva al resto de las alteraciones cerebrales incluidas la formación de las marañas neurofibrilares, muerte celular, disminución del número de sinapsis, decremento en la liberación de neurotransmisores y procesos inflamatorios (La Ferla, 2007; Muller, 2008)

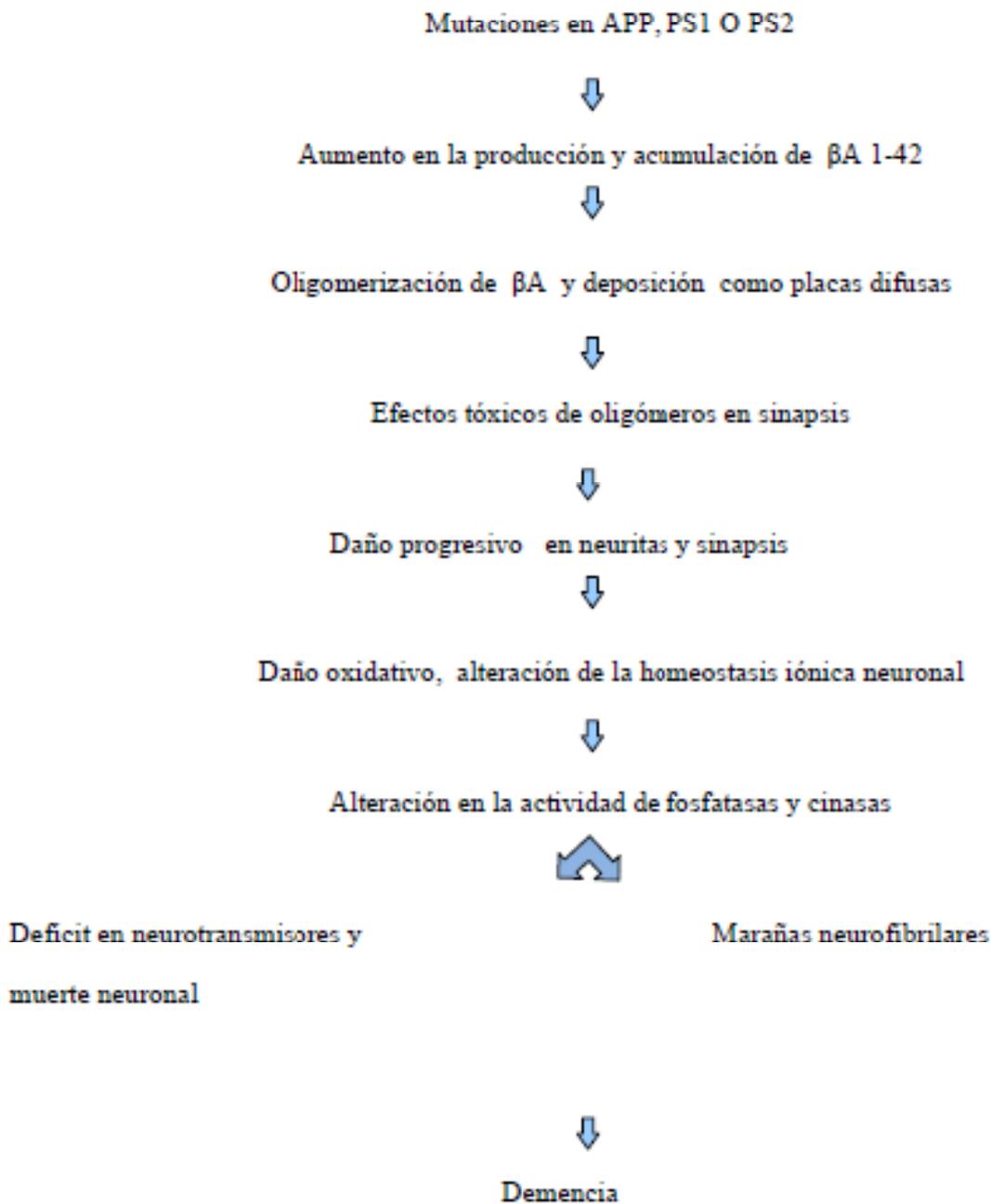


FIGURA 4. Hipótesis de la cascada Amiloide, tomada de Citrón,2004

La hipótesis de la cascada amiloidea se sustenta en las siguientes evidencias:

1. La presencia de mutaciones en los genes de APP, PS1 Y PS2 inducen la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer
2. Pacientes con Síndrome de Down manifiestan enfermedad de Alzheimer en edad temprana
3. Mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau promueve demencia frontotemporal con Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por la deposición de de tau en marañas neurofibrilares sin deposición de β A
4. En ratones transgénicos que sobreexpresan APP y tau la agregación de β A precede a la hiperfosforilación y agregación de tau
5. Terapias que promueven la remoción de β A inducen mejoría cognitiva. (Solomon,2009)
6. Caso de una paciente con Síndrome de Down con trisomía parcial del cromosoma 21 (p12q22.1), que no desarrollo características neuropatológicas ni neuropsicológicas características de EA. La paciente solo posee dos copias del gen de APP (Prasher, 1998).

La hipótesis de la cascada amiloidea ha sufrido muchos cambios a lo largo del tiempo, principalmente con respecto a la especie patogénica. La idea original proponía a las placas neuríticas como la especie causante de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo esto fue ampliamente criticado debido a dos observaciones: La primera se refiere a la falta de correlación entre la cantidad de placas neuríticas con el grado de demencia en los pacientes con enfermedad esporádica y la segunda a la presencia de placas de β A en personas sanas. Debido a estas observaciones se postuló que son los oligómeros solubles los responsables del evento patogénico (Nagy, 2009).

OLIGÓMEROS SOLUBLES DE β A

Una vez que se reconoció que las placas neuríticas no son las especies patogénicas responsable del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se comenzaron a realizar una serie de experimentos en ratones transgénicos con la finalidad de reconocer a las especies claves en esta patología. A través del análisis de las especies encontradas en estos ratones se reconoce que existen una serie de oligómeros solubles, desde dímero a 24mero y se procedió a evaluar su capacidad neurotóxica.

El primer reporte que apoya el papel de los oligómeros solubles del péptido β A como principales mediadores del daño neuronal proviene de estudios con ratones transgénicos en los cuales se revirtió el déficit en memoria a través de la administración intraperitoneal de un anticuerpo anti- β A. En dicho estudio se observó que había una mejora cognitiva con ausencia de un decremento en las placas neuríticas, por lo cual se sugirió que el anticuerpo neutralizaba especies tóxicas solubles de β A (Walsh,2007).

Posteriormente, a partir de una línea celular transfectada con APP se purificaron dodecámeros, por medio de cromatografía de afinidad. Dichos dodecámeros fueron administrados intraventricularmente en los ratones, lo cual resultó en déficit cognitivo. En ese momento se consideró que eran los dodecámeros los responsables de la toxicidad neuronal, sin embargo, era poco probable que fueran los únicos agregados tóxicos presentes durante el desarrollo de la enfermedad.

De hecho este concepto fue rectificado cuando se demostró que ratones transgénicos (Tg2576, con mutación familiar Swedish) se desarrollaba déficit cognitivo con decremento en espinas dendríticas previo a la aparición de dodecámeros. Al observar que los dodecámeros correlacionaban con pérdida en la memoria espacial sin afectar la pérdida sináptica se postuló que los oligómeros de bajo peso molecular eran responsables del efecto neurotóxico (Walsh,2007).

Los péptidos de β A existen como formas oligoméricas interconvertibles. Varios estudios han postulado a los dímeros, trímeros y tetrameros, como potenciales especies tóxicas. La administración de dichas especies a cultivos celulares resultó en inhibición de la potenciación a largo plazo, la pérdida de espinas dendríticas y la

pérdida sináptica. Finalmente se comprobó que los dímeros y trímeros interactúan con las membranas lipídicas, lo cual los posiciona como moduladores clave de la toxicidad de β A (Walsh,2008). Los dímeros son 3 veces más tóxicos que el monómero en cultivo celular y el tetrámero es 13 veces más tóxico (Sakono, 2010).

A partir de dichas observaciones se postuló la hipótesis de los ligandos difundibles derivados de β A. Esta postula que dichas especies solubles causan pérdida de memoria temprana, seguida por degeneración sináptica culminando en la muerte celular. Esta hipótesis incluye 3 observaciones:

1. La presencia de estos agregados solubles puede explicar la falta de correlación entre placas neuríticas y grado de demencia
2. Estos oligómeros son capaces de formarse en estadios tempranos de la enfermedad ya que se forman con bajas concentraciones del péptido que antecede a la formación de las placas.
3. Postula que el déficit en memoria es el resultado de la alteración en cascada de traducción de señales más que en la muerte neuronal (Klein, 2002).

Esta hipótesis se sostiene por una amplia gama de observaciones dentro de las cuales están que los oligómeros solubles inducen muerte neuronal, activación de la microglía, pérdida sináptica e inhibición de las funciones y plasticidad sinápticas.

Una forma de evaluar el efecto del péptido β A sobre las sinapsis es mediante la evaluación de la potenciación a largo plazo, la cual refleja la capacidad de memoria y aprendizaje. Una serie de estudios han demostrado que los oligómeros del péptido β A inhiben la potenciación a largo plazo, es decir altera la capacidad de memoria y aprendizaje. Mientras que la potenciación a largo plazo correlaciona con la habilidad de memoria y aprendizaje, la depresión a largo plazo demuestra lo contrario, siendo así la depresión a largo plazo un regulador negativo de la memoria y aprendizaje en el hipocampo. Los oligómeros de β A inducen la depresión a largo plazo, al parecer, por un mecanismo dependiente de glutamato (Li, 2009). Se propone que durante la patología de la enfermedad de Alzheimer la sinapsis es afectada por oligómeros lo cual, resulta en la alteración de la neurotransmisión glutamatergica, alteración en el reciclaje de vesículas presinápticas, degeneración de neuritas,

alteración del metabolismo celular, regresión axonal e hiperfosforilación de tau (Savioz, 2009)

ESPECIES AMINO TRUNCADAS

Históricamente β A 1-42/1-40 han sido el foco de interés para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, se ha reconocido la presencia de especies amino-truncadas en cerebros de dichos pacientes (Liu, 2006) . Estas especies se han descrito en 35% de los pacientes con la EA, donde representan más del 60% de las especies del péptido (Vanderstichele, 2005)

Con la finalidad de evaluar la composición de los agregados amiloideos en estadios tempranos de la EA, se evaluaron cerebros de adultos mayores sanos que manifestaron placas seniles y marañas neurofibrilares. A través de dichos estudios se demostró que el esqueleto de agregados de β A en estadios tempranos está conformado por especies aminotruncadas de β A 42, incluyendo péptido con inicio, en el residuo 3, 4, 5, 8,9 y 11. Esta evidencia sostiene la teoría de que son las especies amino truncadas de β A 42 las implicadas en los procesos amiloidogénicos tempranos durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Seargent, 2003).

Otra forma de evaluar los estadios tempranos de la EA es mediante el estudio de los cerebros de los pacientes con Síndrome de Down. Debido a que APP se localiza en el cromosoma 21, el 75% de los pacientes con Síndrome de Down desarrollan la EA (Shamas-Ud-Din, 2002). En pacientes con síndrome de Down que desarrollan la EA se han encontrado dos principales especies de β A soluble β A (1-42) y las formas amino truncadas β A (3-42), (11-42) y (17-42) (Youseff, 2008; Vandertichele, 2005; Ruso, 1997; Kumar, 2000). En los pacientes con síndrome de Down las especies amino truncadas aumentan su concentración conforme progresa la formación de placas neuríticas, mientras que dichas especies están menos representadas en los pacientes con Síndrome de Down que no desarrollan la patología de EA, lo cual sugiere que su presencia correlaciona con la severidad y progresión de la enfermedad. En pacientes con síndrome de Down durante la etapa fetal y postnatal son las especies β A 1-40 y 1-42 las más abundantes, sin embargo, conforme aumenta la edad y el paciente comienza a desarrollar la patología tipo Alzheimer las especies amino truncadas aumentan su proporción (Ruso, 2001).

Posteriormente se evaluaron las especies encontradas en cerebros de pacientes con EA familiar y esporádica, en dichos estudios se observó que las placas neuríticas están conformadas en un 50% por las especies amino truncada 3-42 y 11-42 (He, 1999). Estas especies truncadas además presentan una modificación postraduccional, la ciclización del glutamato del extremo amino terminal, formando así p (E)3-42 y p(E)11-42. Esta modificación es mediada por la enzima glutamil ciclasa (Schilling,2008). La glutaminil ciclasa (GC) es la enzima responsable de mediar la formación del piroglutamato en la porción aminoterminal de los péptidos a partir de residuos glutaminil y glutamil. Esta enzima se encuentra de forma abundante en los tejidos neuroendocrinos y linfoides (Hang,2005). La GC se encuentra sobreexpresada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Wirhth,2010), lo cual sugiere, que ésta enzima está involucrada en la generación de especies aminotruncadas modificadas y que su actividad afecta el proceso de depositación del péptido β A en los cerebros de los pacientes con EA (Schilling,2008)

En pacientes con EA se observó una acumulación masiva de especies amino truncadas modificadas, lo cual sugiere que tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Al comparar la composición de las placas neuríticas en los pacientes con EA esporádica contra adultos sanos, se observó que hay una sobreproducción de especies amino truncadas modificadas (Miravalle, 2005).

Un modelo transgénico de ratón con mutaciones en APP (Swedish, London) y PS1 (M233T,L235P) el cual se caracteriza por una muerte neuronal masiva en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo, desarrolla especies amino truncadas desde los 4 meses de edad. Este modelo se caracteriza por la presencia de agregados de alto peso molecular del péptido β A intracelular en etapas tempranas (6 meses), lo cual, correlaciona con la pérdida de neuronas del hipocampo. Estas evidencias sugieren un mecanismo secuencial en el desarrollo de la patología amiloidea, donde inicia con la agregación intracelular del péptido β A, previó al desarrollo de daño neuronal y la depositación extracelular del péptido (Casas, 2004).

El β A p(E)11-42 se acumula en pacientes con mutaciones en PS1 de forma más abundante que en otros pacientes con enfermedad de Alzheimer (Russo,2000). Estos pacientes desarrollan enfermedad de Alzheimer a los 45 años. Esto ayuda a confirmar que las especies amino truncadas favorecen el desarrollo de la EA.

En estudios *in vitro* se ha demostrado que las variantes β A xx-42 son más fibrilogénicas y se agregan más rápidamente que el péptido β A 1-42. Inmunohistoquímicamente se observó que β A 42 se deposita primero en placas difusas en el cerebro de pacientes con la EA y en pacientes con síndrome de Down. El β A 40 contribuye posteriormente al crecimiento de las placas amiloideas para generar las placas neuríticas densas. Sin embargo, la severidad de la enfermedad corresponde a la deposición de placas difusas compuestas principalmente por especies amino truncadas, mientras que la especie completa se encuentra solo en placas densas. El péptido β A p(E)11-42 se localiza principalmente en la porción nuclear de la placa neurítica y también se localiza en los depósitos vasculares (Iwatsubo, 1996). En estudios con células de riñón transfectadas con APP se observó que las placas difusas consistían principalmente de β A amino truncado, mientras que la especie 1-42 está confinada a las paredes de los vasos sanguíneos (Huse, 2002). Estudios *in vitro* han demostrado que es mayor la agregación de los péptidos con deleciones en el extremo amino terminal, lo cual, apoya la propuesta de que son estas especies que funcionan como centros de nucleación para la formación de las placas neuríticas. En base a estudios de dicroísmo circular se ha determinado que las especies amino truncadas poseen un mayor contenido de estructura beta plegada, debido a la pérdida del fragmento con estructura aleatoria (Pike, 1995). Así mismo, se ha sugerido que las especies amino truncadas inician y/o aceleran la formación de placas neuríticas al actuar como centros de nucleación que favorecen el depósito de especies menos amiloigénicas pero más abundantes, tales como β A 1-42.

PÉPTIDO β A p(E)11-42

La heterogeneidad en las especies aminotruncadas del péptido β A es el resultado del corte alternativo de APP por la β secretasa (BACE) en las posiciones designadas como β y β' . Este último es llevado a cabo entre la tirosina en la posición 10 y el Glutamato en la posición 11 (Benjannet, 2004). BACE se ha encontrado principalmente en la red trans-Golgi y en el sistema endosomal, sin embargo, también se encuentra en el retículo endoplásmico. La actividad de BACE en el Retículo endoplásmico promueve el corte B, mientras que el corte generado en la red trans Golgi se da en la posición B' (Takeda, 2009). Por otro lado se ha propuesto que la variante 11-42 es el resultado del corte de APP por BACE en la posición 1 para generar el péptido β A 1-42 y posteriormente

en la posición 11 para generar β A 11-42 (Schilling, 2008). Esta especie amino truncada se encuentra en las placas difusas en forma piroglutamada. Esta modificación es mediada por la glutamil ciclasa, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el hipocampo y corteza cerebral (Iwatsubo, 1996). Estudios enzimáticos demuestran que esta modificación le otorga a la proteína resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares (Russo,2002). Solamente se ha identificado una enzima, la piroglutamil aminopeptidasa, capaz de liberar el piroglutamato de los péptidos con el glutamato ciclizado. Sin embargo esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma y requiere condiciones reductoras para su actividad, lo cual implica que estas especies de β A son difíciles de catabolizar ya que se encuentran en vesículas intracelulares o en el espacio extracelular. Esta resistencia desacelera la degradación del β A 11-42 (Liu, 2002). Por lo que se propone que la pérdida de la estructura aleatoria en el extremo amino terminal de la proteína β A favorece su agregación, lo cual, adjuntado a su resistencia a la degradación por aminopeptidasas, promueve la acumulación de la especie piroglutamada 11-42 para actuar como centro de nucleación para otras variantes del β A lo que resulta en la formación de las placas neuríticas características de la enfermedad (Lee, 2003). Es importante resaltar las propiedades estructurales de dicha especie amino truncada, por un lado, en dicha especie se encuentra ausente la Tirosina en la posición 10, la cual es muy importante para el entrecruzamiento de radicales (Bitain,2003). El proceso de agregación del péptido β A 11-42 se encuentra favorecido debido a la pérdida de 6 aminoácidos cargados, lo cual, favorece la formación de hojas β (He,1999). Por otro lado, se ha observado que los entrecruzamientos intercatenarios entre moléculas de β A se dan frecuentemente entre los residuos Glu11-Glu11, Glu11-Asp23, dichos contactos están involucrados en la formación de dímeros antiparalelos (Liu, 2006)

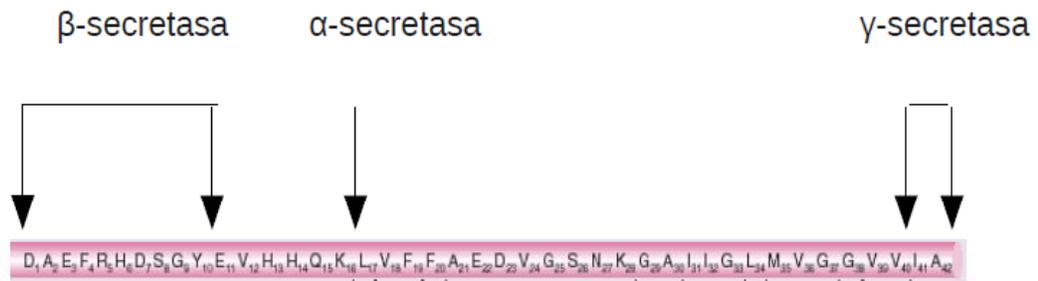


Figura 5. Sitios de corte por la B secretasa (Posición 1 y 11), a- secretasa y Y secretasa en la APP.

Figura 5.

TRATAMIENTO

Debido al rápido incremento en la incidencia de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, se espera que en las próximas décadas se convierta en un problema social, económico y humano importante. En la actualidad los tratamientos dirigidos contra esta enfermedad son utilizados para disminuir la sintomatología así como su avance. Es por ello que es importante trabajar en el desarrollo de terapias eficientes.

Existen dos grandes grupos de medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: los tratamientos sintomáticos y de progresión. Solo hay 5 medicamentos aprobados por la FDA para tratar la EA, 4 de ellos son inhibidores de la acetilcolinesterasa (Donepzil, galantamina, rivastigmina y tacrina. El quinto medicamento corresponde a la Memantina, que es una antagonista de los receptores NMDA. Estos medicamentos son utilizados para disminuir la sintomatología y promover la mejora cognitiva de los pacientes, sin embargo no curan ni modifican el curso de la enfermedad. En la actualidad los fármacos más ampliamente estudiados se dirigen a las lesiones neuropatológicas enfocándose en las placas amiloideas y en las marañas neurofibrilares. Dichos

enfoques se encuentran aún en investigación clínica.

TRATAMIENTOS SINTOMÁTICOS.

Los tratamientos sintomáticos tratan los defectos en las habilidades cognitivas, funcionales y de comportamiento.

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son ampliamente utilizados debido a que uno de los efectos de la agregación del β A es alterar el sistema colinérgico. La acetilcolina es sintetizada y liberada al espacio sináptico por la célula presináptica. Una vez liberada interactúa con su receptor en la célula postsináptica induciendo la salida de potasio y la entrada de sodio. Esta actividad es terminada por la degradación de la acetilcolina por la acetilcolinesterasa. Una manera de modificar las alteraciones generadas en este sistema en pacientes con la enfermedad de Alzheimer es inhibir la degradación de dicho neurotransmisor para que su efecto sea prolongado. Estos medicamentos ejercen un efecto en el mejoramiento de la función cognitiva en un periodo de 6 a 18 meses seguidos de un decaimiento cognitiva semejante a los pacientes sin tratamiento (AD 2000 collaborative group, 2004)

De los antagonistas de los receptores de NMDA, la memantina es la más utilizada. Sin embargo su uso es solo aprobado solo para enfermedad moderada y severa. Este medicamento protege a las células de la citotoxicidad mediada por glutamato. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el Sistema nervioso central, donde tiene un papel importante en la potenciación a largo plazo y la plasticidad sináptica. El incremento en los niveles de glutamato lleva a una actividad excesiva del receptor de N-metil-D-aspartato y a un incremento en el calcio intracelular, lo cual puede llevar al daño y muerte celular.

TRATAMIENTOS DE PROGRESIÓN

En el grupo de medicamentos utilizados para detener el avance de la enfermedad tenemos 4 variantes.

✦ Moduladores de las β y γ - Secretasas. Estos medicamentos son utilizados para disminuir la tasa de síntesis y agregación del β A. El desarrollo de inhibidores de la β -Secretasa es un reto ya que es una enzima que tiene varios sustratos, incluida la proteína involucrada en la mielinización neuroregulina-1, así como una amplia gama de dominios de unión. (Mangialasche, 2010). Un estudio de fase III usando un inhibidor de la β -secretasa como monoterapia en pacientes con EA reportó que el medicamento no promueve mejoría cognitiva. El estudio fue discontinuado tras la advertencia de la FDA de la presencia de riesgos cardiacos asociados al uso del medicamento.

Las investigaciones sobre inhibidores de la γ - secretasa han tenido un mayor avance. Sin embargo existe la preocupación del desarrollo de efectos adversos como resultado de la inhibición del procesamiento de la proteína NOTCH (Geiling, 2002), ya que en estudios preclínicos se ha encontrado que esto induce defectos gastrointestinales, en timo y bazo. El estudio en fase 3 del inhibidor ly450139 fue detenido en agosto del 2010 debido a que los pacientes empeoraron significativamente con respecto a los pacientes que consumieron placebo.

✦ Antiagregantes. son mini chaperonas sintéticas homologas a la región hidrofóbica del β A, los cuales poseen la capacidad de disrumpir la formación de betas plegadas (Soto,1998).

✦ Antagonistas del Receptor para los productos de Glicosilación avanzados (RAGE). RAGE es un receptor altamente expresado en células del hipocampo, astrocitos y microglía. El β A se asocia a dicho receptor estimulando la cascada de inflamación así como la muerte celular. Es por ello que se ha sugerido que el bloqueo de dicho receptor protege a la célula al decrementar la formación de agregados así como la inflamación (Raffi,2009).

Existen otros medicamentos aprobados por la FDA, que han sido considerados como auxiliares de la enfermedad de Alzheimer, dentro de estos encontramos:

✦ Agentes antiinflamatorios. Estudios neuropatológicos han demostrado que en pacientes con la

enfermedad se encuentran concentraciones incrementadas de reactantes de la fase aguda, citocinas y proteínas del complemento, por lo cual, se ha explorado el papel de los corticosteroides y antiinflamatorios no esteroides en el desarrollo de la enfermedad (Breitner,1996).

- ⤴ Antioxidantes. El estrés oxidativo ha sido implicado en el daño neuronal generado en las enfermedades neurodegenerativas. Por lo cual el uso de antioxidantes ha sido evaluado como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer (Gilgun-Sherki,2003).
- ⤴ Estatinas. Inicialmente estudios epidemiológicos sugirieron un decremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer después del uso de estatinas. Esto llevo a una investigación clínica donde se observó que el uso de atorvastatina produjo una mejora cognitiva en pacientes con enfermedad moderada (Crisby,2002).
- ⤴ Estrógeno. Debido a que el estrógeno promueve el crecimiento neuronal, la conectividad así como la supervivencia celular, se ha evaluado el papel del estrógeno como neuroprotector. Un estudio clínico con raloxifeno, un modulador del receptor de estrógeno, sugiere que el uso de 120 mg reduce el riesgo de presentar deficiencia cognitiva, sin embargo, este medicamento aumenta el riesgo de tromboembolia (Mulnard,2009).
- ⤴ Ácido Docosahexonoico (DHA). EL DHA es un ácido graso poliinsaturado omega 3 encontrado en peces y algas marinas. En cerebro afecta la transducción de señales, regula la expresión génica y promueve neuroprotección. Este ácido se localiza en la membrana plasmática y se han encontrado niveles decrementados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Quinn,2010).

También se ha evaluado el uso de Gingko Biloba, homocisteina, xaloprodén (agente neurotrófico) sin embargo ninguno de ellos ha sido efectivo para reducir el decaimiento cognitivo en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

INMUNOTERAPIA

Inmunoterapia es el término médico utilizado para referirse al tratamiento de enfermedades mediante la inducción, estimulación o supresión de la respuesta inmune. En la actualidad la inmunoterapia ha sido utilizada para tratar enfermedades crónicas como cáncer y enfermedades autoinmunes.

En diversos estudios preclínicos se ha observado que la inmunoterapia activa y pasiva sirve como estrategia terapéutica para prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer. Ambas estrategias activan al sistema inmune para inducir la producción de anticuerpos específicos para el péptido β A. En la inmunoterapia activa el péptido β A o fragmentos de éste conjugados a una proteína acarreadora (la cual contiene un epítipo para las células T) son utilizados como inmunógenos, los cuales se administran en presencia de un adyuvante. La inmunoterapia pasiva consiste en la administración directa de los anticuerpos, por lo que, el paciente no requiere de montar una respuesta inmune para producir los anticuerpos específicos contra el péptido β A. La base de la inmunoterapia activa como en la pasiva es que los anticuerpos anti- β A se asocian al β A para favorecer su eliminación (Lemere, 2010).

