



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE
DISTINTAS ESPECIES DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE
EN RATONES DE DIFERENTES CEPAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:
JUAN MANUEL CARREÑO QUIROZ

ASESORA: DRA. GOHAR GEVORGYAN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación de la inmunogenicidad de distintas especies del péptido B-amiloide
en ratones de diferentes cepas

Que presenta el pasante Juan Manuel Carreño Quiroz

Con número de cuenta: 303017426 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 2 de mayo de 2011

PRESIDENTE Q. Arcadia Hernández Beltrán

VOCAL QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

SECRETARIO Dra. Gohar Gevorgyan

1er SUPLENTE MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

2º SUPLENTE M.C. Verónica Castro Bear

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi asesora, la Dra. Gohar Gevorgyan, por aceptarme en su laboratorio, por los apoyos económicos otorgados, por sus valiosas enseñanzas y consejos durante la realización de esta tesis.

A los integrantes de mi jurado por la revisión y corrección del presente trabajo.

A aquellos excelentes profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que más que conocimientos nos transmiten un poco de su pasión por lo que estudian.

Al técnico Gonzalo Acero por su gran apoyo durante la realización de los experimentos y por sus apreciables consejos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su ayuda, consejos y por su agradable compañía.

A mis amigos de toda la vida... Hassim (gracias por tu gran ayuda durante toda la carrera chinto!), Sebas, Ñaño, Naye y Lalo. Porque seguimos juntos!

A Heleny Rose, desde que te conocí los días en la Facultad fueron pura alegría! (recuerda poder libra!).

A Mandy por todo su apoyo tanto en lo profesional, como en lo personal, gracias!

A todos mis amigos y compañeros de la FES Cuautitlán con quienes viví muchos momentos inolvidables y a todas aquellas personas que he conocido a lo largo de mi trayectoria y que de alguna manera me han hecho crecer.

DEDICATORIAS

A mi familia, que con su apoyo y cariño hace que todo lo que hago valga la pena:

A ti mamá. Al ver tu fortaleza, perseverancia y generosidad, he aprendido a luchar por lo que quiero y a ver la vida siempre con optimismo.

A ti papá. Has influido en gran medida en la formación de mi carácter, el cual me ha permitido llegar hasta aquí y junto con mi mamá siempre has procurado darnos lo mejor.

A ti Vio. Desde que éramos pequeños me has sorprendido por tu manera de amar, me has dado tu confianza, tus valiosos consejos y me has permitido ser parte de la linda familia que ahora tienes.

A ustedes los amo como a nadie.

I. ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	I
Abreviaturas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Índice de gráficas.....	V
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA).....	3
2.1.1. Epidemiología.....	3
2.1.2. Características clínicas.....	3
2.1.3. Características histopatológicas.....	4
2.1.4. Genética y factores de riesgo.....	6
2.1.5. Tratamiento sintomático.....	8
2.2. Péptido β -amiloide (β A).....	9
2.2.1. Proteína precursora del amiloide (APP).....	10
2.2.2. Procesamiento de APP.....	10
2.2.3. Especies tóxicas de β A presentes en cerebros de pacientes con EA.....	11
2.2.4. Oligomerización y agregación de β A.....	13
2.2.5. Hipótesis de la cascada amiloide.....	14
2.3. Terapias en investigación para la enfermedad de Alzheimer.....	17
2.3.1. Tratamientos antiinflamatorios	18
2.3.2. Otros tratamientos.....	19
2.3.3. Inmunoterapia.....	20
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos.....	27
6. Diseño experimental.....	28

7. Materiales y métodos.....	29
7.1. Materiales.....	29
7.2 Métodos.....	31
7.2.1. Evaluación de la antigenicidad de los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 por medio de ELISA y Western Blot.....	31
7.2.1.1. <i>Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)</i>	31
7.2.1.2. <i>Western Blot</i>	32
7.2.2. Inmunización de ratones C57BL/6 y BALB/c con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-2.....	34
7.2.3. Detección de anticuerpos anti- β A en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.....	35
7.2.4. Inmunotinción con anticuerpos anti β A 3-42 en corteza temporal de casos con la EA.....	35
7.2.4.1. Microscopía confocal.....	36
8. Resultados.....	37
9. Discusión	46
10. Conclusiones	49
11. Apéndices	50
11.1. Preparación de soluciones.....	50
11.2. Secuencias de péptidos utilizados.....	52
12. Glosario	53
13. Referencias.....	55

Abreviaturas

ABTS: 2,2-azino-di-(3-etilenziazolano-6-ácido sulfónico). Sustrato revelador de la enzima peroxidasa.

AcM: Anticuerpo Monoclonal

AINES: Anti-Inflamatorios No Esteroideos

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína Precursora del Amiloide

βA: Péptido β-amiloide

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAF: Enfermedad de Alzheimer Familiar

EFRH: Secuencia altamente inmunogénica del péptido β-amiloide formada por los aminoácidos: ácido glutámico, fenilalanina, arginina e histidina. Esta secuencia comprende los residuos 3-6 del extremo amino terminal del péptido.

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

PBS: Amortiguador salino de fosfatos (*Phosphate Buffer Solution*)

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SNC: Sistema Nervioso Central

TA: Temperatura Ambiente

Índice de Figuras

Figura 1. Procesamiento proteolítico de APP mediante la acción de complejos enzimáticos denominados secretasas.....	11
Figura 2. Secuencia y estructura de la unidad monomérica de las fibras de A β 40 y A β 42.....	12
Figura 3. Modelos moleculares de oligómeros y fibras de β A 1-42.....	14
Figura 4. Hipótesis de la cascada amiloide.....	15
Figura 5. Modelos de eliminación del péptido β A por medio de anticuerpos específicos contra β A.....	24
Figura 6. Evaluación del estado de agregación de los péptidos β A 11-42, β A 3-42 y β A 1-42 por medio de Western Blot.....	39
Figura 7. Anticuerpos de ratón anti β A 3-42 se unen a agregados amiloides en regiones perinucleares neuronales.....	45

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Evaluación de la inmunogenicidad de los péptidos β A 3-42, 11-42 y 11-25.....	37
Gráfica 2. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido β A 3-42.....	40
Gráfica 3. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido β A 11-42.....	41
Gráfica 4. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido β A 11-25.....	41
Gráfica 5. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido β A 3-42.....	43
Gráfica 6. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido β A 11-42.....	43
Gráfica 7. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido β A 11-25.....	44

1. RESUMEN

La acumulación de formas fibrilares y oligoméricas del péptido β Amiloide (β A) en el cerebro se ha identificado como la principal causa de la enfermedad de Alzheimer (EA). La inmunoterapia es una de las alternativas para atacar a los agregados de dicho péptido y se ha demostrado su capacidad para disminuir la cantidad de las especies tóxicas de β A presentes en cerebros, así como de disminuir el deterioro cognitivo en varios modelos pre-clínicos (en ratones transgénicos, en monos y en caninos).

Aún hay muchos aspectos por entender acerca de esta terapia, por ejemplo: qué especies del péptido β A son las que se tienen que atacar, de qué manera se puede atacar a éstas al mismo tiempo y si su disminución representa una mejora del nivel cognitivo en pacientes y no sólo en modelos preclínicos.

En un estudio previo, por medio del análisis de la inmunogenicidad del péptido β A 11-42 en conejos, se logró identificar que existe un epítipo de células B, compartido en diferentes especies de β A, el cual se encuentra en la región que comprende los aminoácidos 11-25. Con este hallazgo y tomando en cuenta que las especies más abundantes del péptido β A en cerebros de pacientes con EA son β A 1-42, β A 3-42 y β A 11-42, se decidió estudiar la inmunogenicidad del péptido β A 11-25 en ratones de dos cepas, para evaluar la producción de anticuerpos anti- β A y su capacidad de reconocer las especies tóxicas presentes en cerebros de pacientes con EA.

También se decidió realizar los mismos estudios con los péptidos amino-truncados β A 3-42 y β A 11-42 con el propósito de identificar nuevos inmunógenos que, por medio de inmunización activa, sean capaces de generar anticuerpos que reconozcan a las diversas especies de β A presentes en cerebros de pacientes con EA.

Después de inmunizar a ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25, se evaluó por medio de la técnica de ELISA la presencia de anticuerpos en suero. Se encontró que el péptido β A 3-42 es inmunogénico en ambas cepas de ratones, mientras que la inmunización con los péptidos β A 11-42 y β A 11-25 no resultó en producción de anticuerpos. Al caracterizar la especificidad de los anticuerpos anti- β A 3-42 por medio de ELISA, se encontró que reconocen al péptido β A 3-42, mientras que estos anticuerpos no reconocen a los péptidos β A 11-42 y β A 11-25.

Los anticuerpos obtenidos se evaluaron por medio de inmunohistoquímica utilizando cortes de cerebro de pacientes con EA. Se demostró que anticuerpos anti- β A 3-42 se unen a agregados amiloides intracelulares presentes en cerebros de pacientes con EA. Es interesante mencionar, que estos anticuerpos se unen a agregados intracelulares ubicados en la región perinuclear de las neuronas. Sin embargo dichos anticuerpos no reconocen a los agregados amiloides extracelulares. Es un hallazgo nuevo, y puede ser de importancia en futuros estudios de la EA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una neuropatología caracterizada por un deterioro cognitivo progresivo, aunado a alteraciones conductuales y fisiológicas (Weiner & Frenkel, 2006; Roskam et al., 2010). Fue descrita por primera vez por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en 1906, quien logró asociar el deterioro cognitivo con las características histopatológicas de la enfermedad (Engstrom, 2007).

2.1.1. Epidemiología

La EA es la neuropatología más prevalente en el mundo y afecta de 20 a 30 millones de personas (Roskam et al., 2010). La EA es una de las causas de demencia más frecuentes durante la vejez (Mayeux, 2003), aparece en promedio a los 65 años de edad y la prevalencia en población mayor de 60 años es de 5% en hombres y 6% en mujeres. aunque no se ha encontrado que esta diferencia radique en el sexo *per se*; se sabe que hay más casos en el sexo femenino debido a su mayor longevidad (ADEAR Center NIH, 2010).

2.1.2. Características clínicas

Los pacientes con EA presentan un deterioro en funciones asociadas a la memoria, el pensamiento, la comprensión y por lo tanto la abstracción, así como problemas con el lenguaje, la realización de cálculos, la capacidad de aprendizaje y juicio. La demencia causada por esta enfermedad, debe diferenciarse del proceso de envejecimiento normal, en el cual el deterioro cognitivo es mucho menor, se da en un proceso gradual lento y lleva a incapacidades menores (ADEAR Center NIH, 2010).

Se ha realizado una clasificación en tres estadios de deterioro que experimenta un individuo afectado por la EA: inicialmente hay una pérdida fugaz de la memoria a corto plazo, con casos fortuitos de desorientación viso-espacial. Posteriormente se

presenta una pérdida esporádica de la memoria a largo plazo, en donde comienza a ser notoria la disminución de las capacidades cognitivas (comprensión, pensamiento, abstracción y aprendizaje) y se observan problemas con el lenguaje. Es en este punto en donde la enfermedad puede ser detectada de manera más eficiente mediante pruebas de evaluación cognitiva con la finalidad de administrar al paciente tratamientos sintomáticos. En la última etapa, los pacientes con EA pierden total autonomía, siendo incapaces de realizar tareas cotidianas básicas, llegando a ser totalmente dependientes de las personas que se encuentran a su alrededor. Finalmente los pacientes mueren por lo general debido a un fallo cardiorrespiratorio (ADEAR Center NIH, 2010).

2.1.3. Características histopatológicas

Actualmente se conoce bastante acerca de las características histopatológicas de cerebros de pacientes con EA. Se ha descrito en múltiples trabajos la presencia de placas neuríticas y placas difusas formadas por agregados del péptido β amiloide, marañas neurofibrilares formadas por la proteína tau hiperfosforilada, así como células asociadas a un proceso inflamatorio, como astrocitos y células de la microglía (Weiner & Frenkel, 2006). Como consecuencia de dichas alteraciones, las neuronas se dañan dando lugar a dendritas distróficas y axones degenerados. En pacientes con EA avanzada se da una pérdida de hasta un 20% del volumen cerebral: daño que se asocia a la pérdida neuronal (ADEAR Center NIH, 2010).

Es de suma importancia conocer más a detalle estas características histopatológicas para entender el desarrollo de la enfermedad, por lo cual en base al trabajo de Weiner y Frenkel (2006), a continuación se describen:

- Placa amiloide: Sitio de acumulación del péptido β amiloide en cerebros de ratones utilizados como modelo en la enfermedad de Alzheimer y en cerebros de pacientes con dicha enfermedad (Weiner & Frenkel, 2006).

Las placas de β amiloide se clasifican de acuerdo a su estado de agregación. Las denominadas placas neuríticas consisten de agregados conformados por β amiloide en estado fibrilar, es decir, en un estado de agregación más denso, en el cual las subunidades del péptido han formado fibrillas extremadamente estables que se acumulan en la superficie de las neuronas. Por otro lado, las placas difusas están formadas en su mayoría por agregados cuyo centro contiene una densidad menor de fibras de β amiloide, por el contrario presenta una mayor cantidad de especies oligoméricas, de ahí que se les nombre “placas difusas” (Weiner & Frenkel, 2006).

- Marañas neurofibrilares: Agregados proteicos patológicos encontrados en neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Las marañas se forman por hiperfosforilación de una proteína asociada a los microtúbulos conocida como Tau, causando su agregación en una forma insoluble (Weiner & Frenkel, 2006).
- Neuritas distróficas: Inflamación anormal en dendritas y axones, desarrollada como producto del estrés neuronal en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Weiner & Frenkel, 2006).
- Astrocito: Célula glial en forma de estrella del sistema nervioso central que forma una interfase funcional y estructural entre tejidos no nerviosos y neuronas. Una vez activados, los astrocitos expresan proteínas ácidas gliales fibrilares en la superficie (Weiner & Frenkel, 2006).
- Célula microglial: Célula de linaje-macrófago que proviene de la médula ósea y está presente en el sistema nervioso central (Weiner & Frenkel, 2006).

2.1.4. Genética y factores de riesgo

Cuando la EA es resultado de una predisposición genética entonces se le conoce como Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), en estos casos la patología se presenta en individuos jóvenes después de los 30 años de edad. Aunque menos del 5% de los casos de pacientes con la EA son ocasionados por predisposición genética, es importante conocer los genes implicados, el tipo de herencia, así como las diferencias entre EA esporádica y EAF (Mayeux, 2003).

La EAF presenta un tipo de herencia autosómica dominante. Esta forma temprana de la enfermedad es causada por mutaciones en tres genes: los genes de las presenilinas PS1 y PS2, así como el gen de la Proteína Precursora del Amiloide (APP). Estos genes están situados en los cromosomas 14, 1 y 21, respectivamente. Se ha encontrado que la presencia de mutaciones en el gen de PS1 tiene una mayor contribución para el desarrollo de la EAF que las mutaciones en los otros dos genes. Como se detallará más adelante, estos genes están involucrados en el transporte y procesamiento proteolítico de APP (Weiner & Frenkel, 2006).

Más del 95% de los individuos afectados presentan la Enfermedad de Alzheimer esporádica, la cual se ve asociada a factores de riesgo como la edad, la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE), alteración de los niveles de colesterol en el organismo, exposición a ciertos metales, traumatismos craneoencefálicos y estilo de vida (Mayeux, 2003).

Edad: La edad es el factor más importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer esporádica. Como se mencionó, la prevalencia de la enfermedad aumenta de manera proporcional al aumentar la edad y tomando en cuenta que la población mayor está en continuo y gran crecimiento, se estima que, en caso de no encontrar soluciones terapéuticas efectivas, la población afectada podría triplicarse antes del año 2050 (ADEAR Center NIH, 2010).

