



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] en modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Susana Hernández Ramírez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gohar Gevorgyan

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado
<p>1. Datos del Alumno Susana Hernández Ramírez Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias 30616055-2</p>
<p>2. Datos del Tutor Doctora Gohar Gevorgyan</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Doctora Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Doctora Leonor Huerta Hernández</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Doctor Josué Orlando Ramírez Jarquín</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Doctora Alette Ortega Gómez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti-βA-11-42[pE] en modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer 91p. 2013</p>

Agradecimientos

A mi espléndida Facultad de Ciencias, UNAM por darme la oportunidad, las herramientas y el espíritu de formarme como Bióloga.

A la Dra. Gohar Gevorgyan por permitir la realización de este trabajo en su laboratorio en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Biólogo Experimental Gonzalo Asariel Acero Galindo por todos los experimentos realizados en este trabajo y por la ayuda brindada en la estructuración de éste escrito.

A la M. en C. Roxanna Pérez Garmendia por su valiosa asesoría técnica y académica en los experimentos realizados en este trabajo.

A los encargados del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas: MVZ Georgina Díaz Herrera y MVZ Jorge García Rebolgar. Por el cuidado de los animales utilizados en este trabajo

A CONACyT (proyectos: 58081 y 177269) y DGAPA-UNAM (proyectos: 209610 y 200713) por el apoyo financiero otorgado.

A los miembros que conformaron mi jurado, por su tiempo y sus comentarios:

Presidente: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Vocal: Dra. Leonor Huerta Hernández

Secretario: Dra. Gohar Gevorgyan

Suplente: Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín

Suplente: Dra. Alette Ortega Gómez

Dedicatorias

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Paulina, Myriam, Yéssica, Melissa, Carmen, Roxanna. Que sepan que son las personas más inteligentes que he conocido. Al alma del laboratorio y la persona más linda, inteligente, sencilla y divertida. Gracias por todo tu tiempo invertido, gracias por dibujarnos siempre una sonrisa en la cara. Me quito la bata ante ti, Gonzalo, gracias.

A mis mejores amigas, el grupo de las "anas", Mariana y Jovana. Gracias por esta gran aventura, gracias por todas las maravillosas experiencias y por siempre estar juntas apoyándonos. Son las personas más extraordinarias que he conocido, gracias por su amistad, las adoro.

A Álvaro Diego por ser mi inspiración, por apoyarme y porque me hizo comprender que: "El amor verdadero no consiste en encontrar a la persona perfecta, sino en aprender a ver a una persona imperfecta, perfectamente" Jason Jordan.

A Saúl, mi hermano, con la esperanza de darle un buen ejemplo como hermana mayor. Recuerda que siempre hay una recompensa cuando haces las cosas con constancia y dedicación.

Para Tere y Juan, con todo mi amor, respeto y agradecimiento. Para ustedes que me dieron vida y me han visto crecer a lo largo de todo este tiempo. Sepan que la mayor bendición del universo es despertar y saber que están ahí. Gracias por todo su esfuerzo, por darme una educación pero sobre todo gracias por darme todo el amor y apoyo necesario para ayudarme a cumplir este gran logro, titularme. Gracias por ser siempre unos papas buenos y unos buenos papas.



"Si un día tienes que
elegir entre el mundo
y el amor...recuerda: si
eliges el mundo
quedarás sin amor,
pero si eliges el amor,
con él conquistarás al
mundo".

Albert Einstein



Índice

Índice de figuras y tablas i

Abreviaturas ii

Resumen iii

Marco histórico

Alois Alzheimer y Auguste D.14

El Epónimo de la Enfermedad de Alzheimer15

Descripción Clínica

La Enfermedad de Alzheimer (EA)18

Síntomas18

Diagnóstico y Biomarcadores19

Causas.....20

Factores de Riesgo 21

Incidencia de la EA22

Histopatología

Características Histopatológicas de la EA.....25

La proteína tau y las Marañas Neurofibrilares25

La Proteína Precursora Amiloide y su función26

El péptido β -Amiloide.....29

La Astroglía y la Microglía en la EA.....32

Principales Hipótesis para explicar las causas de la EA.....	33
Enfoques Terapéuticos y modelos animales de la EA	
Terapias contra la Enfermedad de Alzheimer	38
Farmacoterapia actual	38
Candidatos a fármacos con posibles efectos modificadores del curso de la enfermedad	39
Inmunoterapia	39
Inmunoterapia Pasiva	41
Mecanismos de acción de la Inmunoterapia	42
Modelos Animales para la EA.....	44
Antecedentes	46
Planteamiento del problema	49
Objetivo General	50
Objetivos Particulares	50
Material y Métodos	51
Animales Experimentales	51
Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-A β -11-42 [pE] mediante ELISA.....	51
Determinación de la permanencia de anticuerpos anti-A β -11-42 [pE] en circulación mediante ELISA..	52
Protocolo de Inmunización de ratones 3xTg-AD.....	52
Análisis Inmunohistoquímico de tejidos de cerebro de ratones 3xTg-AD	53
Análisis por Inmunofluorescencia de cerebros de ratones 3xTg-AD	54
Análisis histoquímico de microhemorragias en cortes de cerebro por tinción para Hemosiderina.....	55
Resultados	57
Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-A β -11-42 [pE] mediante ELISA.....	57
Permanencia de anticuerpos anti-A β -11-42 [pE] en circulación mediante ELISA.....	58
Análisis Inmunohistoquímico de tejidos de cerebro de ratones 3xTg-AD administrados con anti- β A-11-42[pE]	59

Análisis por Inmunofluorescencia de cerebros de ratones 3xTg-AD administrados con anti- β A-11-42[pE]	67
Análisis histoquímico de microhemorragias en cortes de cerebro por tinción para Hemosiderina.....	70
Discusión	72
Conclusiones	78
Referencias.....	79

Índice de Figuras y Tablas

Índice de Figuras

- ▶ Figura 1. Alois Alzheimer.
- ▶ Figura 2. Auguste D.
- ▶ Figura 3. Intentos de Auguste D. por escribir su nombre.
- ▶ Figura 4. Marañas Neurofibrilares de Auguste D. dibujadas por Alzheimer.
- ▶ Figura 5. Morfología y neuroimagen de un cerebro normal contra la un cerebro de un paciente con Enfermedad de Alzheimer (EA).
- ▶ Figura 6. Patología de la proteína tau en la EA.
- ▶ Figura 7. Modelo 3D de la Proteína Precursora Amiloide (APP).
- ▶ Figura 8. Procesamiento de la APP y formación del péptido beta-amiloide (β A).
- ▶ Figura 9. Representación del procesamiento de la APP dentro de célula y liberación del β A al medio extracelular.
- ▶ Figura 10. Tipos de depósitos de β A en la EA.
- ▶ Figura 11. Patofisiología general de la neuroglia.
- ▶ Figura 12. Inmunoterapia Pasiva e Inmunoterapia Activa para la EA.
- ▶ Figura 13. Mecanismos de acción propuestos para la inmunoterapia en la reducción del β A.
- ▶ Figura 14. Procesamiento de los cerebros de ratón.
- ▶ Figura 15. Reactividad cruzada por ensayo de ELISA del anticuerpo anti- β A-11-42[pE].
- ▶ Figura 16. Determinación de la permanencia de anticuerpos anti- β A-11-42[pE] en circulación mediante ELISA.
- ▶ Figura 17. Análisis Inmunohistoquímico de Ratones 3xTg-AD inmunizados con anti- β A-11-42[pE].
- ▶ Figura 18. Análisis Inmunohistoquímico de los cerebros de ratón 3xTg-AD correspondientes al grupo Tratamiento.
- ▶ Figura 19. Análisis por Inmunofluorescencia de tejidos de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE].
- ▶ Figura 20. Evaluación de microhemorragias en ratones 3xTg-AD administrados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE].