ANTICUERPOS

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas sintetizadas y secretadas por los linfocitos B durante la respuesta inmune. Estos son producidos por los linfocitos B en una forma unida a la membrana. La interacción de los antígenos con los anticuerpos de membrana promueve la activación de los linfocitos B iniciando así la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos son también producidos en forma secretada por las células B estimuladas por el antígeno. Ésta constituye la fase efectora de la inmunidad humoral donde los anticuerpos secretados se unen al antígeno activando diversos mecanismos efectoros que inducen su eliminación (Abbas, 2009).

Los anticuerpos poseen una estructura en forma de Y que está conformada por dos cadenas ligeras y dos

pesadas idénticas. Cada cadena ligera se encuentra asociada a una cadena pesada por un puente disulfuro, formando así un heterodímero. Los heterodímeros se encuentran asociados entre sí por puentes disulfuro así como por interacciones débiles para formar la estructura básica del anticuerpo. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras están conformadas por regiones constantes y variables. Las regiones variables contienen regiones de variabilidad en su secuencia de aminoácidos que diferencian los anticuerpos sintetizados por un clon de células B de los anticuerpos sintetizados por otro. La región variable de una cadena pesada se yuxtapone con la región variable de la cadena ligera para conformar el sitio de unión al antígeno. Debido a que la unidad estructural básica de cada anticuerpo contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, la molécula contiene dos sitios de unión al antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos no participan en el reconocimiento antigénico, estas regiones median las funciones efectoras de los anticuerpos al interactuar con otras moléculas y células del sistema inmune (Abbas, 2009). A partir del corte proteolítico de los anticuerpos con la enzima papaína se identificaron 3 regiones: 2 denominadas Fab que corresponden a los sitios de unión al antígeno, y una Fc o fracción cristalizante la cual corresponde a la porción efectora del anticuerpo. Un anticuerpo posee dos funciones, la primera es unirse al antígeno y neutralizar su función, la segunda consiste en reclutar otras células y moléculas del sistema inmune para favorecer la destrucción del antígeno que se encuentra asociado al anticuerpo (Khan,2008).

Los anticuerpos pueden ser separados en diferentes clases en función de las diferencias estructurales de las regiones constantes de su cadena pesada: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Los anticuerpos de la clase IgG se encuentran presentes en líquido linfático, cefalorraquídeo y peritoneal. Su función incluye la aglutinación, formación de precipitados, opsonización, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, activación del complemento, neutralización de toxinas e inmovilización y neutralización de patógenos. En el humano se subdividen en subclases estrechamente relacionadas llamadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Khan,2008). Las diversas funciones efectoras de los anticuerpos dependen de células del sistema inmune que expresan receptores de Fc, FcR, que se unen a anticuerpos de cierta clase o subclase (Abbas, 2009).

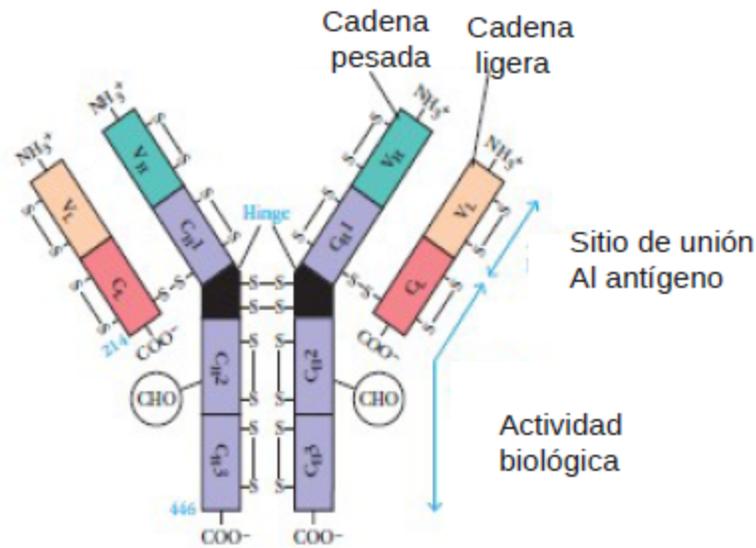


Figura 6. Esquema de la estructura de un anticuerpo, tomada de Kuby,2008

MECANISMOS DE ACCION INMUNOTERAPEUTICA

Se ha propuesto que la inmunoterapia puede actuar mediante tres mecanismos.

1. Fagocitosis por la microglía. Mecanismo basado en la activación de la microglía, la cual fagocita a los agregados del péptido β A opsonizados con los anticuerpos anti- β A. En este escenario el 0.1% de los anticuerpos presentes en torrente sanguíneo llegan al sistema nervioso central donde se unen a los depósitos amiloides e inducen la fagocitosis de los agregados a través del reconocimiento de los anticuerpos por el receptor Fc. Este mecanismo requiere que los anticuerpos lleguen al parénquima cerebral donde activan a la microglía residente, que es incapaz

de eliminar los agregados por si sola (Racke, 2005). Este mecanismo fue corroborado al observar que los anticuerpos con isotipo IgG2, los cuales poseen la mayor afinidad por los receptores Fc, son los que promueven la mayor eliminación de los agregados amiloideos (Burbach, 2007).

2. Disgregación Catalítica. El anticuerpo inhibe la fibrillogénesis y la formación de agregados citotóxicos de β A. En este mecanismo el anticuerpo desagrega directamente los agregados de β A, cambiando el equilibrio entre agregados y monómeros hacia los monómeros, lo cuales son más eficientemente degradados o eliminados. Este postulado está sustentado por estudios *in vitro* donde la adición de anticuerpos anti- β A impide la agregación del péptido β A o bien revierte la agregación de fibrillas. (Brody,2008)
3. Mecanismo de Consumo Periférico.- El anticuerpo dirigido contra la porción central del péptido β A m266, el cual es incapaz de asociarse a las placas amiloides pero posee gran afinidad por los agregados de β A soluble, disminuyó los niveles de β A al ser administrado en modelo murino de EA (DeMattos,2001) . Esto llevó a sugerir que el anticuerpo m266 captura al monómero del péptido β A en torrente sanguíneo favoreciendo así la salida del β A del parénquima cerebral a la periferia, lo cual con un periodo de tiempo extendido lleva a la disminución del β A del parénquima cerebral. Este mecanismo ha sido designado como consumo periférico. En dicho mecanismo el anticuerpo es capaz de secuestrar el β A plasmático lo que resulta en un cambio en el equilibrio entre los niveles de β A del parénquima cerebral y el plasma, resultando en un incremento en la salida de β A hacia la periferia donde es degradado.

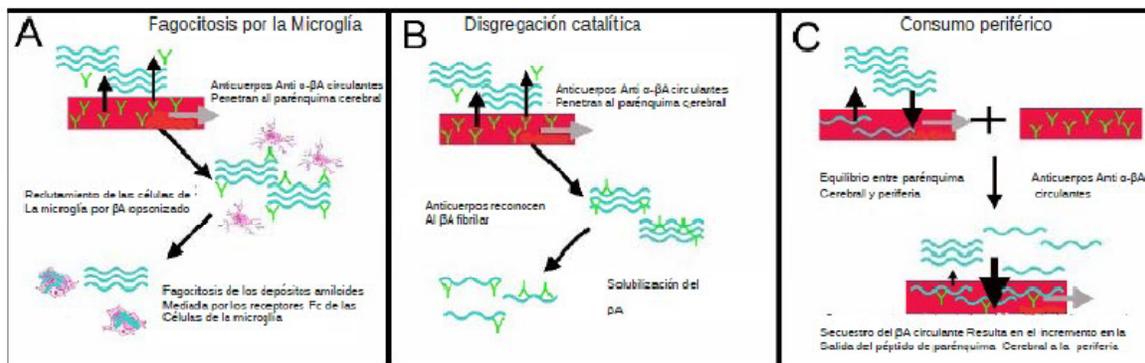


Figura 7. Mecanismo de acción inmunoterapéutica. Tomado de Brody, 2008.

INMUNOTERAPIA ACTIVA.

EL primer reporte de inmunización activa contra la EA fue publicado en 1999 (Schrenk,1999). En dicho estudio se inmunizaron ratones transgénicos PDAPP con el péptido BA 1-42 en adyuvante de Freund, en estos ratones que fueron inmunizados durante 5 meses se observó un decremento en la patología considerada “tipo Alzheimer”. La inmunización decrementó la formación de nuevas lesiones, y la progresión de la amiloidosis así como la neuropatología asociada fue completamente bloqueada. En este estudio también se observó que la inmunización con el péptido β A resultó en la generación de anticuerpos anti- β A y que células reactivas de la microglía se localizaban en las zonas con placas, por lo cual se propone que un posible mecanismo mediante el cual esta terapia favorece la remoción de los agregados de β A es mediante la activación de la microglía a partir de sus receptores Fc (Ferrer, 2004). En estudios posteriores se reportó que la inmunización activa con β A reduce la disfunción cognitiva en ratones transgénicos al observar que los ratones inmunizados presentaron una mejora en su capacidad de aprendizaje y memoria con respecto a los controles no tratados (Buttini,2005; Schenk, 1999). Debido a la eficacia lograda en los estudios preclínicos en ratones transgénicos se decidió trasladar este enfoque hacia estudios clínicos en humanos. Un estudio en fase I (evalúa bioseguridad) en 80 pacientes con enfermedad de

Alzheimer moderada fue desarrollado en el 2000 (Gilman,2010). En dicho estudio los pacientes fueron distribuidos azarosamente en 4 grupos con diferentes dosis de β A preagregado (denominado AN1792) mas adyuvante, saponina. Se realizaron 4 inyecciones intramusculares en un periodo de 6 meses, 4 pacientes fallecieron pero ninguna muerte fue atribuida a la inmunización. Algunos pacientes desarrollaron efectos secundarios tales como alucinaciones, hostilidad y convulsiones, sin embargo estos efectos han sido descritos en pacientes con la enfermedad de Alzheimer no tratada. Este estudio mostró una tendencia a la reducción en la velocidad de progresión del deterioro cognitivo de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, no se logró que los pacientes regresaran a un estado cognitivo normal a diferencia de lo observado en los estudios preclínicos. Este efecto ha sido atribuido a que solo un 60% de los pacientes inmunizados desarrollaron anticuerpos y el título de ellos en los pacientes que respondieron fue 10 veces menor a lo alcanzado en los estudios preclínicos. Debido a que se consideró que la inmunización en dichos pacientes fue bien tolerada se decidió seguir al estudio de fase II. En esta fase se reclutaron 372 pacientes de los cuales 300 recibirían β A preagregado en un esquema de 6 inyecciones. Para este estudio se utilizó nuevamente saponina como adyuvante. Este último favorece la respuesta celular proinflamatoria lo que resultó en que un 6% de los pacientes desarrollaran meningoencefalitis aguda. El estudio fue terminado tras solo 1-3 inmunizaciones. Doce de los pacientes que desarrollaron meningoencefalitis se recuperaron a las pocas semanas de terminado el estudios, sin embargo, 6 de ellos desarrollaron secuelas cognitivas y neurológicas. Las autopsias de los pacientes, demostraron remoción de los agregados de β A, de manera semejante a lo observado en los estudios preclínicos. Grandes áreas de la corteza cerebral se encontraban libres de agregados amiloideos y los remanentes de los agregados mostraron una estructura denominada como “parcheada” caracterizada por poseer núcleos densos desnudos. Con respecto a la respuesta cognitiva de dichos pacientes se observó en un subgrupo de 30 pacientes seguidos durante un año que los pacientes que desarrollaron un alto título de anticuerpo tuvieron una estabilización en el decaimiento cognitivo característico de la enfermedad, mientras que aquellos que no desarrollaron anticuerpos tuvieron un desempeño aún peor que los pacientes no tratados. Es importante recalcar que solo un 20% de los pacientes inmunizados desarrollaron anticuerpos y que la región inmunodominante de dichos anticuerpos corresponde a la porción amino terminal del péptido β A (Schenk, 1999; Morgan, 2000). Debido a que la inmunoterapia activa parece promover una respuesta favorecedora en estudios preclínicos, actualmente nos

encontramos en la búsqueda de estrategias que eviten la respuesta adversa generada, por ello algunos grupos buscan inmunizar con péptidos truncados que no desencadenen una respuesta proinflamatoria, o bien buscan utilizar adyuvantes que no la induzcan. Sin embargo, uno de las principales defectos de este tipo de terapia es la incapacidad de controlar si los pacientes desarrollaran anticuerpos o bien establecer el título de los anticuerpos generados.

INMUNOTERAPIA PASIVA

La inmunoterapia pasiva consiste en introducir anticuerpos directamente en el animal o persona para promover los mismos efectos que la inmunización activa. Al poco tiempo de la publicación inicial de los resultados obtenidos en los estudios preclínicos de inmunización activa, se publicaron dos reportes de inmunización pasiva por infusión sistémica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido βA en ratones transgénicos. En el primero una sola inyección de un anticuerpo dirigido contra la porción amino terminal del péptido rápidamente promovió una mejoría en los ensayos de aprendizaje en ratones transgénicos a pesar de que el anticuerpo no modificó los niveles solubles de βA (Bard,2000). En el segundo, la administración de un anticuerpo dirigido hacia la porción central del péptido βA promovió una normalización en el comportamiento de los ratones transgénicos sin afectar la histopatología (Dodart,20002). A pesar de los efectos benéficos logrados en los ratones transgénicos inmunizados pasivamente sobre el decaimiento de las capacidades cognitivas de los ratones transgénicos una de las preocupaciones evaluadas al inmunizar con estos anticuerpos es el desarrollo de microhemorragias intracerebrales. En el año 2002 un estudio en ratones transgénicos demostró que la inmunización con anticuerpos dirigidos hacia la porción amino terminal del péptido βA incrementó la frecuencia y severidad de las microhemorragias (Pfeifer,2002). Estos anticuerpos se asocian a los depósitos amiloideos localizados en los vasos sanguíneos favoreciendo su remoción. La remoción de los agregados vasculares promueve la degradación vascular (Shoeter ,2008) . Así el incremento de microhemorragias es el resultado de la asociación de los anticuerpos a las placas amiloideas, lo cual favorece la solubilización del βA permitiendo su difusión hacia la vasculatura, ya que uno de los mecanismos de eliminación del péptido es a través de su paso por la membrana basal perivascular (Bard, 2003). Esto es de gran preocupación dado que el 90% de los pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer

desarrollan angiopatía.

Por otro lado, los anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido βA no poseen la capacidad de asociarse a las placas amiloides a pesar de que sí reconocen a los monómeros solubles de βA (Dodart,2002). La incapacidad de dichos anticuerpos de reconocer los agregados amiloides en la vasculatura cerebral resulta en una disminución en el riesgo de desarrollar microhemorragias (Litchlen,2008).

Es importante recalcar que el efecto de la inmunoterapia está en función de la porción del péptido βA que es reconocido por el anticuerpo, las principales diferencias son descritas en la siguiente tabla:

Tabla I. Caracterización de los anticuerpos dirigidos hacia diferentes epítomos del péptido βA . Tomada de Litchlen, 2008

Anticuerpos dirigidos hacia la porción: N terminal	Central	Carboxilo terminal
<ul style="list-style-type: none"> ⤴ Entran al parénquima cerebral ⤴ Se unen a APP, B-amiloide monomérico, depósitos vasculares y cerebrales ⤴ Disgregan los agregados amiloideos mediante fagocitosis ⤴ Generan alto riesgo de angiopatía amiloide vascular 	<ul style="list-style-type: none"> ⤴ No penetran al parénquima cerebral ⤴ Se unen a APP y al B amiloide monomérico ⤴ No se asocia al B-amiloide agregado, fibras o B amiloide vascular ⤴ Actúa mediante el mecanismo del consumo periférico 	<ul style="list-style-type: none"> ⤴ Puede o no penetrar al parénquima cerebral ⤴ Se une APP, B amiloide monomérico y agregado ⤴ Neutraliza los efectos tóxicos del βA oligomérico ⤴ Aumenta el riesgo de desarrollar (CAA) ⤴ Puede actuar en el parénquima cerebral o en la periferia.

(CAA)		
▲ Favorece el riesgo de desarrollar microhemorragias y encefalomeningitis		

INMUNOTERAPIA ACTIVA VS PASIVA

Tanto la Inmunoterapia activa como la pasiva presentan una serie de ventajas así como desventajas.

Por un lado la inmunoterapia activa tiene la ventaja de tener un mayor costo-benéfico que la inmunoterapia pasiva además de ser una terapia a largo plazo, ya que a diferencia de la pasiva, no requiere de visitas mensuales al doctor para recibir una dosis de anticuerpos humanizados. Sin embargo la inmunoterapia activa involucra el uso de adyuvantes, los cuales, pueden inducir respuestas inmunes no deseadas. Esto es de riesgo principalmente en los adultos mayores ya que sus niveles de citocinas inflamatorias se encuentran elevadas (Bruunsgaard,2001). Este efecto adverso puede ser omitido mediante el uso de inmunoterapia pasiva o bien, mediante el uso de adyuvantes que estimulen una respuesta TH2 o antiinflamatoria (Li, 2007).

Otra desventaja de la inmunoterapia activa es que en caso de presentarse efectos adversos, es difícil detener la respuesta rápidamente, ya que no es posible remover el inmunógeno administrado, en cambio, en inmunoterapia pasiva solo se debe detener la administración de los anticuerpos. Sin embargo una de las principales desventajas de la inmunoterapia pasiva es que, los pacientes pueden desarrollar anticuerpos neutralizantes que inhiban el efecto de la terapia administrada y la formación de complejos inmunológicos.

Finalmente podemos decir que la mayor ventaja de la inmunoterapia activa es el desarrollo de memoria inmunológica, ya que asegura protección a largo plazo contra los agregados del péptido β A. La generación de células B de memoria es central para que el paciente responda rápidamente ante los oligómeros tóxicos característicos de la EA (Stanley, 2004)

ENSAYOS CLINICOS ACTUALES

Actualmente se están realizando alrededor de 10 estudios clínicos con inmunoterapia pasiva y 5 con inmunoterapia activa, los cuales están buscando nuevas estrategias tales como diferentes adyuvantes, vacunas de DNA, epítomos de células B o fragmentos de anticuerpos para evitar una respuesta inflamatoria o autoinmune. Sin embargo la mayoría de los estudios de inmunoterapia activa están enfocados en la porción aminoterminal del péptido βA bajo diferentes contextos. Por ejemplo:

La vacuna CAD-106 utiliza el fragmento βA 1-16 acoplado a una partícula viral QB (Wiessner,2011).

ACC-001 Usa el fragmento aminoterminal βA 1-16 conjugado con la proteína CRM19 de la bacteria diftérica (Ryan,2009).

V950- Usa el fragmento amino terminal βA 1-16 conjugado a isomatrix (saponina, colesterol y lípidos) (Hawkes,2008).

ACI-24 Usa el fragmento βA 1-15 conjugado a una estructura liposomal (Hawkes,2008).

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EPÍTOPOS/MIMOTOPOS DEL PEPTIDO BA p(E)11-42 PARA LA INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TABLA 2 Estudios de investigación clínica de inmunoterapia pasiva para tratar la enfermedad de Alzheimer

Terapia	Patrocinador	Anticuerpo	Fase de investigación	Número de pacientes	Duración	Evaluación	Termino del estudio
BAPINEUZUMAB (AAB-001)	Elan, Wyeth, Janssen	Dirigido contra el extremo amino terminal del péptido β A	III	1350	2.5 años	Seguridad y eficacia	Julio 2012
BAPINEUZUMAB (AAB-001)	Elan, Wyeth, Janssen	Dirigido contra el extremo amino terminal del péptido β A	III	4650	18 meses	Función cognitiva	Abril 2011
Solaneuzumab	Eli Lilly	Dirigido contra la porción central del péptido β A	III	2000	19 meses	Función cognitiva	Julio 2012
Gammagard	Baxter health care	Pool de anticuerpos humanos	III	360	18 meses	Función cognitiva	Julio 2011
Bapineuzumab	Wyeth	Dirigido contra la porción central del péptido β A	II	120	6 meses	Efectos Adversos	Marzo 2010
PF-04360365	Pfizer	Anti- β A	II	211	12-18 meses	Seguridad, tolerancia, farmacocinética	Noviembre 2011
R1450	Hoffman-LaRoche	Anti- β A	II	60	3-12 meses	Seguridad y tolerancia	Mayo 2009
IVIg (10%)	Octopharma	Pool de Anti- β A	II	56	6 meses	Cambio en los niveles de β A	Septiembre 2009
GSK933766A	GlaxoSmithKline	Anti- β A	I	122	12 meses	Seguridad, Tolerancia y efectos adversos	Noviembre 2010

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EPÍTOPOS/MIMOTOPOS DEL PEPTIDO BA p(E)11-42 PARA LA INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tabla 3 Estudios de investigación clínica de inmunoterapia pasiva para tratar la enfermedad de Alzheimer

Terapia	Patrocinador	EPITOPO	Fase de investigación	Número de pacientes	Duración	Evaluación	Termino del estudio
ACC-001	ELAN, Wyeth	Conjugado del extremo amino terminal del péptido β A	II	380	24 meses	Seguridad, tolerabilidad evaluación de efectos adversos	Mayo 2012
CAD-105	NOvartis	β A 1-5 acoplado a partícula viral	II	84	12-24 meses	Seguridad, tolerabilidad	Junio 2011
AFFITOPEAD01 Y AD02	Affaris, GlaxoSmithKline	Mimotopo amino terminal	Ib	48	12 meses	Seguridad, tolerabilidad	Diciembre 2009
V950	Merck	Péptido amino terminal conjugado a ISCO-MATRIX	I	124	48 meses	Seguridad, tolerabilidad	Abril 2014
UB311	United Biochemical	β A 1-4	I	18	7 meses	Seguridad, tolerabilidad	Diciembre 2010

MAPEO DE EPITOPOS

Los epítomos o determinantes antigénicos, corresponden a segmentos de un antígeno que son reconocidos por anticuerpos o por células T (Mehra, 1986). La principal función del sistema inmune es hacer la distinción entre lo propio y lo no propio, lo cual se establece a través de dos estrategias: la primera corresponde a la respuesta humoral y consiste en sintetizar anticuerpos, la segunda es la respuesta celular (Abbas, 1991). La rama humoral y celular de la respuesta inmune adaptativa difiere en la forma en la que se reconoce a los antígenos que son encontrados. Las células T se especializan en el reconocimiento de los péptidos derivados de fragmentación

intracelular de los antígenos o vacunas administradas. Las células B son capaces de reconocer epítopos lineales y conformacionales (Janeway ,2005)

Un epítopo de las células B es la región molecular en la superficie de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmune humoral y de combinarse con el anticuerpo específico producido por dicha respuesta. El epítopo es continuo cuando está conformado por aminoácidos adyacentes en la secuencia primaria de la cadena polipeptídica. Los anticuerpos específicos para un epítopo continuo reconocen 3 ó 4 aminoácidos críticos en una secuencia de 6 residuos. Sin embargo también hay epítopos discontinuos, los cuales consisten en residuos alejados en la estructura primaria de la proteína que se encuentran en cercanía en la estructura tridimensional de esta.

El mapeo de epítopos es la metodología mediante la cual pueden ser identificados los determinantes antigénicos específicos a partir del uso de las moléculas del sistema inmune

El mapeo de epítopos se utiliza para una amplia gama de estudios tales como:

1. Determinar las estructuras que permiten la interacción entre dos moléculas
2. Determinar la respuesta inmune ante un antígeno
3. Evaluar la inmunogenicidad de las moléculas
4. Diagnóstico y tipificación de organismos
5. Diseño de vacunas

TECNOLOGÍA DE DESPLIEGUE EN FAGOS FILAMENTOSOS.

Una de las técnicas más utilizadas para el mapeo de epítopos en la tecnología de despliegue de fagos filamentosos. Esta tecnología es una herramienta efectiva para seleccionar y diseñar cadenas polipeptídicas con las especificidades de unión deseadas basada en el desarrollo de proteínas de fusión es decir, en la fusión de una secuencia génica deseada a la secuencia de uno de los genes estructurales del fago. Esto permitirá sintetizar

proteínas fusionadas que se incorporan a la superficie del fago de manera tal que quedan desplegadas de manera heteróloga en su superficie (Sidhu,2000).

La tecnología de despliegue en fago filamentoso fue desarrollada inicialmente con el bacteriófago específico de E.Coli, el fago M13. Las aplicaciones de la tecnología de despliegue en fago se han basado en que la entidad desplegada, sea un péptido o proteína, está físicamente ligada al virus. Este acoplamiento permite realizar selecciones más que screenings. Una proteína con las características deseadas, puede ser recuperada de un pool de millones de variantes, su gen puede ser amplificado como parte del genoma del fago, y su secuencia polipeptídica puede ser determinada (Kehoe,2005)

DESCUBRIMIENTO DE EPITOPOS.

En muchas investigaciones es conveniente mapear el epítipo a una porción determinada del ligando nativo. Para ello se realiza una selección por afinidad de los ligandos peptídicos y se compara la secuencia consenso identificada en dichos ligandos con la secuencia del ligando natural. En muchas ocasiones el motivo coincide con los aminoácidos clave de interacción de la proteína nativa, lo cual permite delimitar el epítipo a una región estrecha de la secuencia del ligando natural. Sin embargo, muchas veces el mapeo de epítipos revela ligandos inesperados, es decir, ligandos que no coinciden con un epítipo lineal y que no pudieron ser anticipados. Esto se encuentra principalmente cuando el epítipo natural es no lineal o no es de carácter proteico. Geysen introdujo el término MIMOTOPO, para referirse a los pequeños péptidos que se unen específicamente al sitio de unión de su receptor sin coincidir con el ligando natural en su secuencia de aminoácidos (Charalombous,2001)

Los péptidos llamados “IMITADORES ANTIGENICOS” son aquellos que son seleccionados por afinidad cuando el receptor utilizado es un anticuerpo. Cuando estos péptidos son utilizados para inmunizar, algunos son capaces de producir anticuerpos que presentan una reacción cruzada con el epítipo natural, a pesar de que el animal nunca ha sido expuesto a éste. Estos péptidos son inmunogénicos. Los péptidos obtenidos a través del descubrimiento de epítipo tienen por lo menos dos usos:

1. Los epítipos miméticos son utilizados para el diagnóstico clínico, La ventaja sobre los antígenos naturales

como reactivos de diagnóstico incluyen, entre otros, el bajo costo de manufactura y descubrimiento

2. El uso de los epítomos como componentes de vacunas sintéticas. Solo se utilizan los antígenos miméticos que son inmunogénicos, ya que deben generar anticuerpos que tengan reacción cruzada con el patógeno o epítomo natural.