Presencia del Alelo $\epsilon 4$ de ApoE (ApoE- $\epsilon 4$): El gen codificante para ApoE es pleomórfico y presenta tres alelos distintos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Se ha reportado que la presencia de un alelo $\epsilon 4$ aumenta 2 veces el riesgo de padecer la enfermedad, mientras que en individuos homocigotos para este alelo, el riesgo aumenta 5 veces (Corder et al., 1993). Aproximadamente el 20% de la población con EA tiene una asociación con ApoE- $\epsilon 4$. También es importante mencionar que los pacientes que son homocigotos para $\epsilon 3$ tienen un riesgo normal de padecer la enfermedad. Por otro lado se ha identificado que los individuos heterocigotos $\epsilon 2,3$ tienen un riesgo menor al normal, por lo cual se dice que la presencia de este genotipo confiere un efecto protector (Corder et al., 1994).

Síndrome de Down: En individuos afectados por este síndrome, aumenta 2 veces el riesgo de padecer EA. En estos pacientes, la patología se presenta aproximadamente cerca de los 40 años de edad. Se sabe también que mujeres que han concebido hijos con Síndrome de Down antes de los 35 años, corren más riesgo de padecer la enfermedad (Schupf et al., 2001).

Traumatismos craneoencefálicos: Está demostrado que daños cerebrales aumentan el riesgo de padecer EA (Guo et al. 2000; Plassman et al., 2000). Aún no se conoce el mecanismo mediante el cual se produce dicha asociación, sin embargo se ha visto tanto en humanos como en ratones que después de un daño craneoencefálico, hay un aumento de péptido β amiloide en cerebro (Uryu, 2002).

Niveles de colesterol: El cerebro está conformado aproximadamente por un 25% de colesterol (Dietschy, 2001), el cual en su mayoría (>95%) es sintetizado *de novo* de manera independiente al que está presente en otras partes del organismo. Esto se puede explicar debido a que el colesterol no puede cruzar la barrera hematoencefálica y por tanto el que se encuentra presente en sangre periférica no puede ingresar a cerebro (Martin et al., 2010).

Aún no se conoce bien el papel del colesterol en el desarrollo de la EA, no se sabe si el aumento de colesterol es producto de la enfermedad o si un exceso de colesterol influye en la aparición de la patología (Martin et al., 2010). El colesterol es necesario para la formación de varios componentes celulares tanto estructurales como no estructurales, por lo cual su deficiencia provoca alteraciones en la homeostasis celular. Sin embargo se sabe que un exceso de colesterol provoca patologías severas como lo es el caso de hipercolesterolemia, síndrome coronario agudo, etc. Por lo cual es muy interesante precisar a futuro, el papel de esta macromolécula en el desarrollo de la EA.

2.1.5. Tratamiento sintomático

En la actualidad no hay cura para la enfermedad de Alzheimer: no existen tratamientos profilácticos (vacunas) ni tratamientos que impidan la progresión de la enfermedad (terapéuticos). Sin embargo se ha encontrado que algunos fármacos y otras terapias pueden actuar como tratamientos paliativos (ADEAR Center NIH, 2010).

Inhibidores de la acetilcolinesterasa: Este tipo de fármacos se utiliza en casos de EA en un estadio leve a moderado. El tratamiento puede ayudar a retrasar los síntomas característicos de la enfermedad por un tiempo limitado y puede ayudar a controlar algunos de los síntomas de conducta. Dentro de los fármacos utilizados se encuentran Galantamina, Rivastigmina, Donepezil y Tacrina, este último ha caído en desuso debido a su baja seguridad (ADEAR Center NIH, 2010).

En general, todos estos fármacos son inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, el cual está implicado en los procesos de aprendizaje y memoria. Aunque aun no se logra entender bien la función de la acetilcolina en la EA, se sabe que conforme avanza la enfermedad, los niveles de este neurotransmisor disminuyen debido a la muerte de neuronas colinérgicas (ADEAR Center NIH, 2010).

Memantina: Para el tratamiento de los síntomas de la EA en estadio moderado a severo se utiliza un fármaco denominado memantina, el cual es un antagonista del N-metil D-aspartato (NMDA). El principal papel de este tratamiento es retardar la progresión de algunos síntomas: permite a los pacientes mantener algunas funciones básicas por un tiempo mas prolongado a diferencia de los pacientes que no utilizan el medicamento. Este medicamento actúa regulando al glutamato, un importante químico a nivel cerebral, ya que cuando este compuesto se produce en exceso, puede ocasionar muerte celular cerebral (ADEAR Center NIH, 2010).

Debido a que los mecanismos de acción de los inhibidores de la acetilcolinesterasa y de la memantina son diferentes, estos medicamentos se pueden usar en conjunto, obteniendo en algunos casos mejores resultados. Sin embargo, hay que recordar que el uso de estos medicamentos es únicamente para disminuir los síntomas, ya que no evitan la progresión de la enfermedad.

2.2. Péptido β amiloide

El péptido beta amiloide (β A) es un péptido de 39 a 42 aminoácidos dependiendo del tipo de procesamiento proteolítico que sufre su proteína precursora (APP) y tiene un peso molecular de aproximadamente 4kDa en su forma monomérica. Se ha identificado a este péptido como el principal factor causante del deterioro cognitivo característico de la EA, por lo cual actualmente la terapia dirigida contra β A es el principal blanco en investigación ((Mayeux, 2003; Ahmed et al., 2010).

2.2.1. Proteína Precursora del Amiloide

La Proteína Precursora del Amiloide (APP) es una proteína transmembranal tipo I de 695 aminoácidos, expresada en células de varios tejidos, como corazón, riñones, pulmones, bazo e intestino, al igual que en cerebro. Esta proteína se encuentra anclada a la membrana de una manera en la cual expone la mayor parte de su estructura hacia el líquido extracelular, su residuo N-terminal se orienta hacia la matriz extracelular y su dominio C-terminal hacia el citoplasma. Hasta el momento se ha encontrado que las funciones de APP están involucradas en la maduración de las neuronas, en la migración de las neuronas recién formadas hacia la corteza, así como en adhesión celular (Turner et al., 2003).

2.2.2. Procesamiento de APP

El procesamiento proteolítico de APP para dar origen a las especies tóxicas de β A, es efectuado por enzimas denominadas secretasas (Ver Fig. 1). Inicialmente, hay dos tipos de enzimas que realizan cortes proteolíticos en la estructura de APP, ambas generan dos fragmentos, uno que se queda anclado a la membrana y un fragmento soluble de mayor tamaño: la secretasa α genera un fragmento soluble de 612 aminoácidos dejando anclado en la membrana un fragmento de 83 aminoácidos (C83), mientras que la secretasa β deja anclado en la membrana un fragmento proteico de 99 aminoácidos denominado C99 (Citron, 2004).

Después de la acción de las secretasas α y β , hay una tercera enzima que realiza un corte proteolítico en los fragmentos proteicos que quedaron anclados a la membrana celular: la secretasa γ . Por un lado esta enzima corta a C83 generando un péptido denominado p3 y por otro lado escinde a C99 para dar origen a las diferentes especies del péptido β amiloide (Citron, 2004).

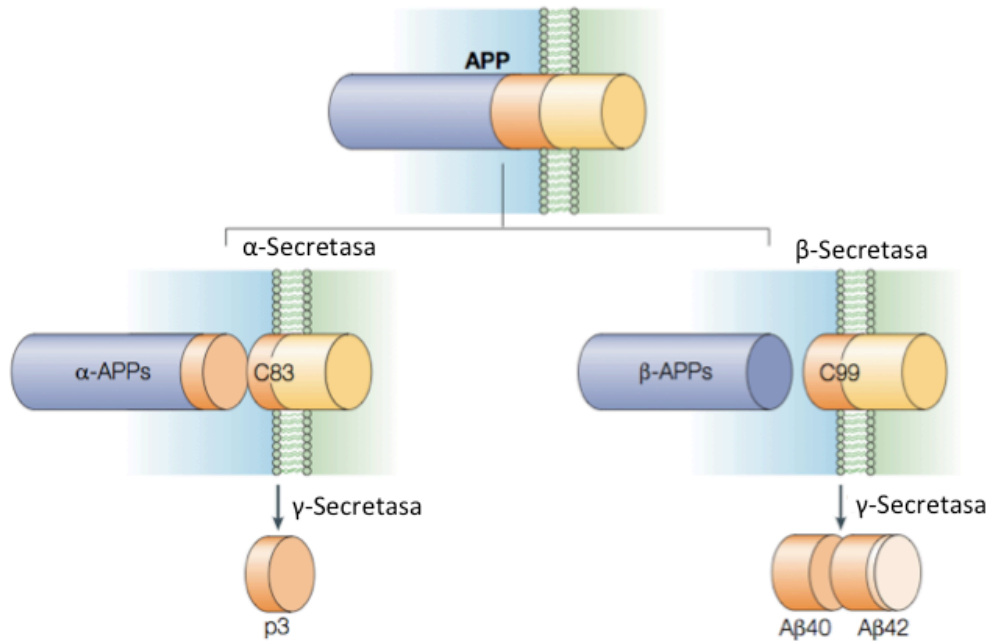


Fig. 1. Procesamiento proteolítico de APP mediante la acción de complejos enzimáticos denominados secretasas (Modificado de Citron, 2004).

2.2.3. Especies tóxicas de β A presentes en cerebros de pacientes con EA

La importancia de APP radica en que es la precursora de las principales especies del péptido β amiloide: β A 1-40, el menos tóxico, así como β A 1-42, el cual debido a su estructura, a su menor solubilidad y a su mayor capacidad de agregación, presenta mayor toxicidad (Ahmed et al., 2010).

El estudio de las fibras de β A 1-40 mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha demostrado que los residuos 1-10 no presentan una estructura específica mientras que los residuos 11-40 adoptan un plegamiento tipo β -giro- β . El ensamblaje de las cadenas de monómero se lleva a cabo entre F19-I32, L34-V36 y entre Q15-V36 al igual que entre H13-V40 (líneas punteadas en azul) (Ver Fig. 2b).

En las fibras de β A 1-42, los residuos 1-17 no presentan una estructura específica (residuos en gris) y los residuos 18-42 se encuentran plegados tipo β -giro- β . Se han reportado contactos intramoleculares en el monómero de las fibras de β A 1-42 entre F19-G38 (líneas en rojo) y entre M35-A42 (líneas en naranja).

Tanto en βA 1-40 como en βA 1-42, la conformación β -giro- β es estabilizada por interacciones hidrofóbicas (residuos en verde) así como por un puente salino entre D23-K28 (línea curva en negro)(Ver Fig. 2b).

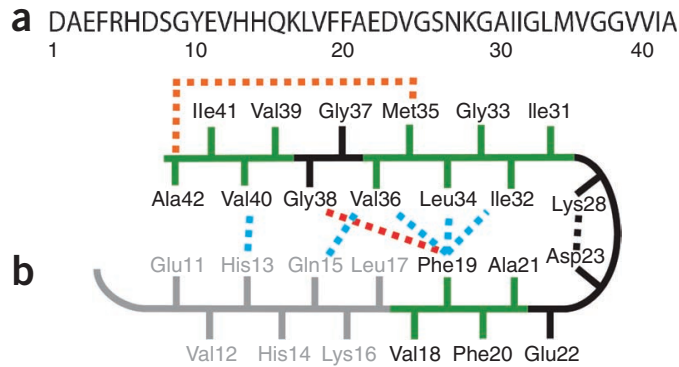


Fig. 2. Secuencia (a) y estructura (b) de la unidad monomérica de las fibras de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 (Modificado de Ahmed et al., 2010).

Existen además, otras especies tóxicas presentes en cerebros de pacientes con EA como péptidos amino-truncados (βA 3-42, βA 11-42) y especies truncadas-modificadas, como aquellas que tienen en sus extremos N-terminal grupos piroglutamato, $\beta AN3(pE)$ y $\beta AN11(pE)$. Aunque el significado patológico de estas formas “cortas” del péptido βA no se ha logrado comprender del todo, diversos estudios han demostrado que estos péptidos son significativamente más resistentes a la degradación, se agregan más rápido y muestran similar o en algunos casos mayor toxicidad en cultivos neuronales de hipocampo, en comparación con los péptidos completos (Acero et al., 2009).

Se sugiere que las especies truncadas se forman paso a paso a partir del péptido de longitud completa por acción de exopeptidasas (Saido et al., 1995). Por otro lado se ha demostrado que las especies amino modificadas sufren una ciclización del ácido glutámico en N-terminal por medio de la enzima glutaminil ciclasa, formando un piroglutamato en dicha región (Wirths, 2010).

2.2.4. Oligomerización y agregación de β A

El proceso de agregación de β A es un proceso gradual, espontáneo y rápido, que va desde la formación de estructuras de bajo peso molecular como dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros (que se ha demostrado que son muy estables) y decámeros, posteriormente se forma lo que se conoce como oligómeros de alto peso molecular y por último se forman protofibrillas y fibras más estables (Ahmed et al., 2010).

En el proceso de agregación, se sabe que intervienen distintos tipos de interacciones tanto intermoleculares como intramoleculares. En el caso de los oligómeros la estabilidad intra-monomérica se da principalmente por cargas opuestas entre residuos ácidos y básicos, mientras que la asociación inter-monomérica se da principalmente por interacciones hidrofóbicas. Para la formación de las fibrillas más estables, las principales fuerzas que actúan uniendo a los monómeros son de carácter hidrofóbico. Se sabe también, que para la agregación intervienen diversos factores como la temperatura, concentración de monómero y concentración de sales en el medio. (Ahmed et al., 2010).

Los oligómeros de β A 1-42 miden alrededor de 10-15 nanómetros de diámetro. Estudios de RMN demostraron que en el caso de la estructura oligomérica, los monómeros de β A 1-42 que la conforman, muestran un contacto intramolecular entre los residuos F19-L34 (líneas en azul). Mediante estudios de accesibilidad de solventes, se ha demostrado que el extremo C terminal de las subunidades oligoméricas, se encuentra orientado hacia el centro de la estructura (Ver Fig. 3, a y b).

Cuando β A 1-42 se encuentra en estado fibrilar, la estructura de la unidad monomérica es como se describió en el apartado anterior (Ver Fig. 3, c). Por otro lado, se ha demostrado que la orientación intramolecular del monómero dentro de la fibra es antiparalela y la estructura de las fibrillas es “escalonada”, es decir que se apilan unas sobre otras (Ver Fig. 3, c y d).

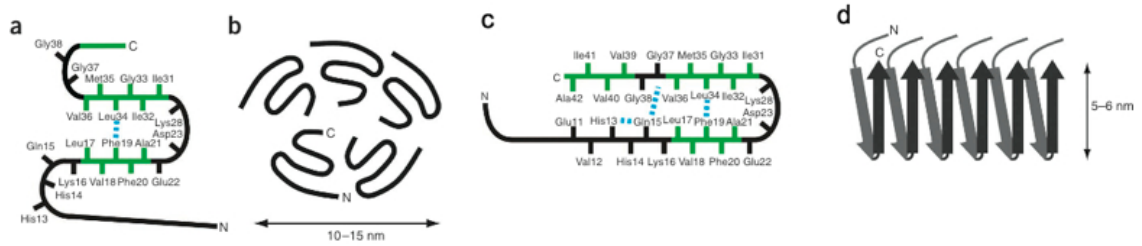


Fig. 3. Modelos moleculares de oligómeros y fibras de β A 1-42. a) Esquema del monómero dentro de la estructura oligomérica b) Esquema del pentámero c) Esquema del monómero dentro de la estructura fibrilar d) Esquema de la estructura fibrilar (Modificado de Ahmed et al., 2010).

2.2.5. Hipótesis de la cascada amiloide

Hace ya casi 20 años que se logró asociar la presencia del péptido β A con la neurodegeneración característica de la EA. Desde entonces se han hecho diversos hallazgos que han permitido establecer una hipótesis de los diferentes eventos ocurridos de manera secuencial durante la enfermedad (Hardy & Selkoe, 2002).