Índice Tablas

- ▶ Tabla 1. Casos publicados de la Enfermedad de Alzheimer disponibles en el manual de Kraepelin, 1910.
- ▶ Tabla 2. Factores genéticos confirmados a la predisposición de la EA.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
EA	Enfermedad de Alzheimer
β A	Beta-amiloide
NFT	Marañas neurofibrilares
[pE]	Piroglutamato
β A[pE]	Péptidos de Beta-Amiloide piroglutamados
CT	Tomografía Computarizada
PET	Tomografía por emisión de positrones
SPECT	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales
NH ₂	Extremo amino
EAF	Enfermedad de Alzheimer Familiar
EAT	Enfermedad de Alzheimer Temprana
APP	Proteína Precursora Amiloide
PS-1	Presenilina 1
PS-2	Presenilina 2
EAE	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
apoE	Apolipoproteína E
MTBD	Dominios de unión a microtúbulos
MT	Microtúbulos
MAPs	Proteínas asociadas a los microtúbulos
PHF	Filamentos helicoidales emparejados
AICD	Dominio intracelular de APP
ADDLs	Ligandos difusibles derivados de β A
CAA	Angiopatía Cerebral Amiloide
AChEI	Inhibidores de la acetilcolinesterasa
NMDA	N-metil-D-aspartato
LTP	Potenciación de largo plazo
SNC	Sistema Nervioso Central
BHE	Barrera hematoencefálica
QC	Glutaminil ciclasa

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que comienza con un ligero déficit de memoria a corto plazo y culmina en la pérdida total de las funciones cognitivas y básicas (Pimplikar, et al., 2010). Actualmente no hay un tratamiento disponible que disminuya o detenga la EA. Sin embargo, los investigadores de todo el mundo se encuentran estudiando decenas de estrategias de tratamiento que pueden tener el potencial de cambiar el curso esta enfermedad (Thies y Bleiler, 2012). Patológicamente, las tres características de la EA son las placas extracelulares amiloides compuestas de agregados del péptido Beta-amiloide (β A), las marañas neurofibrilares (NFT) intracelulares compuestas de agregados de proteína *tau* hiperfosforilada, y pérdida de la sinapsis neuronal (Newell, et al., 1999).

Las principales variantes de β A detectadas en el cerebro humano son β A1-40 y β A1-42, y además una proporción significativa de β A en la EA también se compone de especies truncadas modificadas en el extremo amino (NH_2) conocidas como amino-truncadas (Güntert, Döbeli, et al., 2006; Hasegawa et al., 1992; Saido et al., 1995; Schilling, Appl, et al., 2008). Entre todas las especies amino-truncadas los péptidos β A piroglutamados-modificados (β A[pE]) han demostrado ser los componentes más predominantes en los cerebros de pacientes con la EA. Estudios sobre las propiedades biofísicas de los péptidos β A piroglutamados demostraron que forman una estructura de β -plegada con mayor facilidad que los péptidos β A de longitud completa, sugiriendo que éstas especies posiblemente actúen como semillas de agregación para la formación de agregados amiloides (He & Barrow, 1999). Por todo lo anterior los péptidos β A [pE]) se han convertido en un blanco para la Inmunoterapia.

Adicionalmente, el grupo de investigadores al que pertenezco, desarrollaron anticuerpos policlonales en conejos anti-A β 11-42[pE] e identificaron dos epítomos de células B, que reconocen estos anticuerpos. El anticuerpo policlonal de conejo anti- β A11-42[pE] reconoce la parte central del péptido A β y es capaz de reconocer al péptido completo β A-1-42, así como también a los péptidos amino-truncados β A-3-42[pE] y β A-11-42[pE]. Estos

resultados son importantes para el desarrollo de inmunoterapéuticos dirigidos hacia diferentes variantes del β A (Perez-Garmendia et al., 2010).

En el presente estudio se evaluó la capacidad protectora de los anticuerpos anti-A β 11-42[pE] considerando dos esquemas de tratamiento: a) Terapéutico y b) Profiláctico. Cada esquema se llevó a cabo por inmunización pasiva mediante la administración intravenosa de los anticuerpos. Así mismo se demostró que cuando los anticuerpos son administrados vía intravenosa estos permanecen en plasma hasta 14 días después de una dosis única permitiéndonos una inmunización cada 10 días. También se demostró que los anticuerpos anti-A β 11-42 [pE] tienen un efecto moderado en la carga del amiloide en los ratones 3xTg-AD en los protocolos de tratamiento profiláctico. No se observó ningún efecto cuando el anticuerpo se administra en ratones 3xTg-AD de edad avanzada como tratamiento terapéutico. Los resultados obtenidos sugieren que el anticuerpo anti-A β 11-42 [pE] podría tener un efecto positivo ralentizando la progresión de la enfermedad si se es administrado como tratamiento preventivo. También se demostró que la presencia de microhemorragias en ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti-A β 11-42 es mayor en comparación con ratones 3xTg-AD sin tratamiento y con ratones no-transgénicos. Esto sugiere que el anticuerpo anti-A β 11-42 podría estar causando un efecto adverso cuando se administra vía intravenosa.

Marco Histórico

Alois Alzheimer y Auguste Deter

Alois Alzheimer nació el 14 de Junio de 1864, en Markbreit, Alemania. Estudió medicina en las universidades de Berlín, Tübingen, y Würzburg, en donde escribió su tesis doctoral *Über die Ohrenschmalzdrüsen* (En las Glándulas Ceruminales del Oído) en 1887. En diciembre de 1888, comenzó su carrera como médico residente en el Hospital para Enfermos Mentales y Epilépticos, Frankfurt am Main, y posteriormente fue promovido a médico en jefe (Maurer, et al., 1997).

Los intereses de Alzheimer (ver *Figura 1*) para la investigación fueron amplios y no incluyeron sólo el origen la demencia degenerativa y vascular (arteriosclerosis), sino también las psicosis, la psiquiatría forense, la epilepsia y el control de la natalidad. Su interés en la neuropatología de trastornos demenciales fue compartido por su colega Franz Nissl, que llegó a Frankfurt en marzo de 1889. Nissl proporcionó a Alzheimer nuevas técnicas histopatológicas para el estudio de las enfermedades nerviosas (Whitehouse y Maurer, 2000).



Figura 1. Alois Alzheimer. Fotografiado en Berlín antes de irse a Breslau. Tomada de Whitehouse & Maurer, 2000.