VACUNAS DE EPÍTOPO

Conceptualmente el método más fácil de identificar epítomos deseables es aislar un anticuerpo que se una a dicho epítomo. Se espera que ese anticuerpo represente el efecto último deseado de la vacunación con el epítomo seleccionado. Por lo que cuando un anticuerpo neutralizante es identificado se propone que la inmunización individual con el epítomo reconocido por dicho anticuerpo genere la misma actividad neutralizante (Gershoni, 2007)

VENTAJAS DE LAS VACUNAS DE EPÍTOPOS

1. Permiten la identificación de los epítomos eficientes, ya que un antígeno posee cientos de epítomos pero no todos inducen una respuesta inmune efectiva. Así mismo, no todos los individuos desarrollan una respuesta fuerte hacia todos los epítomos. La selección de epítomos capaces de brindar protección puede generar una respuesta inmune dirigida hacia la generación de un repertorio preferente de anticuerpos.
2. Los epítomos dominantes de un antígeno no son necesariamente las más neutralizantes. Las vacunas de epítomos ayudan a escoger epítomos en función de su capacidad neutralizante más que por su área de exposición a la superficie.
3. Evitan los efectos secundarios de la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos contra epítomos no efectivos puede llevar a la endocitosis de inmunocomplejos acoplados a patógenos por los

macrófagos a partir de su receptor Fc. La vacunación por epítomos elimina la presencia de anticuerpos no específicos aumentando los anticuerpos neutralizantes (Gershoni,2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Alzheimer se considera un problema económico y de salud pública, sin embargo no se cuenta con tratamientos eficaces para controlarla. Los medicamentos utilizados actualmente disminuyen los síntomas de la enfermedad, sin embargo solo logran mejoría clínica por un periodo corto de 18 meses.

47

Las estrategias terapéuticas se han enfocado en la hipótesis de la cascada amiloide, la cual propone que es la acumulación del péptido β A en parénquima cerebral es la causante de la cascada patogénica que culmina en la demencia. Es por ello que dichas estrategias buscan decrementar los niveles del péptido, ya sea al favorecer su eliminación o disminuir su producción.

A través de una amplia gama de estudios *in vitro* y del estudio AN1792 se demostró que la inmunoterapia es una estrategia efectiva para reducir los niveles del péptido β A así como para promover mejoría en el área cognitiva. Sin embargo, los enfoques utilizados han tenido efectos secundarios importantes como la presencia de microhemorragias y meningoencefalitis. Estos datos han hecho pensar a un gran número de investigadores que la estrategia terapéutica es efectiva, sin embargo es necesario identificar el epítipo adecuado para inmunizar. Estos estudios utilizaron al péptido β A 1-42 sin considerar a las especies aminotruncadas-modificadas. Debido al importante papel de las especies amino truncadas modificados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer estas especies se posicionan como eficientes blancos terapéuticos.

OBJETIVO

Identificar y caracterizar epítomos-mimótopos del péptido amino truncado β A p(e)11-42 con el fin de desarrollar moléculas capaces de inducir una respuesta inmune protectora para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

OBJETIVO PARTICULAR

1. Caracterización del suero específico contra el péptido amino truncado β A p (E) 11-42 de Conejo.
2. Purificación y caracterización de la fracción de inmunoglobulinas del suero anti β A p(E) 11-42
3. Búsqueda de epitopos/mimótopos del péptido β A p(E) 11-42 por bioselección con una biblioteca comercial de péptidos expresados en fago vs el suero policlonal anti β A 11-42
4. Evaluación *in vitro* del daño producido por el péptido β A p(E) 11-42
5. Evaluación del efecto protector del purificado de inmunoglobulinas ante el daño inducido por el péptido B amiloide *in vitro*

METODOLOGÍA

Previamente en el laboratorio se realizó la inmunización subcutánea de conejos Nueva Zelanda Albino con el péptido BA fibrilar piroglutamado 11-42 (p(E)11-42). Primero se realizó la monomerización del péptido a través de su dilución en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol a una concentración de 1 mM a temperatura ambiente durante una hora. Se transfirió a 4 °C por 15 minutos y se permitió su evaporación a temperatura ambiente toda la noche. Los restos de isopropanol fueron evaporados en el SpeedVac (30 min a 43°C). Para obtener las fibrillas, el pellet monomérico se resuspendió en DMSO a una concentración de 5 mM y se llevó a una concentración final de 1 mg/ml mediante la adición de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). El pellet se incubó a 37°C durante 7 días.

El conejo se inmunizó con 200 µg de péptido emulsionado con Adyuvante de Freud Completo (Sigma) vol 1:1. Se inyectaron 200 µg de péptido fibrilar en dos sitios. Después se realizaron 3 refuerzos. El primer y segundo refuerzo se realizaron a los 15 y 30 días y el tercer refuerzo a los 75 días. Una semana después se realizó la sangría. Los conejos control fueron inmunizados únicamente con PBS y adyuvante de Freud.

Previó a la sangría se verificó la existencia de anticuerpos específicos contra β A p (E) 11-42 mediante ELISA.

TITULACIÓN DEL SUERO MEDIANTE ELISA

En una placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp) se inmovilizaron los siguientes péptidos preagregados β A 1-42, β A 1-16, β A12-28, β A 17-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 8-42, β A 25-35 (Bachem, Filadelfia) y un péptido no relacionado TIC, en una concentración de 0.2 µg/ pozo en 100ul de buffer de carbonatos. La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween y se incubó con una dilución 1:200 de suero anti adyuvante, suero anti β A p(E) 11-42, suero anti β A p(E) 3-42 y suero anti β A 1-42 por una hora a 37°C. Estos últimos sirvieron de controles para evaluar la especificidad del suero. Se lavó 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (

Zymed, San Francisco) diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (Zymed, San Francisco) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia). Una vez comprobada la especificidad y sensibilidad del suero anti β A p(E) 11-42, se tituló el suero mediante diluciones seriales 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000

PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DEL SUERO ANTI β A P (E) 11-42

Las proteínas contenidas en el suero fueron precipitadas con sulfato de amonio saturado, preparada a partir de la disolución de 150 g de sulfato de amonio en 100 ml de agua. Previamente se realizó una dilución 1:10 del suero obtenido en Tris 1M pH 8. A ésta se le adicionó un volumen de sulfato de amonio saturado y se agitó durante una hora a 4 °C. Se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió en una solución de sulfato de amonio al 50%. Se centrifugó a 10000g durante 20 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en PBS hasta obtener el volumen inicial. La solución obtenida se dializó en PBS con 6 cambio de medio durante 3 días. Para aislar la porción de inmunoglobulinas del resto de las proteínas precipitadas del suero, se realizó la purificación en una columna de afinidad. Para ello, se empacó una columna con un 1ml de gel de sepharosa proteína G (Zymed) . La columna se lavó con 10 volúmenes de PBS y se incubó durante una hora en agitación con 3 ml del dializado. La columna se lavo con 10 volúmenes de PBS. La fracción de inmunoglobulinas se eluyó con 1ml de Glicina pH 2.8 y se recuperó el pico completo de elución. Se lavó la proteína con 10 volúmenes de PBS y se eluyó nuevamente con Glicina pH 2.8 . El proceso se repitió hasta purificar el volumen total del dializado. El eluido se dializó contra Agua MilliQ durante 2 días, realizando 4 cambios. Finalmente se liofilizó el dializado y almacenó a -20°C. El mismo procedimiento se realizó para el suero anti adyuvante.

TITULACIÓN DEL PURIFICADO MEDIANTE ELISA

En una placa de microtitulación se inmovilizaron los siguientes péptidos preagregados β A 1-42, β A 1-16,

β A12-28, β A 17-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 8-42, β A 25-35 y un péptido no relacionado TIC, en una concentración de 0.2 μ g/ pozo en 100 μ l de buffer de carbonatos. La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween se incubó con una 2 μ g de purificado anti adyuvante, purificado anti β A p(E) 11-42 y suero anti β A p(E) 3-42 por una hora a 37°C. Se lavó 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-0.2% Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2% Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas. Una vez comprobada la especificidad y sensibilidad del purificado anti β A p(E) 11-42, se tituló mediante el uso de 1,2,4,8, y 10 μ g.

ELISA DE COMPETENCIA

En una placa de microtitulación se inmovilizó el péptido preagregado β A 11-42 en una concentración de 0.2 μ g/ pozo en 100 μ l de buffer de carbonatos. La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche. En tubos independientes se preincubó el purificado de inmunoglobulinas anti-11-42 en una concentración de 1 μ g/100 μ l con 200, 400, 600 y 800 ng de los péptidos β A 1-16, β A 11-42, β A 3-42- β A 1-42, β A 12-28 Y β A 17-42 y se dejaron interactuar a 4 ° C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween se incubó con el anticuerpo anti-11-42 preincubado con los péptidos β A por una hora a 37°C. Se lavo 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo monoclonal cabra anti IgG conejo acoplado a peroxidasa cabra anti conejo diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas .

WESTERN BLOT

Se realizó el corrimiento de 0.5 μg de proteína en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 40 minutos a 25V. La membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del purificado del suero $\beta\text{A}3\text{-}42$, $\beta\text{A} 11\text{-}42$ y anti adyuvante durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo cabra anti IgG conejo acoplado a peroxidasa (1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia (Thermo).

DOT BLOT

Se absorbieron 0.5, 1 y 2 μg de monómeros, oligómeros y péptido fibrilar (1-42, 3-42 y 11-42) a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del purificado del suero $\beta\text{A} 11\text{-}42$ y bam 10 (anticuerpo anti βA , dirigido hacia los aminoácidos 13-28) toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti IgG cabra anti conejo acoplado a peroxidasa, para bam 10 se utilizó un Anti IgG conejo anti ratón (1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia (Thermo).

XTT

En una placa de 96 pozos se sembraron 10,000 células IMR-32 (neuroblastoma) en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico-antimicótico. Las células se dejaron diferenciar con 1mM de dibutilil cAMP por 7 días a 37°C con 5% de CO₂. Se incubó 20 μM de anticuerpo anti-11-42 con 20uM de péptido 1-42, 3-42 y 11-42 a 37 °C durante una hora. Previo a la adición del tratamiento las células

se lavaron 4 veces con PBS se resuspendieron en 50ul de medio DMEM-F12 sin rojo de fenol. Posteriormente se les adicionaron 50ul del péptido incubado con el anticuerpo anti-11-42 y se dejó a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 h. A las 48 h se realizó el ensayo XTT, en el cual se adicionan 50ul de la mezcla comercial a cada pozo y se incubó a 37°C durante 4 h. Posteriormente se realizó la lectura de la placa a 500nm.

MAPEO DE EPÍTOPOS

Para la identificación de epítomos/mimótopos del péptido β A 11-42 se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en fagos filamentosos M13. El proceso de bioselección se realizó en 3 rondas para un formato de fase sólida. En 4 pozos de una placa de microtitulación se inmovilizó un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón a una concentración de 0.5 μ g/ pozo a 37°C por una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2 % Tween, y se bloqueó con PBS-2% leche una hora a 37°C. Después de realizar los lavados con PBS-0.2% Tween se incubó con 1:100 de suero anti β A p(E) 11-42 durante una hora a 37°C. Después de lavados los pozos se añadieron 100ul/pozo de la biblioteca comercial a una concentración de 10 E 11 pfu/ en PBS 2% Leche y se incubó a 4° C toda la noche. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2% Tween y se incubó 30 minutos con 100ul /pozo de trietilamina IM a temperatura ambiente. Se recolectó el contenido de los 4 pozos y se les adicionaron 200 μ l de Tris-HCL pH 7.4.

AMPLIFICACIÓN

En un matraz de 250 ml se infectaron 50 ml de medio 2YT con 500 μ l de un cultivo de toda la noche de E. coli TG1 . Se dejó incubar a 37°C medio ahora y se le agregó 500 μ l del eluido obtenido. Posteriormente se incubó durante 4.5 h a 37° C. Se centrifugó a 10000 rpm a 4° durante 10 minutos y el sobrenadante recuperado se precipitó con Polietilenglicol/ NaCl (PEG/NaCl), esto con la finalidad de recuperar los fagos. Esta reacción se mantuvo a 4°C toda la noche.

PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 10000 rpm a 4°C 10 minutos. EL pellet fue resuspendido en 1ml de TBS pH 7.5. La suspensión se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos y el sobrenadante se resuspendió en 150ul de PEG/NaCl. Se incubó en hielo por una hora y se centrifugo a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos. EL pellet se resuspendió en 200 µl de TBS, se volvió a centrifugar para obtener el sobrenadante y ser titulado.

TITULACIÓN DEL ELUIDO

Se sembró una colonia de TG1 en 10 ml de 2YT y se incubó en agitación hasta obtener una concentración aproximada de 10^8 células por mililitro (O.D= 0.5) En tubos de 1.5 ml se infectaron 200 µl de bacterias con 5 y 50 µl del eluido amplificado. Estos se incubaron por 30 minutos. A cada tubo se le adicionaron 15 µl de Xgal/PTG y se mezcló el volumen completo con 4ml de TOP AGAR a 45°C, la mezcla se agitó en un vortex y se vació en cajas de Petri con 10 ml de LB. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche. EL título del eluido y del amplificado se obtuvieron a partir del conteo del número de placas presentes en las cajas de cada dilución, el cual se expresa como unidades formadoras de placas por mililitro pfu/ml.

Se llevaron a cabo 3 rondas de bioselección utilizando el amplificado de la primera y segunda ronda para reiniciar el proceso. Después de la tercer ronda se obtuvieron 21 clonas individuales, las cuales fueron amplificadas y tituladas para obtener suficiente fago 10^{11} pfu/ml para evaluar su reactividad en ELISA y analizar sus secuencias.

El amplificado obtenido de las clonas individuales se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 4000 rpm. EL sobrenadante recuperado se dividió en dos: 1.2 ml se utilizó para la precipitación de fagos para evaluación en ELISA, y 1ml se utilizó para aislar DNA de cadena sencilla.

EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA

Los fagos obtenidos se precipitaron con PEG/NaCl, como previamente se ha detallado. Los Fagos aislados de las 21 clonas seleccionadas fueron evaluados por ELISA con la finalidad de determinar su reconocimiento por el suero anti β A 11-42. Para ello se sensibilizó una placa de microtitulación con un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón a una concentración de 0.5 μ g/ pozo a 37°C por una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2 % Tween, y se bloqueo con PBS-2% leche una hora a 37°C. Después de realizaron los lavados con PBS-0.2% Tween se incubó con 1:200 de suero anti β A p(E) 11-42 durante una hora a 37°C. Después de lavados los pozos se añadieron 100ul/pozo de las clonas seleccionadas a una concentración de 7×10^{10} pfu/ml en PBS 2% Leche y se incubó a 4° C toda la noche. Después de 4 lavados con PBS-0.2% Tween, se incubó una hora a 37°C con anticuerpo anti M13 diluido 1:4000. Se lavo 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo monoclonal anti IgG acoplado a peroxidasa conejo anti ratón diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

OBTENCIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA

A los sobrenadantes obtenidos tras la amplificación de las clonas se les añadió 400 μ l de PEG/NaCl y se incubó a 4°C toda la noche. Se centrifugaron a 14,000 rpm 10 minutos a 4°C. EL pellet se resuspendió en 200 μ l de buffer de ioduro de sodio/ EDTA. EL DNA se precipitó con etanol absoluto y se centrifugó a 13 000 rpm 10 minutos. El pellet se lavó con etanol al 70% y se centrifugo bajo las mismas condiciones. Finalmente el DNA se resuspendió en 15 μ l de agua milli Q. La integridad y cantidad de DNA fue evaluada mediante el corrimiento electroforético de 1ul de DNA en un gel de 0.8% de agarosa. EL gel se tiño 10 minutos con Bromuro de Etidio 0.02% y se observó en un transiluminador. La obtención de las secuencias de las clonas se obtuvo a través del kit de secuenciación Quick Denature Plasmid Sequencing Kit con dATP a-S 35, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Se cargaron 7 μ l de la mezcla de secuenciación obtenida en un gel de poliacrilamida al 8% y se corrió

por 2.5 horas a 1500V. AL término del tiempo se recuperó el gel y se permitió su secado en el secador apropiado, el secado se realizo durante 60 minutos a 80°C. Una vez seco el gel se introdujo en un cassette de exposición con una placa de rayos X, donde se guardó para su revelado después de 72 horas de exposición.

ELISA DE COMPETENCIA

En una placa de microtitulación se inmovilizó el péptido preagregado β A 11-42 en una concentración de 0.2 μ g/ pozo en 100ul de buffer de carbonatos. La placa se dejo sensibilizar a 4°C toda la noche. En tubos independientes se preincubó el purificado de inmunoglobulinas anti-11-42 en una concentración de 1 μ g/100 μ l con una concentración de E11, E10 y E9 de los fagos positivos amplificados y se dejaron interactúa a 4 ° C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween se incubó con el anticuerpo anti-11-42 preincubado con los péptidos β A por una hora a 37°C. Se lavo 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo monoclonal anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplada a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

WESTERN BLOT DE COMPETENCIA

Se realizó el corrimiento de 0.5 μ g de proteína, β A 1-42, 3-42 y 11-42, en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 40 minutos a 25V. La membrana se bloqueo con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. En tubos de 2ml se dejo incubando 1 μ g/ml de anticuerpo anti 11-42 con E9 de Fagos. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubo la membrana con el anticuerpo previamente incubado con fagos durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se lavo 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti IgG cabra anti conejo acoplado a

peroxidasa. Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia (Thermo).

RESULTADOS

EVALUACIÓN DEL SUERO ANTI β A P(E) 11-42

Para la generación de anticuerpos anti- β A p(E)11-42 se inmunizaron conejos blancos de nueva Zelanda con el péptido oligomérico β A p(E)11-42 en presencia de adyuvante de Freund. Diez días después del tercer refuerzo se realizó la sangría blanca y se aisló el suero. La reactividad del suero fue evaluada mediante el ensayo de ELISA con los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 así como con los fragmentos del péptido β A que abarcan los aminoácidos 1-16, 12-28, 17-42 y 8-42. Como control se comparó con la reactividad del suero de los conejos inmunizados con el péptido β A 1-42, 3-42 y solo adyuvante.

En la figura 1 se muestran los resultados de 3 ensayos de ELISA en los cuales se observó que el suero de los conejos inmunizados con el péptido p(E)11-42 reconoce a los 3 péptidos β A: 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42, y a los fragmentos 12-28, 17-42 y 8-42 sin reconocimiento del fragmento 1-16. EL suero del conejo inmunizado con el adyuvante no reconoció a ninguno de los péptidos. Como previamente se reportó el suero del conejo inmunizado con β A 1-42 reconoció a los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E) 11-42 y los fragmentos 8-42, 17-42 y 1-16. El suero del conejo inmunizado con β A p (E)3-42 reconoce exclusivamente al péptido p(E)3-42 como se describió previamente (Acero,2009)

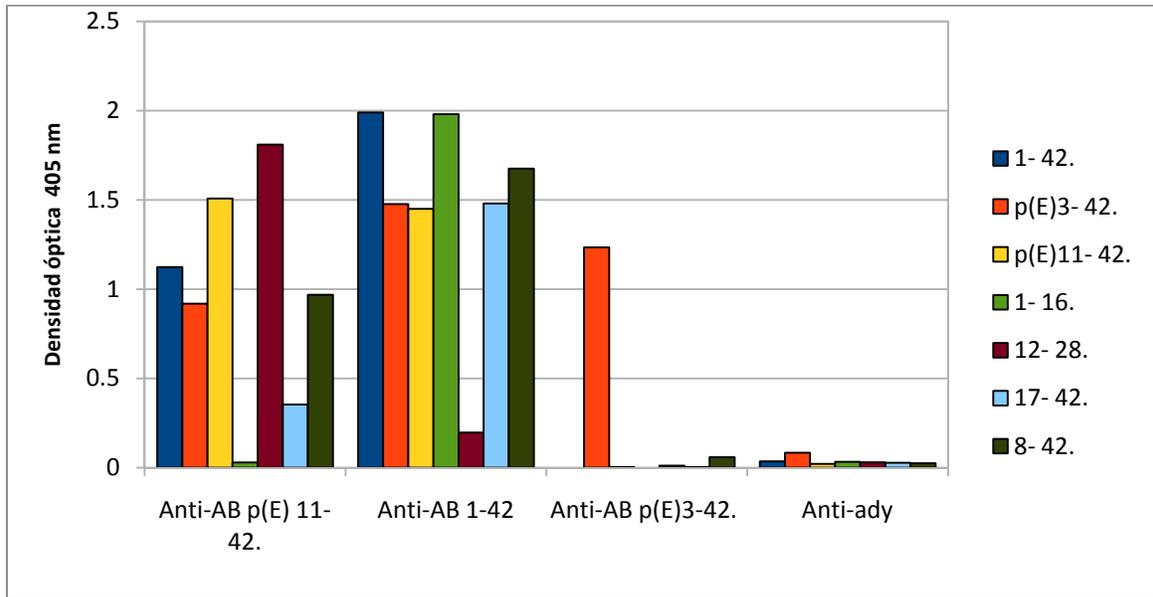


Figura 1. Reactividad por ELISA de los sueros de conejos inmunizados con el péptido β A p(E) 11-42. EL suero fue evaluado con los péptidos β A 1-42, p(E)3-42, p(E)11-42 y los fragmentos 1-16, 8-42, 12-28 y 17-42. Los sueros anti- β A 1-42, β A p(E)3-42 y anti-adyuvante fueron utilizados como control. La dilución utilizada de los sueros fue 1:200. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

La titulación del suero anti- β A p(E)11-42 se realizó utilizando 5 diluciones del suero 1:400,1:800, 1:200,1:400 y 1:8000 utilizando el péptido β A p(E)11-42 la evaluación se realizó por medio de un ensayo de ELISA. En la figura 2 se muestra la curva de titulación resultante de 3 ensayos de ELISA del suero anti- β A p(E) 11-42 con el péptido β A p(E) 11-42 donde se observa que el suero reconoce eficientemente al péptido β A p(E) 11-42 en las diluciones 1:400, 1:800 y 1:2000.

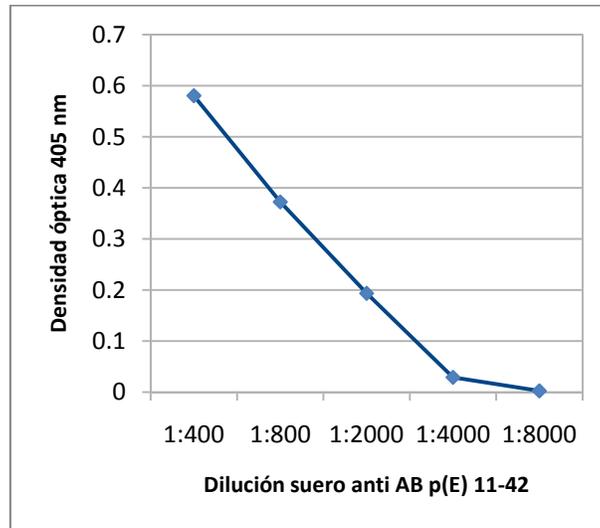


Figura 2. Titulación del suero del conejo inmunizado con el péptido β A p(E) 11-42 mediante la reactividad por ELISA con el péptido β A p(E)11-42 utilizando diluciones de 1:400, 1:800, 1:2000, 1:4000 y 1:8000. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

Se realizó la titulación del suero anti- β A p(E)11-42 utilizando los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 8-42 y 17-42. Debido a que la reactividad del suero con el péptido p(E)11-42 fue efectiva con diluciones menores a 1:4000 decidimos evaluar la reactividad del suero a diluciones de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 y 1:2000.

En la figura 3 se muestra la curva de titulación de 3 ensayos de ELISA del suero con los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42 y con los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 8-42, donde se encontró que se mantiene la reactividad con los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 y con los fragmentos 8-42, 12-28 y 17-42 en las diluciones 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1000. Con la dilución 1:2000 solo se dio el reconocimiento del péptido β A p(E)11-42 y del fragmento 8-42.

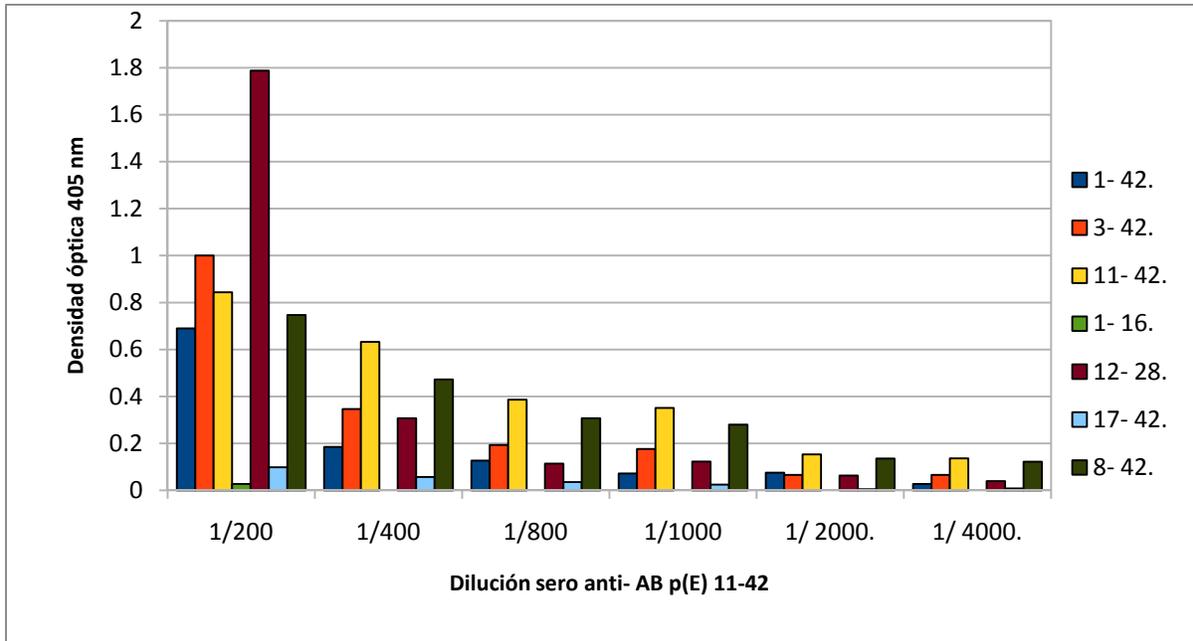


Figura 3. Titulación del Suero anti βA p(E) 11-42 mediante la reactividad en ELISA con los péptidos βA 1-42, p(E) 3-42,p(E) 11-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 y 8-42 usando diluciones seriales del suero 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 , 1:2000 y 1:4000. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes ± desviación estándar

Como control de nuestra titulación, se tituló el suero del conejo inmunizado con el péptido βA p(E)3-42, el cual reconoce específicamente al péptido p(E)3-42 y no reacciona con los otros péptidos ni fragmentos de βA. En la figura 4 se muestra la curva de titulación resultante de 3 ensayos de ELISA del suero anti βA p(E) 3-42 con diluciones 1:200, 1:400 y 1:800. En este ensayo se corroboró que el reconocimiento es específico para el péptido βA p (E) 3-42 con las 3 diluciones utilizadas.