La hipótesis propone que la cascada es iniciada por la generación de distintas especies del péptido β A. En el caso de la EA familiar, el péptido β A se produce debido a mutaciones patogénicas, mientras que en la EA esporádica, varios factores pueden contribuir al aumento de la carga de oligómeros y agregados de β A (Citron, 2004).

Los oligómeros y agregados de β A pueden directamente dañar la sinapsis y las neuritas de las neuronas, además de activar a la microglía y los astrocitos. Por otro lado se cree que β A induce la hiperfosforilación de Tau y la formación de marañas neurofibrilares, lo cual contribuye substancialmente al proceso de la enfermedad (Citron, 2004. Ver Fig. 4).

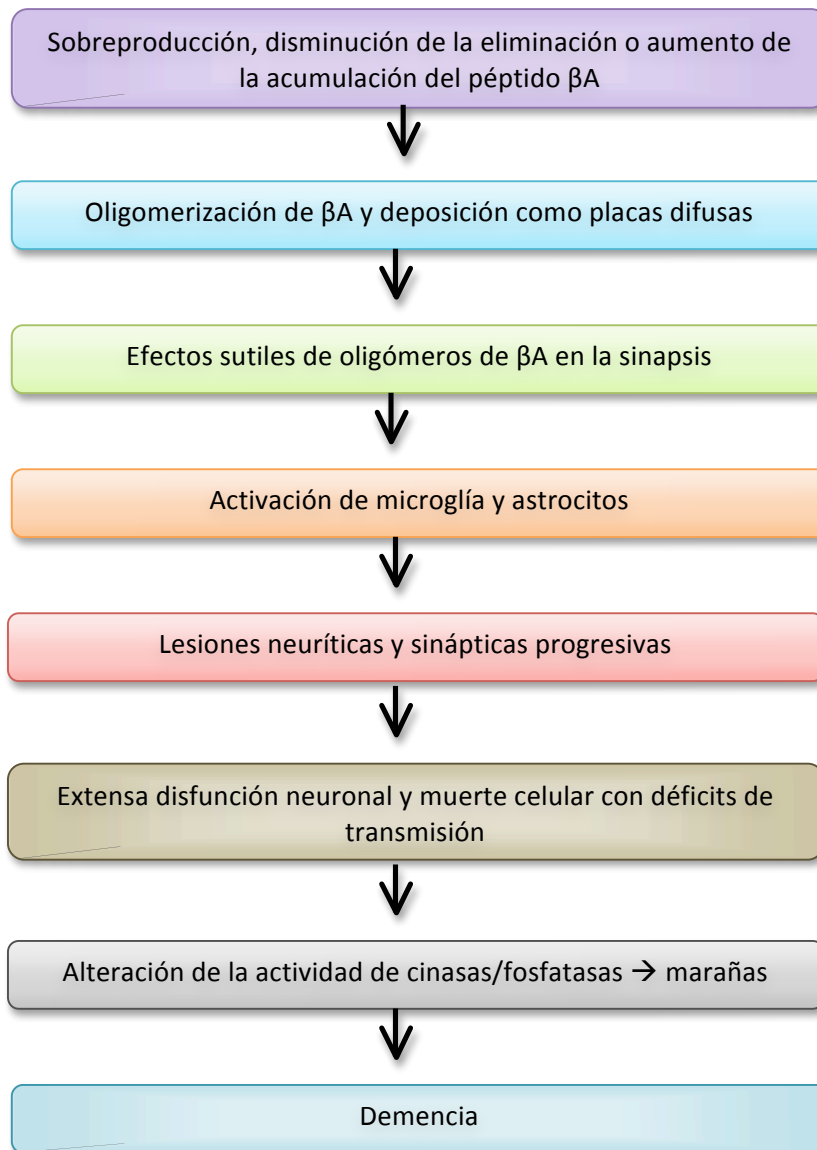


Fig. 4. Hipótesis de la cascada amiloide (Modificado de Citron, 2004).

Aunque inicialmente algunos investigadores no consideraban que la acumulación y agregación del péptido β A fuera el evento inicial en el desarrollo de la neuropatología, a lo largo de los años la hipótesis de la cascada amiloide se ha visto reforzada por una serie de descubrimientos, entre ellos:

- Mutaciones en PS1 y PS2, las cuales forman parte del complejo enzimático “secretasa γ ”, alteran el metabolismo de APP para formar β A y contribuir al desarrollo de la EA (Duff et al., 1996; Citron et al., 1997).

- Mutaciones en el gen codificante para APP, causan una sobreproducción del péptido β A en ciertas familias con una forma autosómica dominante de la enfermedad (Citron, 1992).
- Las estrategias dirigidas a disminuir los agregados de β A disminuyen también los síntomas de la enfermedad y mejoran las tareas cognitivas en modelos transgénicos de ratón para la EA (Roskam et al., 2010).
- Mutaciones en el gen codificante para la proteína Tau causan demencia frontotemporal con parkinsonismo. Esta afección neurodegenerativa es caracterizada por amplia deposición de marañas neurofibrilares de Tau en el cerebro, pero no por la deposición de β A (Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998).

La implicación clara es que aun las más severas consecuencias de la alteración de Tau, no son suficientes para inducir las placas amiloides características de la EA. Lo que indica que las marañas neurofibrilares presentes en cerebros de pacientes con EA fueron probablemente depositadas después del metabolismo de β A y posterior a la formación inicial de placas (Hardy & Selkoe, 2002).

- Ratones transgénicos que expresan tanto APP humana mutante como Tau presentan un incremento en la formación de marañas neurofibrilares de Tau, en comparación con ratones transgénicos que sólo expresan Tau, mientras que el número de placas no se altera. Esto sugiere que el procesamiento alterado de APP ocurre antes que las alteraciones de Tau en la cascada patológica de la EA (Lewis et al., 2001).

- Cruzas entre ratones transgénicos para APP con ratones deficientes de ApoE, generan descendencia con una reducción significativa en la deposición de β A en cerebro, lo cual proporciona evidencia de que el rol patogénico de la variabilidad en el locus humano de ApoE es muy probable que involucre el metabolismo de β A (Corder et al., 1993; Bales et al., 1997).
- Existe evidencia de que la variabilidad genética en el catabolismo y la eliminación de β A podría contribuir al desarrollo de la EA generalizada (Myers et al., 2000; Ertekin-Taner et al., 2000).

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la noción de que la acumulación cerebral de β A es la influencia primaria en la EA y que el resto del proceso de la enfermedad, incluyendo la formación de las marañas de Tau, resultan de un desbalance entre la producción de β A y su eliminación (Hardy & Selkoe, 2002).

2.3. Terapias en investigación para la Enfermedad de Alzheimer

Actualmente en todo el mundo y principalmente en países desarrollados, se está realizando exhaustiva investigación acerca de terapias para la EA. Se han identificado distintos blancos terapéuticos a los cuales se busca atacar desde distintos enfoques.

Debido a la gran cantidad de información disponible sobre la investigación de estas terapias y los estudios que se realizan acerca de cada una de ellas, con fines prácticos sólo se hará mención de ellas, mostrando sólo un ejemplo detallado: los tratamientos anti-inflamatorios. Para más información acerca de estas terapias en investigación, los mecanismos de acción de los agentes utilizados y los estudios en los cuales se evalúa su efectividad en modelos animales y/o ensayos clínicos, se recomienda consultar las revisiones de Golde y Citron (2006 y 2010, respectivamente). Posteriormente, como la base de este trabajo es la inmunoterapia, se presentará una revisión actual y detallada sobre este tema.

2.3.1. Tratamientos anti-inflamatorios

Estudios epidemiológicos han demostrado que la prevalencia de la EA disminuye en pacientes que usan de manera crónica anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) (McGeer et al., 2006). Este tipo de fármacos inhibe las enzimas denominadas ciclooxigenasas (COX), las cuales a partir de ácido araquidónico producen prostaglandinas, los principales componentes pro-inflamatorios (Weiner & Frenkel, 2006). La expresión de COX2, la isoforma inducible encontrada en neuronas y otras células, aumenta en cerebros de pacientes con EA (Yasojima, 1999), indicando que los AINES podrían ayudar en la mejora de pacientes con EA reduciendo la inflamación neurotóxica que ocurre por la deposición de β amiloide (Weiner & Frenkel, 2006).

Los clásicos AINES utilizados como Ibuprofeno e Indometacina, a través de su inhibición no selectiva de las ciclooxigenasas, pueden suprimir la producción de prostaglandinas por células de la microglía, lo cual ocurre en procesos inflamatorios cerebrales (Hoozemans et al., 2003). También se ha reportado que un grupo de AINES independientes de la inhibición de COX disminuyen los niveles de β A (Weggen et al., 2001), aparentemente por la modulación de las secretasas γ y β .

Sin embargo a pesar de todos los estudios realizados con agentes anti-inflamatorios, ensayos clínicos efectuados con inhibidores específicos de COX2 no han logrado reducir el deterioro cognitivo, ni han logrado cambiar los patrones de comportamiento característicos de la enfermedad, por lo cual su papel como agentes terapéuticos no es muy prometedor (Aisen et al., 2003).

2.3.2. Otros tratamientos

Una vez que se logró identificar que mutaciones en ciertas enzimas involucradas en el procesamiento de APP estaban relacionadas de manera directa con la EA familiar (Duff et al., 1996; Citron et al., 1997), comenzó la investigación para el desarrollo y descubrimiento de agentes inhibidores de las principales enzimas asociadas a la producción del péptido β A. En 1999 se desarrollaron los primeros inhibidores de la enzima γ -secretasa (Sinha & Lieberburg, 1999) y unos años más tarde se comenzaron a estudiar a los inhibidores de la β -secretasa, así como agentes que aumentan la producción de α -secretasa, de manera que ésta última enzima compita con β -secretasa en el procesamiento de APP y finalmente disminuya la producción de β Amiloide (Golde, 2006).

Otras estrategias que se han desarrollado incluyen la disminución de la producción del péptido β A por medio de: a) uso de fármacos que se unen a transcritos de RNA de APP, disminuyendo así la expresión de esta proteína y por tanto al péptido β A (Utsuki et al., 2006) b) terapia génica con RNAs de silenciamiento o vectores virales utilizados como sistemas de transporte de material genético a células neuronales (Singer et al., 2005).

También se ha planteado evitar la agregación del péptido β A mediante moléculas pequeñas como inhibidores de agregación (Soto et al., 2005), o aumentar la eliminación del péptido mediante el uso de enzimas que degradan a β A, como neprilisina (NEP) (Iwata et al., 2000; Iwata et al., 2001; Eckman et al., 2005) o la enzima degradadora de insulina (IDE) (Qiu et al., 1998; Eckman et al., 2005), entre otras.

En cuanto a estrategias dirigidas contra la proteína Tau, se han propuesto y/o estudiado: a) disminuir su producción, b) evitar su fosforilación, c) alterar su agregación y d) modificar sus chaperonas (Golde, 2006). Sin embargo, debido al papel del péptido β A en el desarrollo de la EA (ver apartado: "hipótesis de la cascada amiloide") la mayoría de los estudios clínicos y/o preclínicos involucran a este péptido como blanco terapéutico.

Actualmente hay protocolos de investigación clínica en fase I, II y III de diferentes agentes terapéuticos, cuyos mecanismos de acción incluyen algunos de los antes mencionados (clinicaltrials.gov, NIH). Se espera que en un futuro no muy lejano, algunos de estos medicamentos sean efectivos y seguros para el tratamiento de la EA.

De todos los tratamientos, la inmunoterapia, la cual se describirá a continuación, es la alternativa más prometedora, debido a las evidencias en estudios preclínicos que demuestran una disminución en el deterioro cognitivo y en la neuropatología tipo Alzheimer, así como la baja frecuencia de efectos adversos al utilizar dichos agentes terapéuticos.

2.3.3. Inmunoterapia

En 1999 Schenk y colaboradores, realizaron un experimento clave que sirvió como punto de partida, para el desarrollo de lo que actualmente se conoce como inmunoterapia para la enfermedad de Alzheimer: inmunizaron dos grupos de ratones transgénicos PDAPP (los cuales sobre-expresan una forma mutante de APP humana) con el péptido β A 1-42, un grupo fue inmunizado antes de la aparición de la patología tipo Alzheimer (ratones de 6 semanas de edad) y el otro grupo, cuando la deposición de β A en cerebros de ratones transgénicos y los cambios neuropatológicos están bien establecidos en el modelo (a los 11 meses de edad). La inmunización de los ratones jóvenes previno la formación de placas del péptido β A, neuritis distróficas y astrogliosis, mientras que la inmunización de los ratones de edad avanzada disminuyó la progresión de la neuropatología tipo Alzheimer. Con este experimento lograron poner en evidencia que la inmunización con el péptido β A podría ser efectiva en la prevención y el tratamiento de la EA (Schenk et al., 1999).

Sin embargo, el grupo de Schenk y colaboradores, no fue el primero en describir que los anticuerpos dirigidos contra el péptido β A podrían actuar como agentes terapéuticos. En 1996 ya se había comprobado en estudios *in vitro* que algunos anticuerpos monoclonales inhiben la formación de fibrillas del péptido β A

(Solomon et al., 1996) y en 1997 se demostró que dichos anticuerpos también tienen la capacidad de desagregar las fibrillas y pasar a la forma monomérica del péptido β A, la cual no es tóxica (Solomon et al., 1997)

En el año 2000, Bard y colaboradores, realizaron otro experimento clave que ha desencadenado una serie de investigaciones y formación de hipótesis con respecto a los mecanismos de eliminación del péptido β A por medio de anticuerpos, los cuales se discutirán más adelante. Administraron por vía intravenosa a ratones transgénicos PDAPP anticuerpos dirigidos contra el péptido β A y demostraron que dichos anticuerpos entraron al Sistema Nervioso Central (SNC) y redujeron la patología tipo Alzheimer (Bard et al., 2000). En ese mismo año, Janus y colaboradores, realizaron estudios de conducta en ratones transgénicos TgCRND8 (los cuales sobre-expresan una forma mutante de APP humana) y demostraron que la inmunización con el péptido β A disminuye el deterioro cognitivo característico de la neuropatología tipo Alzheimer en dichos ratones (Janus et al., 2000).

Con los antecedentes que se tenían hasta esa fecha, en el año 2002, la compañía farmacéutica Elan Pharmaceuticals Inc. decidió realizar un estudio clínico y después de fase I sin efectos secundarios, pasaron a fase II, en el cual se inmunizó a pacientes con EA leve a moderada, con el péptido β A más el adyuvante QS-21. A pesar de las expectativas que se tenían en ese momento, el ensayo clínico se detuvo debido a que el 6% de los pacientes (18 de 298) presentó meningoencefalitis (Nicoll et al., 2003; Orgogozo et al., 2003; Gilman et al., 2005). Se demostró en estudios posteriores que dicho proceso inflamatorio fue causado por una infiltración de linfocitos T auto-reactivos contra la propia proteína β A (Lemere et al., 2007; Lemere, 2009).

En cuanto a la mejora cognitiva de los pacientes incluidos en el estudio, se ha reportado que aquellos sujetos que produjeron una cantidad de anticuerpos considerable, presentaron una ligera mejora a nivel cognitivo en comparación con aquellos pacientes que no produjeron una cantidad robusta de anticuerpos, sin embargo dicho efecto no pudo ser estudiado de manera adecuada debido a que el estudio fue suspendido antes de que el tratamiento concluyera (Gilman et al., 2005).

Después de los resultados obtenidos en dicho estudio clínico, la comunidad científica se percató de que aún quedan muchos aspectos por entender acerca de la inmunoterapia, el más importante de ellos, la determinación de un epítipo preciso como blanco, para obtener la máxima eficacia terapéutica (Golde, 2006). Si el blanco es βA , entonces el reto será desarrollar inmunógenos que mediante inmunización activa desencadenen una elevada producción de anticuerpos sin la presencia de respuestas de células T auto-reactivas dañinas. Aunque se ha logrado estudiar dichos inmunógenos en ratones, debido a la heterogeneidad de la respuesta inmune en el hombre, es difícil predecir los efectos de dichas estrategias en humanos (Agadjanyan, 2005; Maier, 2006).