El 25 de Noviembre de 1901, Auguste Deter (ver *Figura 2*) fue ingresada en el hospital de Frankfurt, donde fue examinada por Alzheimer. Ella tenía un sorprendente grupo de síntomas que incluían reducción de memoria y comprensión (por ejemplo: trastorno amnésico de escritura ver *Figura 3*), así como afasia, desorientación, comportamiento impredecible, paranoia, alucinaciones auditivas, y deterioro psicosocial pronunciado. En 1903, Alzheimer partió de Frankfurt, y después de una corta estancia en Heidelberg, se trasladó a la Clínica Psiquiátrica Real, Múnich, cuyo director era Emil Kraepelin. Allí, Alzheimer continuó dándole seguimiento al caso de Auguste D. hasta la muerte de ésta en Frankfurt el 8 de abril de 1906, tras lo cual se fue a estudiar las características neuropatológicas de la enfermedad (Maurer et al., 1997).

Poco antes de la muerte de Auguste D. su expediente indicaba: “Tendencia al decúbito desde el comienzo de 1906. Desarrollo de úlcera sacra y trocantérea del lado izquierdo. Estado débil, temperatura arriba de 40°C en los últimos días. Neumonía de ambos lóbulos inferiores”. La última documentación esta datada del 8 de Abril de 1906: “Dentro de la mañana, *exitus letalis*. Causa de la muerte: Septicemia por decúbito. Diagnóstico anatómico: hidrocefalia moderada interna y externa. Atrofia Cerebral. Arterioesclerosis de los pequeños vasos cerebrales. Neumonía en los dos lóbulos inferiores. Nefritis” (Whitehouse & Maurer, 2000).

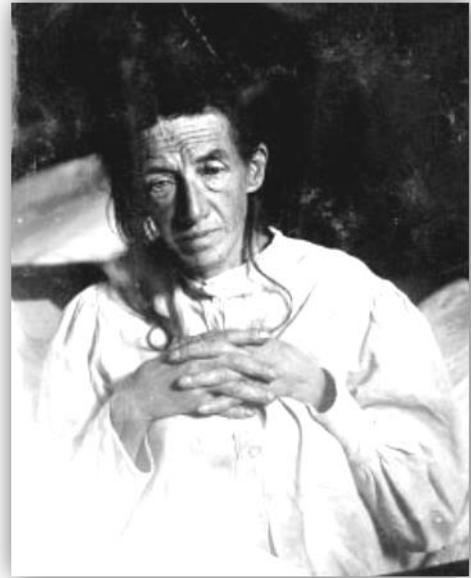


Figura 2. Auguste D., fotografía datada de Noviembre de 1902. Sacada de Maurer et al., 1997.

El Epónimo de la Enfermedad de Alzheimer

En 1907 Alzheimer dio a conocer su publicación “Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral” en la 37ª Conferencia de Psiquiatras Alemanes del Sudeste en Tübingen.

En su publicación el describió las características psicológicas e histológicas de lo que con el tiempo se convirtió en su caso No.1. A ésta publicación le siguieron la de Francesco Bonfiglio en 1908, la de Gaetano Perusini en 1909 y la de Fisher en 1907 la cual fue paralela a la primera publicación de Alzheimer. Sin embargo, en 1911 Alzheimer describe su segundo caso de demencia (Johann F.). En la discusión de ésa publicación se encontraban dibujos de los cambios típicos en las neurofibrillas de su primer caso Auguste D (Maurer et al., 1997).

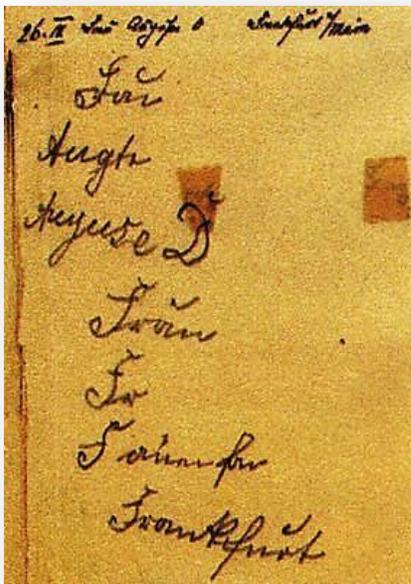


Figura 3. Intentos de Auguste D. por escribir su nombre. Tomado de Maurer et al., 1997.

En 1910 Kraepelin, el director de *The Royal Psychiatric Clinic*, en su 8ª Edición de su Manual de

Psiquiatría declaró que “Un grupo particular de casos con alteraciones celulares extremadamente graves fue descrito por Alzheimer”. Los resultados de la necropsia mostraron cambios que “representan las formas más graves de demencia senil. Las placas eran extremadamente numerosas y casi una tercera parte de las células corticales estaban muertas. Y en su lugar había miles de neurofibrillas sumamente teñidas” (ver Figura 4). Kraepelin mencionó “Enfermedad de Alzheimer” por primera vez, diciendo, “La interpretación clínica de la *Enfermedad de Alzheimer* es todavía poco clara. Aunque los hallazgos anatómicos sugieren que estamos lidiando con una forma particularmente grave de demencia senil, lo cierto es que ésta enfermedad a veces inicia por muy temprano después de los cuarenta” (Kraepelin, 1910; Whitehouse & Maurer, 2000).



Figura 4. Marañas Neurofibrilares de Auguste D. dibujadas por Alzheimer. Tomada de Maurer et al., 1997.

Existen muchos cuestionamientos de la lógica que siguió Emil Kraepelin al crear el epónimo de la *Enfermedad de Alzheimer*, sin embargo, la idea más aceptada es que Kraepelin pensaba que Alzheimer había descubierto una nueva enfermedad. Otra idea es que se le dio el epónimo de la *Enfermedad de Alzheimer* ya que fue el primero en publicar el caso sobre Auguste D. en 1907, donde después de su publicación le seguirían otras más hasta el día de hoy.

Tabla 1 Casos publicados de la Enfermedad de Alzheimer disponibles en el manual de Kraepelin, 1910. Tomada y modificada de Whitehouse & Maurer, 2000.

Caso	Autor/Año de Publicación	Edad (años)
Auguste D.	Alzheimer, 1907	51
Leonard Sch.	Bonfiglio, 1908	60
Auguste D.	Perusini, 1909	51
R. M.	Perusini, 1909	45
B.A.	Perusini, 1909	65
Leonard Sch.	Perusini, 1909	60

Descripción Clínica

La Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se ha convertido en un importante problema de salud pública desde que la esperanza de vida de los humanos se ha extendido gracias a la medicina moderna (Nestler, et al., 2008). La enfermedad de Alzheimer es la sexta causa principal de muerte de las personas mayores de 65 años o más en los Estados Unidos (Kochanek, et al., 2011). La etiología de la EA parece ser multicausal. No existe, como en las patologías infecciosas, un agente patógeno claramente identificado, sino que se trata de una enfermedad compleja y multifactorial. La EA, pertenece a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas llamadas *demencias*, dentro de este grupo de enfermedades la EA es el tipo más común de demencia. “Demencia” es un término general que describe una variedad de enfermedades y condiciones que se desarrollan cuando las neuronas mueren o ya no funcionan normalmente. La muerte o el mal funcionamiento de neuronas, causa cambios en la memoria, el comportamiento y la capacidad juicio con alteraciones del lenguaje. En la EA, estos cambios en el cerebro afectan la capacidad del individuo de forma progresiva e irreversible.

Síntomas

Las enfermedades mentales afectan al funcionamiento psíquico de la persona, mientras que el grupo de enfermedades neurodegenerativas, al que pertenece el Alzheimer, perturba las funciones cognitivas, especialmente la memoria y la atención. La EA, además, provoca trastornos de comportamiento y de humor, sobre todo, depresión, alucinaciones o ideas delirantes, que pueden llevar a pensar en una enfermedad mental. Sin embargo, lo que en este caso provoca los síntomas son las lesiones cerebrales causadas por la enfermedad (Moulin & Thévenet, 2011).