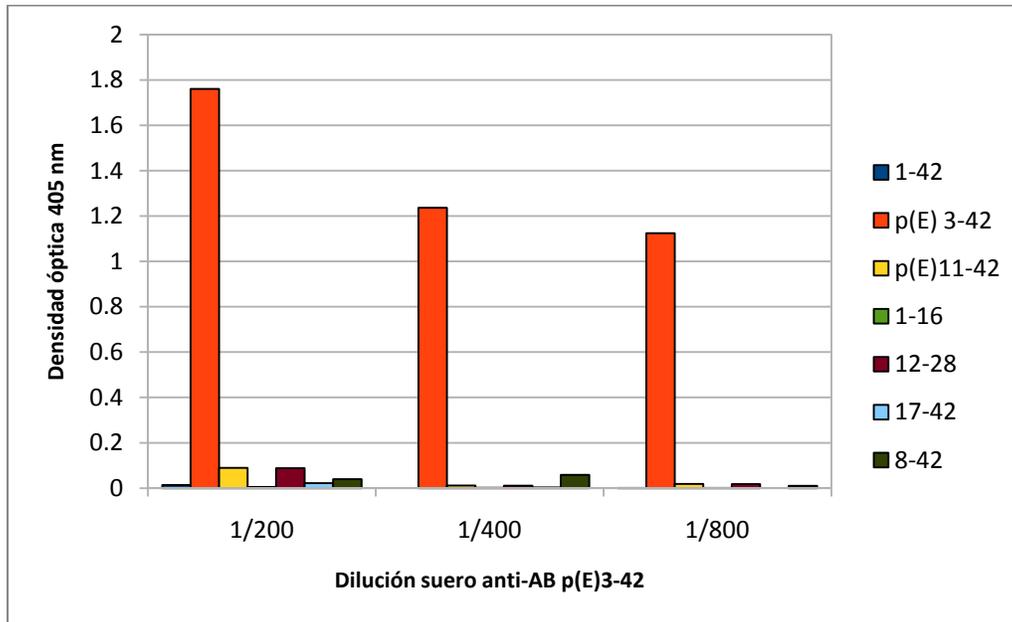


Figura 4. Titulación del suero del conejo inmunizado con el péptido con β A p(E)3-42 mediante la reactividad por ELISA con los péptidos 1-42,p(E)3-42, p(E)11-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 y8-42 mediante diluciones seriales del péptido 1:200,1:400 y 1:800. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

PURIFICACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS DEL SUERO ANTI β A P(E) 11-42

Purificamos la fracción de inmunoglobulinas contenidas en el suero anti β A p (E)11-42 por medio de una columna de sepharosa proteína G, la cual se une a la fracción Fc de las IgG de mamífero. Las IgG retenidas en la columna fueron eluidas mediante un choque de pH. Para evaluar la pureza de la fracción de inmunoglobulinas se realizó un Western Blot revelando con anticuerpo cabra anti- IgG de conejo acoplado a peroxidasa. En la figura 5 se muestra la fracción de inmunoglobulinas purificadas del suero del conejo inmunizado con el péptido β A p(E)11-42.

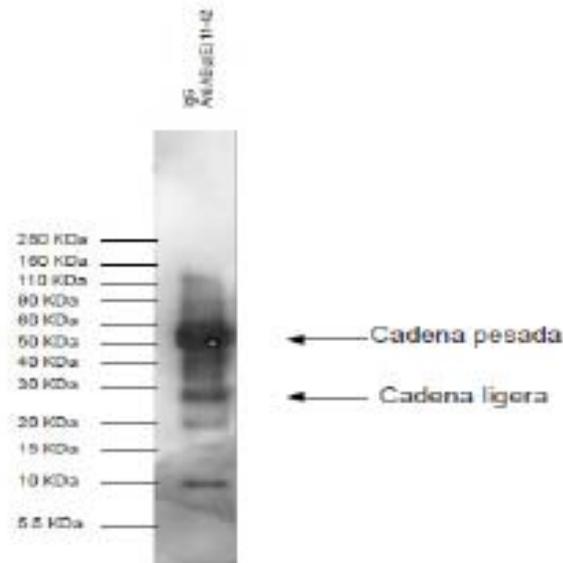


Figura 5. Western Blot fracción de inmunoglobulinas del conejo inmunizado con β A p(E)11-42

EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ANTI β A p(E) 11-42

Posteriormente se evaluó la reactividad de la fracción de inmunoglobulinas purificadas del suero del conejo inmunizado con β A p(E)11-42 por medio de un ensayo de ELISA con los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 y los fragmentos 1-16, 8-42,12-28 y 17-42. Como control se utilizó la fracción de inmunoglobulinas purificadas del suero del conejo inmunizado con solo adyuvante y la del conejo inmunizado con β A p(E)3-42.

En la figura 6 se muestran los resultados de 3 ensayos de ELISA donde se encontró que los anticuerpos anti β A p(E)11-42 reconocen a los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E)11-42 y los fragmentos 12-28, 8-42 y 17-42. El fragmento 1-16 no es reconocido. Los anticuerpos anti β A p(E)3-42 reconocen exclusivamente al péptido p(E)3-42, mientras que la fracción de inmunoglobulinas Anti- adyuvante no reconocen a ninguno de los péptidos.

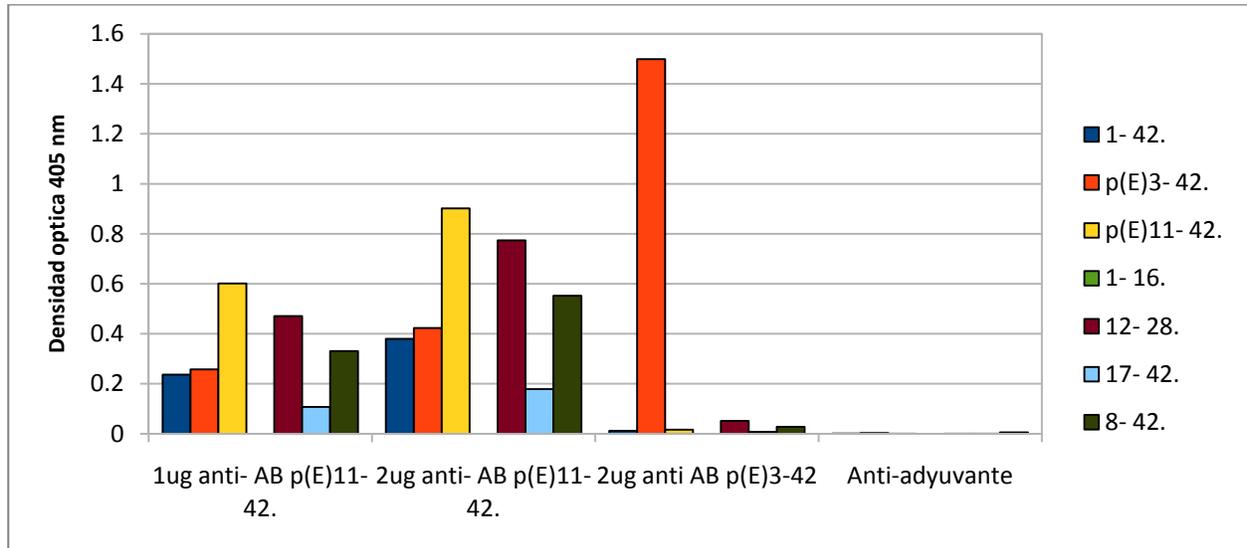


Figura 6. Reactividad por medio de ELISA de los anticuerpo anti β A p(E)11-42, p(E)3-42 y adyuvante contra los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42, p(E) 11-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 y 8-

42. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

La titulación del purificado de inmunoglobulinas obtenido del suero anti β A p(E) 11-42 realizamos se realizó utilizando 1, 2, 4, y 8 μ g de inmunoglobulinas por pozo en un ensayo de ELISA con los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 y los fragmentos 1-16, 12-18 y 17-42.

En la figura 7 se muestra la curva de titulación resultante de 3 ensayos de ELISA donde se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti β A p(E)11-42 con los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E)11-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 y 8-42. En esta titulación se observó que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen a los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42, p(E) 11-42 y los fragmentos 12-28, 17-42 y 8-42 a concentraciones de 1-8 μ g por pozo.

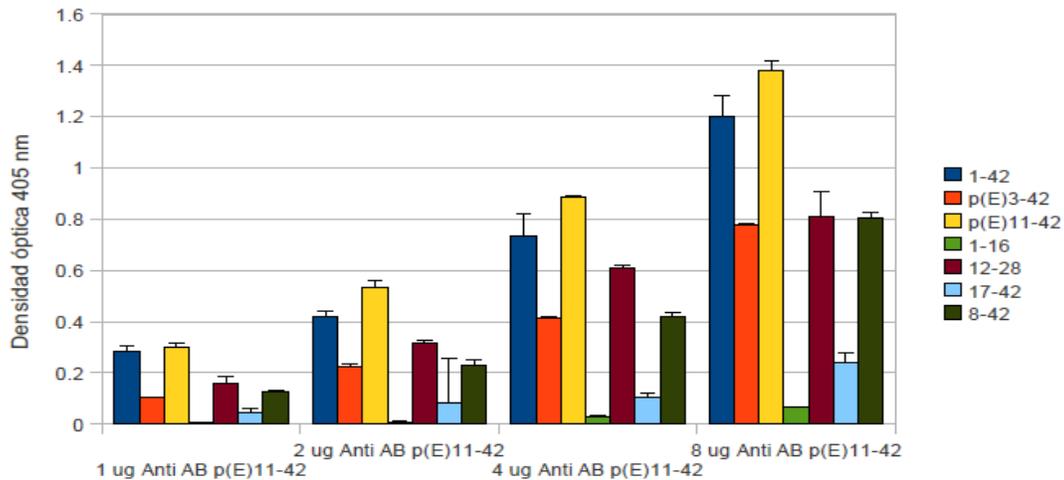


FIGURA 7. Titulación de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 mediante la reactividad por ELISA con los péptidos β A 1-42,p(E)3-42,p(E) 11-42 y los fragmentos 1-16, 12-28, 17-42 y 8-42.

Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

ELISA DE COMPETENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β A p(E)11-42

Para poder confirmar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos anti β A p(E)11-42 hacia las variantes del péptido β A se realizó un ensayo de ELISA de competencia, el cual, evalúa la interacción antígeno-anticuerpo en solución. Este ensayo evalúa la capacidad de los diferentes péptidos de bloquear la interacción del anticuerpo anti β A p(E)11-42 con el β A p(E)11-42 inmovilizado.

En la figura 8 se muestra los resultados del ELISA de competencia. Se encontró que la preincubación de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 con el péptido β A p(E)11-42 inhibe el reconocimiento en un 70-90% de forma dosis-dependiente. EL fragmento 12-28 inhibe entre el 50-70%, seguido de los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y el fragmento 17-42 que inhiben entre un 20-50%. El fragmento 1-16 no inhibe la reacción. Por lo que se determinó que los anticuerpos anti β A p(E)11-42 reconocen a los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 y los fragmentos 8-42, 12-28 y 17-42, sin reconocer el fragmento 1-16, porción amino terminal del péptido β A.

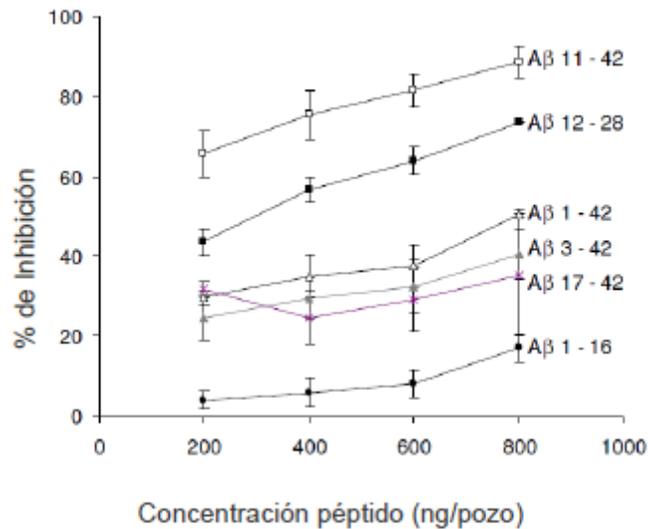


Figura 8. ELISA de competencia de anticuerpo anti p(E) -11-42 preincubado con péptidos β A 1-42 p(E)11-42, p(E)3-42 y los fragmentos 1-16, 8-42, 12-18 y 17-42 en una placa de ELISA previamente incubada con 200 ng de β A p(E)11-42. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar

EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE AGREGACIÓN DE LOS PÉPTIDOS β A 1-42, p(E) 3-42 Y p(E)11-42 POR LOS ANTICUERPOS ANTI β A p(E)11-42

Con la finalidad de evaluar los estados de agregación de los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E) 11-42 que son reconocidos por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 se realizó un Western blot con los oligómeros de los 3 péptidos.

En la figura 9 se muestra el Western Blot de los péptidos β A p(E)3-42, p(E) 11-42 (A) y 1-42 (B) revelados con los anticuerpos anti β A p(E)11-42. Como control se utilizó el anticuerpo comercial 4G8, el cual va dirigido contra los aminoácidos 17-24 del péptido β A. Dicho anticuerpo reconoce a los 3 péptidos en sus diferentes estados de agregación. Mediante el revelado con el anticuerpo 4G8 corroboramos que nuestras preparaciones de

oligómeros de los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42 estaban conformadas por monómeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de bajo peso molecular.

Por medio del Western Blot encontramos que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen todas las formas de agregación de los péptidos β A p(E) 3-42 y p(E) 11-42 (A), sin embargo solo reconocen a los oligómeros de β A 1-42. Los anticuerpos anti β A p(E)11-42 no reconocen al monómeros del péptido β A 1-42 .

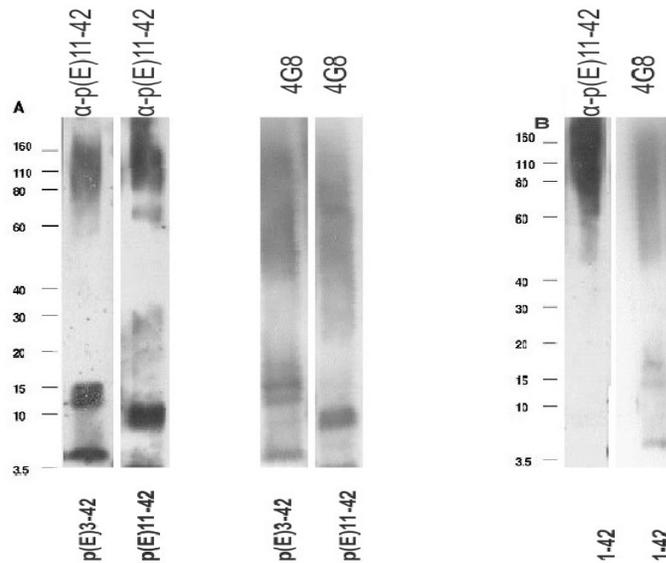


Figura 9. Western Blot de los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42, revelados con 4G8 y con los anticuerpos anti β A p(E)11-42. A) Péptidos p(E) 3-42 y p(E)11-42 revelados con α 11-42 y 4G8 (anti extremo β A1-42) b) Péptido β A 1-42 revelado con α 11-42 y 4G8

DOT BLOT

Para corroborar la falta de reconocimiento de los monómeros del péptido β A 1-42 por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 realizamos un dot blot. Primero realizamos preparaciones de monómeros de los péptidos β A 1-42, p(E)3-42 y p(E) 11-42 mediante la resuspensión de los péptidos sintéticos en DMSO. Para corroborar que la

preparación estuviera compuesta de monómeros y no hubiese contaminación por oligómeros realizamos un Western BloT. En la figura 10 se muestra el Western Blot de las preparaciones de monómeros de las tres especies de β A, revelado con el anticuerpo monoclonal anti β A bam 90.

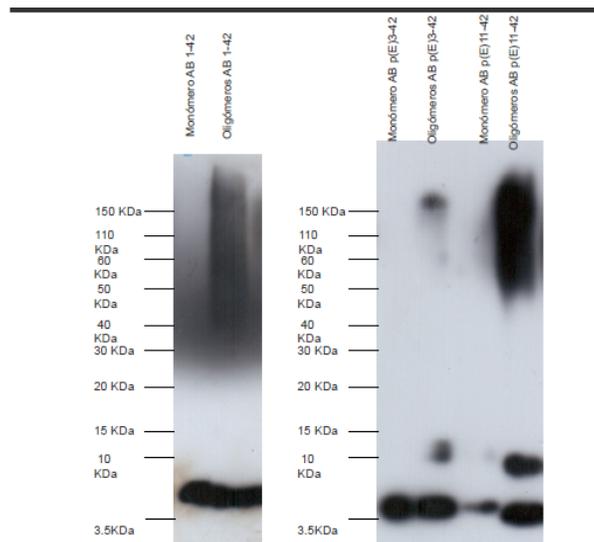


Figura 10. Western Blot de las preparaciones de monómeros y oligómeros de los péptidos β A 1-42, 3-42 y 11-42, revelados con el anticuerpo monoclonal bam 90.

Una vez confirmado que nuestra preparación solo contenía monómeros, realizamos el Dot Blot. Para ello adsorbimos a una membrana de PVDF 0.5 μ g del péptido y la revelamos con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42. Como control se utilizaron los anticuerpos anti β A 1-42 y anti β A p (E) 3-42

En la figura 11 se muestra el Dot Blot en el cual encontramos que los anticuerpos anti β A 1-42 reconocen a los monómeros del péptido β A 1-42 y p (E) 3-42, sin reconocer al monómero de β A p(E) 11-42 (B). Los anticuerpos anti β A p(E) 3-42 reconocen exclusivamente a los monómeros del péptido β A p(E) 3-42. Finalmente confirmamos

que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen a los monómeros del péptido β A p(E) 3-42 y β A p(E) 11-42, sin reconocer al monómero de β A 1-42 (D).

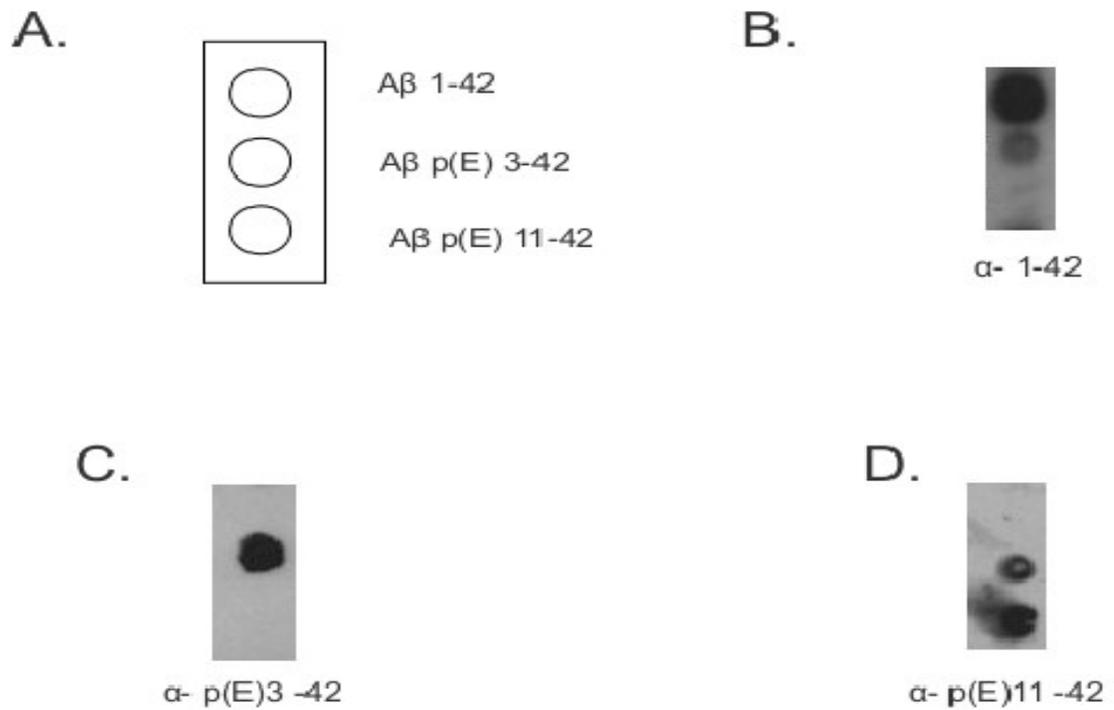


Figura 11. DOT Blot de los Monómeros del péptido β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 revelados con B) α -1-42, c) α - 3-42 y d) α -11-42

Para confirmar que la falta de reconocimiento de los monómeros por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 no se debiera a la falta de péptido en la membrana, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal bam90, anticuerpo monoclonal que reconoce a lo monómeros de β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42. En la figura 12 se

muestra el resultado de las 3 membranas utilizadas que adsorbieron los monómeros de las 3 especies de β A: β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42.

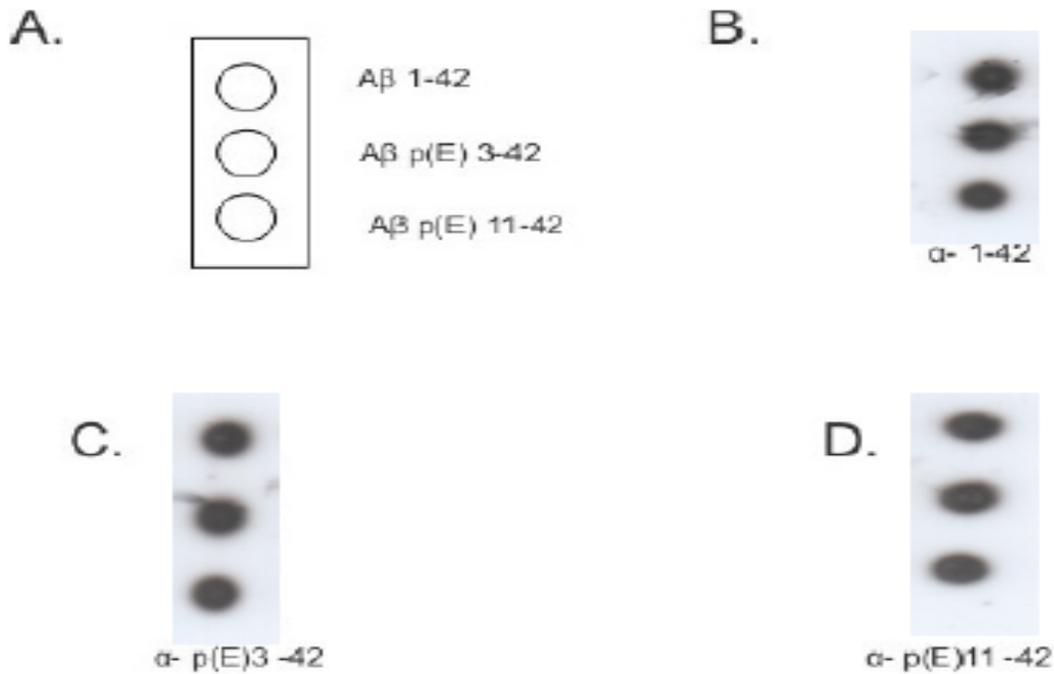


Figura 12. DOT Blot de los Monómeros del péptido β A 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 revelados con bam 90

RECONOCIMIENTO DE LOS DEPOSITOS DE β A EN CEREBRO HUMANO POR LOS ANTICUERPOS ANTI β A p(E)11-42

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 de reconocer los agregados amiloideos encontrados en pacientes con la EA, realizamos doble inmunofluorescencia en cortes de cerebros de

pacientes con la enfermedad utilizando como control el anticuerpo anti β A bam10, anticuerpo dirigido hacia la porción aminoterminal del péptido β A 1-42. Para verificar la especificidad de los anticuerpos se realizó la inhibición del reconocimiento mediante la preincubación de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 con los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42. Como control se utilizó el fragmento del péptido 35-25.

En la figura 13 se muestra la doble inmunofluorescencia en los cortes de cerebros humanos con la EA. Encontramos que los anticuerpos anti β A p(E)11-42 reconocen los agregados amiloides presentes en los cerebros de los pacientes con EA (A Y B). Se encontró que este reconocimiento es inhibido por los péptidos p(E) 11-42 (D), p(E) 3-42 (E) y 1-42 (F).