Actualmente, varios estudios se dedican a inmunoterapia pasiva para la EA, por las ventajas que presenta frente a la inmunización activa: a) Se sabe que durante la vejez la capacidad del sistema inmunológico para responder ante un antígeno es limitada, en especial la capacidad de las células B para producir anticuerpos (Siegrist & Aspinall, 2009), por lo cual la administración de anticuerpos en esta población es una estrategia muy conveniente, b) Es posible administrar anticuerpos modificados o fragmentos de anticuerpos como Fab's, scFV's o VH's, los cuales carecen de la fracción Fc y por lo tanto no activan microglía, pero sí son efectivos en el reconocimiento y neutralización de las especies tóxicas del péptido βA (Wilcock et al., 2003; Medecigo et al., 2010) y c) Se pueden administrar anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico de cualquiera de las especies del péptido βA , ya sea modificadas o truncadas, y de esta manera neutralizar los efectos tóxicos de las especies deseadas (Bard et al., 2003; Medecigo et al., 2010).

Aunque un gran número de estudios efectuados recientemente involucran esquemas de inmunización pasiva, no se descarta la posibilidad del uso de inmunización activa como terapia para la EA. En términos generales, esta estrategia de inmunización es más económica y la producción de los inmunógenos es relativamente simple (Lemere, 2009). Lo ideal en este tipo de inmunoterapia sería administrar el inmunógeno antes de que se presenten incluso síntomas de la enfermedad y en una edad y condición física en la que el sistema inmunológico de

los individuos pueda responder eficientemente a la vacunación, es decir mediante un tratamiento profiláctico (Siegrist & Aspinall, 2009). Para llevar a cabo lo anterior, se requieren métodos de diagnóstico específicos, mediante el uso de marcadores tempranos que pongan en evidencia la enfermedad, los cuales aun se encuentran en investigación (Pauwels et al., 2009). La finalidad de esto, es llegar a un diagnóstico certero de la patología antes de que afecte a nivel cognitivo a los pacientes.

Independientemente de que la inmunoterapia se lleve a cabo por medio de inmunización activa o pasiva, hay factores esenciales que debemos tomar en cuenta al momento de realizar el tratamiento. Dependiendo de la carga del péptido β A en parénquima cuando la inmunización es iniciada, del modelo animal empleado y de las diferentes propiedades de los anticuerpos monoclonales y/o péptidos utilizados, la eficacia del tratamiento puede variar (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Bard et al., 2003). Recientemente se ha confirmado que a edades más tempranas la inmunización es más efectiva en la prevención de la acumulación de β A y del deterioro cognitivo, lo cual está relacionado con la carga del péptido β A en cerebro, sin embargo también se ha reportado que puede haber una mejora cognitiva posterior a la inmunización sin necesidad de que haya disminución visible de placas amiloides en cerebro (Dodart et al., 2002).

Otro aspecto importante, es evitar la presencia de microhemorragias. Se ha detectado que algunos anticuerpos monoclonales producen un aumento en la deposición de β A vascular, lo cual resulta en la producción de microhemorragias (Pfeifer et al., 2002; Wilcock et al., 2004; Racke et al., 2005). Aun no se sabe por qué algunos anticuerpos provocan estos efectos mientras que otros no, sin embargo se piensa que esto podría estar relacionado con el epítipo al que reconocen (Golde, 2006).

Hasta el momento, se han propuesto cuatro mecanismos de eliminación del péptido β A por medio de anticuerpos: 1) Parte de los anticuerpos producidos mediante inmunización activa o administrados mediante inmunización pasiva, entran al SNC y reconocen al péptido β A, posteriormente la microglía se activa y fagocita al complejo

anticuerpo- β A (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000), 2) Se ha encontrado que algunos anticuerpos tienen la capacidad de reconocer y desagregar fibrillas de β A, sin embargo aún no se conoce el mecanismo mediante el cual dichos anticuerpos causan este efecto (Solomon et al., 1997; Frenkel et al., 2000), 3) El mecanismo de “eliminación periférica” consiste en el reconocimiento del péptido β A en el torrente sanguíneo y su posteriormente eliminación, al cambiar la concentración de β A en la sangre se promueve el flujo del monómero desde el SNC hacia la circulación periférica (DeMattos et al., 2001) y 4) Por último, se ha demostrado que las especies oligoméricas formadas por β A son el principal factor causante de la pérdida de la sinapsis y el daño neuronal (Walsh & Selkoe, 2007), por lo cual se propone que algunos anticuerpos reconocen a estas especies y las eliminan, produciendo una mejora en el deterioro cognitivo sin disminución visible de placas amiloides (Dodart et al., 2002).

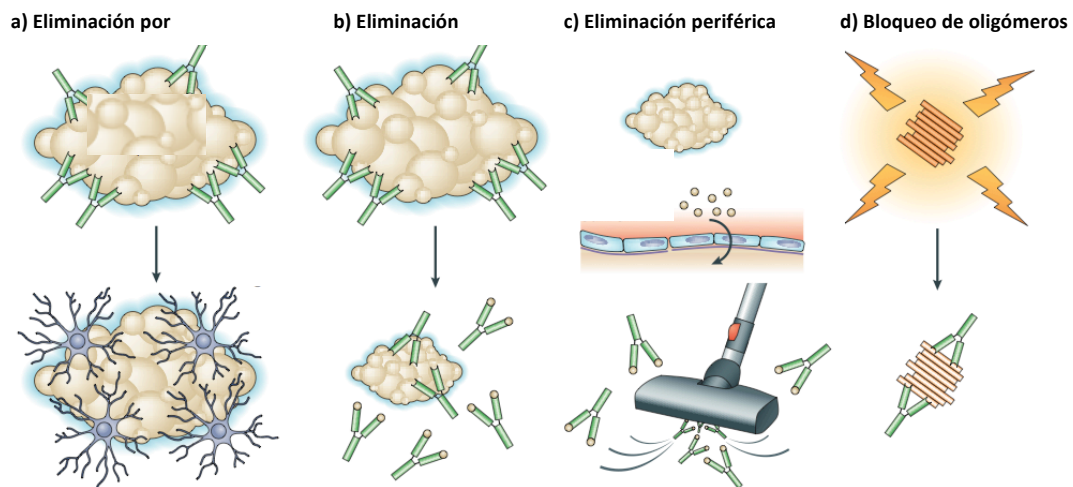


Fig. 5. Modelos de eliminación del péptido β A por medio de anticuerpos específicos contra β A. a) Pequeñas cantidades de anticuerpos alcanzan los depósitos amiloides en el cerebro y activan una respuesta fagocítica por la microglía. b) Anticuerpos alcanzan los depósitos amiloides en el cerebro y los eliminan directamente a través de la interacción del anticuerpo con el depósito amiloide. c) Anticuerpos actúan por medio de una eliminación periférica de las especies solubles de β A, provocando finalmente la disgregación de los depósitos en el cerebro por medio del transporte de β A a la periferia, donde es rápidamente eliminado. d) Anticuerpos se unen rápidamente a especies de β A oligoméricas, bloqueando sus efectos tóxicos sin un impacto inmediato en la carga amiloide (Modificado de Siegrist & Aspinall, 2009).

Con respecto a los estudios clínicos, actualmente diversas compañías farmacéuticas llevan a cabo ensayos en fase I, II y III, para evaluar la seguridad y eficacia de distintos péptidos y/o fragmentos de β A, así como de anticuerpos monoclonales y/o sueros purificados con anticuerpos dirigidos hacia β A. Hasta la fecha se han probado más de diez agentes inmunoterapéuticos (clinicaltrials.gov, NIH). Tres de ellos se encuentran en estudios de fase III: a) Bapineuzumab de la compañía farmacéutica Elan, un anticuerpo monoclonal humanizado conocido como 3D6, el cual reconoce a la región N-terminal del péptido β A, b) Solanezumab de la compañía Eli Lilly, el anticuerpo monoclonal humanizado m266, que reconoce a la región central de β A y c) La inmunoglobulina intravenosa G (IVIG) de Baxter, la cual es una preparación de un suero humano que contiene anticuerpos contra β A (Siegrist & Aspinall, 2009).

Al conocer los efectos tan devastadores de la EA en los individuos afectados se puede entender la urgencia del estudio de dicha patología y por tanto, la necesidad de crear estrategias terapéuticas efectivas y seguras. Actualmente la inmunoterapia es la alternativa más estudiada y más prometedora debido a su potente capacidad de eliminar las principales especies tóxicas del péptido β A y de disminuir y/o revertir el deterioro cognitivo tanto en modelos pre-clínicos como en pacientes con EA. Sin embargo aún hay muchos aspectos por entender acerca de esta terapia, como qué especies del péptido β A son las que se tienen que atacar, de qué manera se puede atacar a todas al mismo tiempo y si la disminución de éstas representa una mejora del nivel cognitivo en pacientes y no sólo en modelos preclínicos.

3. JUSTIFICACIÓN

En un estudio previo, por medio del análisis en conejos de la inmunogenicidad del péptido β A 11-42, se logró identificar que existe un epítipo de células B, compartido en diferentes especies de β A, el cual se encuentra en la región que comprende los aminoácidos 11-25 (Perez-Garmendia et al., 2010). Con este hallazgo y tomando en cuenta que las especies más abundantes del péptido β A en cerebros de pacientes con EA son β A 1-42, β A 3-42 y β A 11-42 (Youssef, 2008), se decidió estudiar la inmunogenicidad del péptido β A 11-25 en ratones de diferentes cepas, para evaluar la producción de anticuerpos anti- β A y su capacidad de reconocer las especies tóxicas presentes en cerebros con EA. También se decidió realizar los mismos estudios con los péptidos amino-truncados β A 3-42 y β A 11-42. Esto, con el propósito de identificar nuevos inmunógenos que, por medio de inmunización activa, sean capaces de generar anticuerpos que reconozcan a las diversas especies de β A presentes en cerebros de pacientes con EA.

Actualmente las terapias en investigación con inmunización activa, no proponen que los anticuerpos producidos, reconozcan a una gran variedad de especies del péptido β A. Los anticuerpos producidos al inmunizar con el péptido completo β A 1-42, van dirigidos contra la región N-terminal y por lo tanto no reconocen a otras especies tóxicas, entre ellas las especies N-truncadas (Perez-Garmendia et al., 2010). Es importante desarrollar anticuerpos que reconozcan a las especies N-truncadas, las cuales tienen en común la región central, sobre la cual se ha reportado previamente, que anticuerpos dirigidos contra este sitio, neutralizan la toxicidad de diversas formas del péptido β A y mejoran el deterioro cognitivo (Solórzano-Vargas et al., 2008; Dodart et al., 2002).

4. HIPÓTESIS

Si al inmunizar a ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 hay producción de anticuerpos, entonces los anticuerpos producidos reconocerán a diferentes especies tóxicas del péptido beta Amiloide presentes en cerebros de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer.

5. OBJETIVOS

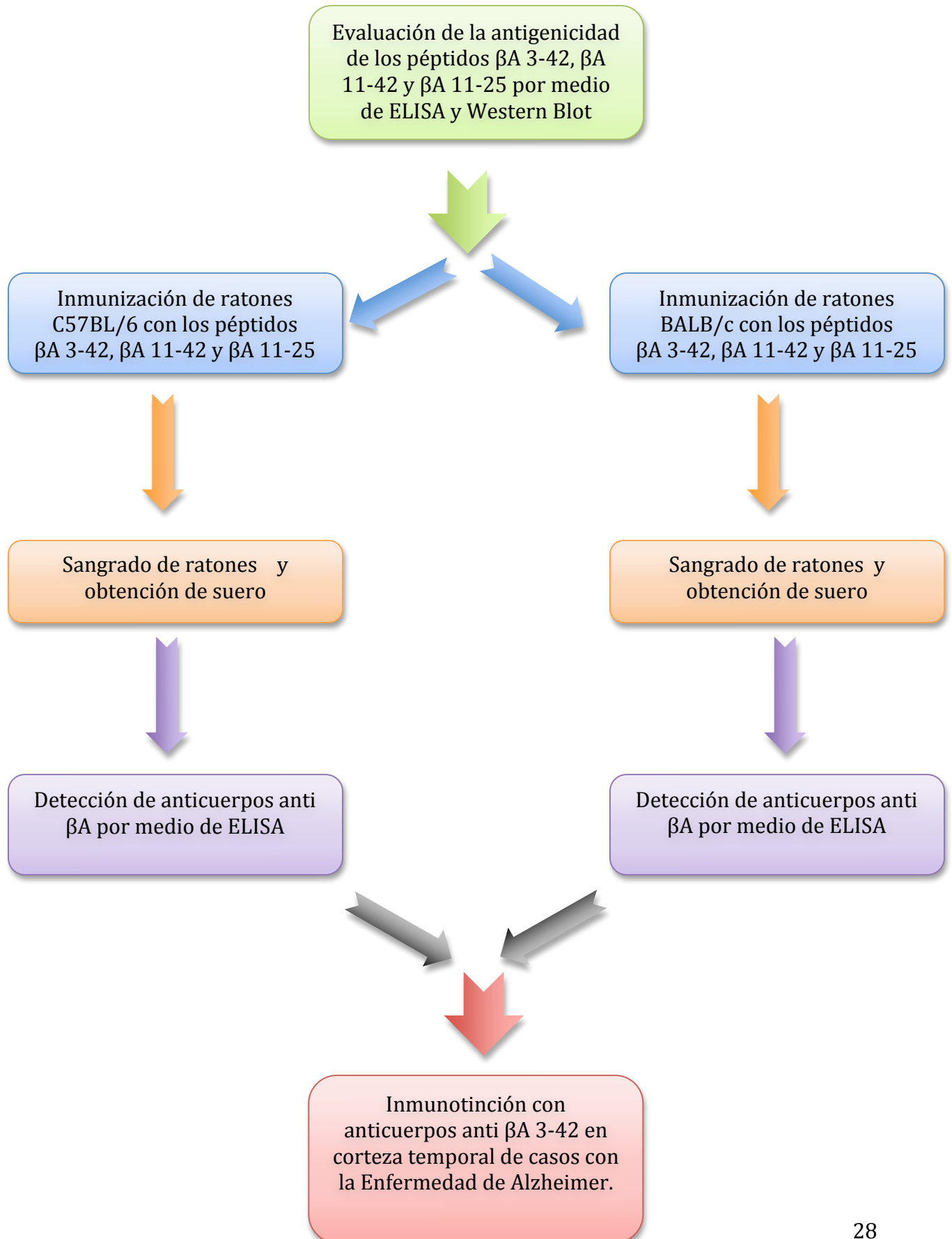
Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad de dos especies tóxicas del péptido β A (β A 3-42 y β A 11-42), presentes en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, así como del fragmento β A 11-25, en ratones de diferentes cepas (BALB/c y C57BL/6).