Uno de los primeros síntomas de la EA es la pérdida de memoria. A medida que avanza la enfermedad, la capacidad para aprender nueva información se ve cada vez más comprometida. El acceso a memorias distantes, la cual se encuentra intacta en las etapas iniciales de la enfermedad, comienza a disminuir. Conforme el deterioro cognitivo avanza, los pacientes pueden perderse al caminar o conducir, y son cada vez más incapaces de realizar tareas diarias tales como preparar comida, tomar medicamentos de manera regular,

cepillarse los dientes, o peinarse. A medida que la capacidad cognitiva disminuye, los pacientes pueden experimentar depresión, irritabilidad, y en etapas avanzadas delirios y alucinaciones. Los pacientes pueden llegar a ser agresivos, incluso hacia las personas que los cuidan. La etapa final de la EA se caracteriza generalmente por la pérdida completa de la independencia. La enfermedad tiene un costo enorme, no sólo de los individuos afectados, sino también de los amigos y familiares que cuidan de ellos así como de la sociedad en general (Nestler et al., 2008).

Diagnóstico y Biomarcadores

El diagnóstico de la EA sólo puede confirmarse mediante la patología celular definida que se observa en el examen *post mortem* del encéfalo. La histopatología presenta tres características principales: a) colecciones de filamentos de citoesqueleto intraneuronales denominadas marañas *neurofibrilares* (NFT); b) depósitos extracelulares de la proteína β -amiloide (β A) denominados *placas seniles* y c) una pérdida difusa de neuronas. Estos cambios son más aparentes en la neocorteza, las estructuras límbicas (hipocampo, amígdala y sus cortezas asociadas) y núcleos seleccionados del tronco del encéfalo (especialmente los núcleos del encéfalo anterior basal) (Purves, 2007).

Para hacer el diagnóstico tentativo de la EA y para excluir otras causas de demencia, los médicos se basan en las historias clínicas de los pacientes y de los informantes; exámenes físicos, neurológicos y psiquiátricos; pruebas neuropsicológicas; pruebas de laboratorio (por ejemplo: las alteraciones en los niveles específicos de alguna proteína en el suero o el líquido cefalorraquídeo, como el péptido β -amiloide y la proteína tau, lo cual puede ser útil en el diagnóstico de la EA) y una variedad de otras pruebas diagnósticas que incluyen la Tomografía Computarizada (CT) o la Resonancia Magnética (MRI). En pacientes con la EA las imágenes pueden mostrar anomalías, particularmente en el lóbulo temporal medial, estableciendo un valor predictivo para el diagnóstico. La tomografía por emisión de positrones (PET) (En la *Figura 6* se muestra la comparación entre el PET de un cerebro de un paciente sano y un paciente con EA) y la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales (SPECT) por lo general muestran una disminución del flujo

sanguíneo regional en los lóbulos parietal y temporal, así como en otras áreas corticales en las etapas avanzadas de la enfermedad (Kandel, et al., 2012).

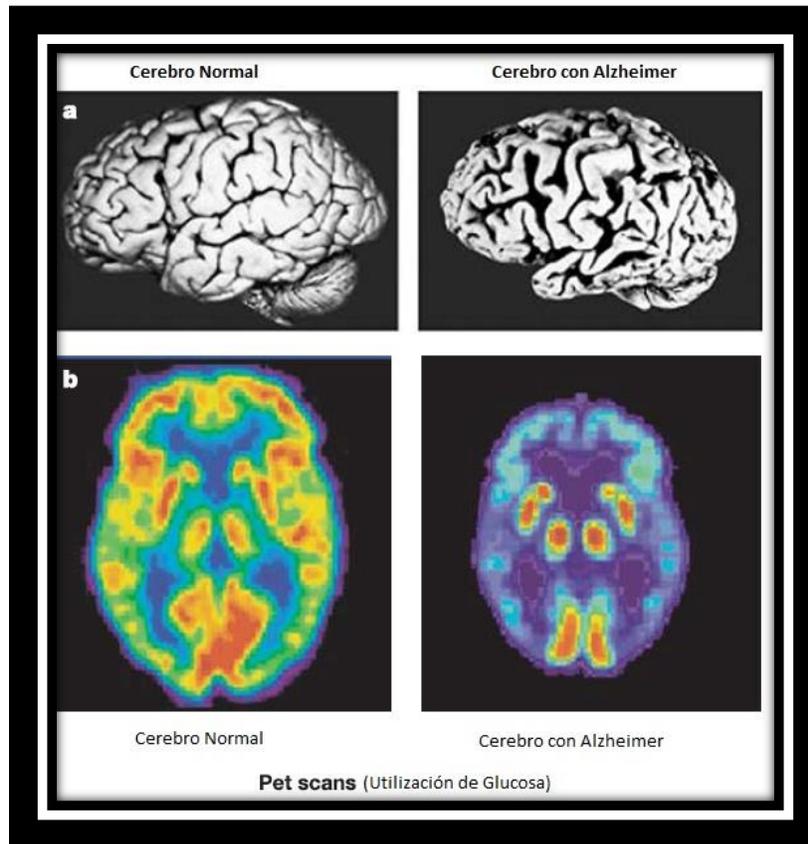


Figura 5 Morfología y neuroimagen de un cerebro normal contra la un cerebro de un paciente con Enfermedad de Alzheimer (EA). (a) Cuando se compara el cerebro de una persona sana y el cerebro de un paciente con EA, el segundo presenta una disminución en las circunvoluciones en el lóbulo temporal y los lóbulos frontales. (b) Diferencia entre el PET de un cerebro normal que muestra la absorción de glucosa (rojo y amarillo que indican altos niveles de consumo de glucosa) y una persona con EA la cual presenta una reducción en el metabolismo energético en la corteza frontal y los lóbulos temporales. Tomado y modificado de Mattson, 2004.

Causas

La causa o causas de la Enfermedad de Alzheimer aún no se conocen en su totalidad. Sin embargo, la mayoría de los expertos coinciden en que la EA, al igual que otras enfermedades crónicas comunes, se desarrolla como resultado de múltiples factores y se asocian con varios factores de riesgo. Estos factores incluyen una variedad de cambios en el cerebro que se piensa, comienzan hasta 20 años antes de que aparezcan los síntomas, es decir, que el individuo es capaz de mantener sus funciones cerebrales con normalidad, a

pesar de estos cambios en el cerebro, pero conforme avanza la enfermedad, el cerebro ya no puede compensar el aumento de daño neuronal causado por los cambios en el mismo, y finalmente el individuo experimenta una ligera disminución en su capacidad cognitiva (Thies y Bleiler, 2012).

Entre los cambios en el cerebro que se cree que contribuyen al desarrollo de la EA están la acumulación de la proteína β -amiloide fuera de las neuronas y la acumulación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada dentro de estas. Además, la transferencia de información en las sinapsis comienza a fallar, debido a una disminución en el número de ellas. La acumulación de β -amiloide fuera de estas sinapsis se cree que interfiere en la comunicación neurona-neurona y contribuye a la muerte celular. En el interior de la neurona los niveles altos (anormales) de la proteína tau hiperfosforilada forman marañas que bloquean el transporte de nutrientes y otras moléculas esenciales en toda la célula. Esto también se cree que contribuye a la muerte celular. Los cerebros con EA avanzada muestran una dramática pérdida de células y amplios cúmulos de neuronas muertas y neuronas a punto de morir (Alzheimer's Association, 2012).