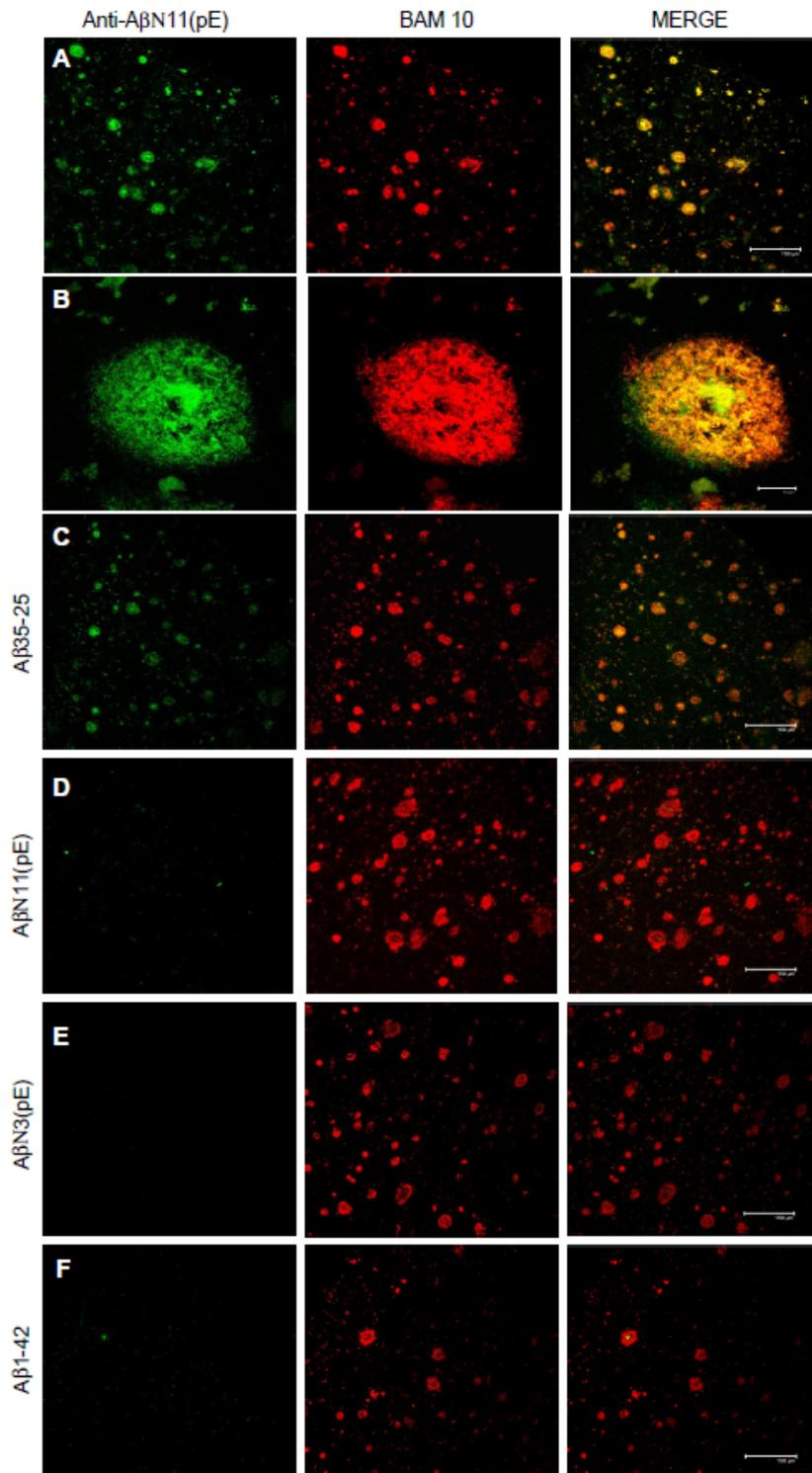


Figura 13. Reconocimiento de los agregados amiloides en cerebros de pacientes con EA por los anticuerpos anti β A p(E)11-42 (A y B) y su inhibición por los péptidos β A p(E)11-42 (D), p(E)3-

42 (E) y 1-42 (F). i

ENSAYO DE NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR OLIGÓMEROS DE BETA AMILOIDE

p(E)11-42

Con el fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos anti β A p(E)11-42 de inhibir la toxicidad inducida por los oligómeros de los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42 realizamos un ensayo de citotoxicidad en una línea de neuroblastoma humana. Para ello determinamos las concentraciones a las cuales estos péptidos reducen la viabilidad celular en cultivos de células de neuroblastoma (IMR-32) previamente diferenciadas con dBAC por 7 días. Para evaluar la viabilidad celular realizamos 3 ensayos de XTT en los cuales expusimos a las células durante 48 h a concentraciones de 10 y 20 μ M de cada péptido. Como control positivo utilizamos estaurosporina y como control negativo el péptido β A 35-25.

En la figura 14 se muestran los resultados de los 3 ensayos de XTT. Encontramos que el péptido β A 1-42 a una concentración de 10 μ M reduce la viabilidad celular en un 20% y a 20 μ M un 45%. El péptido β A p(E) 3-42 reduce la viabilidad celular en un 5% a una concentración de 10 μ M y en un 25% a 20 μ M. Finalmente encontramos que el péptido β A p(E) 11-42 reduce la viabilidad celular en un 10% a 10 μ M y en un 25% a 20 μ M. Debido a ello decidimos utilizar la concentración de 20 μ M de los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42 para realizar los ensayos de protección.

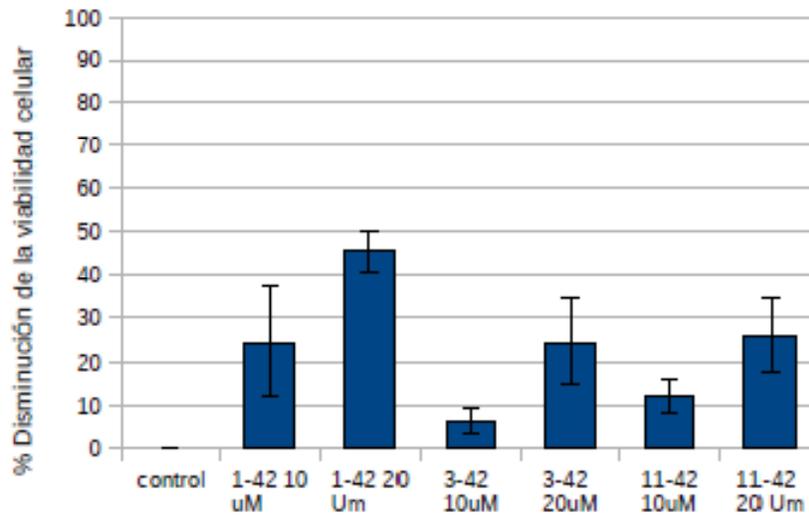


Figura 14. Evaluación de citotoxicidad inducida por los oligómeros de los péptidos β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E)11-42 en células de neuroblastoma por medio de ensayo XTT. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO β A p(E) 11-42 POR LOS ANTICUERPOS ANTI β A p(E) 11-42

Una vez determinada la concentración citotóxica del péptido β A p(E)11-42 , 20uM, evaluamos la capacidad protectora de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 para inhibir su toxicidad. En estos ensayos preincubamos durante una hora a 37°C el péptido β A p(E)11-42 con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 en una relación 1:1 Molar. Como control preincubamos el péptido con los anticuerpos anti adyuvante. Posteriormente expusimos durante 48 h a las células de neuroblastoma diferenciadas con la mezcla antígeno-anticuerpo. Para evaluar el efecto protector de los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 evaluamos la viabilidad celular mediante 3 ensayos independientes de XTT.

En la figura 15 se muestran los resultados del ensayo de inhibición de la toxicidad celular inducida por el péptido β A p(E) 11-42. La exposición a 20uM del péptido β A p(E) 11-42 redujo la viabilidad celular ente un 30-

60%. La preincubación del péptido con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 inhibió la toxicidad del péptido β A p(E) 11-42 , ya que se presentó una viabilidad celular de entre el 80-100% . La preincubación del péptido con anti adyuvante resultó en la reducción de la viabilidad celular en un 50%.

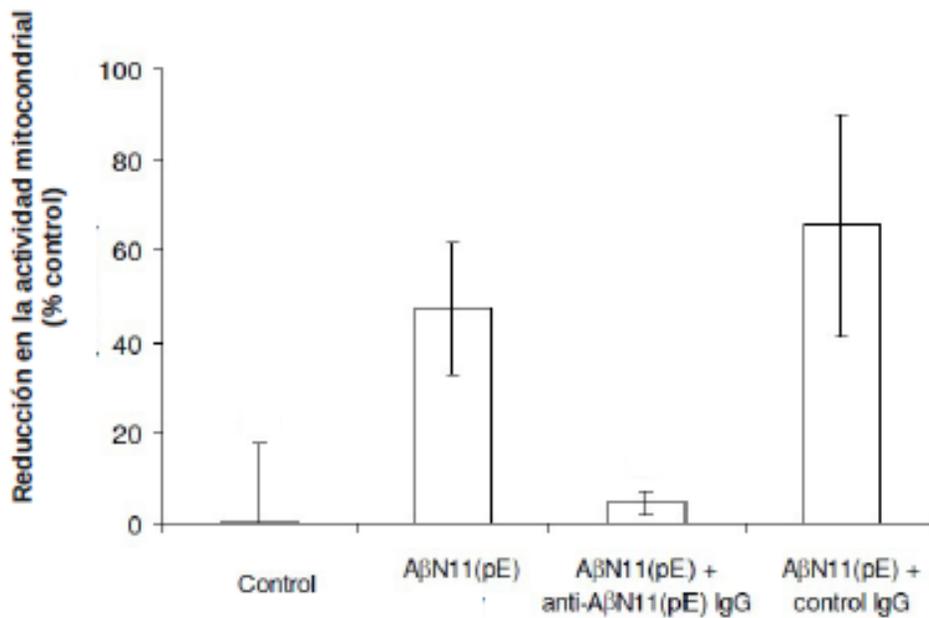


Figura 15. Viabilidad celular de células IMR-32 diferenciadas expuestas durante 48h a 20 μ M del péptido β A p(E) 11-42, p(E)11-42 preincubado con 20 μ M del a 11-42 y con anticuerpo anti adyuvante. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm error estándar.

BIOPANNING

Para identificar la región inmunodominante del péptido β A p(E)11-42 se realizaron 3 rondas de bioselección con una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en el fago filamentoso M13 con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42. En la siguiente tabla se muestra la eficiencia de cada una de las rondas de

bioselección reflejada en los títulos , representados como unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml), de los eluidos de cada ronda así como los valores de entrada, los cuales reflejan el título de la amplificación. Con cada ronda de bioselección aumenta la cantidad de clonas específicas reconocidas por el suero anti β A p(E) 11-42

Tabla I título de fagos por ronda de bioselección con el suero anti β A p(E) 11-42.

Ronda	Entrada (pfu/ml)	Salida (pfu/ml)
1	1.14E+013	9.30E+004
2	1.27E+013	3.32E+007
3	9.34E+012	8.04E+008

Los valores de entrada corresponden al valor de unidades formadoras de placas/ml tras un proceso de amplificación de las clonas seleccionadas en cada ronda.

Los valores de salida corresponden al valor de las unidades formadoras de placas / ml del eluido de las clonas seleccionadas con el suero anti β A p (E) 11-42 en cada ronda de selección.

De la tercera ronda del proceso de bioselección con el suero anti β A p(E) 11-42, se seleccionaron al azar 21 clonas, las cuales se amplificaron y titularon.

EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES CON EL SUERO ANTI β A p(E)11-42

Para determinar el reconocimiento de las clonas bioseleccionadas por el suero anti β A p(E) 11-42 se realizó un ensayo de ELISA. De las 21 clonas bioseleccionadas 11 fueron reconocidas por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42. Las clonas positivas fueron: 1,3,6,7,8,10,11,12,15,17,19. Del resto de las clonas, 10 no fueron reconocidas por los anticuerpo anti β A p (E) 11-42. En la figura 15 se muestra la reactividad de las clonas bioseleccionadas en 3 ensayos de ELISA

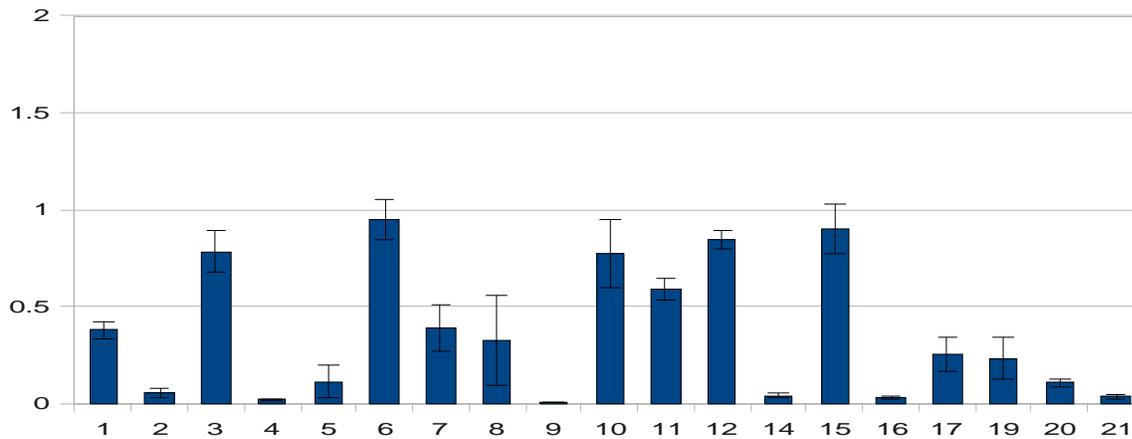


Figura 16. Reconocimiento de las Clonas bioseleccionadas por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 mediante ensayo de ELISA. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes

± desviación estándar.

SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS BIOSELECCIONADAS

Una vez determinadas las clonas reconocidas por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 se realizó su secuenciación para determinar la región inmunodominante del péptido β A p(E) 11-42. Para ello se aisló el DNA de los fagos, como descrito previamente, y se evaluó el material genético mediante el corrimiento electroforético en un

gel de Agarosa al 0.8%.



Figura 17. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Cada carril posee DNA de una clona.

Una vez purificado el DNA de las 21 clonas realizamos la secuenciación del inserto codificante del heptapéptido expresado en el fago M13 y su secuencia de aminoácidos fue determinada. En la tabla 2 se muestra la secuencia péptido de los insertos encontrados en las clonas reconocidas por los anticuerpos anti β A p(E)11-42. En función de la presencia de una secuencia consenso, las clonas pueden ser clasificadas en 3 grupos:

El primer grupo está conformado por las clonas 6, 12 y 15 las cuales contienen una secuencia rica en histidinas (H). Estas clonas comparten el motivo (Q, R, E)HHH(Q,E)H(L,P).

Esta secuencia consenso presenta homología con la porción aminoterminal del péptido β A p(E)11-42, lo que

sugiere que estas clonas corresponden a mimótopos del epítipo presente de la porción aminoterminal del péptido β A p (E) 11-42. Estas clonas poseen el mayor reconocimiento por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 en el ensayo de ELISA.

El segundo grupo está compuesto por las clonas 7,11,17 y 19, las cuales comparten el motivo K(E,G)AEA(G,D)L(S,P)F(R,Y). Este motivo presenta homología con la porción central del péptido β A p (E) 11-42, lo que sugiere que esta región corresponde a otro epítipo para las células B. Nuevamente la secuencia de heptapéptidos de estas clonas corresponden a mimótopos del péptido β A p(E) 11-42.

El tercer grupo corresponde a las clonas que no presentan una secuencia con homología al péptido β A.

Dos clonas fueron eliminadas del análisis: la clona 13 y la 18. La primera fue removida por poseer un codón de término de la traducción en su secuencia, la segunda por tener la misma secuencia que la clona 17.

Tabla 2. Secuencias y densidad óptica de las clonas positivas para el suero anti β A p(E) 11-42. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

Clona	Secuencia	DO		
1	FIDPDRM	0.3775 \pm	0.0403361	
3	SHKDDTM	0.78425 \pm	0.1100678	
6	QH HH QHL	0.9495 \pm	0.1058001	
7	KIAEAPF	0.39 \pm	0.1206842	
8	LPKTDDV	0.322 \pm	0.2311089	
10	DLLMGHP	0.7705 \pm	0.1748018	
11	EVAEGSR	0.589 \pm	0.0540432	
12	RHH H QHP	0.84575 \pm	0.0508617	
15	EHHHEHL	0.898 \pm	0.1269514	
17	KIAEALF	0.2555 \pm	0.0860717	

De igual manera analizamos las secuencias de las clonas no reconocidas por los anticuerpos anti β A p(E)11-42 mediante ensayo de ELISA. Ninguna de estas clonas presenta el motivo (Q,R,E)HHH(Q,E)H(L,P), el motivo K(E,G)AEA(G,D)L(S,P)F(R,Y) ni homología con la secuencia del péptido β A p(E) 11-42.

Tabla 3 Secuencias y densidad óptica de las clonas negativas para el suero anti β A p(E) 11-42. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

4	MPVYHRL	0.02 \pm	0
5	STYDGSD	0.11 \pm	0.08
9	DVSAIMG	0 \pm	0
14	HDDAGDY	0.04 \pm	0.02
20	TSDDED	0.11 \pm	0.02
21	LPKTDDP	0.04 \pm	0.01

ELISA DE COMPETENCIA

Para determinar el reconocimiento específico de las clonas positivas por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 se realizó un ELISA de competencia. Como control del ensayo se utilizó una clona negativa, clona 9, y 2 clonas bioseleccionadas con los anticuerpos anti β A p(E) 3-42, las cuales no son reconocidas por los anticuerpos anti β A p(E)11-42.

En la figura 18 se muestran los resultados del ELISA de competencia de la inhibición en el reconocimiento del péptido β A p(E) 11-42 por las clonas 6,12 y 15 preincubadas con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 . Encontramos que las clonas 6,12 y 15, las cuales comparten el motivo Q, R,E) HHH (Q, E) H (L, P) inhiben el reconocimiento del péptido β A p (E) 11-42 en un 50%.

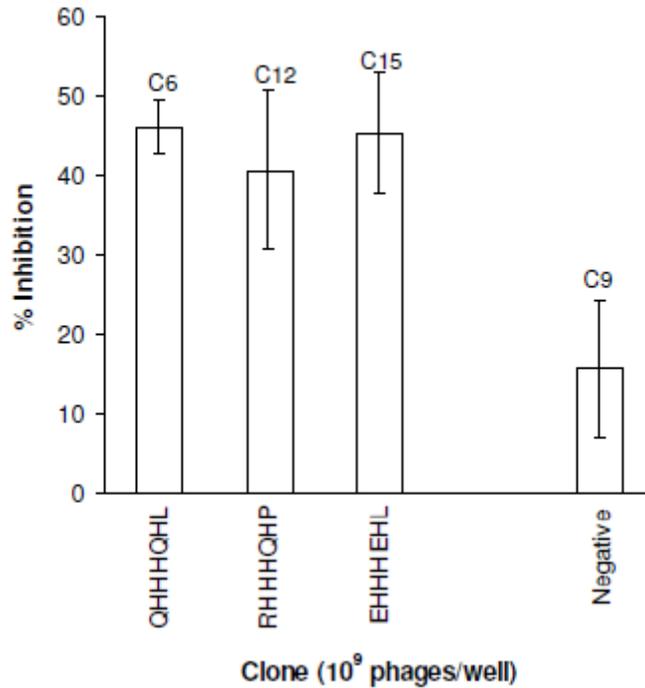


Figura18. Elisa de competencia de las Clonas Positivas 6,7,8,10,12 Y 15 en placa previamente sensibilizada con 200 ng de β A p(E)11-42. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

WESTERN BLOT DE COMPETENCIA

Para corroborar la inhibición del reconocimiento de péptido β A por las clonas bioseleccionadas realizamos un ensayo de Western Blot de competencia. Para ello transferimos a una membrana de nitrocelulosa 0.5 μ g de los oligómeros del péptido β A p(E) 11-42 e incubamos con los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 preincubado con la clona 6, la cual pertenece a la clonas con el motivo consenso (Q,R,E)HHH(Q,E)H(L,P). Como control incubamos la membrana solo con los anticuerpos anti β A p(E)11-42.

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EPÍTOPOS/MIMOTOPOS DEL PEPTIDO BA p(E)11-42 PARA LA INMUNOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la figura 19 se muestra el Western Blot de competencia donde se demostró que la clona 6 (QH HH QHL) inhibe el reconocimiento tanto de monómero, trímero, tetramero y oligómeros del péptido β A p(E) 11-42 por los anticuerpos anti β A p(E)11-42.

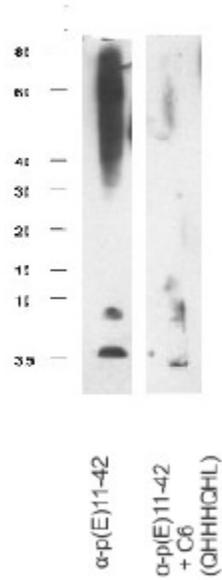


Figura 19. Western Blot de competencia de los oligómeros del péptido β A p(E)11-42 por los anticuerpos anti β A p(E)11-42 preincubado con la Clona QH HH QHL.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la principal forma de demencia en los adultos mayores de 65 años. Ésta se caracteriza por la presencia de alteraciones sinápticas, activación de la microglía, astrogliosis, hiperfosforilación de tau, generación de las marañas neurofibrilares, disminución en los neurotransmisores y muerte neuronal (Feldman,2007; Almeida,2005; Masliah,2005). A pesar de que los aspectos clave de la enfermedad no han sido clarificados, se ha demostrado que los agregados extracelulares e intraneuronales del péptido β A están involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Friedrich,2010).

La mayoría de los estudios sobre la enfermedad de Alzheimer se han enfocado en el péptido β A 1-42, sin embargo en el año 2003 Seargeant determinó que el 60% de las especies del péptido β A encontradas en los cerebros de los pacientes corresponde a especies aminotruncadas modificadas (Seargeant, 2003). Estas especies fueron identificadas en pacientes con enfermedad avanzada así como en pacientes en etapas tempranas. Debido a la alta proporción de especies aminotruncadas del péptido β A se ha propuesto que estas especies tienen un papel importante en el proceso amiloidogénico.

El péptido β A p(E) 11-42 representa alrededor del 18% de las especies del péptido en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Naslund,1994). Este péptido se caracteriza por la ciclización del glutamato en su extremo aminoterminal, lo cual le confiere resistencia a la degradación por las aminopéptidasas extracelulares (Russo,2002). Se ha reportado que las especies amino truncadas modificadas favorecen el proceso de agregación, por lo que se propone que la especie β A p(E) 11-42 juega un papel importante en el proceso de formación de los agregados tóxicos del péptido β A (Schlenzig, 2009).

El papel de las especies aminotruncadas modificadas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer fue corroborado a través de estudios con ratones transgénicos APP SL PS1 M146L, los cuales presentan niveles elevados de dichas especies (Casas,2004). La aparición de las especies β A N-truncadas modificadas precede a la acumulación del péptido β A 1-42 y correlaciona con la edad de aparición de la muerte neuronal hipocampal(Seargant,2003).

Todas estas evidencias posicionan a las especies aminotruncadas modificadas como blancos terapéuticos efectivos para el desarrollo de inmunoterapia para la enfermedad de Alzheimer.

En el presente trabajo caracterizamos los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 y encontramos que estos anticuerpos reconocen a las 3 principales especies del péptido β A encontrado en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer: el péptido de longitud completa β A 1-42 y las especies aminotruncadas p(E) 3-42 y p(E) 11-42. Además demostramos que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen la porción central del péptido β A de longitud completa, los residuos 12-28. La mayoría de las estrategias inmunoterapéuticas para tratar la enfermedad de Alzheimer se han enfocado en el uso del péptido β A 1-42. El aislamiento de los anticuerpos desarrollados tras la vacunación con el péptido β A 1-42 en humanos, AN1792, permitió mapear su región inmunodominante (Lee,2005). A partir de estos estudios se demostró que los anticuerpos producidos reconocen la porción aminoterminal del péptido β A 1-42, residuos 3-6 o secuencia EFRH. Estos anticuerpos dirigidos contra la porción aminoterminal reconocen el epítipo lineal por lo que no es dependiente de la conformación ni del estado de agregación (Lee, 2005). Las estrategias inmunoterapéuticas para tratar la enfermedad de Alzheimer a través de anticuerpos dirigidos hacia la porción aminoterminal del péptido β A incrementan el riesgo de desarrollar microhemorragias, por lo que el uso de anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido reduce el riesgo de manifestar este efecto secundario (Litchlen,2008).

En la actualidad sabemos que el 60% de las especies de péptido β A identificadas en cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer están conformadas por especies amino truncadas modificadas (Lee,2009). Alrededor del 20% de las especies identificadas en estos pacientes corresponde a la especie β A p(E) 11-42. La inmunización con el péptido β A 1-42 desarrolla anticuerpos que no reconocen al péptido β A p(E)11-42, debido a que este carece de la región aminoterminal, hacia la cual están dirigidos los anticuerpos desarrollados. La inmunización con el péptido amino truncado β A p(E) 3-42 resulta en la producción de anticuerpos que reconocen específicamente a dicha especie, la cual representa alrededor del 10% de las especies del péptido presentes en los cerebros de los pacientes con EA (Acero,2009).

El péptido β A p (E) 11-42 , debido a su modificación postraducciona, presenta una resistencia a la

degradación por las aminopeptidasas extracelulares, lo cual facilita su acumulación en el parénquima cerebral. Por otro lado este péptido tiene una mayor tasa de agregación como resultado de la pérdida de la región aminoterminal, lo cual facilita la formación de estructuras β plegada (Pike,1995). Estas observaciones acompañadas de su aparición en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, postulan al péptido β A p(E) 11-42 como un péptido importante en el desarrollo del proceso amiloigénico, fungiendo como centro de nucleación que favorece la formación de los agregados tóxicos característicos de la enfermedad de Alzheimer. La inmunización con el péptido β A 1-42 no desarrolla anticuerpos capaces de proteger de la toxicidad ejercida por el péptido β A p(E)11-42, mientras que la inmunización con el péptido β A p(E)11-42 permite desarrollar anticuerpos que reconozcan y protejan de las 3 principales especies de β A.

A pesar de que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen a los 3 péptidos encontrados en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, estos no reconocen todos sus estados de agregación. Los anticuerpos anti β A p(E)11-42 reconocen a los monómeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de bajo peso molecular de las especies amino truncadas β A p(E) 3-42 y p(E)11-42. Sin embargo estos anticuerpos reconocen a los oligómeros del péptido β A 1-42 sin reconocer al monómero.

La producción del péptido β A a través del corte endoproteolítico de APP es un proceso fisiológico que ocurre de manera normal en las células neuronales. En la última década se le han atribuido al monómero del péptido β A una serie de funciones fisiológicas tales como estimulador de la plasticidad sináptica y regulador de la actividad neuronal, sin embargo fue gracias a los estudios en ratones knockout para la enzima β secretasa que se determinó que el déficit en el péptido β A resulta en anomalías en el comportamiento así como en disfunciones sinápticas (Giuffrida 2010). El péptido β A no solo tiene un papel en la regulación de la actividad sináptica, también es capaz de promover un incremento en la captura de glucosa y en su metabolismo (Soucek,2003) y de favorecer la supervivencia neuronal bajo condiciones de privación trófica (Giuffred, 2009). Así mismo se ha observado que protege a las neuronas de la muerte por excitotoxicidad. Finalmente se le ha atribuido al monómero del péptido β A 1-42 una actividad antioxidante.

Actualmente la importancia de remover al monómero del péptido β A 1-42 en las estrategias

inmunoterapéuticas es controvertido. Por un lado se ha postulado que debido al papel del monómero del péptido β A en la supervivencia neuronal, plasticidad sináptica y en la formación de memoria, la remoción de dicho péptido podría ser perjudicial (Giufrida, 2010). Por otro lado sabemos que el monómero del péptido β A 1-42 encontrado en el plasma de los pacientes con la EA es removido por los anticuerpos presentes en circulación. Esta remoción favorece la salida del péptido de parénquima cerebral al plasma lo que promueve la reducción de los agregados amiloides en sistema nervioso central. Por lo que el reconocimiento del monómero por los anticuerpos podría aumentar la eficacia de la terapia.

Es importante enfatizar que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 reconocen los agregados amiloides naturales presentes en los cerebros de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, lo cual es de gran importancia ya que los mecanismos de plegamiento y acumulación del péptido β A *in vitro* no necesariamente reflejan el proceso de oligomerización presente en cerebros humanos. El reconocimiento de los agregados naturales del péptido β A por los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 sugiere que la inmunización con el péptido β A p(E) 11-42 es una estrategia terapéutica prometedora para tratar la enfermedad de Alzheimer.