Objetivos particulares

- Evaluar la antigenicidad de los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25, por medio de ELISA y Western Blot.
- Inmunizar ratones de diferentes cepas (BALB/c y C57BL/6) con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 para inducir la producción de anticuerpos anti- β A.
- Detectar anticuerpos anti- β A en los sueros de ratones (BALB/c y C57BL/6) inmunizados con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.
- Caracterizar la especificidad de los anticuerpos producidos en ratones BALB/c y C57BL/6 inmunizados con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.
- Realizar ensayos de inmunofluorescencia en corteza temporal de casos con la EA utilizando los anticuerpos obtenidos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

7.1.1. Material biológico:

- 12 ratones de 4-6 semanas edad de cada cepa (BALB/C y C57BL/6)
- Secciones de corteza temporal de pacientes con EA

7.1.2. Péptidos y reactivos:

- ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (Invitrogen, CA, USA)
- Ácido fórmico al 98% (Merk Darmstadt)
- Adyuvante completo de Freund
- Adyuvante incompleto de Freund
- Agua destilada
- Agua estéril
- Albúmina libre de IgG (Sigma, USA)
- Amortiguador salino de carbonatos
- Amortiguador salino de fosfatos
- Anticuerpo monoclonal BAM 90.1 (Sigma, MO, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti IgG (H+L) de conejo, acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Jackson ImmunoRes Lab inc West Grove P.A.)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a peroxidasa (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a peroxidasa (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra-anti IgG (H+L) de ratón, acoplado a TRITC (isotiocianato de rodamina) (Jackson ImmunoRes Lab inc West Grove P.A.)
- Buffer de carga NuPAGE LDS (Invitrogen, CA, USA)
- Buffer de corrida NuPAGE MES SDS (Invitrogen, CA, USA)

- Dimetilsulfóxido
- Etanol 70%
- Kit de quimioluminiscencia Super Signal (Thermo, Sci, IL, USA)
- Marcador de pesos moleculares (Novex, Invitrogen, CA, USA)
- Microcentrífuga (Minispin Eppendorf, Alemania)
- Péptidos sintéticos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 11-25 y β A 35-25
- Sevofluorano (Abbott Labs, DF, México)
- Sueros policlonales de conejo: α - β A 1-42, α - β A 3-42 y α - β A 11-42
- TO-PRO (Invitro Gen)
- Tritón X-100 (Sigma)
- Vectashield (Vector Labs, Burlingane C.A)

7.1.3. Equipo, cristalería y desechables:

- Agitador
- Agujas de doble vía
- Baño a 37°C
- Cámara de electroforesis XCell Sure Lock (Invitrogen, USA)
- Cámara de transferencia semi-seca Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer-Cell (BioRad, USA)
- Campana de flujo laminar
- Estufa a 37°C
- Filtros para electrotransferencia
- Fuente de poder (BioRad, USA)
- Gel de poliacrilamida de gradiente del 4 al 12% de 1mm NuPAGE Bis-Tris-Gel (Invitrogen, CA, USA)
- Jeringas de insulina
- Lavador de microplacas (Wellwash 4, Denley, USA)
- Lector de placas de ELISA Opsy (Dynex, Tech, VA, USA)
- Membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA)
- Micropipetas

- Microscopio confocal (TCS-SP2, Leica, Heidelberg. Alemania)
- Placas de 96 pozos para ELISA (Nunc, New York, USA)
- Potenciómetro
- Puntas de micropipetas
- Refrigerador a 4°C
- Sonificador
- Vortex

7.2. Métodos

7.2.1. Evaluación de la antigenicidad de los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 por medio de ELISA y Western Blot.

7.2.1.1. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para evaluar la antigenicidad de los péptidos, es decir, su capacidad para ser reconocidos por distintos anticuerpos, se realizó una prueba de ELISA de la siguiente manera: se preparó una solución de cada uno de los péptidos (β A 1-42, β A 3-42 y β A 11-42) como se indica en el apéndice número 2. Para la preparación de los péptidos β A 11-25 y β A 35-25 se disolvió 1mg de péptido liofilizado en 1mL de agua mQ.

Se sensibilizó una placa para ELISA de poliestireno de 96 pozos por 24 horas a 4 °C, con 100 μ L de una solución de los péptidos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42 a 2 μ g/mL y 100 μ L de una solución de los péptidos β A 11-25 y β A 35-25 a 20 μ g/mL respectivamente. Todos los péptidos se diluyeron en solución amortiguadora de Carbonatos pH=9.6 (ver preparación en el apéndice 2). La cantidad final de péptido en cada pozo fue de 0.2 μ g/pozo de los péptidos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42 y 2 μ g/pozo de los péptidos β A 11-25 y β A 35-25.

Posteriormente se lavó la placa 4 veces en un lavador de microplacas con solución de PBS 1X-Tween 0.2% (ver preparación en el apéndice 2). Se bloqueó durante una hora a 37 °C con solución de PBS 1X-leche descremada 2% (ver preparación en el apéndice 2), se realizó un lavado igual al anterior y se agregaron los sueros (anticuerpo primario) en solución de PBS 1X-leche descremada 2%-triton X-100 0.2% (ver preparación en el apéndice 2) de la siguiente manera: anti- β A 1-42 - dilución 1:100, anti- β A 3-42 - dilución 1:100, anti- β A 11-42 - dilución 1:100, AcM BAM 90.1 - dilución 1:1000 y suero control - dilución 1:100. Se dejó incubar la placa con el anticuerpo primario por 1h a 37 °C y se realizó otro lavado como los anteriores.

Por último, se agregó el anticuerpo secundario con una dilución de 1:5000. Para realizar las diluciones de dichos anticuerpos, se utilizó una solución de PBS 1X-leche descremada 2%-triton X-100 0.2% (ver preparación en el apéndice 2). Para los pozos que tenían al AcM BAM 90.1 como anticuerpo primario, se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a peroxidasa para el resto de los pozos, los cuales tenían sueros de conejo, se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a peroxidasa. Después de agregar el anticuerpo secundario, se dejó incubar la placa por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavó la placa y se agregó a cada pozo 100 μ L de solución de ABTS como sustrato, se cubrió con papel aluminio y se dejó incubar 5 minutos a 37 °C, inmediatamente se leyó en el lector de microplacas a una longitud de onda de 405nm, obteniendo los valores de densidad óptica de todos los pozos.

7.2.1.2. Western Blot

Con la finalidad de evaluar el estado de agregación de los péptidos β A 3-42 y β A 11-42, se realizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia o western blot, usando como péptido control al péptido β A 1-42 (utilizado como control positivo para detectar la presencia de monómeros y oligómeros).

Inicialmente se realizó una electroforesis para separar a los péptidos β A en sus distintos estados de agregación (monómeros y oligómeros). Se cargaron las muestras en un gel de poliacrilamida de gradiente del 4 al 12% de 1mm NuPAGE Bis-Tris-Gel, agregando 16 μ L de mezcla de carga por carril, de una solución que contenía 1 μ g de cada uno de los péptidos (β A 1-42, β A 3-42 y β A 11-42), con 10 μ L de agua mQ y 5 μ L buffer de carga NuPAGE LDS. El marcador de pesos moleculares se preparó tomando una alícuota de 5 μ L, más 6 μ L de agua mQ y 5 μ L de buffer de carga. Finalmente se corrieron las muestras en una cámara de electroforesis con buffer de corrida con una fuente de poder a 200V.

Una vez finalizada la electroforesis, se extrajo el gel de poliacrilamida y se realizó la transferencia de los péptidos a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia semi-seca a 25V por 50 min, usando una solución amortiguadora de transferencia Tris/Glicina pH 8.35.

Por último, se realizó la detección de los péptidos en la membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó por 24 horas a 4 °C con solución de PBS 1X-leche descremada 2% (ver preparación en el apéndice 2). Posteriormente, se lavó la membrana cada cinco minutos con solución de PBS 1X-Tween 0.2%, realizando un total de tres lavados. Se incubó con los anticuerpos primarios por 24 horas a 4 °C: a) Suero purificado de conejo, el cual contiene anticuerpos que van dirigidos contra el péptido β A 11-42, b) Anticuerpo monoclonal BAM 90.1, el cual va dirigido contra los aminoácidos 13-28, es decir contra la región central del péptido β A o, c) Suero de conejo que contiene anticuerpos contra el péptido β A 1-42. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana cada cinco minutos con solución de PBS 1X-Tween 0.2%, realizando un total de tres lavados.

La membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario con una dilución de 1:2500. A las membranas que tenían como anticuerpo primario un suero de conejo (sueros anti- β A 11-42 y anti- β A 1-42), se les agregó posteriormente un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a peroxidasa. A la membrana que fue tratada con el anticuerpo

monoclonal BAM 90.1, se le agregó un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a peroxidasa. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó la membrana cada cinco minutos con solución de PBS 1X-Tween 0.2%, para quitar el exceso de anticuerpo, realizando un total de tres lavados.

Por último se revelaron las membranas por quimioluminiscencia, usando un kit de quimioluminiscencia como sigue: se agregó una mezcla 1:1 del buffer peróxido con la solución *enhancer* (luminol) a la membrana de nitrocelulosa, inmediatamente después se colocó una película fotográfica sobre la membrana para capturar la luminiscencia producida. Se sumergió la membrana en la solución reveladora, posteriormente se lavó en agua y por último, se sumergió en la solución fijadora.

7.2.2. Inmunización de ratones C57BL/6 y BALB/c con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.

Con el objetivo de obtener anticuerpos contra epítomos de β A, se inmunizó por vía subcutánea con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 a grupos de ratones hembras de la cepa C57BL/6 y BALB/c de 4-6 semanas de edad. La dosis de la primera inmunización fue de 30 μ g de péptido por ratón. La dosis de 20 μ g por ratón fue aplicada en 3 inmunizaciones subsecuentes, a intervalos de 10 días entre cada inmunización. Se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund en las subsecuentes inmunizaciones.

Se utilizaron 3 ratones de cada cepa como control a los cuales se les administró PBS y adyuvante de Freund únicamente. La preparación de los inmunógenos se realizó mezclando en proporción 1:1 adyuvante de Freund (completo e incompleto según correspondía) con el péptido disuelto en PBS. Para la inmunización inicial se utilizaron 200 μ l de adyuvante de Freund completo mezclado con 90 μ l de péptido previamente disuelto en 110 μ l de PBS. Para las inmunizaciones subsecuentes se utilizaron 200 μ l de adyuvante de Freund incompleto mezclado con 60 μ l de péptido previamente disuelto en 140 μ l de PBS.

7.2.3. Detección de anticuerpos anti- β A en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.

Cinco días después de la última inmunización, se sangraron los ratones para obtener su suero y evaluar la producción de anticuerpos anti- β A. El sangrado se llevó a cabo por ruptura del plexo retro-orbital utilizando como anestésico sevoflurano. Una vez obtenida la sangre, se centrifugó por 5 minutos a 6000rpm en una microcentrífuga, se separó el suero y se almacenó a 4 °C para usarse al día siguiente.

Para la detección de anticuerpos en el suero y la caracterización de su especificidad, se realizaron ensayos de ELISA como se mencionó previamente.

Se utilizaron los sueros de los ratones inmunizados, diluidos 1:100 en solución de PBS 1X-leche descremada 2%-triton X-100 0.2% (ver preparación en el apéndice 2) . Como control positivo se agregó un suero de conejo anti- β A 11-42 purificado, con una dilución de 1:100. Se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de ratón o anti-IgG de conejo, respectivamente, conjugado a peroxidasa.

Después de la incubación y los lavados, se agregaron a cada pozo 100 μ L de solución de ABTS como sustrato, se cubrieron con papel aluminio y se dejaron incubar 5 minutos a 37 °C, inmediatamente se leyó en el lector de microplacas a una longitud de onda de 405nm, obteniendo los valores de densidad óptica de todos los pozos.

7.2.4. Inmunotinción con anticuerpos anti β A 3-42 en corteza temporal de casos con la EA.

Se realizó una triple inmunotinción en corteza temporal (50 μ m) de casos con la EA utilizando: el suero obtenido al inmunizar ratones de la cepas C57BL/6 y BALB/c con el péptido β A 3-42 y como control positivo, para detectar la presencia de agregados amiloides, se utilizaron IgG purificadas del suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42, utilizando una contratinción con el colorante TO-PRO.

Previo a la inmunotinción, el tejido se puso en contacto con ácido fórmico al 98% por 3 min a temperatura ambiente (TA) y se lavo con PBS. Posteriormente se bloqueó en solución de albúmina al 0.2% libre de IgG en TBS por 20 min a TA. Al término de este bloqueo, el tejido se puso en contacto con el coctel de los anticuerpos anti β A 3-42 y anti β A 11-42 (a una dilución de 1:100), en TBS tritón 0.2% toda la noche a 4°C. Se revelaron por una hora a TA con un coctel de anticuerpos secundarios: cabra anti IgG (H+L) de conejo, acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) y cabra-anti IgG (H+L) de ratón, acoplado a TRITC, en TBS tritón 0.2%. Los tejidos se contratiñeron con colorante para nucleos TO-PRO al 0.1% en PBS. Posteriormente se analizaron al microscopio confocal.

7.2.4.1. Microscopia confocal

Las inmunotinciones fueron montadas en Vectashield (anti apagamiento de fluorescencia) y se observaron al microscopio confocal. Se analizaron con un objetivo plan apocromático 100X de inmersión en aceite (AN 1.4), se obtuvieron de 10-15 cortes ópticos, con una distancia entre ellos de 0.8-1.0 μ m. Para evitar la contaminación de un canal a otro, las triples inmunotinciones se capturaron de una manera secuencial, a través de la muestra en el eje de las z. La colecta de imágenes se proyectó y se analizó en un plano bidimensional (proyección), usando pseudocolores verde (Fluoresceína), rojo (Rojo Texas) y azul (CY5). Los fluorocromos en las múltiples tinciones se excitaron a 488nm (para FITC), 560nm (TxR) y 650nm (CY5). Las imágenes se almacenaron en discos compactos.

Los colores de colocación son los siguientes:

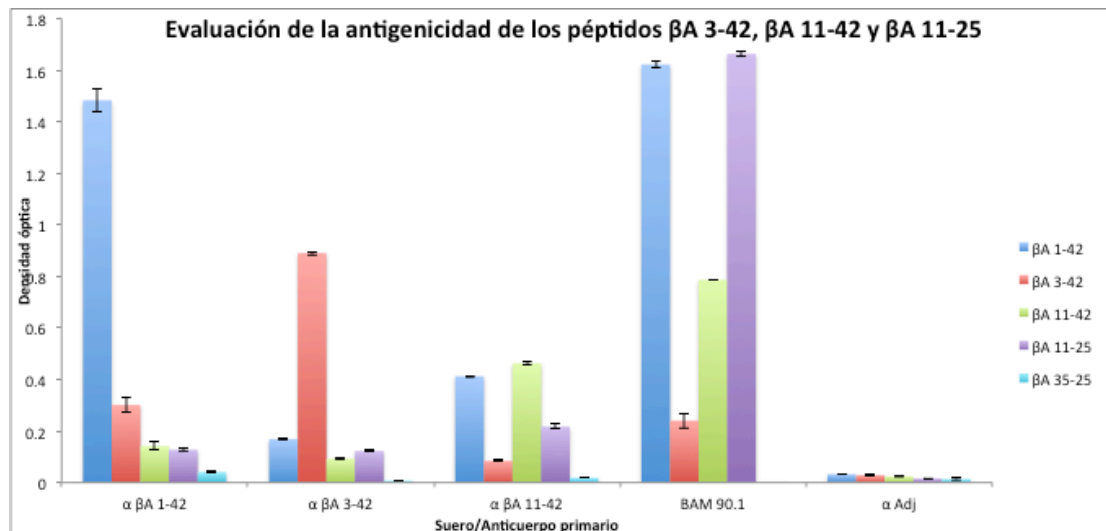
- Verde con azul= Turquesa
- Verde con rojo= Amarillo
- Azul con rojo= Fiusha
- Verde, azul y rojo= Blanco

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación de la antigenicidad de los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 por medio de ELISA y Western Blot.

8.1.1. Resultados de ELISA:

Se evaluó la antigenicidad de los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 en ensayos de ELISA. Como se puede apreciar en la [Gráfica 1](#), los péptidos fueron reconocidos por sus respectivos anti-sueros/anticuerpos monoclonales. Se observó una absorbancia promedio a 405nm de: 0.89 para β A 3-42, 0.47 para β A 11-42 y 1.66 para β A 11-25. En éste último caso se utilizó el anticuerpo monoclonal BAM 90.1 como anticuerpo primario, el cual reconoce a la región que comprende a los aminoácidos 13 a 28 de la secuencia del péptido β A. Como control positivo se utilizó al péptido β A 1-42, el cual fue reconocido por su anti-suero (OD405: 1.48).