Factores de Riesgo

El principal factor de riesgo para el desarrollo de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas es la edad avanzada. La mayoría de las personas con la EA son diagnosticadas a la edad de 65 o más. Sin embargo, las personas menores de 65 años también pueden desarrollar la enfermedad. Cuando la enfermedad se desarrolla en una persona menor de 65 años, suele asociarse con la llamada, Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) o Enfermedad de Alzheimer Temprana (EAT), la cual se debe a mutaciones en ciertos genes (Alzheimer's Association, 2012; Prince y Jackson, 2009). Las mutaciones en los genes de la Proteína Precursora Amiloide (APP), Presenilina 1 (PS-1) y Presenilina 2 (PS-2), representan la mayor parte de estos casos de EAF.

Para la Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE) o Tardía tanto los factores ambientales (estilo de vida) como los factores genéticos son importantes. Entre los factores

ambientales se ha encontrado evidencia, en muestreos representativos y estudios de casos y controles, que sugieren una asociación entre la EA y la educación escolar limitada (Ott et al., 1995), así como también una asociación entre la EA y el traumatismo craneoencefálico (Mayeux et al., 1995; Mortimer et al., 1991). Sin embargo, las evidencias antes mencionadas son parcialmente apoyados por estudios longitudinales (de seguimiento) (Stern et al., 1994). Uno de los factores genéticos más estudiados en pacientes con EAE es el polimorfismo del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (apoE), el cual aumenta considerablemente el riesgo de padecer demencia; en la población cerca del 25% tiene una o dos copias de este alelo (Nalbantoglu et al., 1994; Saunders et al., 1993). En resumen se muestra en la *Tabla 2* los factores genéticos confirmados a la predisposición de la EA, todos con excepción del polimorfismo en apoE4 (que supone un factor de riesgo para la EAE) suponen un factor de riesgo para la EAF.

Tabla 2. Factores genéticos confirmados a la predisposición de la EA. Tomado y modificado de Selkoe, 2001.

Cromosoma	Defecto Genético	Fenotipo
21	Mutaciones en APP	↑ Todos los péptidos βA , o ↓ de péptidos $\beta A1-40$, EA, déficit cognitivo
19	Polimorfismo en ApoE4 (alelo $\epsilon 4$)	↑ Densidad de placas βA y depósitos vasculares
14	Mutación en Presenilina 1	↑ Producción de péptido $\beta A1-42$
1	Mutación en Presenilina 2	↑ Producción de péptido $\beta A1-42$

Incidencia de la EA.

La incidencia global de la demencia se estima en 35.6 millones y se prevé que casi se duplique cada 20 años, llegando a 65.7 millones en 2030 y 115.4 millones en 2050, dando lugar a una costosa carga para el cuidado de los pacientes. El número total de nuevos casos de demencia cada año es casi 7.7 millones en el mundo, lo que supone un nuevo caso cada cuatro segundos (Wortmann, 2012).

La EA constituye el 60-80% de los casos de demencia (Thies y Bleiler, 2012). En el 2012 se estimó que 5.4 millones de Estadounidenses padecen la EA. Esta cifra incluye 5.2

millones de personas con una edad de 65 años o más (Hebert, et al., 2003) y 200,000 individuos por debajo de los 65 años los cuales sufren la EAF. Es decir, una de cada ocho personas ≥ 65 años (13%) sufren la EA, mientras que casi la mitad de las personas ≥ 85 años (45%) tienen la EA (Maslow, et al, 2006).

La población en México en 2012 se estimó en 116.9 millones de habitantes y presenta una tasa de crecimiento natural de 1.35 por ciento anual. El grupo de adultos mayores ≥ 65 años, por su parte, aumentó su tamaño de 7.1 millones en 2010 y aumentará a 9.8 millones en 2020 y 23.1 millones en 2050 (<http://www.conapo.gob.mx>). Reportes epidemiológicos recientes en México, han estimado que alrededor de 800 mil personas sufren de algún tipo de demencia (Llibre Rodriguez et al., 2008), y en el Distrito Federal se estima que hay 41 mil personas con esta enfermedad; cantidad que aumentará proporcionalmente con el incremento en la población adulta mayor (Dirección General de Equidad y Desarrollo Social / Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares, 1999). Además los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) revelan que anualmente mueren 2,030 pacientes por la EA en México (www.innn.salud.gob.mx).

Histopatología

Las características histopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer

Los cerebros de pacientes con la EA, se caracterizan histopatológicamente por dos lesiones: las marañas neurofibrilares y las placas seniles. Estas dos lesiones patológicas actúan de manera sinérgica causando una disfunción progresiva en la sinapsis y, eventualmente, la muerte de las neuronas, especialmente en el sistema límbico y las cortezas de asociación, las cuales están implicadas en la memoria y la navegación (Ittner y Götz, 2011). Así, con el propósito de investigar cuales son los mecanismos por lo que se dan estos cambios patológicos lo investigadores de todo el mundo se dedicado a estudiar dichos mecanismos , incluyendo la agregación y depósito de β A, la hiperfosforilación de la proteína tau la cual forma las marañas neurofibrilares, la disfunción neurovascular, los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Blennow, et al, 2006). A continuación se tratará a fondo los dos marcadores histopatológicos mejor conocidos en la EA.

La proteína Tau y las Marañas Neurofibrilares

Se sabe que el citoesqueleto es una estructura celular que brinda sostén a las células y proporciona la morfología neuronal. Sus componentes esenciales son los microtúbulos (MT). El citoesqueleto es importante en el establecimiento de la polaridad neuronal determinando el desarrollo del axón y las dendritas; los cuales están involucrados, entre otras funciones, en el transporte de nutrientes y desechos así como también en la neurotransmisión. La estabilidad y la dinámica para la polimerización de los MT es promovida por proteínas que se denominan como *proteínas asociadas a los microtúbulos* (MAPs) (Meraz-Ríos et al., 2010). Entre las MAPs, Tau es una proteína importante que participa en la asociación-disociación de los MTs axonales, confiriéndole dinámica al sistema (Weingarten, 1975). En la *Figura 6* se esquematiza los cambios que va sufriendo la neurona debido a la acumulación intracelular de la proteína tau.