En este estudio demostramos que los anticuerpos anti β A p(E) 11-42 son capaces de neutralizar el efecto tóxico de los oligómeros del péptido β A p(E) 11-42 en células de neuroblastoma humano (IMR-32) diferenciadas. Las especies aminotruncadas modificadas, conforman los agregados tóxicos encontrados en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Schlenzig, 2009). La aparición de las especies aminotruncadas modificadas concuerda con la inducción de muerte neuronal en el hipocampo de ratones transgénicos. Estas evidencias nos dictan que estas especies no solo tienen un papel importante en el proceso amiloigénico, sino que también tienen un efecto tóxico sobre las células neuronales. Es por ello que el uso de especies aminotruncadas como blancos terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer podría ser una estrategia efectiva para prevenir la degeneración neuronal, la formación de las placas difusas y la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer.

Finalmente identificamos los epítopos/ mimótopos del péptido β A p(E) 11-42 . Demostramos que el

péptido β A p(E)11-42 presenta dos epítomos para las células B. El primero se localiza en la porción aminoterminal del péptido, correspondiendo a los residuos 11-15 (EVHHQL). El segundo está localizado en la porción central del péptido, residuos aminoácidos 20-24 (AEDVG). Los insertos peptídicos de las clonas seleccionadas corresponden a mimótopos de estos epítomos, es decir son pequeños péptidos que se unen específicamente a los anticuerpos anti β A p(E)11-42 a pesar de que no coinciden con la secuencia de aminoácidos de su ligando natural. Los anticuerpos producto de la inmunización con el péptido β A p(E)11-42 están dirigidos hacia la porción central del péptido β A 1-42.

En la última década se han realizado una gran cantidad de estudios para evaluar diferentes epítomos para la inmunoterapia para tratar la enfermedad de Alzheimer. A partir de estos estudios se ha determinado el efecto de la producción de anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones del péptido β A 1-42. En el 2002 Pfeifer determinó que la inmunización de ratones transgénicos con anticuerpos dirigidos hacia la porción aminoterminal del péptido β A 1-42 duplica el riesgo de desarrollar micro-hemorragias así como su severidad (Pfeifer, 2002). Los anticuerpos dirigidos contra la porción aminoterminal del péptido β A reconocen los agregados amiloides depositados en parénquima cerebral así como los agregados amiloides adheridos a los vasos sanguíneos. En estudios realizados en ratones transgénicos se demostró que la inmunización pasiva con estos anticuerpos promueve un decremento en los agregados amiloides encontrados en parénquima cerebral acompañado de un incremento en los agregados amiloides en la vasculatura cerebral. El incremento en la angiopatía amiloide cerebral incrementa el riesgo de desarrollo de hemorragias (Racke, 2005).

Se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra la porción carboxilo terminal del péptido β A, (residuos 28-42), promueven una redistribución del péptido β A desde el parénquima cerebral a la pared de los vasos sanguíneos. Wilcock propone que esto es resultado de la actividad de la microglía sobre los agregados de β A opsonizados por el anticuerpo en su intento de eliminarlos a través de la barrera hematoencefálica (Wilcock 2004). Esta relocalización del β A se ha relacionado con un incremento en microhemorragias cerebrales.

Finalmente DeMattos propuso que los anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido β A, residuos 13-28, no reconocen las placas neuríticas características de la enfermedad de Alzheimer ni los agregados

de β A que conforman la angiopatía amiloide cerebral (DeMattos,2002). Los anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido β A secuestran al β A soluble encontrado en plasma (Demattos, 2001). A pesar de que los anticuerpos dirigidos hacia la porción central del péptido β A no reconocen los agregados en parénquima si reducen los niveles de β A en cerebro. Estos anticuerpos también revierten el déficit en memoria de los ratones transgénicos y promueven una mejoría en el aprendizaje (Dodart,2002).

Como los anticuerpos anti β A p(E)11-42 reconocen la porción central del péptido β A, estos podrían promover una eficacia terapéutica con un menor riesgo de desarrollar efectos secundarios, sin embargo, es necesario evaluar su efectividad en modelos animales.

La inmunoterapia como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer ha brindado resultados favorecedores en varios modelos animales, incluidos ratones transgénicos, primates y perros. Estudios preclínicos en ratones transgénicos mostraron que la inmunización con el péptido preagregado β A 1-42 promueve un decremento en la neuropatología de β A acompañado de mejoría cognitiva. Los resultados favorecedores encontrados en los estudios preclínicos llevaron a desarrollar el primer estudio clínico en humanos utilizando el péptido β A preagregado 1-42. En la fase I del estudio se inmunizaron 104 pacientes con el Péptido β A 1-42 preagregado en presencia de saponina como adyuvante, debido a la seguridad y tolerabilidad encontrada se decidió con la fase II del estudio. La fase II consistió en un estudio multicéntrico internacional, en el cual se deseaba evaluar la seguridad, tolerancia y eficacia clínica del péptido β A 1-42 preagregado. La administración del péptido fue terminada debido a la presencia de signos y síntomas característicos de meningoencefalitis en el 6% de los pacientes en el estudio (Orgogozo 2003). Los análisis inmunológicos de la respuesta humoral y celular de los pacientes que participaron en este estudio determinaron que no existía una correlación entre los niveles ni la especificidad de los anticuerpos desarrollados con la severidad de la encefalitis, lo cual descarta a la producción de anticuerpos anti β A como causantes de dicho efecto secundario. Sin embargo se detectó que los pacientes que desarrollaron meningoencefalitis presentaban infiltración de células T, a diferencia del resto de los pacientes inmunizados que no manifestaron una respuesta celular contra el Péptido β A (Ferrer,2004). La generación de células T autoreactivas se debe a la presencia de un epítipo para las células T en la porción media- carboxilo terminal del Péptido β A (residuos 16-42) (Munch, 2006) Es por ello que el

diseño de inmunógenos para realizar inmunoterapia para la enfermedad de Alzheimer ha explorado el uso del epítipo inmunodominante del péptido β A 1-42 excluyendo la porción carboxilo terminal reactiva para las células T. Otra forma de evitar el desarrollo de una respuesta autoinmune es el uso de mimótopos. El uso de los mimótopos tiene dos ventajas: la primera es que al no ser propios, no es necesario romper la tolerancia existente para auto antígenos. La segunda es que al estar conformados por solo 7 aminoácidos se evita la activación de células T autoreactivas específicas para β A (Schellenberg), lo cual reduce el riesgo de presentar meningoencefalitis.

EL uso de los mimótopos seleccionados en el presente trabajo puede ayudar al diseño de inmunógenos capaces de desarrollar anticuerpos que mimeticen el efecto de los anticuerpos anti β A (E)11-42, los cuales tienen las siguientes ventajas: reconocen a las 3 especies del péptido β A predominantes en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer β A 1-42 y las especies aminotruncadas β A p(E) 3-42 y p(E) 11-42, reconocen los agregados amiloides naturales presentes en cerebros humanos y neutralizan la toxicidad del péptido β A p(E) 11-42. Además al ser anticuerpos dirigidos contra la porción central del péptido β A 1-42, el riesgo de desarrollar microhemorragias se ve decrementado.

CONCLUSIONES

El uso de los mimótopos seleccionados en el presente trabajo pueden ayudar al diseño de inmunógenos capaces de desarrollar anticuerpos que mimeticen el efecto de los anticuerpos anti β A (E)11-42, los cuales tienen las siguientes ventajas: reconocen a las 3 especies predominantes en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer β A 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42, no reconoce al monómero de β A 1-42 y neutralizan la toxicidad del péptido β A p(E) 11-42. Además al ser anticuerpos dirigidos contra la porción central del péptido β A 1-42, el riesgo de desarrollar microhemorragias se ve decrementado.

El diseño de inmunógenos capaces de inducir la producción de anticuerpos que reconozcan a las 3 principales especies de β A presentes en cerebros de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer puede aumentar la eficacia de la inmunoterapia, ya que solamente el 0.1% de los anticuerpos presentes en circulación son capaces de entrar al sistema nerviosa central.

REFERENCIAS

1. Abbas A. ,1991,Cellular and molecular immunology, University of California-San Francisco
2. Acero, G.; Manoutcharian, K.; Vasilevko, V.; Munguia, M. E.; Govezensky, T.; Coronas, G.; Luz-Madrigal, A.; Cribbs, D. H. ,Gevorkian, G.,2009,Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Abeta-specific antibodies produced in rabbits J Neuroimmunol, 213, 39-46
3. Alafuzoff, I.; Thal, D.; Arzberger, T.; Bogdanovic, N.; Al-Sarraj, S.; Bodi, I.; Boluda, S.; Bugiani, O.; Duyckaerts, C. , Gelpi, E, 2009, Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium Acta Neuropathologica, 117, 309-320
4. Almeida, C. G.; Tampellini, D.; Takahashi, R. H.; Greengard, P.; Lin, M. T.; Snyder, E. M. , Gouras, G. K.,2005,Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses,Neurobiol Dis, 20, 187-98
5. Attems, J. , Jellinger, K, 2005, Alzheimer's disease pathology influences severity and topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy,Acta Neuropathol, 110, 222-231
6. Aveleyra, E. , E., G.,1998, Características neuropsicológicas y genéticas de la enfermedad de Alzheimer,Salud Mental, 208, 21, 64-71
7. Bard, F.; Barbour, R.; Cannon, C.; Carretto, R.; Fox, M.; Games, D.; Guido, T.; Hoenow, K.; Hu, K.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, C.; Lee, M.; Motter, R.; Nguyen, M.; Reed, A.; Schenk, D.; Tang, P.; Vasquez, N.; Seubert, P. , Yednock, T., 2003, Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology,Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 2023-8
8. Bard, F.; Cannon, C.; Barbour, R.; Burke, R. L.; Games, D.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Nguyen, M.; Soriano, F.; Vasquez, N.; Weiss, K.; Welch, B.; Seubert, P.; Schenk, D. , Yednock, T.,2000,Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nat Med, 6, 916-9
9. Benjannet, S.; Cromlish, J. A.; Diallo, K.; Christien, M. , Seidah, N. G., 2004, The metabolism of beta-

- amyloid converting enzyme and beta-amyloid precursor protein processing, *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 235-42
10. Billings, L.; Oddo, S.; Green, K.; McGaugh, J. , LaFerla, F., 2005, Intra-neuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice, *Neuron*, Elsevier, 45, 675-688
 11. Bitan, G.; Vollers, S. S. , Teplow, D. B., 2003, Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization, *J Biol Chem*, 278, 34882-9
 12. Braak, E.; Braak, H. , Mandelkow, E. M., 1994, A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads, *Acta Neuropathol*, 87, 554- 67
 13. Brody, D. L. , Holtzman, D. M., 2008, Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders, *Annu Rev Neurosci*, 31, 175-93
 14. Broersen, K.; Rousseau, F. , Schymkowitz, J., 2010, The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation?, *Alzheimers Res Ther*, 2, 12
 15. Brookmeyer, R.; Corrada, M.; Curriero, F. , Kawas, C., 2002, Survival following a diagnosis of Alzheimer disease, *Archives of neurology*, *Am Med Assoc*, 59, 1764-67
 16. Bruunsgaard, H.; Pedersen, M. , Pedersen, B. K., 2001, Aging and proinflammatory cytokines, *Curr Opin Hematol*, 8, 131-6
 17. Burbach, G. J.; Vlachos, A.; Ghebremedhin, E.; Turco, D. D.; Coomaraswamy, J.; Staufenbiel, M.; Jucker, M. , Deller, T., 2007, Vessel ultrastructure in APP23 transgenic mice after passive anti-A β immunotherapy and subsequent intracerebral hemorrhage, *Neurobiol Aging*, 28, 202-12
 18. Buttini, M.; Masliah, E.; Barbour, R.; Grajeda, H.; Motter, R.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Seubert, P.; Freedman, S.; Schenk, D., 2005, Beta-Amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease, *The Journal of neuroscience*, *Society for Neuroscience*, 25, 9096-9106
 19. Casas, C.; Sergeant, N.; Itier, J.-M.; Blanchard, V.; Wirths, O.; van der Kolk, N.; Vingtdoux, V.; van de Steeg, E.; Ret, G.; Canton, T.; Drobecq, H.; Clark, A.; Bonici, B.; Delacourte, A.; Benavides, J.; Schmitz, C.; Tremp, G.; Bayer, T. A.; Benoit, P. , Pradier, L., 2004, Massive CA1/2 neuronal loss with intra-neuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model, *Am J Pathol*, 165, 1289-300
 20. Charalambous, B. , Feavers, I., 2001, Mimotope vaccines, *J Med Microbiol*, 50, 937-939

21. Citron, M., 2004, Strategies for disease modification in Alzheimer's disease, *Nat Rev Neurosci*, 5, 677-85
22. Claassen, A.; Guévremont, D.; Mason-Parker, S.; Bourne, K.; Tate, W.; Abraham, W. , Williams, J., 2009, Secreted amyloid precursor protein-[alpha] upregulates synaptic protein synthesis by a protein kinase G-dependent mechanism, *Neuroscience letters*, Elsevier, 460, 92-9
23. Crisby, M.; Carlson, L. A. , Winblad, B., 2002, Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 16, 131-6
24. DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Dodart, J. C.; Paul, S. M. , Holtzman, D. M., 2001, Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8850-5
25. DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Paul, S. M. , Holtzman, D. M, 2002, Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease, *Science*, 295, 2264-7
26. Carlo, M. D., 2010, Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways, *Eur Biophys J*, 39, 877-88
27. Dodart, J.; Bales, K.; Gannon, K.; Greene, S.; DeMattos, R.; Mathis, C.; DeLong, C.; Wu, S.; Wu, X. , Holtzman, D., 2002, Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model, *Nature Neuroscience*, Nature Publishing Group, 5, 452-457
28. Duyckaerts, C.; Delatour, B. , Potier, M., 2009, Classification and basic pathology of Alzheimer disease, *Acta Neuropathologica*, Springer, 118, 5-36
29. Engler, H.; Forsberg, A.; Almkvist, O.; Blomquist, G.; Larsson, E.; Savitcheva, I.; Wall, A.; Ringheim, A.; Langstram, B. , Nordberg, A., 2006, Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease, *Brain*, 129, 2856-66
30. Feldman, H., 2007 ,Atlas of Alzheimer's Disease Informa Healthcare
31. Ferrer, I.; Rovira, M. B.; Guerra, M. L. S.; Rey, M. J. , Costa-Jussa, F., 2004, Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease, *Brain Pathol*, 14, 11-20
32. Friedrich, R. P.; Tepper, K.; Ranicke, R.; Soom, M.; Westermann, M.; Reymann, K.; Kaether, C. , Frendrich, M., 2010, Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta

- pathogenicity, Proc Natl Acad Sci U S A, 107, 1942-7
33. Gandy, S., 2005, The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease, *J Clin Invest*, 115, 1121-9
 34. Geling, A.; Steiner, H.; Willem, M.; Bally-Cuif, L. , Haass, C., 2002, A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish, *EMBO Rep*, 3, 688-94
 35. Gershoni, J.; Roitburd-Berman, A.; Siman-Tov, D.; Freund, N. , Weiss, Y., 2007, Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines, *BioDrugs, Adis International*, 21, 145-156
 36. Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E. Offen, D., 2003, Antioxidant treatment in Alzheimer's disease: current state, *J Mol Neurosci*, 21, 1-11
 37. Gilman, S.; Koller, M.; Black, R. S.; Jenkins, L.; Griffith, S. G.; Fox, N. C.; Eisner, L.; Kirby, L.; Rovira, M. B.; Forette, F. ; Orgogozo, J.-M, 2005, Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial, *Neurology*, 64, 1553-62
 38. Giuffrida, M. L.; Caraci, F.; Bona, P. D.; Pappalardo, G.; Nicoletti, F.; Rizzarelli, E. , Copani, A., 2010, The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology, *Rev Neurosci*, 21, 83-93
 39. Giuffrida, M. L.; Caraci, F.; Pignataro, B.; Cataldo, S.; Bona, P. D.; Bruno, V.; Molinaro, G.; Pappalardo, G.; Messina, A.; Palmigiano, A.; Garozzo, D.; Nicoletti, F.; Rizzarelli, E. , Copani, A., 2009, Beta-amyloid monomers are neuroprotective, *J Neurosci*, 29, 10582-7
 40. Glenner, G. G. , Wong, C. W., 1984, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 885-90
 41. Gouras, G.; Almeida, C. , Takahashi, R., 2005, Intraneuronal A [beta] accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging*, 26, 1235-1244
 42. Gouras, G.; Tampellini, D.; Takahashi, R. , Capetillo-Zarate, E., 2010, Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimers disease, *Acta NeuroKim, K. I. L. G. Y. C. T. K. S. , Grundke-Iqbal, H. M. W.*, 1989, Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease, *PNAS*, 86, 2853-7
 43. Gruschus, J. M., 2008, Do amyloid oligomers act as traps for misfolded proteins? A hypothesis, *Amyloid*, 15, 160-5

44. Gunn, A. P.; Masters, C. L. , Cherny, R. A., 2010, Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1915-8
45. Haass, C. , Selkoe, D. J., 1993, Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide, *Cell*, 75, 1039-42
46. Hardy, J. A. , Higgins, G. A.,1992, Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, 256, 184-5
47. Hawkes, C. , McLaurin, J., 2008,Clinical immunotherapy trials in Alzheimer's disease,*Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 5, 177-183
48. He, W. , Barrow, C., 1999, The AB 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length AB, *Biochemistry*, ACS Publications, 38, 10871-10877
49. Higgins, L. S.; Murphy, G. M.; Forno, L. S.; Catalano, R. , Cordell, B., 1996, P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain, *Am J Pathol*,149, 585-96
50. Huang, K.-F.; Liu, Y.-L.; Cheng, W.-J.; Ko, T.-P. , Wang, A. H.-J.,2005, Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation,*Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13117-22
51. Huse, J. T.; Liu, K.; Pijak, D. S.; Carlin, D.; Lee, V. M.-Y. , Doms, R. W., 2002, Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain, *J Biol Chem*, 277, 16278-84
52. Iwatsubo, T.; Saido, T. C.; Mann, D. M.; Lee, V. M. , Trojanowski, J. Q., 1996, Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques, *Am J Pathol*, 149, 1823-30
53. Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M. , Shlomchik, M., 2005 , *Immunobiology* Churchill Livingstone
54. Janus, C.; Pearson, J.; McLaurin, J.; Mathews, P. M.; Jiang, Y.; Schmidt, S. D.; Chishti, M. A.; Horne, P.; Heslin, D.; French, J.; Mount, H. T.; Nixon, R. A.; Mercken, M.; Bergeron, C.; Fraser, P. E.; George-Hyslop, P. S. , Westaway, D., 2000, A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and

- plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature*, 408, 979-82
55. Kehoe, J. W. , Kay, B. K.,2005, Filamentous phage display in the new millennium, *Chem Rev*, 105, 4056-72
56. Klein, W. L.,2002, Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets, *Neurochem Int*, 41, 345-52
57. Kumar-Singh, S.; Jonghe, C. D.; Cruts, M.; Kleinert, R.; Wang, R.; Mercken, M.; Strooper, B. D.; Vanderstichele, H.; L'ŕfgren, A.; Vanderhoeven, I.; Backhovens, H.; Vanmechelen, E.; Kroisel, P. M. , Broeckhoven, C. V., 2000, Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease, *Hum Mol Genet*, 9, 2589-98
58. LaFerla, F. M.; Green, K. N. , Oddo, S.,2007, Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease, *Nat Rev Neurosci*, 8, 499-509
59. Le, T.; Crook, R.; Hardy, J. , Dickson, D.,2001, Cotton wool plaques in non-familial late-onset Alzheimer disease,*Journal of Neuropathology* , *Experimental Neurology*, 60, 105
60. Lee, E. B.; Skovronsky, D. M.; Abtahian, F.; Doms, R. W. , Lee, V. M.-Y.,2003, Secretion and intracellular generation of truncated Abeta in beta-site amyloid-beta precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons, *J Biol Chem*, 278, 4458-66
61. Lee, M.; Bard, F.; Johnson-Wood, K.; Lee, C.; Hu, K.; Griffith, S. G.; Black, R. S.; Schenk, D. , Seubert, P.,2005, Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies, *Ann Neurol*, 58, 430-5
62. Lemere, C. A. , Masliah, E., 2010, Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy?, *Nat Rev Neurol*, 6, 108-19
63. Li, H.; Nookala, S. , Re, F., 2007, Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release, *J Immunol*, 178, 5271-6
64. Li, M.; Chen, L.; Lee, D. H. S.; Yu, L.-C. , Zhang, Y.,2007, The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease, *Prog Neurobiol*, 83, 131-9
65. Li, Q.; Cao, C.; Chackerian, B.; Schiller, J.; Gordon, M.; Ugen, K. E. , Morgan, D.,2004, Overcoming antigen masking of anti-amyloidbeta antibodies reveals breaking of B cell tolerance by virus-like particles

- in amyloidbeta immunized amyloid precursor protein transgenic mice, *BMC Neurosci*, 5, 21
66. Li, S.; Hong, S.; Shepardson, N. E.; Walsh, D. M.; Shankar, G. M. , Selkoe, D.,2009, Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake,*Neuron*, 62, 788-801
67. Lichtlen, P. , Mohajeri, M. H.,2008,Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools,*J Neurochem*, 104, 859-74
68. Lippa, C. F.; Saunders, A. M.; Smith, T. W.; Swearer, J. M.; Drachman, D. A.; Ghetti, B.; Nee, L.; Pulaski-Salo, D.; Dickson, D.; Robitaille, Y.; Bergeron, C.; Crain, B.; Benson, M. D.; Farlow, M.; Hyman, B. T.; George-Hyslop, S. P.; Roses, A. D. , Pollen, D. A.,1996,Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway,*Neurology*, 46, 406-12
69. Liu, K.; Doms, R. W. , Lee, V. M.-Y.,2002, Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression, *Biochemistry*, 41, 3128-36
70. Mangialasche, F.; Kivipelto, M.; Mecocci, P.; Rizzuto, D.; Palmer, K.; Winblad, B. , Fratiglioni, L.,2010, High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age,*J Alzheimers Dis*, 20, 1029-37
71. Martinez-Castillo, E. , Fernández, A.,2001, Neuropsicología de la memoria: aplicaciones al estudio de la enfermedad de Alzheimer, *Revista de psicología general y aplicada*, 201, 54, 17-29
72. Masliah, E, 2005, Remembering in Alzheimer's disease: the "Bobs" at the turn of the new century, *Alzheimers Dement*, 1, 82
73. Mehra, V.; Sweetser, D. , Young, R. A.,1986, Efficient mapping of protein antigenic determinants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7013-7
74. McLean, C.; Cherny, R.; Fraser, F.; Fuller, S.; Smith, M.; Beyreuther, K.; 1999, Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease *Ann Neurol*, 46, 860-6
75. Miravalle, L.; Calero, M.; Takao, M.; Roher, A. E.; Ghetti, B. , Vidal, R.,2005, Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques, *Biochemistry*, 44, 10810-21
76. Morgado, I.,2005,Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes,*Rev*

- Neurol, 40, 289-97
77. Morgan, D.; Diamond, D.; Gottschall, P.; Ugen, K.; Dickey, C.; Hardy, J.; Duff, K.; Jantzen, P.; DiCarlo, G.; Wilcock, D. ,2000,Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature*, Nature Publishing Group, 408, 982-985
78. Morris, J.; Storandt, M.; McKeel, D.; Rubin, E.; Price, J.; Grant, E. , Berg, L.,1996, Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in ``normal"aging, *Neurology*, AAN Enterprises, 46, 707
79. Muller, T.; Meyer, H. E.; Egensperger, R. , Marcus, K.,2008,The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease, *Prog Neurobiol*, 85, 393-406
80. Nagy, Z, 2005, The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Journal of cellular and molecular medicine*, Wiley Online Library,9, 531-541
81. Näslund J, Schierhorn A, Hellman U , Lannfelt L , Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J , Gandy S E, Winblad B, Greeng, 1994, Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8378-82
82. Nelson, P.; Braak, H. , Markesbery, W.,2009, Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, NIH Public Access, 68, 1
83. Perez-Garmendia, R.; Ibarra-Bracamontes, V.; Vasilevko, V.; Luna-Muñoz, J.; Mena, R.; Govezensky, T.; Acero, G.; Manoutcharian, K.; Cribbs, D. H. , Gevorkian, G., 2010, Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological AB species: relevance for immunotherapy,*J Neuroimmunol*, 229, 248-55
84. Perry, G., 2006 , Alzheimer's disease: A century of scientific and clinical research Ios Pr Inc
85. Pfeifer, M.; Boncristiano, S.; Bondolfi, L.; Stalder, A.; Deller, T.; Staufenbiel, M.; Mathews, P. M. , Jucker, M.,2002, Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy, *Science*, 298, 1379
86. Pike, C. J.; Overman, M. J. , Cotman, C. W.,1995, Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro, *J Biol Chem*, 270, 23895-8
87. Pimplikar, S., Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease, *The international journal*

- of biochemistry , cell biology, Elsevier, 41, 1261-1268
88. Portelius, E.; Zetterberg, H.; Gobom, J.; Andreasson, U. , Blennow, K.,2008,Targeted proteomics in Alzheimer's disease: focus on amyloid-beta, *Expert Rev Proteomics*, 5, 225-37
89. Prasher, V. P.; Farrer, M. J.; Kessling, A. M.; Fisher, E. M.; West, R. J.; Barber, P. C. , Butler, A. C.,1998, Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome,*Ann Neurol*, 43, 380-3
90. Quinn, J. F.; Raman, R.; Thomas, R. G.; Yurko-Mauro, K.; Nelson, E. B.; Dyck, C. V.; Galvin, J. E.; Emond, J.; Jack, C. R.; Weiner, M.; Shinto, L. , Aisen, P. S.,2010, Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial,*JAMA*, 304, 1903-11
91. Rabinovici, G. , Roberson, E.,2010, Beyond diagnosis: What biomarkers are teaching us about the biology of Alzheimer disease, *Annals of neurology*, 67, 283-285
92. Racke, M. M.; Boone, L. I.; Hepburn, D. L.; Parsadainian, M.; Bryan, M. T.; Ness, D. K.; Piroozii, K. S.; Jordan, W. H.; Brown, D. D.; Hoffman, W. P.; Holtzman, D. M.; Bales, K. R.; Gitter, B. D.; May, P. C.; Paul, S. M. , DeMattos, R. B., 2005, Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta, *J Neurosci*, 25, 629-36
93. Rafii, M. , Aisen, P.,2009, Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics,*BMC medicine*, BioMed Central Ltd, 7, 7
94. Roychoudhuri, R.; Yang, M.; Hoshi, M. M. , Teplow, D. B.,2009, Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease,*J Biol Chem*, 284, 4749-53
95. Ruiloba, J.,, 2006 ,Introducción a la psicopatología y la psiquiatría,Elsevier España
96. Russo, C.; Saido, T. C.; DeBusk, L. M.; Tabaton, M.; Gambetti, P. , Teller, J. K.,1997, Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains,*FEBS Lett*, 409, 411-6
97. Russo, C.; Salis, S.; Dolcini, V.; Venezia, V.; Song, X.; Teller, J. , Schettini, G.,2001, Identification of amino-terminally and phosphotyrosine-modified carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain, *Neurobiology of Disease*, Elsevier, 8, 173-180
98. Russo, C.; Schettini, G.; Saido, T. C.; Hulette, C.; Lippa, C.; Lannfelt, L.; Ghetti, B.; Gambetti, P.; Tabaton, M. , Teller, J. K.,2000,Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease,*Nature*, 405, 531-2