Gráfica 1. Evaluación de la inmunogenicidad de los péptidos β A 3-42, 11-42 y 11-25. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 11-25 y el péptido no relacionado β A 35-25, con los sueros anti- β A 1-42, anti- β A 3-42, anti- β A 11-42 y el anticuerpo monoclonal BAM 90.1. Como control negativo se utilizó un suero de ratón al cual se administró sólo el adyuvante de Freund. [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]

8.1.2. Resultados de Western Blot:

Para evaluar el estado de agregación de los distintos péptidos, se llevó a cabo un ensayo de Western Blot, en el cual se corrieron los distintos péptidos en un gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron por medio del uso de diferentes anticuerpos.

En este ensayo se evaluaron los péptidos β A 3-42 y β A 11-42, utilizando como control positivo al péptido β A 1-42. En la Fig. 6, se muestran las membranas de nitrocelulosa con los péptidos β A 11-42, β A 3-42 y β A 1-42. En la membrana a) que se reveló con suero anti β A 11-42, se puede observar que los anticuerpos reconocen a los oligómeros de las tres especies de β A, sin embargo no reconocen al péptido 1-42 en forma monomérica. En la membrana b) que se reveló con suero de conejo inmunizado con el péptido β A 1-42, se puede observar que los anticuerpos anti- β A 1-42 sólo reconocen a las especies del péptido β A 1-42 y β A 3-42, mientras que no reconocen ni a las formas oligoméricas ni a la forma monomérica del péptido β A 11-42, lo cual es debido a que el péptido β A 1-42 contiene el epítipo inmunodominante EFRH en la posición 3 a 6 y la mayoría de los anticuerpos producidos van dirigidos contra esta región que es ausente en el péptido β A 11-42. c) Esta membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal BAM 90.1, el cual reconoce a los aminoácidos 13 a 28, secuencia que corresponde a la región central del péptido β A. Como se puede observar en la figura, este anticuerpo reconoce a los monómeros y oligómeros de tres especies del péptido, β A 11-42, β A 3-42 y β A 1-42.

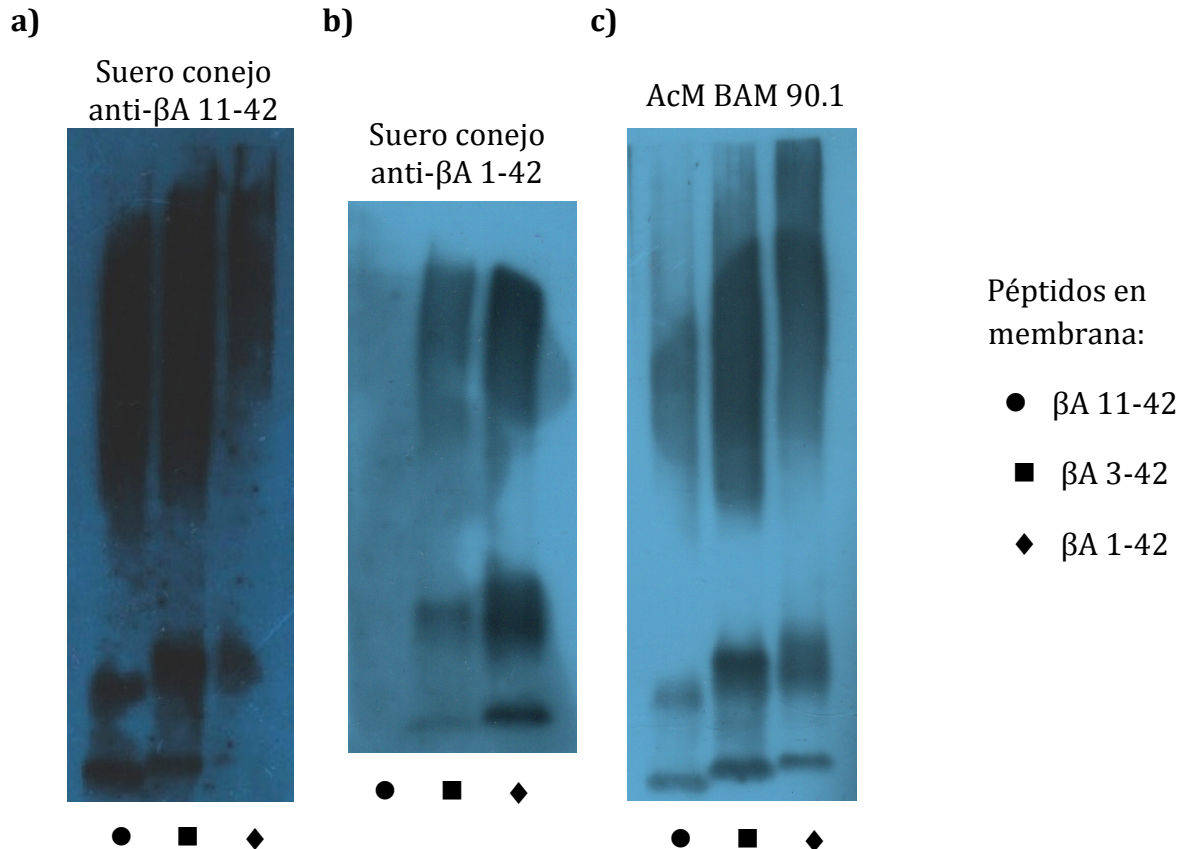


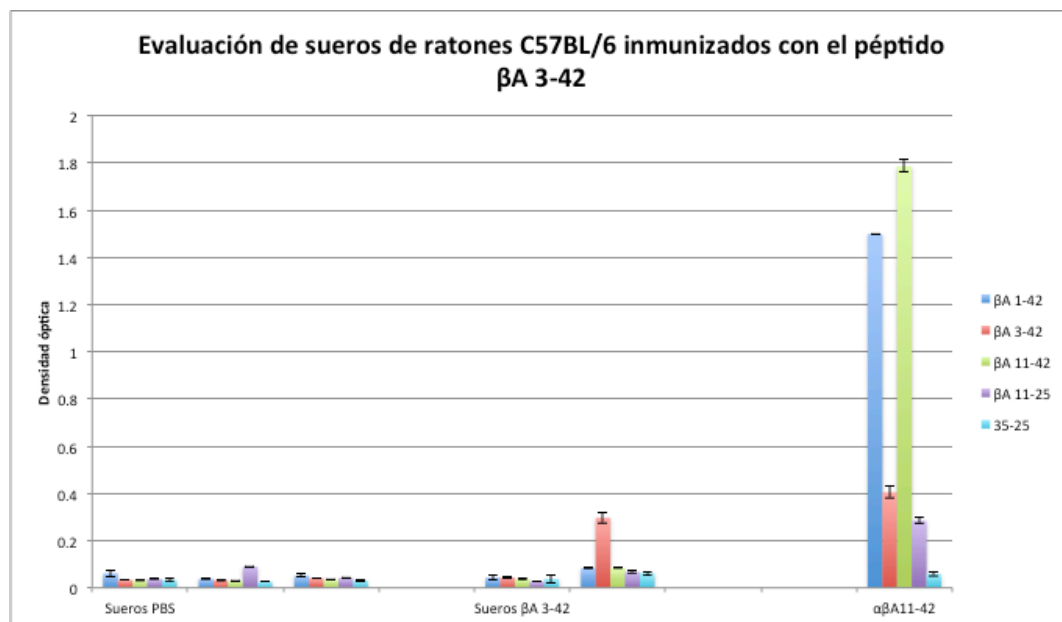
Fig. 6. Evaluación del estado de agregación de los péptidos β A 11-42, β A 3-42 y β A 1-42 por medio de Western Blot. a) se utilizó el suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42, b) se utilizó el suero de conejo inmunizado con el péptido β A 1-42, c) se utilizó el anticuerpo monoclonal BAM 90.1 el cual reconoce a la región central del péptido β A (aminoácidos 13-28).

8.2. Detección de anticuerpos anti- β A en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.

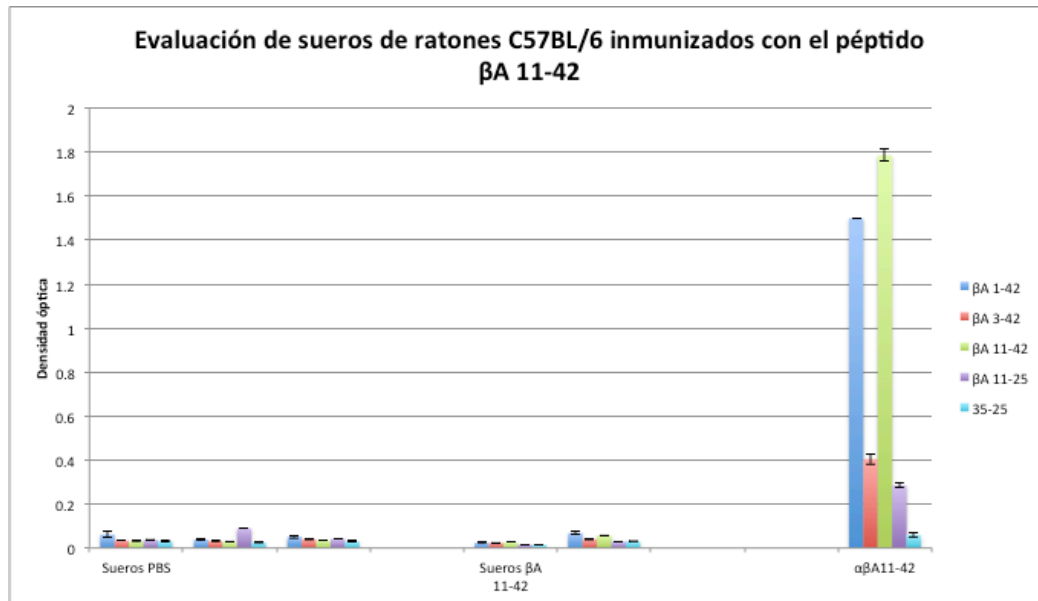
Se evaluó la presencia de anticuerpos en los sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 por medio de ELISA.

Cabe mencionar en este punto, que dos de los ratones murieron durante el periodo de experimentación debido a un exceso de exposición a la anestesia: dichos ratones pertenecían a los grupos que fueron inmunizados con β A 11-42 y β A 3-42, respectivamente.

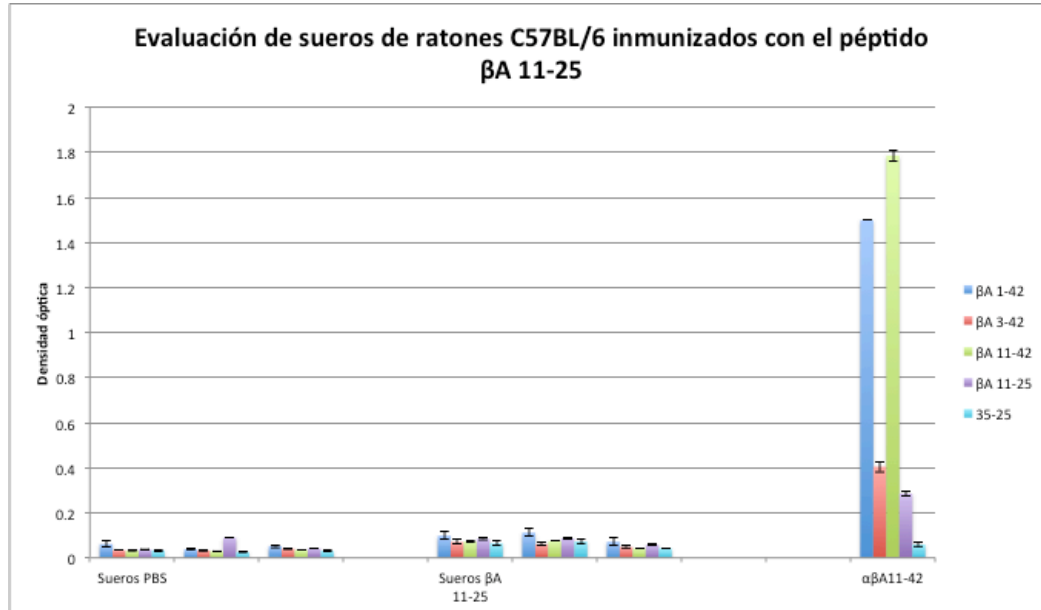
En las Gráficas 2, 3 y 4, se presentan los resultados de ELISA de sueros de ratones inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25, respectivamente. Como control negativo se utilizó el suero de ratones a los que se administró sólo con PBS y adyuvante, y como control positivo se utilizaron IgG purificadas del suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42. Como se puede observar, sólo el suero de un ratón inmunizado con el péptido β A 3-42 tiene anticuerpos anti- β A 3-42 (OD405: 0.29).



Gráfica 2. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido β A 3-42. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido β A 3-42 (en el centro), usando como control negativo suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]



Gráfica 3. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido βA 11-42. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos βA 1-42, βA 3-42, βA 11-42, βA 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido βA 11-42 (en el centro), usando como control negativo suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido βA 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]



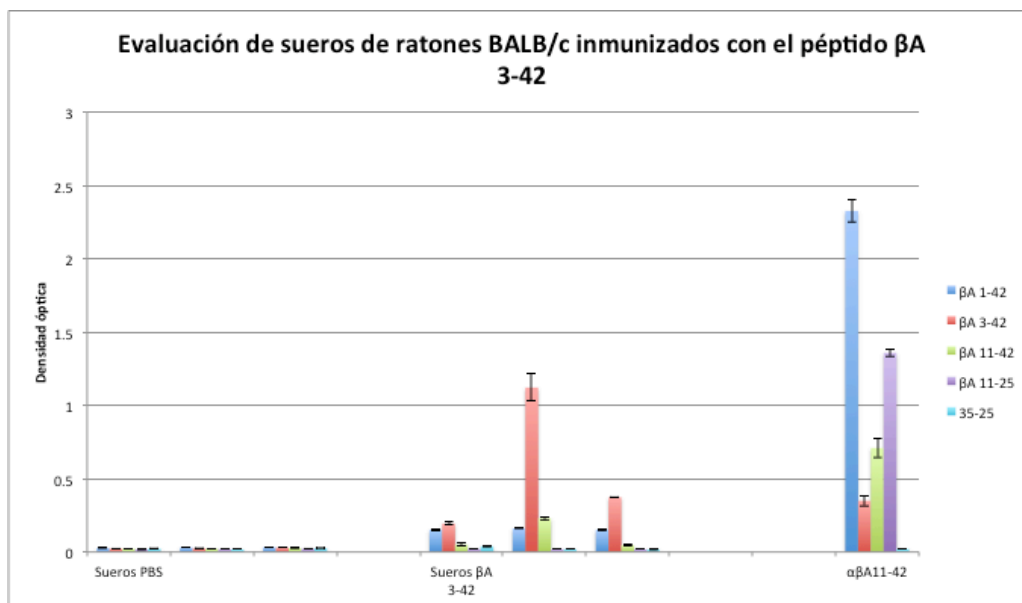
Gráfica 4. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido βA 11-25. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos βA 1-42, βA 3-42, βA 11-42, βA 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido βA 11-25 (en el centro), usando como control negativo suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido βA 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]

8.3. Detección de anticuerpos anti- β A en sueros de ratones BALB/c inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25.