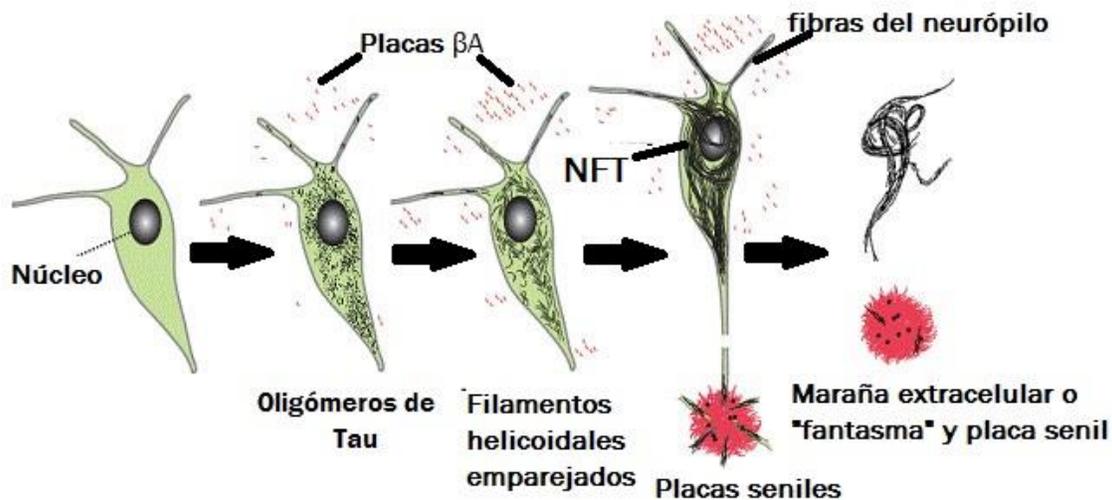


Figura 6. Patología de la proteína tau en la Enfermedad de Alzheimer. En ésta imagen se ilustra la secuencia de cambios que la neurona va sufriendo por la degeneración neurofibrilar. La hiperfosforilación de la proteína tau causa el autoensamblaje de la misma formando los oligómeros, los filamentos helicoidales emparejados, las marañas intracelulares (NFT) y finalmente las marañas extracelulares o "fantasmas".

La proteína tau contiene dos motivos, uno para formar laminas β y el otro con repeticiones de *dominios de unión a microtúbulos* (MTBD). Cuando esta estructura es alterada por alguna modificación tal como la hiperfosforilación o el truncamiento, como sucede en la EA, la proteína pierde afinidad hacia los MTs y comienza autoensamblarse, resultando en la formación de *filamentos helicoidales emparejados* (PHF). Como resultado se forman las *Marañas Neurofibrilares* (NFT) por la acumulación masiva de las PHF dentro de la célula (Kidd, 1963; Mandelkow et al, 2007; Meraz-Ríos et al., 2010).

La Proteína Precursora Amiloide y su procesamiento.

El gen de la APP se localiza en el cromosoma 21q21 en los humanos. Tiene tres isoformas principales que surgen del splicing alternativo de su pre-mRNA, estas son APP695, APP751 y APP770 (correspondiendo a su longitud de 695, 751 o 770 aminoácidos respectivamente) (Goate et al., 1991). La APP751 y la APP770 se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que APP695 se expresa predominantemente en las neuronas (Rohan de Silva et

al., 1997; Zhang, et al., 2011). La APP es un miembro de la familia de proteínas evolutivamente conservadas denominada como APP-like (proteínas parecidas a APP) donde la región del promotor muestra características típicas de un gen constitutivo (*en inglés housekeeping gene*), y donde la transcripción puede iniciar en múltiples sitios (Salbaum et al, 1988). Lo anterior es de gran relevancia, a pesar de que su función no está bien definida, pero su desregulación apunta a un papel importante en la patogenia de la EA.

La APP es una glicoproteína integral de membrana de tipo I: tiene aproximadamente un tramo de 23 residuos hidrofóbicos, localizados cerca de su región carboxilo-terminal (C-terminal), el cual le sirve para anclarse a la bicapa fosfolipídica de las membranas internas (como el aparato de Golgi o endosomas) y externas; un dominio citoplasmático c-terminal pequeño y un dominio amino-terminal (N-terminal) relativamente largo (Yokeş, 2007) tal como se observa en la *Figura 7*. A pesar de que APP ha sido objeto de muchos estudios desde su identificación, su función fisiológica permanece en gran medida sin determinar. Se han sugerido varios papeles a la APP como el crecimiento de neuritas y sinaptogénesis, tráfico de proteínas neuronales a lo largo del axón, transducción de señales transmembranales, adhesión celular, metabolismo del calcio (Zheng y Koo, 2006).

APP es modificada post-traduccionalmente por la N- y la O-glicosilación, la fosforilación y la sulfatación de tirosina (De Strooper y Annaert, 2000). APP es sintetizada en el retículo endoplasmático (RE) y después transportada a través del aparato de Golgi a la red trans-Golgi, en donde se encuentra la mayor concentración de APP en las neuronas en un estado de reposo, para después ser secretada por la vía constitutiva. Después de su maduración, la APP se procesa secuencialmente por tres proteinasas denominadas α -, β - y γ -secretasas. El procesamiento de la APP por vía amiloidogénica

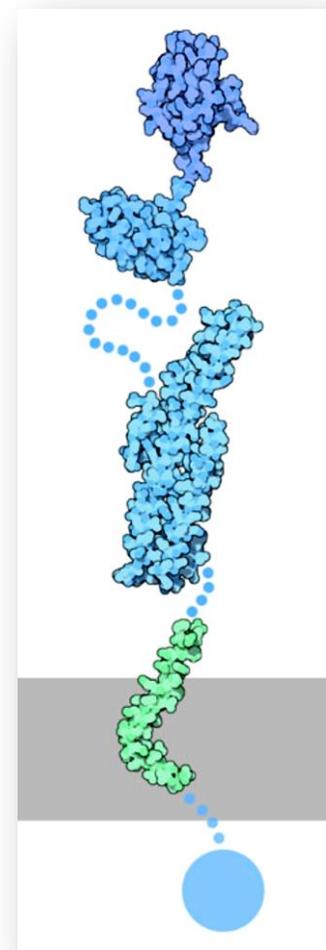


Figura 7. Modelo 3D de la Proteína Precursora Amiloide (APP). Se observa su dominio N-terminal (el más largo) y su dominio C-terminal el más corto, donde la membrana citoplasmática es esquematizada por la franja gris). Tomada de Goodsell, 2006.

resulta en la producción del péptido β -amiloide (β A) mientras que el procesamiento de la APP por la vía no amiloidogénica (el más común) previene la formación de β A. El primer corte en la vía amiloidogénica se lleva a cabo por la β -secretasa y genera un fragmento extracelular soluble de APP (sAPP β) y un fragmento de 99 aminoácidos de residuos C-Terminal (C99) unido a la membrana. Por otro lado, en la vía no amiloidogénica el corte es por la α -secretasa y se genera un fragmento extracelular soluble de la APP (sAPP α) y un fragmento unido a la membrana de 83 aminoácidos (C83). C99 y C83 son procesados posteriormente por el corte de la γ -secretasa, localizada en el dominio transmembranal, para generar el β A y p3, respectivamente. Además del β A y p3 se genera un fragmento citosólico soluble, denominado *dominio intracelular de APP* (AICD). Lo anterior se esquematiza en la *Figura 8*.