99. Ryan, J. M. , Grundman, M.,2009, Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing, *J Alzheimers Dis*, 17, 243
100. Sakono, M. , Zako, T.,2010, Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers, *FEBS J*, 277, 1348-58
101. Savioz, A.; Leuba, G.; Vallet, P. G. , Walzer, C., 2009, Contribution of neural networks to Alzheimer disease's progression, *Brain Res Bull*, 80, 309-14
102. Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K. ,1999, Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature*, 1999, 400, 173-177
103. Schilling, S.; Zeitschel, U.; Hoffmann, T.; Heiser, U.; Francke, M.; Kehlen, A.; Holzer, M.; Hutter-Paier, B.; Prokesch, M.; Windisch, M.; Jagla, W.; Schlenzig, D.; Lindner, C.; Rudolph, T.; Reuter, G.; Cynis, H.; Montag, D.; Demuth, H.-U. , Rossner, S.,2008, Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology, *Nat Med*, 14, 1106-11
104. Schlenzig, D.; Manhart, S.; Cinar, Y.; Kleinschmidt, M.; Hause, G.; Willbold, D.; Funke, S. A.; Schilling, S. , Demuth, H.-U.,2009, Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides, *Biochemistry*, 48, 7072-8
105. Schroeter, S.; Khan, K.; Barbour, R.; Doan, M.; Chen, M.; Guido, T.; Gill, D.; Basi, G.; Schenk, D.; Seubert, P., 2008, Immunotherapy reduces vascular amyloid-beta in PDAPP mice, *The Journal of Neuroscience*, Society for Neuroscience, 28, 6787
106. Selkoe, D.,2001, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiological reviews*, Am Physiological Soc, 81, 74
107. Selkoe, D.,2001, Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein: A reanalysis of a therapeutic hypothesis, *JAD*, 3, 75-81
108. Sergeant, N.; Bombois, S.; Ghestem, A.; Drobecq, H.; Kostanjevecki, V.; Missiaen, C.; Watez, A.; David, J.-P.; Vanmechelen, E.; Sergheraert, C. , Delacourte, A., 2003, Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach, *J Neurochem*, 85, 1581-91
109. Sidhu, S. S.,2000, Phage display in pharmaceutical biotechnology, *Curr Opin Biotechnol*, 11, 610-6
110. Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castañero, E. M. , Frangione, B.,1998, Beta-sheet

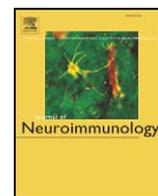
- breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy, *Nat Med*, 4, 822-6
111. Soucek, T.; Cumming, R.; Dargusch, R.; Maher, P., Schubert, D., 2003, The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide, *Neuron*, 39, 43-56
112. Takahashi, R.; Capetillo-Zarate, E.; Lin, M.; Milner, T., Gouras, G., 2010, Co-occurrence of Alzheimer's disease [beta]-amyloid and tau pathologies at synapses, *Neurobiology of aging*, Elsevier, 31, 1145-11
113. Takahashi, R. H.; Almeida, C. G.; Kearney, P. F.; Yu, F.; Lin, M. T.; Milner, T. A., Gouras, G. K., 2004, Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain, *J Neurosci*, 24, 3592-9
114. Takeda, T., Klimov, D., 2009, Interpeptide interactions induce helix to strand structural transition in A beta peptides *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, 77, 1-13
115. Turner, R.; Suzuki, N.; Chyung, A.; Younkin, S., Lee, V., 1996, Amyloids beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation, *The Journal of biological chemistry*, 271, 896
116. Ud-Din, S. S., 2002, Genetics of Down's syndrome and Alzheimer's disease, *Br J Psychiatry*, 181, 167-8
117. Vanderstichele, H.; Meyer, G. D.; Andreasen, N.; Kostanjevecki, V.; Wallin, A.; Olsson, A.; Blennow, K., Vanmechelen, E., 2005, Amino-truncated beta-amyloid42 peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment, *Clin Chem*, 51, 1650-60
118. Walsh, D. M., Selkoe, D. J., 2007, A beta oligomers - a decade of discovery, *J Neurochem*, 101, 1172-84
119. Weller, R.; Subash, M.; Preston, S.; Mazanti, I., Carare, R., 2008, Perivascular Drainage of Amyloid-beta Peptides from the Brain and Its Failure in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease, *Brain Pathology*, 18, 253-266
120. Wiessner, C.; Wiederhold, K.-H.; Tissot, A. C.; Frey, P.; Danner, S.; Jacobson, L. H.; Jennings, G. T.; Lind, R.; Ortmann, R.; Reichwald, J.; Zurini, M.; Mir, A.; Bachmann, M. F., Staufenbiel, M., 2011, The Second-Generation Active Abeta Immunotherapy CAD106 Reduces Amyloid Accumulation in APP Transgenic Mice While Minimizing Potential Side Effects, *J Neurosci*, 31, 9323-31
121. Wilcock, D. M.; Rojiani, A.; Rosenthal, A.; Levkowitz, G.; Subbarao, S.; Alamed, J.; Wilson, D.; Wilson,

- N.; Freeman, M. J.; Gordon, M. N. , Morgan, D.,2004, Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition, *J Neurosci*, 24, 6144-51
122. Winkler, D.; Bondolfi, L.; Herzig, M.; Jann, L.; Calhoun, M.; Wiederhold, K.; Tolnay, M.; Staufenbiel, M. , Jucker, M.,2001, Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy, *The Journal of Neuroscience, Society for Neuroscience*, 21, 1619
123. Wirths, O.; Breyhan, H.; Marcello, A.; Cotel, M.-C.; Braack, W. , Bayer, T. A.,2010, Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 31, 747-5
124. Wirths, O.; Multhaup, G. , Bayer, T.,2004, A modified B-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade, *Journal of neurochemistry*, , 91, 513-520
125. Yankner, B. A. , Lu, T.,2009, Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease, *J Biol Chem*, 284, 4755-9
126. Youssef, I.; Florent-Bachard, S.; Malaplate-Armand, C.; Koziel, V.; Bihain, B.; Olivier, J.-L.; Leininger-Muller, B.; Kriem, B.; Oster, T. , Pillot, T.,2008, N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis, *Neurobiol Aging*, 29, 1319-3
127. Wu Zhang, Y.; Thompson, R.; Zhang, H. , Xu, H.,2011, APP processing in Alzheimer's disease, *Mol Brain*, 4, 3



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological $A\beta$ species: Relevance for immunotherapy

Roxanna Perez-Garmendia^a, Vanessa Ibarra-Bracamontes^a, Vitaly Vasilevko^b, Jose Luna-Muñoz^c, Raul Mena^c, Tzipe Govezensky^a, Gonzalo Acero^a, Karen Manoutcharian^a, David H. Cribbs^{b,d}, Goar Gevorkian^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70228, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, Mexico

^b The Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, University of California Irvine, Irvine, CA 92697-4540, USA

^c Department of Neurosciences, CINVESTAV-IPN, Mexico, DF, Mexico

^d Department of Neurology, University of California Irvine, Irvine, CA 92697-4540, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2010

Received in revised form 24 August 2010

Accepted 26 August 2010

Available online xxxxx

Keywords:

N-truncated amyloid beta ($A\beta$) peptide

Alzheimer's disease immunotherapy

Immunodominant epitope

B cell epitope

ABSTRACT

N-truncated/modified forms of amyloid beta ($A\beta$) peptide are found in diffused and dense core plaques in Alzheimer's disease (AD) and Down's syndrome patients as well as animal models of AD, and represent highly desirable therapeutic targets. In the present study we have focused on N-truncated/modified $A\beta$ peptide bearing amino-terminal pyroglutamate at position 11 ($A\beta$ N11(pE)). We identified two B-cell epitopes recognized by rabbit anti- $A\beta$ N11(pE) polyclonal antibodies. Interestingly, rabbit anti- $A\beta$ N11(pE) polyclonal antibodies bound also to full-length $A\beta$ 1-42 and N-truncated/modified $A\beta$ N3(pE), suggesting that the three peptides may share a common B-cell epitope. Importantly, rabbit anti- $A\beta$ N11(pE) antibodies bound to naturally occurring $A\beta$ aggregates present in brain samples from AD patients. These results are potentially important for developing novel immunogens for targeting N-truncated/modified $A\beta$ aggregates as well, since the most commonly used immunogens in the majority of vaccine studies have been shown to induce antibodies that recognize the N-terminal immunodominant epitope (EFRH) of the full length $A\beta$, which is absent in N-amino truncated peptides.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The accumulation of fibrillar and oligomeric forms of amyloid-beta ($A\beta$) peptide in the brain has been hypothesized to play a central role in the neuropathology of Alzheimer's Disease (AD) (Haas and Selkoe, 2007; Masters et al., 1985; Walsh and Selkoe, 2004). The main $A\beta$ variants detected in the human brain are $A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42, however a significant proportion of AD brain $A\beta$ consists also of N-terminal truncated/modified species (Guntert et al., 2006; Mori et al., 1992; Saido et al., 1995; Seubert et al., 1992; Tekirian et al., 1998; Wirths et al., 2010). Previous studies have demonstrated that these shortened $A\beta$ forms are significantly more resistant to degradation, aggregate more rapidly *in vitro* and exhibit similar or, in some cases, increased toxicity in hippocampal neuronal cultures compared to the full-length peptides (D'Arrigo et al., 2009; Pike et al., 1995; Russo et al., 2002; Schilling et al., 2006; Youssef et al., 2007). Also, it has been demonstrated that N-truncated $A\beta$ peptides progressively accumulate in the brain of Familial Alzheimer's disease (FAD) and Down syndrome patients as

well as in the brain of sporadic AD patients at the earliest stages of AD even before the appearance of clinical symptoms (Huse et al., 2002; Kumar-Singh et al., 2000; Liu et al., 2006; naslund et al., 1994; Piccini et al., 2005; Saido et al., 1995; Sergeant et al., 2003; Tekirian et al., 1998; Vanderstichele et al., 2005). In addition, the presence of intraneuronal pool of N-truncated $A\beta$ peptides has been shown to correlate with the progression of pathology and neuronal loss in transgenic mice models APP/PS1KI and TBA2 (Bayer et al., 2008; Casas et al., 2004; Wirths et al., 2009). Thus, the N-terminally truncated/modified $A\beta$ peptides represent highly desirable and abundant therapeutic targets.

Most of N-truncated $A\beta$ peptides have been considered to be the degradation products of full-length $A\beta$, however, the cloning and overexpression in cultured cells of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1) led to the conclusion that $A\beta$ 11-40/42 may be generated intracellularly directly by BACE1 cleavage of APP (Huse et al., 2002; Lee et al., 2003; Liu et al., 2006; Vassar et al., 1999). This shortened form of $A\beta$ peptide may be further modified by cyclization of the N-terminal glutamate resulting in a peptide bearing amino-terminal pyroglutamate at position 11 ($A\beta$ N11(pE)). This modification protects the peptide from degradation by most aminopeptidases leading to its accumulation and aggregation.

* Corresponding author. Tel.: +52 5556223151; fax: +52 5556223369.
E-mail address: gokar@servidor.unam.mx (G. Gevorkian).

Anti-A β antibodies have been shown to disrupt A β aggregates, block aggregation, attenuate toxicity, as well as promote the clearance of the peptide in the central nervous system (CNS). Immunotherapy approaches, both active immunization with A β peptide, or passive transfer of anti-A β antibodies, have been demonstrated to decrease amyloid deposits and associated neuronal and inflammatory pathologies and reverse A β -related cognitive deficits in several amyloid precursor protein transgenic (APP/Tg) mouse models (Bard et al., 2000; Biscaro et al., 2009; Brody and Holtzman, 2008; Lemere, 2009; Schenk et al., 1999; Wilcock et al., 2004), as well as canine and primates models of amyloidosis (Head et al., 2008; Lemere et al., 2004). Interestingly, the majority of the previous studies used mainly A β 1–40 or A β 1–42 as an immunogen for active immunization, which induced antibodies specific for amino-terminal part (EFRH epitope) of A β . However, most of the N-truncated/modified forms of the A β lack this critical B-cell epitope. Thus, novel immunogens directed to generate anti-N-truncated/modified A β antibodies should be designed and considered for vaccine preparations for AD.

In the present study we have focused on N-truncated/modified A β peptide bearing amino-terminal pyroglutamate at position 11 (A β N11(pE)). We produced anti-A β N11(pE) polyclonal antibodies in rabbits, and identified two B-cell epitopes recognized by these antibodies. Interestingly, rabbit anti-A β N11(pE) polyclonal antibodies bound also to full-length A β 1–42 and N-truncated/modified A β N3(pE), suggesting that the three peptides may share a common B-cell epitope. Importantly, we demonstrated that rabbit anti-A β N11(pE) antibodies bound to A β deposits present in AD brain and inhibit A β N11(pE)-induced cytotoxicity in IMR-32 differentiated neuroblastoma cells. We believe our results are potentially important for developing novel immunogens targeting N-amino-truncated/modified A β N3(pE) and A β N11(pE) as well as full-length A β 1–42, three main pathological species of the A β peptide present in human brain.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Synthetic human A β 1–42, A β 1–16, A β 8–42, A β 17–42, A β 12–28 and A β 35–25 as well as N-pyroglutamate modified peptides A β N3(pE) and A β N11(pE) were purchased from AnaSpec (San Jose, CA, USA). A monoclonal anti-A β antibodies (4G8, BAM10 and BAM90.1) were from Sigma. HRP-conjugated anti-mouse IgG2b and IgG1 and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG were from Zymed (San Francisco, CA, USA). Super Signal West Dura Extended Duration Substrate kit was from Pierce, Rockford, IL, USA.

2.2. Peptide preparation, WB and dot blot assays

A β 1–42, A β N3(pE) and A β N11(pE) were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to allow a conversion to the monomer and, after evaporation of solvent, were stored in aliquots at -20°C . Oligomeric A β 1–42, A β N3(pE) and A β N11(pE) were prepared essentially as described previously by incubation of monomers in DMEM/F12 at 4°C for 24 h following overnight incubation at 37°C (Klein, 2002; Solorzano-Vargas et al., 2008). A β 1–16, A β 17–42 and A β 12–28 were dissolved in a water at a concentration of 1 mg/ml. Formation of oligomeric A β 1–42, A β N3(pE) and A β N11(pE) species was confirmed by the Western Blot. Briefly, after incubation, peptides were separated by electrophoresis on 4–12% polyacrylamide precast NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 100 V for 1 h 45 min and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a semi dry blot system (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. Membranes were blocked in PBS/2% non-fat dry milk/0.2% Triton X-100 overnight at 4°C and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: 4G8 (1:2000), BAM10 (1:2000), BAM90.1 (1:2000) or

rabbit anti-A β N11(pE) polyclonal IgG. After washing with PBS/0.2% Tween, the membranes were incubated with HRP-conjugated anti-mouse IgG2b or IgG1, 1:2500 or anti-rabbit IgG, for 2 h at RT. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate kit. In competition WB assays, rabbit anti-A β N11(pE) polyclonal IgG were incubated with corresponding phage (10^9 pfu/ml) 1 h at room temperature prior to adding to the membrane. Then the assay was performed as described above. For dot blot assay, peptide monomers prepared as described above, were applied to PVDF membrane and air dried. Rabbit anti-A β N3(pE), anti-A β N11(pE) and anti-A β 1–42 polyclonal IgG diluted in PBS/2% non-fat dry milk/0.2% Triton X-100 (4 μ /ml) were added, and after overnight incubation at 4°C , the immunoreactivity was detected as described above.

2.3. Immunization protocol

All experiments with animals were conducted using protocols approved by our Institutional Animal Care Committee. Three 3-month-old White New Zealand rabbits were immunized subcutaneously (s.c.) at 14 days intervals with 200 μ g of human A β N11(pE) oligomers prepared at 37°C as described above. Freund's complete adjuvant was used for primary injection followed by incomplete Freund's adjuvant for three boost injections. Control rabbits were immunized with adjuvant alone or with a non-related peptide. Animals were bled on day 0 and 10 days after the third boost injection. The sera were stored at -20°C until use.

2.4. Purification of rabbit IgG

IgG were precipitated from rabbit sera with 1.7 M ammonium sulphate and dialyzed against PBS. Then this solution was applied to columns with Protein G-Sepharose (Zymed) and incubated for 1 h at room temperature. Non-bound proteins were removed by washing with PBS, and IgG was eluted with elution buffer (0.2 M glycine, adjusted to pH 2.8 with HCl). After dialysis against water, antibodies were lyophilized and stored at -20°C .

2.5. ELISA for evaluation of anti-A β N11(pE) antibodies

ELISA analysis was carried out using MaxiSorp microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) coated overnight with a synthetic peptides at a concentration of 20 μ g/ml in carbonate buffer (pH 9.6). After washing with phosphate buffer containing 0.2% Tween-20 (PBS-Tween), plates were blocked with PBS/2% non-fat dry milk for 1 h at 37°C . Plates were washed, then rabbit sera diluted in PBS/2% non-fat dry milk/0.2% Triton X-100 were added and after incubation for 1 h at 37°C , plates were washed with PBS/0.2% Tween. Rabbit anti-human A β 1–42 polyclonal antibodies (Zymed) as well as rabbit polyclonal anti-A β N3(pE) antibodies obtained in our laboratory (Acero et al., 2009) and mouse anti-A β monoclonal antibodies (4G8, BAM10 and BAM90.1) were used as a positive control to confirm the peptide binding to well. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG1 and IgG2b (Zymed) diluted in PBS/2% non-fat dry milk/0.2% Triton X-100 were added, and plates were incubated for 1 h at 37°C . Plates were washed and 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) single solution (Zymed) was added. The OD reading at 405 nm was registered using Opsy MR Microplate Reader (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA). For competition ELISA, sera were preincubated overnight at 4°C with the preparations of synthetic peptides (diluted 1:200, 1:400, 1:600 and 1:800), prior to adding to A β N11(pE)-coated wells. Then the assay was performed as described above.

2.6. Immunohistochemical analysis

2.6.1. Brain tissue

Brain tissue from six AD patients was examined in this study (2–6 hour post-mortem delay). The diagnosis of AD was obtained by the NIA-NINCDS group criteria (Mckhann et al., 1984). Blocks of the temporal cortex were fixed by immersion in a solution of 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4 °C for 7 days.

2.6.2. Double immunolabeling

50 μm -thick free-floating sliding microtome brain tissue sections were pretreated with 99% formic acid (Merck, Darmstadt), by immersion for 3 min, at RT and then thoroughly washed several times with TBS (Tris-buffer saline). After blocking with a solution of 0.2% IgG free-albumin (Sigma) in TBS for 20 min at RT, brain slices were incubated overnight at 4 °C with anti-A β N11(pE) antibodies (1:200) combined with BAM10 (1:200) diluted in TBS containing 0.2% Triton X-100 (TBS-Tx). Then sections were rinsed several times with TBS-Tx and incubated with a mixture of TRITC-tagged goat-anti-mouse IgG and FITC-tagged goat-anti rabbit IgG (Jackson Immuno. Res. Lab. Inc. West Grove) diluted in TBS-Tx for 1 h at RT.

To confirm the specificity of anti-A β N11(pE) antibodies in AD brain tissue, a 5 μM solution of A β 35-25, A β 1-42, A β N3(pE) and A β N11(pE) were preincubated, individually, with anti-A β N11(pE) antibodies at 37 °C for 2 h and immunohistochemistry was performed as previously described.

2.6.3. Confocal microscopy

Sections were mounted in the anti-bleaching media Vectashield (Vector Labs, Burlingame) and viewed through a confocal laser scanning microscope (TCP-SP2, Leica, Heidelberg) using a 20 \times or 100 \times oil-immersion plan Apochromat objective (NA 1.4). Ten to fifteen consecutive single sections were obtained at 0.8–1.0 μm intervals and sequentially scan for two channels throughout the z-axis of the sample. The resulting stack of images was projected and analyzed onto the two-dimensional plane using a pseudocolor display green (FITC) and red (TRITC). Fluorochromes in double and triple labeled samples were excited at 488 nm (for FITC) and 540 nm (for TRITC) wavelengths.

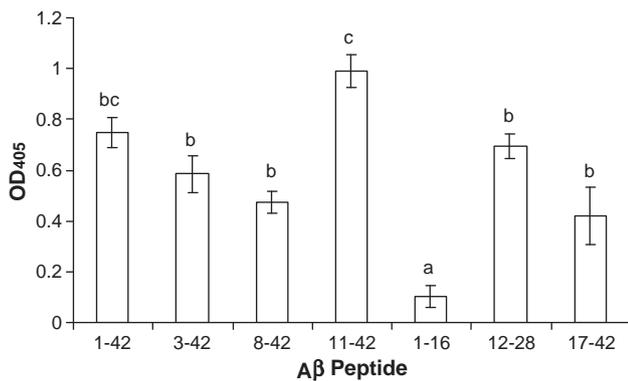


Fig. 1. Rabbit anti-A β N11(pE) antibodies are binding in ELISA to A β N11(pE), A β 1-42, A β N3(pE), A β 8-42, A β 12-28 and A β 17-42 peptides. No recognition of A β 1-16 was observed. Peptides were prepared as described in Materials and methods and used for covering microtiter plates. Rabbit serum was diluted 1:1000. Optical densities (OD) were registered at 405. Data are means of three independent experiments \pm SD. Means denoted with different letters are statistically different ($P < 0.05$). Rabbit preimmune sera as well as sera from rabbits immunized with adjuvant alone showed $OD_{405} < 0.1$.

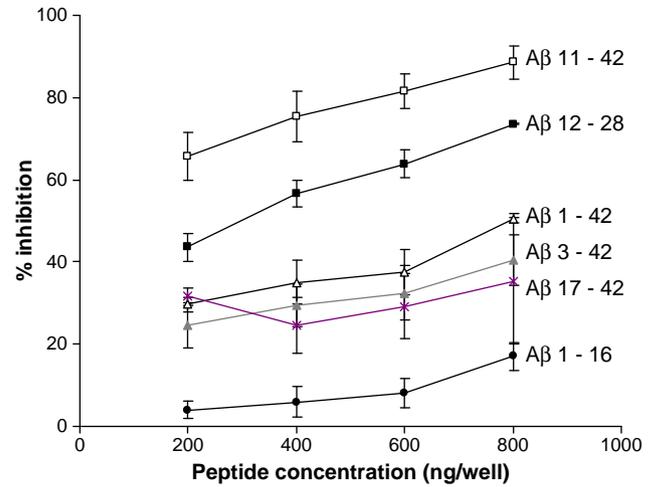


Fig. 2. The specificity of binding of anti-A β N11(pE) antibodies to A β peptides was confirmed by competition ELISA. Sera were preincubated overnight at 4 °C with the preparations of synthetic A β N3(pE), A β N11(pE), A β 1-42, A β 12-28, A β 17-42 and A β 1-16 (see Materials and methods section) prior to adding to A β N11(pE)-coated wells.

2.7. Inhibition of A β N11(pE) toxicity in vitro by selected anti-A β N11(pE) antibodies in IMR-32 cell cultures

Human neuroblastoma IMR-32 cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) were maintained in DMEM/F12 (1:1) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO) and penicillin-streptomycin (GIBCO) and differentiated for

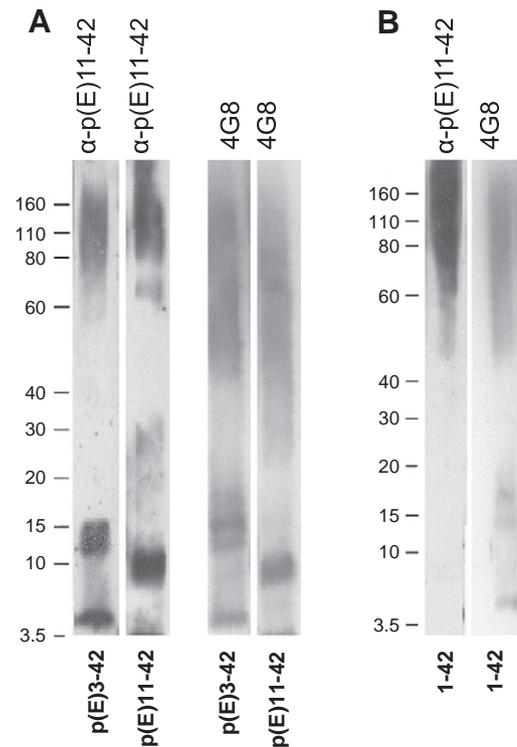


Fig. 3. Rabbit anti-A β N11(pE) antibodies bound to A β oligomers in Western Blot. Oligomers were prepared and analyzed as described in Materials and Methods section. (A) Anti-A β N11(pE) antibodies were used to detect A β N3(pE) and A β N11(pE). A monoclonal anti-A β antibody 4G8 was used as a control. (B) Rabbit anti-A β N11(pE) antibodies were used to detect oligomers of A β 1-42. A monoclonal anti-A β antibody (4G8) binding to a central part of A β 1-42 was used as a control. No binding of anti-A β N11(pE) antibodies to a monomer of A β 1-42 was observed although a control antibody (4G8) detected it in the same preparation. Migration of the molecular mass standards is indicated.

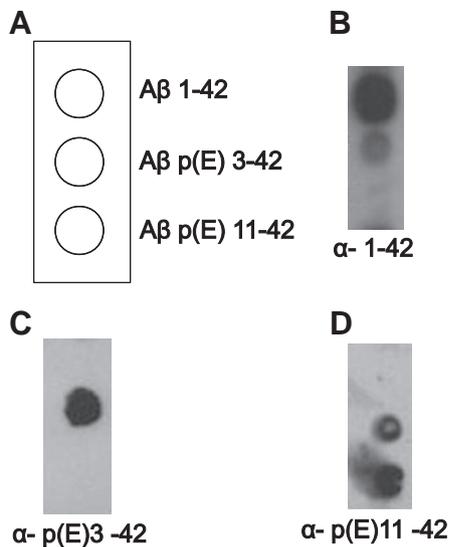


Fig. 4. Dot blot analysis. A β monomers were applied to PVDF membrane as shown in A) and detected with rabbit anti-A β 1-42 (B), anti-A β N3(pE) (C) and anti-A β N11(pE) (D) antibodies.