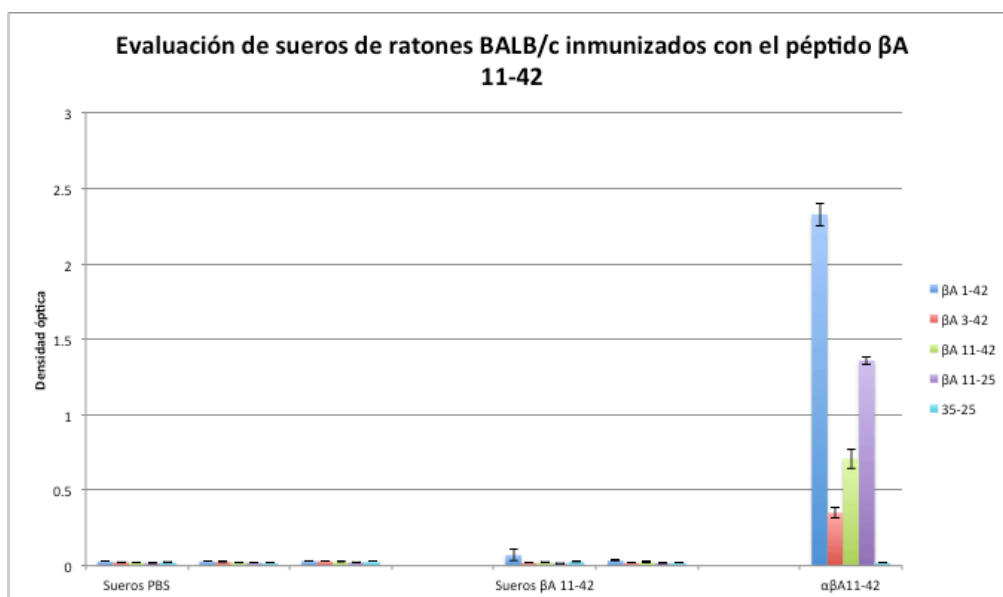
Se evaluó la presencia de anticuerpos en los sueros de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con los péptidos β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25 por medio de ELISA.

Cabe mencionar en este punto, que también en este experimento, dos de los ratones murieron durante el periodo de experimentación debido a un exceso de exposición a la anestesia, dichos ratones, pertenecían a los grupos que fueron inmunizados con β A 11-25 y β A 11-42, respectivamente

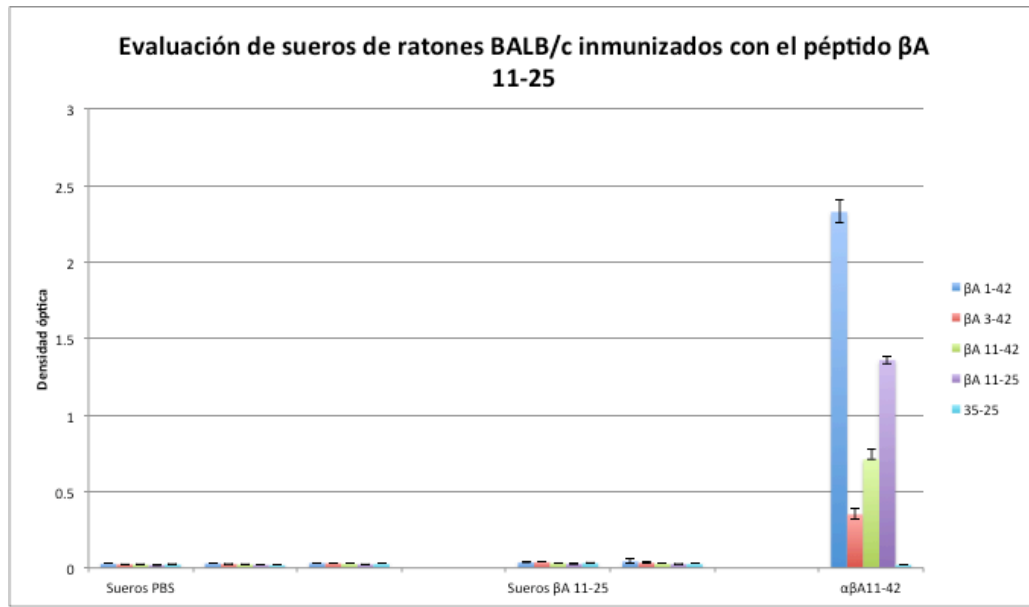
En las [Gráficas 5, 6 y 7](#), se presenta la evaluación de los sueros de ratones inmunizados con β A 3-42, β A 11-42 y β A 11-25, respectivamente. Del lado izquierdo de cada gráfica, se pueden observar los resultados de los controles negativos (sueros de ratones inmunizados sólo con PBS y adyuvante de Freund), en el centro los sueros problema y del lado derecho el control positivo (IgG purificadas del suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42). Como se puede observar, similar a los resultados obtenidos con ratones C57BL/6, sólo 2 de 3 ratones que fueron inmunizados con el péptido β A 3-42 produjeron anticuerpos (OD405: 0.37 y OD405: 1.12).



Gráfica 5. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido βA 3-42. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos βA 1-42, βA 3-42, βA 11-42, βA 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido βA 3-42 (en el centro), usando como control negativo un suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido βA 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]



Gráfica 6. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido βA 11-42. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos βA 1-42, βA 3-42, βA 11-42, βA 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido βA 11-42 (en el centro), usando como control negativo un suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido βA 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]



Gráfica 7. Detección de anticuerpos en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido β A 11-25. En el histograma se muestra la interacción de los péptidos β A 1-42, β A 3-42, β A 11-42, β A 11-25 y el péptido no relacionado 35-25, con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con el péptido β A 11-25 (en el centro), usando como control negativo un suero de ratones administrados con adyuvante de Freund únicamente (a la izquierda) y como control positivo un suero de conejo inmunizado con el péptido β A 11-42 (a la derecha). [El gráfico mostrado es representativo de un ensayo, el ensayo se repitió 3 veces]

8.4. Inmuntinción con anticuerpos anti β A 3-42 en corteza temporal de casos con la EA.

Se realizó una triple inmuntinción en corteza temporal (50 μ m) de casos con la EA y se observaron las muestras al microscopio confocal. En la Fig. 7 se puede apreciar que los anticuerpos de ratón anti- β A 3-42 se unen preferentemente a la región perinuclear de las neuronas (en color verde), lo cual pone en evidencia la presencia de agregados amiloides en dicha región. Los núcleos celulares se marcan con el colorante TO-PRO (en color azul), el cual tiene afinidad por el ADN. Por otro lado los anticuerpos de conejo anti β A 11-42 se unen a agregados extracelulares de β A (en color rojo).

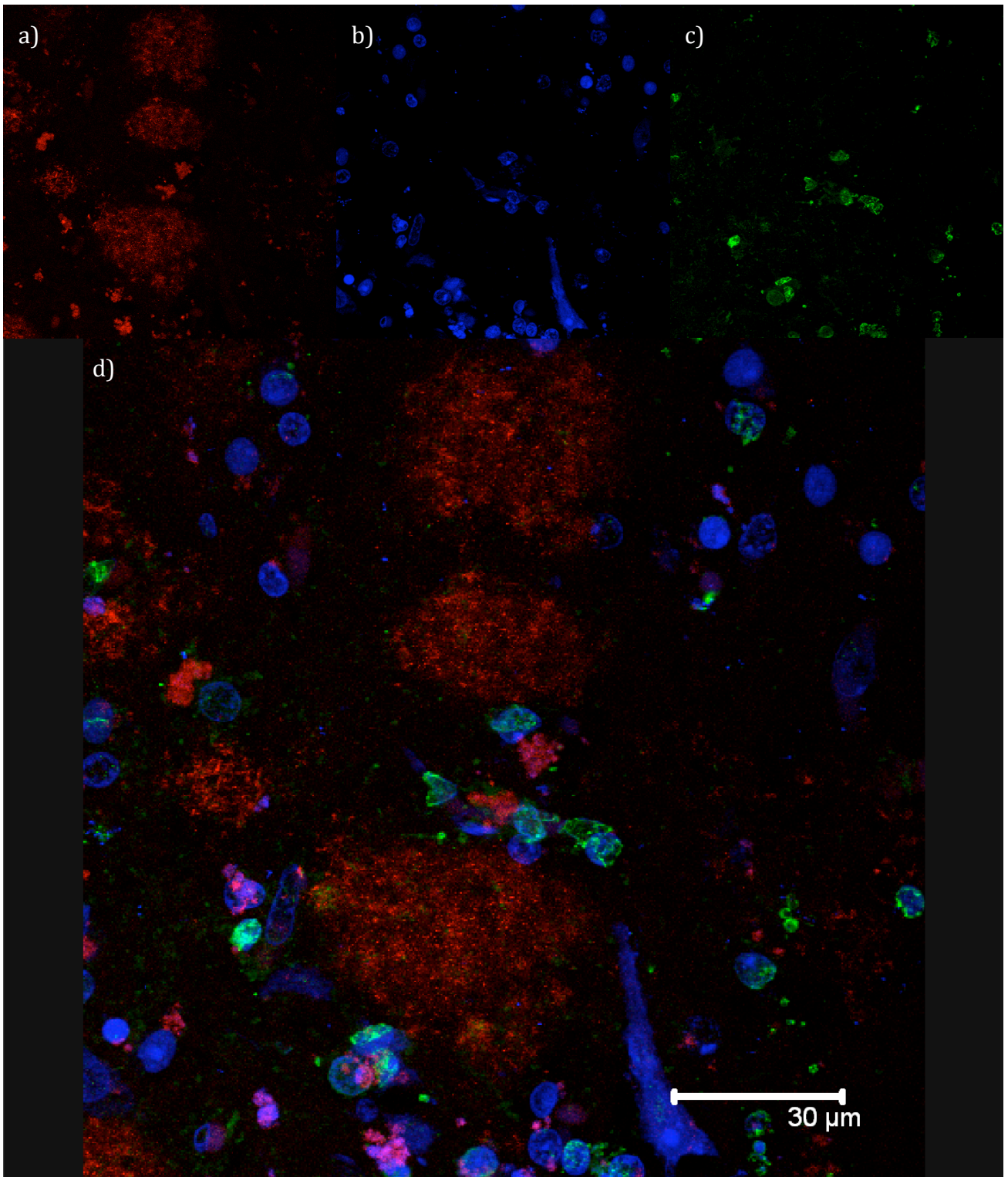


Fig. 7. Anticuerpos de ratón anti β A 3-42 se unen a agregados amiloides en regiones perinucleares neuronales. Las imágenes obtenidas con microscopía confocal muestran una sección coronal (50 μ m) del cerebro de un paciente con EA, la cual se trató con: a) Suero purificado de conejo que contiene anticuerpos anti β A 11-42, los cuales se unen a agregados amiloides extracelulares, b) Colorante TO-PRO que se une al DNA y c) Suero de ratón que contiene anticuerpos anti β A 3-42. En d) se muestra la colocalización de a), b) y c) lo cual nos permite observar la presencia de agregados amiloides en la región perinuclear.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la inmunogenicidad de los péptidos β A 11-25, β A 3-42 y β A 11-42 en ratones de dos cepas, para evaluar la producción de anticuerpos anti- β A y su capacidad de reconocer las especies tóxicas presentes en cerebros de pacientes con EA. Se encontró que el péptido β A 3-42 es inmunogénico, mientras que los péptidos β A 11-25 y β A 11-42 no lo fueron.

Se ha comprobado que en estudios de inmunoterapia activa para la EA, el inmunógeno no debe tener la región C-terminal del péptido β A, ya que esta secuencia de aminoácidos contiene un epítipo para células T (Lemere & Masliah, 2010), el cual se ha asociado con la presencia de meningoencefalitis debido a infiltración de linfocitos T auto-reactivos en pacientes con EA inmunizados con el péptido completo β A 1-42 (Nicoll et al., 2003; Orgogozo et al., 2003; Gilman et al., 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que los agregados de β A presentes en los cerebros de pacientes con EA, son más tóxicos que aquellos presentes en cerebros normales y esto se ha correlacionado con una mayor cantidad de especies β A N-truncadas en proporción al péptido β A completo (Piccini et al., 2005; Schilling et al., 2008). Por lo cual es importante desarrollar inmunógenos que induzcan la producción de anticuerpos contra la región central del péptido β A y que estos anticuerpos reconozcan las especies tóxicas en cerebros de pacientes con EA, incluyendo las especies N-truncadas β A 3-42 y β A 11-42 cuya toxicidad es elevada (Youssef, 2008).

Recientemente se ha demostrado que gran parte de las especies N-truncadas sufren modificaciones postransduccionales en las que el ácido glutámico (E) ubicado en la región N-terminal de los péptidos β A 3-42 y β A 11-42 sufre una ciclización por acción de la enzima glutaminil ciclasa y que estas especies truncadas-modificadas que poseen el grupo piroglutamato, $A\beta$ N3(pE) y $A\beta$ N11(pE), son muy resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas lo cual aumenta su acumulación en el

cerebro de pacientes con EA (Schilling et al., 2008).

Un estudio de fase II del anticuerpo monoclonal m266, ha demostrado una disminución del deterioro cognitivo en modelos preclínicos (Dodart et al., 2002) y se han obtenido resultados alentadores respecto a la seguridad de este tratamiento en estudios clínicos de fase II (clinicaltrials.gov, NIH). Esto demuestra que anticuerpos dirigidos contra la región central del péptido β A pueden ser un tratamiento eficaz y seguro para la EA.

Por todo lo anterior, el estudio de inmunógenos capaces de inducir la producción de anticuerpos que reconozcan a diferentes especies tóxicas del péptido β A sin inducir una respuesta inflamatoria es algo esencial en el tratamiento y la prevención de la EA. Actualmente, hay varios anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en estudios clínicos de fase II y III para el tratamiento de la EA (clinicaltrials.gov, NIH), sin embargo los estudios clínicos que involucran inmunización activa para la EA aún son limitados debido a la falta de inmunógenos y/o protocolos adecuados.

Aunque en el presente estudio no se lograron obtener anticuerpos contra el péptido β A 11-25, considerando el potencial terapéutico de anticuerpos dirigidos contra esa región, es importante realizar más estudios de la inmunogenicidad de este péptido, por ejemplo: utilizar diferentes vías de inmunización, un modelo animal distinto o utilizar alguna estrategia para aumentar la inmunogenicidad, como la construcción de polímeros o repeticiones diméricas en tándem del péptido β A 11-25 (Lemere, 2009).

Con respecto a los anticuerpos anti- β A 3-42 obtenidos, se demostró que se unen a agregados amiloides intracelulares presentes en cerebros de pacientes con EA. Es interesante que estos anticuerpos se unen a agregados intracelulares ubicados en la región perinuclear de las neuronas y que no reconocen a los agregados amiloides extracelulares. Este es un hallazgo nuevo y puede ser de importancia en futuros estudios de la EA.

Hasta el momento, se ha descrito la presencia de agregados intracelulares del péptido β A en cultivos celulares, en cerebros de ratones transgénicos y en cortes de cerebro de pacientes con EA y síndrome de Down (Wirhth et al., 2004; Oakley et al., 2006). Recientemente se detectaron agregados del péptido β A en la región perinuclear en células de neuroglioma humano transfectadas con plásmidos codificantes para β A (Park et al., 2009).

Sin embargo no hay estudios que describan la presencia de agregados amiloides en la región perinuclear de neuronas en cerebros de pacientes con EA y los estudios que reportan agregados intracelulares describen que están conformados por el péptido β A 1-42 (Gouras et al., 2000; Wirhth et al., 2004). Por lo anterior, es muy importante caracterizar la naturaleza de los agregados encontrados en este estudio y conocer su papel en el desarrollo de la EA.

También es interesante evaluar la intervención de estos agregados en el desarrollo del estrés oxidativo y su relevancia en la muerte celular por apoptosis, como se ha realizado en estudios previos con agregados intracelulares del péptido β A en otros compartimentos celulares (Kienlen-Campard et al., 2002; Wirhth et al., 2004).

10. CONCLUSIONES

- 1) Se evaluó la inmunogenicidad de las especies tóxicas β A 3-42 y β A 11-42 (las cuales están presentes en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer) y del fragmento β A 11-25, utilizando ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6.
- 2) Se demostró que el péptido β A 3-42 es inmunogénico en las dos cepas utilizadas.
- 3) Se demostró que los anticuerpos de ratón anti- β A 3-42 obtenidos en el laboratorio, se unen a agregados amiloides en la región perinuclear de las neuronas en cortes de cerebros de humanos con la EA. Sin embargo dichos anticuerpos no reconocen a los agregados amiloides extracelulares. Es un hallazgo nuevo, y puede ser de importancia en futuros estudios de la EA.