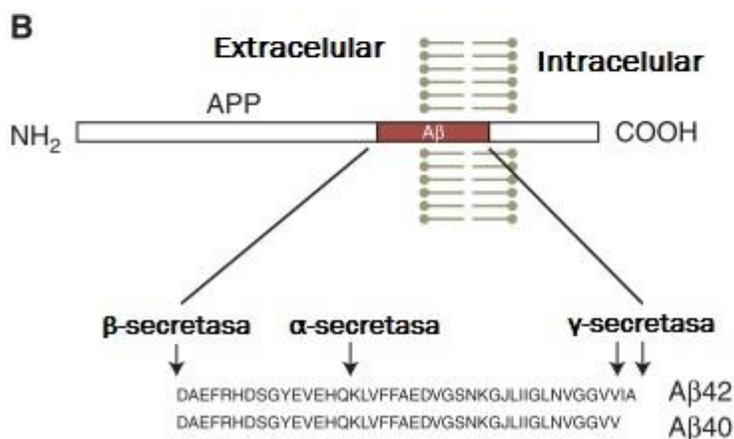
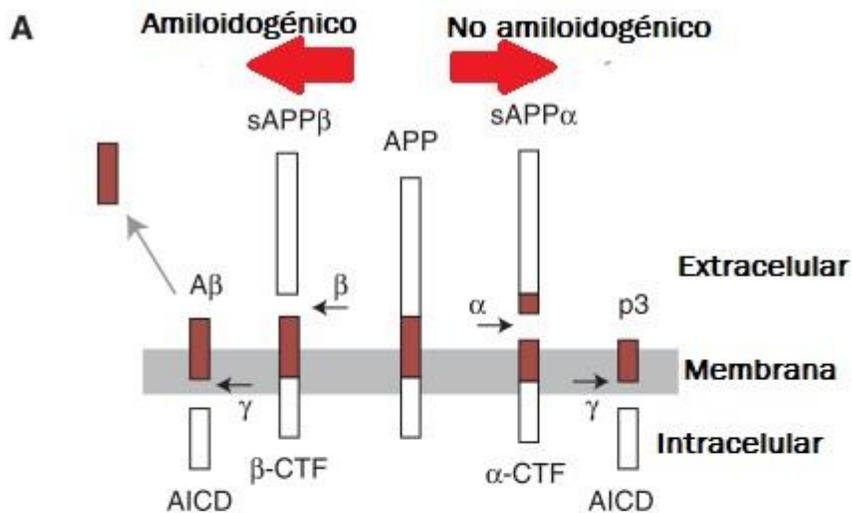


Figura 8. Procesamiento de la APP y formación del péptido Beta-amiloide (β A). (A) Se observan las dos vías de procesamiento de la APP, la vía amiloidogénica (izquierda) y la vía no amiloidogénica (derecha). En la vía amiloidogénica, el corte secuencial de la β - y la γ -secretasa libera el dominio extracelular soluble de APP (sAPP β), el péptido β A, y el dominio C-Terminal intracelular de la APP (AICD). Por otro lado en la vía no amiloidogénica, la α -secretasa no forma β A, en su lugar produce sAPP α y el péptido p3. (B) Diagrama que muestra la APP de longitud completa y la secuencia correspondiente a los péptidos β A40 y β A42, también se indica con flechas los sitios de corte proteolíticos de las secretasas. Tomado y modificado de Sheng, et. al., 2012.

El péptido β -amiloide

El monómero β A de 4kDa es derivado de la APP, como ya se mencionó anteriormente, por la acción de la β -secretasa y el complejo proteico de la γ -secretasa. Este monómero puede tener diferentes conformaciones como *random coil*, o una α -hélice, o una horquilla- β . A ciertas concentraciones los monómeros del péptido β A empiezan agregarse y se forman intermediarios metaestables, solubles y cortos, denominados oligómeros (ver *Figura 11*). Éstos se unen para formar un núcleo oligomérico que puede ser extendido rápidamente por la adición de monómeros para formar protofibrillas curvilíneas. Finalmente, las protofibrillas se juntan para formar grandes, e insolubles, fibrillas de láminas- β las cuales se acumulan en placas (Bitan, et al., 2001; Cappai y White, 1999; Evin y Weidemann, 2002; Gilbert, 2013; Sandberg et al., 2010). El péptido β A1-40 representa la forma más abundante de β A en el cerebro, mientras que β A1-42 muestra un aumento significativo en la EA (Näslund et al., 1994). β A1-42 posee dos aminoácidos hidrofóbicos adicionales en comparación con β A1-40, promoviendo una mayor formación de agregados en β A1-42 (Butterfield, et al., 2013).

Los oligómeros de β A son considerados las formas más tóxicas de los agregados amiloides (Walsh y Teplow, 2012). Los oligómeros interactúan con neuronas y células gliales llevando a la activación de cascadas pro-inflamatorias, disfunción de la mitocondria e incremento del estrés oxidativo, disfunción de las vías de señalización intracelulares y plasticidad sináptica, incremento de la fosforilación de tau, incremento de la actividad de GSK-3 β , desregulación del metabolismo del calcio e inducción de la apoptosis neuronal. Todos estos mecanismos en conjunto dan lugar a un círculo de retroalimentación positiva en la producción de péptidos β A, esto conduce a eventos perjudiciales para las neuronas, que a su vez lleva a la disfunción del metabolismo de la APP y mayor producción de péptidos β A (De-paula, et al., 2012; Roberts et al., 1994).

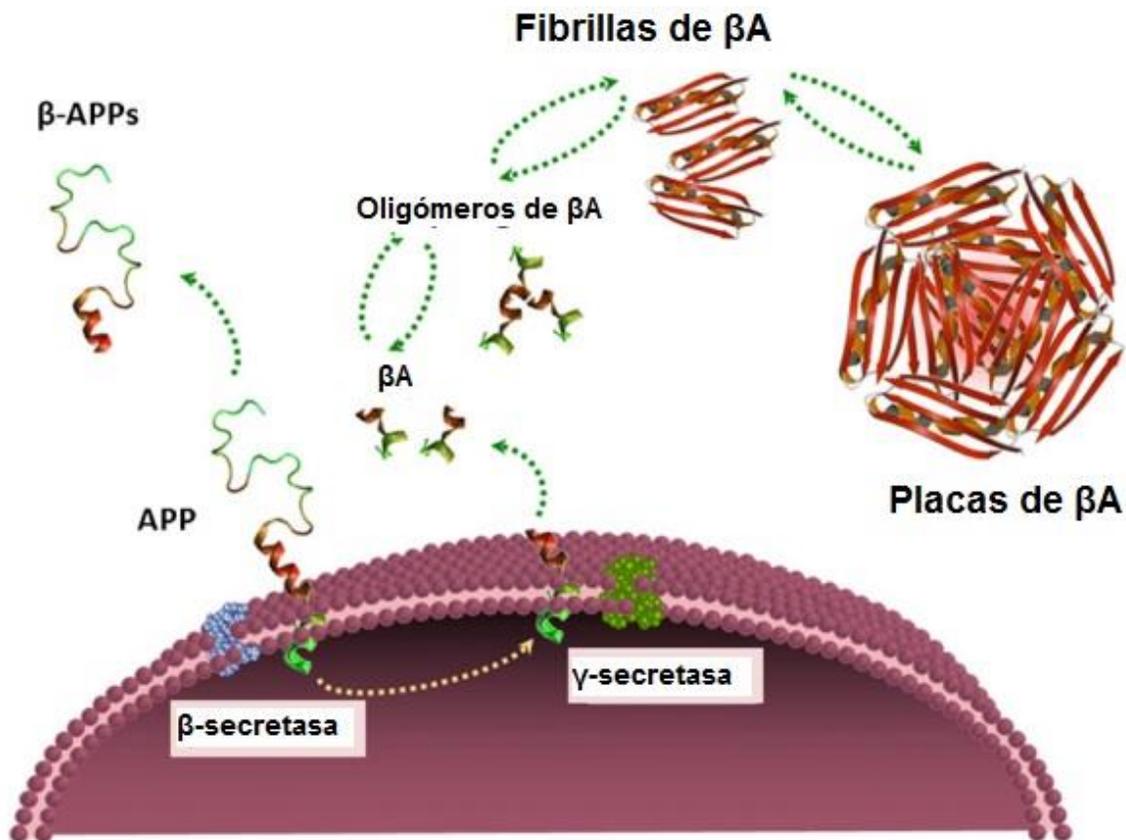


Figura 9. Representación del procesamiento de la APP dentro de célula y liberación del β A al medio extracelular. Se observa cómo es que el β A se agrega para formar oligómeros, fibrillas que comprenden los constituyentes principales de las placas en la EA. Tomado de Fodero-Tavoletti et al., 2011.