8–10 days in the presence of 1 mM dibutyryl cAMP. To test the inhibitory effect of anti-A β N11(pE) antibodies on the neuronal toxicity induced by A β N11(pE), cells were plated at a density of 1×10^4 cells/200 μ l per well in 96-well tissue culture plates (Corning, NY, USA). For all assays, A β N11(pE) peptide preparations were mixed to a final concentration of 20 μ mol/ml in OPTI-MEM serum free medium containing 200 u/ml penicillin and 200 μ g/ml streptomycin. Synthetic A β 35-25 was used as a negative control. Anti-A β N11(pE) IgGs and IgGs from the rabbit immunized with adjuvant only were mixed with A β N11(pE) peptide (1:1 molar ratio) and incubated for 1 h at room temperature. Before treatment of cells, the old medium was removed and the peptide preparation (with or without antibodies) was added to each well and incubated for 48 h. Cell viability was assessed using an XTT cytotoxicity assay (sodium 3' [1-phenylaminocarbonyl]-3-4 tetrazolium}-bis {4-methoxy-6-nitro} benzene sulfonic acid hydrate) (Roche, IN, USA) according to manufacturer's instructions. 50 μ l of XTT was added to each plate and incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. The OD reading at 500 nm was registered using Opsys MR Microplate Reader (DYNEX Technologies).

2.8. Affinity selection of phages binding to anti-A β N11(pE) antibodies

Selection of phages by biopanning was performed as described previously (Gevorkian et al., 2004). Briefly, a Phage Display Peptide Library from New England Biolabs (Beverly, MA, USA) was used. The displayed 7-mer peptides are expressed at the N-terminus of the minor coat protein (cpIII) of M13 phage. MaxiSorp microtiter plates were coated with goat anti-rabbit IgG (Zymed) at a concentration of 5 μ g/ml 1 h at 37 °C, washed and blocked with PBS-2%BSA. After washing, polyclonal rabbit anti-A β N11(pE) antibodies diluted 1:200 in PBS-Tween-1% BSA were added and plates were incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed, then 10^{11} plaque-forming units (PFU) from phage library diluted in PBS/BSA 1% were added and plates were incubated overnight at 4 °C. Non-specific phages were washed off, and bound phage clones were eluted by triethylamine (0.1 M)

and neutralized by Tris-HCl (1 M, pH 7.5). Three rounds of biopanning were performed, and 19 individual clones were selected after the third round, amplified and used in direct and competition ELISA to evaluate their binding to anti-A β N11(pE) antibodies. For direct ELISA experiments, MaxiSorp microtiter plates were coated with goat anti-rabbit IgG and blocked as described above. Rabbit anti-A β N11(pE) antibodies diluted 1:100 in PBS-Tween-1% BSA were added and plates were incubated for 1 h at 37 °C. After washing, 10^{10} PFU/ml of each phage clone diluted in PBS-1%BSA were added to plates and incubated overnight at 4 °C. After washing, HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody (Invitrogen) was added and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, ABTS single solution was added. The OD reading at 405 nm was registered using Opsys MR Microplate Reader (DYNEX Technologies). For competition ELISA, plates were coated with synthetic A β N11(pE) preparation and phage clones were incubated overnight with anti-A β N11(pE) antibodies before adding to plates. Then the assay was performed as described above. For competition WB analysis, phage clones (10^9 /ml) were preincubated with rabbit anti-A β N11(pE) antibodies 1 h at room temperature and then the assay was performed as described above.

Also, single-stranded DNA was prepared from all positive clones and one negative clone as described previously and used for DNA sequencing [37]. T7 Sequenase version 2.0 Quick Denature Plasmid Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) and [α -³⁵S] dATP (Amersham) were used according to the manufacturer's instructions.

2.9. BLAST homology search

A homology between peptide inserts of selected positive clones and known protein sequences was analyzed using BLASTP program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.10. Statistical analysis

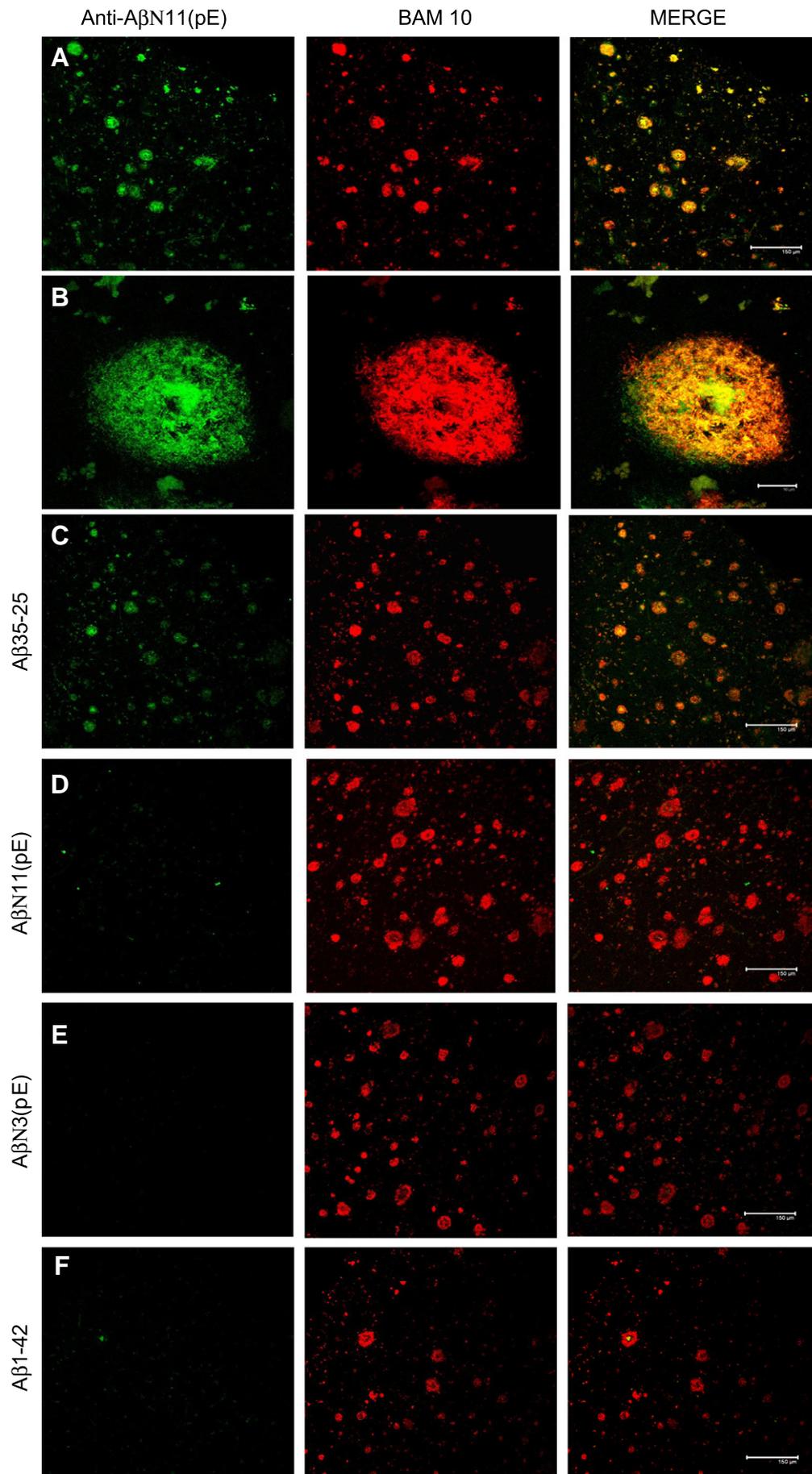
Data were analyzed by ANOVA using SPSS statistical software program (Release 9.0).

3. Results

3.1. Production of anti-A β N11(pE) antibodies and their binding to synthetic A β peptides

To produce anti-A β N11(pE) antibodies, rabbits were immunized with oligomeric peptide preparation mixed with adjuvant. Animals were bled 10 days after the third boost injection and the production of specific antibodies was tested by ELISA. Anti-A β N11(pE) antibodies were found to bind to A β N11(pE) peptide as well as to A β N3(pE), A β 1-42, A β 8-42, A β 12-28 and A β 17-42 while no binding to A β 1-16 was observed (Fig. 1). No binding of IgGs from preimmune serum or a serum from a rabbit immunized with the adjuvant alone, to A β peptides was detected. The specificity of binding of anti-A β N11(pE) antibodies to A β peptides was confirmed by competition ELISA. After pre-incubation of anti-A β N11(pE) antibodies with A β N11(pE), A β N3(pE), A β 1-42, A β 12-28 and A β 17-42, but not with A β 1-16, there were inhibition of binding of anti-A β N11(pE) antibodies to oligomeric A β N11(pE) immobilized wells (Fig. 2).

Fig. 5. Anti-A β N11(pE) antibodies bound to amyloid aggregates in 50 μ m-thick brain tissue sections of temporal cortex from AD patients (A,B), and this binding is inhibited by A β N11(pE) (D), A β N3(pE) (E) and A β 1-42 (F), but not by A β 35-25 (C). Each panel shows, from the left: the reactivity of anti-A β N11(pE) antibodies (shown in green); the reactivity of a mouse anti-human A β 1-42 monoclonal antibody (BAM10) (shown in red); the merge between red and green channels. A, C-F: scale bar represents 150 μ m; B: scale bar represents 10 μ m.



3.2. Rabbit anti-A β N11(pE) antibodies bind to A β oligomers in Western Blot and A β deposits in human brain

Anti-A β N11(pE) antibodies were tested in Western Blot and found to bind to all forms of A β N11(pE) and A β N3(pE). Interestingly, anti-A β N11(pE) antibodies did not bind to monomeric A β 1-42, while binding to oligomeric A β 1-42 was detected (Fig. 3B). To further analyze preferential binding of polyclonal anti-A β N11(pE) antibodies we used dot blot assay. HFIP treated synthetic peptides A β 1-42, A β N3(pE) and A β N11(pE) were diluted in DMSO and applied to PVDF membrane. Anti-A β N11(pE) antibodies bound to A β N3(pE) and A β N11(pE) monomers but failed to stain A β 1-42 monomers (Fig. 4D). Anti-A β 1-42 rabbit IgGs were used as a positive control to stain A β 1-42 monomers (Fig. 4B).

Importantly, anti-A β N11(pE) antibodies recognized amyloid deposits present in human brain from AD patients (Fig. 5A and B), and this binding was inhibited by A β 1-42, A β N3(pE) and A β N11(pE), but not by A β 35-25 (Fig. 5C-F).

3.3. Inhibition of A β N11(pE) toxicity in vitro by anti-A β N11(pE) antibodies in IMR-32 cell cultures

We assessed the ability of anti-A β N11(pE) antibodies to inhibit A β N11(pE)-induced cytotoxicity in IMR-32 differentiated neuroblastoma cells using XTT assay. Overnight preincubation of A β N11(pE) with anti-A β N11(pE) antibodies prior to adding to cells resulted in inhibition of cytotoxicity (Fig. 6). Control IgGs from a rabbit immunized with adjuvant only did not show any inhibition activity.

3.4. Affinity selection of phages binding to anti-A β N11(pE) antibodies

To identify the immunodominant region of A β N11(pE) peptide, the library of random heptapeptides displayed as a fusion to the minor coat protein of M13 phage was screened with rabbit anti-A β N11(pE) antibodies. Three rounds of biopanning were performed and 19 clones were randomly selected from the eluate after the third round. Binding of these clones to anti-A β N11(pE) antibodies was tested in ELISA. DNA sequences of heptapeptides coding inserts of 10 positive and 9 negative phage clones were determined and the deduced amino acid sequences of all positive clones are shown in Table 1. Peptide inserts of the seven positive clones could be grouped into one of two motifs having consensus sequences Q(E,R)HHHQ(E)HL(P) (phage clones C6, C12 and C15) and K(E,G)I(VF)AEA(G,D)L(S,P)F(R,Y) (phage clones C7, C11, C17 and C19). The first motif has a homology with an amino-terminal part of A β N11(pE) (aa 11-15) suggesting that the peptide inserts of these clones are mimotopes of an epitope present at the amino-terminal region of A β N11(pE). The second motif has a

Table 1

Peptide sequences and reactivity of selected positive phage clones with rabbit anti-A β N11(pE) antibodies.

PHAGE CLONE	SEQUENCE	OD405 nm
C6	Q H H H Q H L	0.95 ± 0.1
C12	R H H H Q H P	0.85 ± 0.05
C15	E H H H E H L	0.89 ± 0.12
C7	K I A E A P F	0.39 ± 0.12
C11	E V A E G S R	0.5 ± 0.05
C17	K I A E A L F	0.25 ± 0.08
C19	G F A E D L Y	0.23 ± 0.11
C1	F I D P D R M	0.38 ± 0.04
C3	S H K D D T M	0.78 ± 0.11
C10	D L L M G H P	0.78 ± 0.17

homology with a central part of A β N11(pE) (aa 20-24) suggesting a presence of another B cell epitope in this region. The remaining three positive clones (C1, C3, and C10) with no homology with A β N11(pE) could not be grouped into a clear motif.

To test the binding specificity of the selected clones, the ability of the clones to inhibit the binding of anti-A β N11(pE) antibodies to A β N11(pE) peptide was studied in a competition ELISA (Fig. 7). Three clones bearing a multiple histidine motif (C6, C12 and C15) showed the highest inhibition of binding to A β N11(pE) peptide, while four clones with inserts mimicking the epitope in the central region of A β N11(pE) (phage clones C7, C11, C17 and C19) and the remaining positive clones (C1, C3 and C10) showed a background inhibition similar to a negative phage clone C9 bearing a peptide sequence DVSAIMG. Also, in competition WB analysis phage C6 bearing a multiple histidine motif inhibited the binding of anti-A β N11(pE) antibodies to all forms of the peptide (Fig. 8).

4. Discussion

It has been demonstrated that A β aggregates present in the brain of sporadic AD patients and in Down syndrome were significantly different and more toxic compared with A β present in normal brain, and this was correlated with the predominance of the N-truncated species over full length A β 1-42 (Piccini et al., 2005; Saïdo et al., 1995; Schilling et al., 2008; Vanderstichele et al., 2005). Importantly, significant quantities of N-truncated A β peptides were post-translationally modified pyroglutamate-containing forms of A β (A β N3(pE) and A β N11(pE)). The resistance toward proteolytic degradation by aminopeptidases decreases the rate of their clearance and enhances their accumulation in the brain. In addition, pyroglutamate-containing A β species have been shown to have an increased aggregation propensity and proposed to play an important role during the initiation of the disease (He et al., 1999; Schilling et al., 2006). Finally, it has been demonstrated recently that inhibition of glutaminy cyclase, an enzyme responsible for pyroglutamate formation, reduced plaque load in two different transgenic mouse models of AD accompanied by alleviated plaque-associated inflammation and a significant memory improvement (Schilling et al., 2008). Thus, collectively, these data suggest that anti-A β immunotherapeutic strategies should take into account pyroglutamate-containing forms A β N3(pE) and A β N11(pE) and emphasize the need to search for immunogens capable to target N-truncated/modified species, since the great majority of previously reported immunotherapy studies are based on EFRH epitope absent in these peptides.

Recently, we have demonstrated that the immunodominant region of A β N3(pE) is located at its amino terminus (Acero et al., 2009). In the present study we identified two major B-cell epitopes in A β N11(pE); the first one located in the amino-terminal part and the second one in the central part of the peptide. Peptide inserts of selected positive phage clones are mimicking antigenic properties of

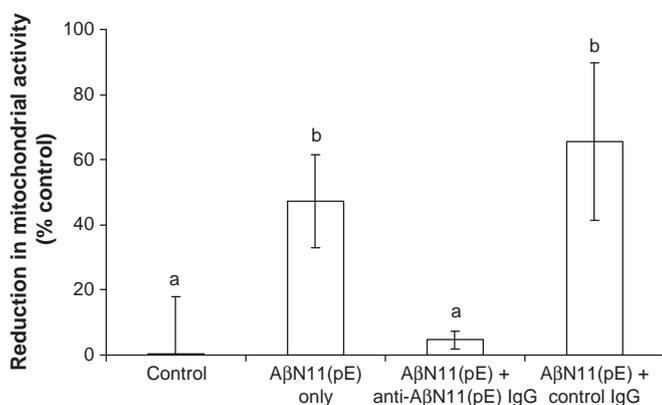


Fig. 6. Anti-A β N11(pE) antibodies inhibit A β N11(pE) induced neurotoxicity in human differentiated neuroblastoma IMR-32 cell cultures. Cell viability was assessed using an XTT toxicity assay. Data presented are means \pm SE of three independent experiments.

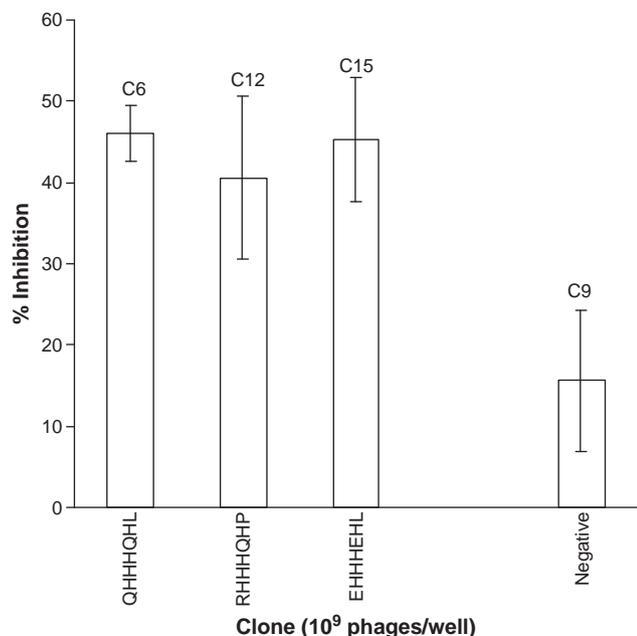


Fig. 7. Inhibition of the anti-A β N11(pE) antibody binding to A β N11(pE) by the selected phage clones. Plates were coated with A β N11(pE), and anti-A β N11(pE) antibodies were added after overnight incubation with or without phage clones. Optical densities (OD) were registered at 405. Data are means of three independent experiments \pm SD.

these epitopes. Interestingly, two independent web-servers (ABCpred and EpiTope) for predicting B-cell epitopes in an antigen sequence also pointed to these regions of A β N11(pE) (aa 11–18 and aa 19–26) as putative B-cell epitopes (Rubinstein et al., 2009; Saha and Raghava, 2006). Further studies in animal models would be needed to determine if peptides identified in this study may induce specific B-cell response to natural epitopes present in A β N11(pE). Importantly, anti-A β N11(pE) rabbit polyclonal antibodies bound also to A β 1–42 and A β N3(pE), suggesting that the three peptides may share a common B-cell epitope, and immunization with selected mimotopes may induce cross-reacting antibodies binding to all three major forms of A β .

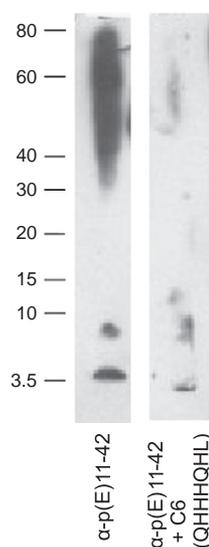


Fig. 8. Inhibition of the anti-A β N11(pE) antibody binding to A β N11(pE) by the phage bearing a multiple histidine motif (C6). Phage preparation (10⁹/ml) was incubated with rabbit anti-A β N11(pE) antibodies 1 h at room temperature prior to adding to A β N11(pE)-blotted nitrocellulose membrane and the assay was performed as described in Materials and methods.

Finally, anti-A β N11(pE) antibodies inhibited A β N11(pE)-induced cytotoxicity in IMR-32 differentiated neuroblastoma cells and recognized naturally occurring amyloid aggregates present in brain samples from AD patients. The latter is important since there may be differences in epitope exposure in synthetic peptide aggregates *in vitro* and natural amyloid deposits formed in brain. Understanding the antigenic and immunogenic properties of mimotopes selected in this study may help to develop immunogens capable to elicit B-cell response mimicking anti-A β N11(pE) one for targeting different pathological species of A β . This will represent a promising immunotherapeutic approach for the disease treatment and/or prevention.

In conclusion, by designing new immunogens capable of inducing antibodies against N-amino-truncated/modified A β peptides as well as full-length A β , one may target all pathological species of the A β peptide present in human brain. This should significantly enhance the efficacy of immunotherapy in the CNS of AD patients, because only approximately 0.1% of the antibody in the blood gains entry into the brain.

Acknowledgments

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN200907 and IN209610-3), PASPA-DGAPA-UNAM, CONACyT (58081), Mexico to GG; by UC CONACyT MEXUS grant to DHC and GG, as well as NIH RO-1 grants (NIA AG20241 and NINDS NS50895) to DHC and Alzheimer's Association Grant IIRG 91822 to DHC. R.P. and V.I. are recipients of postgraduate fellowship from CONACyT, Mexico.

References

- Acerio, G., Manoutcharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M.E., Govezensky, T., as G., Luz-madriral, A., Cribbs, D., Gevorkian, G., 2009. Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Ab-specific antibodies produced in rabbits. *J Neuroimmunol* 213, 39–46.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, K., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T., 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid- β peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Med* 6, 916–919.
- Bayer, T.A., Breyahn, H., Duan, K., Rettig, J., Wirths, O., 2008. Intraneuronal β -amyloid is a major risk factor – novel evidence from the APP/PS1KI mouse model. *Neurodegener Dis* 5, 140–142.
- Biscaro, B., Lindvall, O., Hock, C., Efdahl, C., Nitsch, R.M., 2009. A β immunotherapy protects morphology and survival of adult-born neurons in doubly transgenic APP/PS1 mice. *J Neurosci* 29, 14108–14119.
- Brody, D.L., Holtzman, D.M., 2008. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci* 31, 175–193.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdoux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., Drobecq, H., Clark, A., Bonici, B., Delacourte, A., Benavides, J., Schmitz, C., Tremp, G., Bayer, T.A., Benoit, P., Pradier, L., 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a Novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289–1300.
- D'Arrigo, C., Tabaton, M., Perico, A., 2009. N-terminal truncated pyroglutamylyl β amyloid peptide A β py3–42 shows faster aggregation kinetics than the full-length A β 1–42. *Biopolymers* 91, 861–873.
- Gevorkian, G., Petrushina, I., Manoutcharian, K., Ghochikyan, A., Acerio, G., Vasilevko, V., Cribbs, D.H., Agadjanyan, M.G., 2004. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar β -amyloid. *J Neuroimmunol* 156, 10–20.
- Guntert, A., Dobeli, H., Bohrmann, B., 2006. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461–475.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101–112.
- He, W., Barrow, C.J., 1999. The A beta 3-pyroglutamylyl and 11-pyroglutamylyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38, 10871–10877.
- Head, E., Pop, V., Vasilevko, V., Hill, M., Saing, T., Sarsoza, F., Nistor, M., Christie, L.A., Milton, S., Glabe, C., Barrett, E., Cribbs, D., 2008. A two-year study with fibrillar beta-amyloid (A β) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain A β . *J Neurosci* 28, 3555–3566.
- Huse, J.T., Liu, K., Pijak, D.S., Carlin, D., Lee, V.M.-Y., Doms, R.W., 2002. β -Secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277, 16278–16284.
- Klein, W.L., 2002. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41, 345–352.

- Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Lofgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Kroisel, P.M., Van Broeckhoven, C., 2000. Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 9, 2589–2598.
- Lee, E.B., Skovronsky, D.M., Abtahian, F., Doms, R.W., Lee, V.M.-Y., 2003. Secretion and intracellular generation of truncated A beta in beta-site amyloid-beta precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons. *J Biol Chem* 278, 4458–4466.
- Lemere, C.A., 2009. Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Prog Brain Res* 175, 83–92.
- Lemere, C.A., Beierschmitt, A., Iglesias, M., Spooner, E.T., Bloom, J.K., Leverone, J.F., Zheng, J.B., Seabrook, T.J., Louard, D., Li, D., Selkoe, D.J., Palmour, R.M., Ervin, F.R., 2004. Alzheimer's disease A beta vaccine reduces central nervous system A beta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am J Pathol* 165, 283–297.
- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2006. Characterization of A beta(1–40/42) peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A beta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112, 163–174.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245–4249.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., Selkoe, D.J., 1992. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267, 17082–17086.
- Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Nordstedt, C., Terenius, L., 1994. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8378–8382.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrasa, S., Saido, T.C., Markesbery, W., Gambetti, P., Tabaton, M., 2005. beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280, 34186–34192.
- Pike, C.J., Overman, M.J., Cotman, C.W., 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270, 23895–23898.
- Rubinstein, N.D., Mayrose, I., Martz, E., Pupko, T., 2009. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitope. *BMC Bioinform* 10, 287.
- Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P., Schettini, G., 2002. Pyroglutamate-modified amyloid-peptides – A N3(pE) – strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem* 82, 1480–1489.
- Saha, S., Raghava, G.P.S., 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 65, 40–48.
- Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S., 1995. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta(3) (pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457–466.
- 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., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bohm, G., Demuth, H.-U., 2006. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45, 12393–12399.
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Landler, C., Rudolph, T., Reuter, G., Cynis, H., Montag, D., Demuth, H.U., Rossner, S., 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A beta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14, 1106–1111.
- Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Watzte, A., David, J.-P., Vanmechelen, E., Sergheraert, C., Delacourte, A., 2003. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 85, 1581–1591.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schiossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I., Schenk, D., 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325–327.
- Solórzano-Vargas, R.S., Vasilevko, V., Acero, G., Ugen, K.E., Martinez, R., Govezensky, T., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., 2008. Epitope mapping and neuroprotective properties of a human single Chain Fv antibody that binds an internal epitope of amyloid-beta 1–42. *Mol Immunol* 45, 881–886.
- Tekirian, T.L., T.C., Markesbery, W.R., Russel, M.J., Wekstein, D.R., Patel, E., Geddes, J.W., 1998. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular Abeta deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 76–94.
- Vanderstichele, H., De Meyer, G., Andreassen, N., Kostanjevecki, V., Wallin, A., Olsson, A., Blennow, K., Vanmechelen, E., 2005. Amino-truncated beta-amyloid 42 peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment. *Clin Chem* 51, 1650–1660.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181–193.
- Wilcock, D.M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Levkowitz, G., Subbarao, S., Alamed, J., Wilson, D., Wilson, N., Freeman, M.J., Gordon, M.N., Morgan, D., 2004. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci* 24, 6144–6151.
- Wirh, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H.-U., Bayer, T.A., 2009. Intraneuronal pyroglutamate-A beta 3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487–496.
- Wirh, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P.J., Milthaupt, G., 2010. Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm* 117, 85–96.
- Youssef, I., Florent-Bechard, S., malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J.-L., Leininger-Muller, B., Kriem, B., Oster, T., Pilot, T., 2007. N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging* 29, 1319–1333.