11. APÉNDICES

11.1. Preparación de soluciones

11.1.1. Amortiguador salino de fosfatos 1X (PBS 1X). Mezclar la siguiente cantidad de reactivos:

Reactivo	Concentración	Cantidad*
KH_2PO_4	0.01 M	5.4436g
Na_2HPO_4	0.1 M	56.748g
NaCl	1.37 M	320.2512g
KCl	0.027 M	8.0514g

* Para 4 litros de solución PBS10X

Llevar a 3.8L con agua mQ y ajustar el pH=6.8, posteriormente aforar a 4L, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Esta solución es 10X, para preparar la solución 1X, diluir 1 parte de la solución original en 9 partes de agua.

11.1.2. Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6. Mezclar la siguiente cantidad de reactivos:

Reactivo	Cantidad*
NaHCO_3	0.420g
Na_2CO_3	0.178g

*Para 50mL de solución amortiguadora de carbonatos

Llevar a 50mL con agua mQ.

11.1.3. Solución amortiguadora de transferencia Tris/Glicina pH 8.35

Reactivo	Cantidad
Tris 0.025 M	3.03g
Glicina 0.193M	14.48g
Metanol	200mL

A la solución amortiguadora se le adiciona el metanol antes de usar. Desgasificar por 5 minutos. Para una transferencia se ocupa aproximadamente 1 litro de solución amortiguadora.

11.1.4. Solución PBS 1X-leche descremada 2%: Para 100mL, pesar 2g de leche descremada (marca comercial) y disolver en agitación en 100mL de PBS 1X.

11.1.5. Solución PBS 1X-leche descremada 2%-tritón 0.2%: Para 100mL, pesar 2g de leche descremada de marca comercial y medir 200 μ L de Triton® X-100 (J.T. Baker, USA), disolver en agitación en 100mL de PBS 1X.

11.1.6. Solución PBS 1X-Tween 0.2%: Para 100mL, medir 200 μ L de Tween® 20 (USB, USA), disolver en agitación en 100mL de PBS 1X.

11.1.7. Oligómeros de β A 1-42, β A [pGlu]3-42 y β A [pGlu]11-42:

11.1.7.1. Monomerización

Pesar 1mg de péptido en un vial de vidrio y enfriar a 4 °C. Enfriar 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (Sigma, USA) y agregar:

- 0.222ml a 1mg de β A 1-42
- 0.232ml a 1mg de β A 3-42
- 0.302ml a 1mg de β A 11-42

Con lo cual obtenemos una solución 1mM. Dejar en reposo a temperatura ambiente por 1 hora. Enfriar los viales a 4 C y dispensar los volúmenes que correspondan a:

Masa	β A 1-42	β A 3-42	β A 11-42
90 μ g	20 μ L	21 μ L	27.2 μ L

Evaporar toda la noche a temperatura ambiente en la campana y liofilizar por 3 días. Cerrar los tubos y guardar a -20 °C en desecación.

11.1.7.2. Oligomerización y fibrilización

Resuspender en DMSO puro para hacer una solución 5mM según el siguiente cuadro:

Péptido	Masa	DMSO (5mM)	PBS para 100 mM	PBS para 1mg/mL
β A 1-42	90 μ g	4 μ L	196 μ L	90 μ L
β A 3-42	90 μ g	4.5 μ L	220.5 μ L	90 μ L
β A 11-42	90 μ g	5.4 μ L	264.6 μ L	90 μ L

Agitar en el vortex y lavar las paredes del tubo para humedecer completamente el pellet. Resuspender en PBS estéril, según el cuadro de arriba para tener oligómero (100 μ M) o fibrilar (1mg/mL). Incubar a 4 °C por 24 horas y a 37 °C por 24 horas si se va a hacer oligómero y en caso de querer fibrilar se incuba por 7 días a 37 °C.

11.2. Secuencias de péptidos utilizados

Beta Amiloide 1-42: H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH

Beta Amiloide [pGlu]3-42: pGlu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH

Beta Amiloide [pGlu]11-42: pGlu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH

Beta Amiloide 11-25: H-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-OH

Beta Amiloide 35-25: H-Met-Leu-Gly-Ile-Ile-Ala-Gly-Lys-Asn-Ser-Gly-OH

12. Glosario

Amiloide: Término utilizado para designar una variedad de agregados proteicos que se acumulan como fibras extracelulares de 7 a 10 nm. Estos agregados tienen características estructurales comunes, incluyendo una conformación de láminas β -plegadas y habilidad para unirse a colorantes como Rojo Congo.

Angiopatía amiloide cerebral: Condición en la cual hay un depósito de péptido β amiloide 1-40 en las paredes de las arterias que irrigan al cerebro.

Astrocito: Célula glial en forma de estrella del sistema nervioso central que forma una interfase funcional y estructural entre tejidos no nerviosos y neuronas. Una vez activados, los astrocitos expresan proteínas ácidas gliales fibrilares en la superficie.

Astrogliosis: Incremento en el número de astrocitos debido a su proliferación en los sitios de daño en el sistema nervioso central.

Célula microglial: Célula de linaje-macrófago que proviene de la médula ósea y está presente en el sistema nervioso central.

Fibrillas amiloides: Estructuras formadas por proteínas que al agregarse causan patología. Las fibrillas amiloides comparten características bioquímicas comunes como solubilidad, alto contenido de tiras β plegadas y estructuras cruzadas, además de resistencia a proteasas y capacidad para unirse a colorantes lipofílicos, como el Rojo Congo, Tioflavina S y Tioflavina T.

Gliosis: Exceso de crecimiento de células neurogliales en el cerebro cuya aparición usualmente precede a la muerte neuronal y puede llevar a la formación de tejido cicatrizante.

Marañas neurofibrilares: Agregados proteicos patológicos encontrados en las neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Las marañas se forman por hiperfosforilación de una proteína asociada a los microtúbulos conocida como Tau, causando su agregación en una forma insoluble.

Neuritas distróficas: Inflamación anormal desarrollada como producto del estrés neuronal en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

Placa amiloide: Sitio de acumulación del péptido β amiloide y neuritas distróficas en cerebros de ratones utilizados como modelo en la enfermedad de Alzheimer y de pacientes con dicha enfermedad.

Proteína Precursora del Amiloide (APP): Glicoproteína de membrana componente del transporte axonal rápido. De la cual el péptido β amiloide es escindido por procesamiento proteolítico.

Sistema límbico: Conjunto de estructuras corticales y subcorticales importantes para el procesamiento de información emocional y de memoria. Estructuras representativas incluyen hipocampo y amígdala.

Tau: Proteína neuronal que se une a microtúbulos, promoviendo su ensamblaje y estabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Acero G, Manoutcharian K, Vasilevko V, Munguia ME, Govezensky T, Coronas G, Luz-Madriral A, Cribbs DH, Gevorkian G. (2009) Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A β -specific antibodies produced in rabbits. *J. Neuroimmunol.* 213:39–46.
- [2] Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, Saing T, Cribbs DH. (2005) Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J. Immunol.* 174:1580–1586.
- [3] Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, Elliott JI, Van Nostrand WE, Smith SO. (2010) Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils. *Nat. Struct. & Mol Biol.* 17(5):561-568.
- [4] Aisen PS, Schafer KA, Grundman M. (2003) Effects of rofecoxib or naproxen versus placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA.* 289:2819–2826.
- [5] Alzheimer's Disease Education & Referral (ADEAR) Center, A Service of the National Institute on Aging, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services (2010):
<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/medicationsfs.htm>
- [6] Alzheimer's Disease Education & Referral (ADEAR) Center, A Service of the National Institute on Aging, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. (2010):
<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/adfact.htm>
- [7] Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du YS, Altstiel L, Bende M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nat Genet.* 17:263–264.
- [8] Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, 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.* 6:916–919.

[9] 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 β -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:2023–2028.

[10] Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. (1992) Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature.* 360(6405):672–674.

[11] Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 3:67–72.

[12] Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. (2004) *Nat Rev Neurosci.* 5:677–685.

[13] Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9:387–398.

[14] Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 7:180–184.

[15] Corder EH, Saunders A M, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses A D, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921–923.

- [16] DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. (2001) Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:8850–5.
- [17] Dietschy JM, Turley SD. (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. 12:105–112.
- [18] Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain Aβ burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*. 5:452–7.
- [19] Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. (1996) Increased amyloid-β₄₂ in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 383(6602):710–713.
- [20] Eckman EA, Eckman CB. (2005) Aβ-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochemical Society Transactions*. 33(5):1101–1105.
- [21] Engstrom JE. (2007) Researching Dementia in Imperial Germany: Alois Alzheimer and the Economies of Psychiatric Practice. *Cult Med Psychiatry*. 31:405–413.
- [22] Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Baker M, Adamson J, Ronald J, Blangero J, Hutton M, Younkin SG. (2000) Linkage of plasma Aβ₄₂ to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science*. 290:2303.
- [23] Frenkel D, Katz O, Solomon B. (2000) Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11455–11459.
- [24] 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 Aβ immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 64:1553–1562.

- [25] Golde TE. (2006) Disease modifying therapy for AD? *J Neurochem.* 99:689–707.
- [26] Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 156:15–20.
- [27] Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC, Sadovnick AD, Duara R, DeCarli C, Johnson K, Go RC, Growdon JH, Haines JL, Kukull WA, Farrer LA. (2000) Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology.* 54:1316–1323.
- [28] Hardy J, Selkoe DJ. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297:353–356.
- [29] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Eikelenboom P. (2003) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets.* 4:461–8.
- [30] <http://clinicaltrials.gov> (2011, Página oficial de estudios clínicos efectuados en Estados Unidos y alrededor del mundo. Es un servicio de los Institutos Nacionales de Salud de EU).
- [31] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science.* 292:1550-1552.
- [32] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med.* 6:143-150.
- [33] Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. (2000) A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408:979–982.

- [34] Kienlen-Campard P, Miolet S, Tasiaux B, Octave JN. (2002) Intracellular amyloid- β 1-42, but not extracellular soluble amyloid- β peptides, induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem.* 277:15666–15670.
- [35] Lemere CA, Maier M, Peng Y, Jiang L, Seabrook TJ. (2007) Novel A β immunogens: is shorter better? *Current Alzheimer Research.* 4:427–436.
- [36] Lemere CA. (2009) Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Prog Brain Res.* 175:83–93.
- [37] Lemere CA, Masliah E. (2010) Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol.* 6:108–119.
- [38] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293:1487–1491.
- [39] Maier M, Seabrook TJ, Lazo ND, Jiang L, Das P, Janus C, Lemere CA. (2006) Short amyloid- β (A β) immunogens reduce cerebral A β load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A β -specific cellular immune response. *J. Neurosci.* 26:4717–4728.
- [40] Martin M, Dotti C, Ledesma MD. (2010) Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1801:934–944.
- [41] Mayeux R. (2003) Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:81-104.
- [42] McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. (2006) Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis.* 9:271–276.
- [43] Medecigo M, Manoutcharian K, Vasilevko V, Govezensky T, Munguia ME, Becerril B, Luz-Madriral A, Vaca L, Cribbs DH, Gevorkian G. (2010) Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries. *J. Neuroimmunol.* 223:104–114.
- [44] Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshere M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J,

- Owen MJ, Hardy J, Goate AM. (2000) Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. 290(5500):2304–2305.
- [45] Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*. 9(4):448–452.
- [46] Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 26:10129–10140.
- [47] Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization. *Neurology*. 61:46–54.
- [48] Park HJ, Kim SS, Kang S, Rhim H. (2009) Intracellular A β and C99 aggregates induce mitochondria-dependent cell death in human neuroglioma H4 cells through recruitment of the 20S proteasome subunits. *Brain Res*. 1273:1-8.
- [49] Pauwels EK, Volterrani D, Mariani G. Biomarkers for Alzheimer's disease. *Drug News Perspect*. 2009;22:151–160.
- [50] Perez-Garmendia R, Ibarra-Bracamontes V, Vasilevko V, Luna-Muñoz J, Mena R, Govezensky T, Acero G, Manoutcharian K, Cribbs DH, Gevorkian G. (2010) Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: relevance for immunotherapy. *J Neuroimmunol*. 229(1-2):248-55.
- [51] Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M. (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science*. 298:1379.
- [52] Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torrassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P, Tabaton M. (2005) β -Amyloid Is Different in Normal Aging and in Alzheimer Disease. *J Biol Chem*. 280:34186–34192.

- [53] Plassman BL HR, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JC. (2000) Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*. 55:1158–1166.
- [54] Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. 43:815–25.
- [55] Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 273: 32730–32738.
- [56] Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Parsadainian M, Bryan MT, Ness DK, Piroozzi KS, Jordan WH, Brown DD, Hoffman WP, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, May PC, Paul SM, DeMattos RB. (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*. 25:629–636.
- [57] Roskam S, Neff F, Schwarting R, Bacher M, Dodel R. (2010) APP transgenic mice: the effect of active and passive immunotherapy in cognitive tasks. *Neurosci Biobehav Rev*. 34:487–499.
- [58] Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron*. 14:457–466.
- [59] 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- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400:173-177.
- [60] 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 HU, Rossner S. (2008) Glutaminyl cyclase

inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* 14:1106–1111.

[61] Schupf N, Kapell D, Nightingale B, Lee JH, Mohlenhoff J, Bewley S, Ottman R, Mayeux R. (2001) Specificity of the fivefold increase in AD in mothers of adults with Down syndrome. *Neurology* 57:979–84.

[62] Siegrist CA & Aspinall R. (2009) B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 9:185–194.

[63] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E. (2005) Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci.* 8:1343–1349.

[64] Sinha S & Lieberburg I. (1999) Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11049–11053.

[65] Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T. (1996) Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer β -amyloid peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 93:452–455.

[66] Solomon B, Koppel R, Frenkel D, Hanan-Aharon E. (1997) Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94:4109–4112.

[67] Solórzano-Vargas RS, Vasilevko V, Acero G, Ugen KE, Martinez R, Govezensky T, Vazquez-Ramirez R, Kubli-Garfias C, Cribbs DH, 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.

[68] Soto C, Estrada L. (2005) Amyloid inhibitors and beta-sheet breakers. *Subcell Biochem.* 38:351–364.

[69] Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. (1998) Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol.* 8:387–402.

[70] Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 70(1):1–32.

- [71] Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Praticò D, Martinez D, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ. (2002) Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *Journal of Neuroscience*. 22:446–454.
- [72] Utsuki T, Yu Q, Davidson D, Chen D, Holloway H, Brossi A, Sambamurti K, Lahiri D, Greig N, Giordano T. (2006) Identification of novel small molecule inhibitors of amyloid precursor protein synthesis as a route to lower Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *J Pharmacol Exp Ther*. 318:855–862.
- [73] Walsh DM, Selkoe DJ. (2007) A β oligomers—a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*. 101(5):1172–1184.
- [74] Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*. 414:212–216
- [75] Weiner HL & Frenkel D. (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol*. 6:404–416.
- [76] Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. (2003) Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci*. 23:3745–51.
- [77] Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. (2004) Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation*. 1:24.
- [78] Wirths O, Erck C, Martens H, Harmeyer A, Geumann C, Jawhar S, Kumar S, Multhaup G, Walter J, Ingelsson M, Degerman-Gunnarsson M, Kalimo H, Huitinga I, Lannfelt L, Bayer TA. (2010) Identification of low molecular weight pyroglutamate abeta oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis. *The Journal of Biological Chemistry*. Paper in Press.

- [79] Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. (2004) A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide—the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*. 91(3):513–520.
- [80] Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. (1999) Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brains and peripheral organs. *Brain Research* 830:226–36.
- [81] Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T. (2008) N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging*. 29:1319-1333.