Es muy importante resaltar que en cerebros con EA se encuentran tres tipos de depósitos de β A (Terry et al., 1991) referidos como placas difusas, placas seniles y depósitos cerebrovasculares que ocupan del 12-25% del volumen total (ver Figura 12). A continuación se describe brevemente los tres tipos de depósitos de β A:

- **Placas Difusas:** Son más abundantes que las placas seniles en la mayoría de los cerebros de pacientes con la EA. Son depósitos de β A poco densos, amorfos, y casi esféricos (Tagliavini, et al., 1988). Las placas difusas no contienen ningún núcleo amiloideo pero son β A positivas y se cree que representan una etapa temprana en la formación del amiloide (Dickson, 1997). Se encuentran generalmente a lo largo de los hemisferios cerebrales y en un menor grado en la materia blanca, el cuerpo estriado y la corteza

cerebelar (Braak y Braak, 1991). Los depósitos difusos de β A han sido encontrados en una gran cantidad de sujetos cuyo estatus intelectual ha sido evaluado como normal, llevando a la conclusión de que este tipo de lesiones puede no ser directamente tóxico (Delaère et al., 1990; Dickson et al., 1992).

- ▶ **Placas Seniles:** Las clásicas placas seniles, también denominadas como placas neuríticas, son estructuras esféricas alrededor de 50-200 μ m de diámetro compuestos de un núcleo central de amiloide rico en péptidos β A(x-42, x-43) (Iwatsubo et al., 1994). Las placas seniles se encuentran rodeadas por neuritas distróficas que a menudo contienen PHF, astrocitos reactivos y microglía (Mandybur y Chuirazzi, 1990).
- ▶ **Amiloide Cerebrovascular:** La Angiopatía Cerebral Amiloide (CAA) es frecuente en la EA, pero no siempre se observa. En dichos casos, el péptido β A se deposita en los vasos sanguíneos cerebrales que involucra las leptomeninges, vasos superficiales corticales, grandes vasos en el espacio subaracnoideo y pequeños vasos en parénquima que están frecuentemente asociados con las placas seniles (Vinters, et al, 1996). Sin embargo, la CAA se puede observar en algunas personas de edad avanzada que no tienen demencia y que no cumplen los criterios histológicos para la EA (Glennner, et al., 1981; Mandybur, 1975). β A1-39 y β A1-40 son las especies más predominantes en la CAA a diferencia de las placas extracelulares compuestas principalmente por β A 1-42 (Prelli, et al., 1988; Soto, et al. 1994).

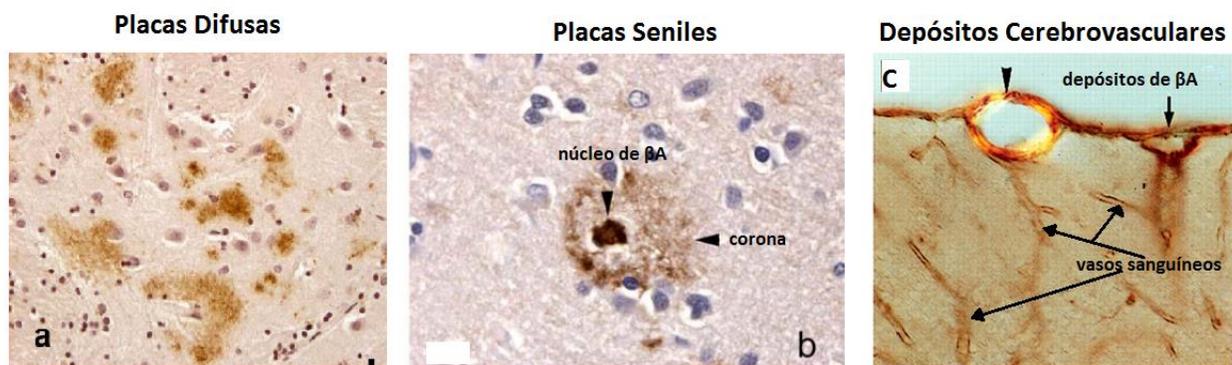


Figura 10. Tipos de depósitos de β A en la EA. (a) Placas difusas (*café*) en el striatum marcado con el anticuerpo 6F/3D. (b) Placas seniles: se observa el núcleo de amiloide (*café oscuro*) rodeado por un halo y una corona los cuales están teñidos suavemente con un anticuerpo anti- β A (*Dako*). (c) Se muestra el depósito de β A cerebrovascular con la tinción rojo Congo

(punta flecha) y la negativa (flecha) en el modelo de ratón APP23 de 16 meses de edad. Tomado y modificado de Calhoun, 1999; Duyckaerts, et al., 2009.

La Astrogliá y la Microglía en la EA

Las células de la neuroglia son generalmente neuroprotectoras: ellas contienen el daño y facilitan la supervivencia celular. En varias condiciones patológicas, la neuroglia activada puede resultar tóxica. Sin embargo, esto puede ser considerado como un mecanismo de defensa y supervivencia dirigido a la rápida reparación de los elementos dañados y sellando el área de lesión (Verkhratsky, et al., 2013). En las enfermedades neurodegenerativas, el papel de la neuroglia está poco explorado, no obstante, los cambios homeostáticos que acompañan la neurodegeneración implican la disfunción glial. Hay evidencia que indica que las células de la neuroglia ya se encuentran afectadas en las etapas tempranas en el proceso de neurodegeneración y son importantes elementos en la patofisiología de éstas enfermedades (Heneka, 2010; Rodríguez y Verkhratsky, 2011; Verkhratsky, 2010).

Se ha reportado que la acumulación de astrocitos activados y microglía cerca de los depósitos de β A sugiere que estos dos tipos celulares juegan un papel importante en la EA. Los astrocitos son el tipo celular más abundante en el Sistema Nervioso Central. Tras la exposición a β A, los astrocitos se activan y desempeñan un papel neuroprotector extendiendo sus procesos hipertróficos para separar físicamente a las neuronas de las fibrillas de β A (Wegiel, 2000). Además, los astrocitos activados pueden internalizar y degradar el β A (Pihlaja et al., 2008). Sin embargo, la exposición de los astrocitos a β A aumenta la expresión de las citosinas inflamatorias y la liberación del ácido nítrico en cultivos de astrocitos (Hu, 1998). Por otra parte, se ha reportado que la microglía puede internalizar fibrillas de β A mediante la fagocitosis estimulada por la interacción del complejo β A-anticuerpo con el receptor Fc (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005; Paresce, 1996) y/o mediante la interacción de las fibrillas de β A con el sistema de complemento mediante C1q o C3b (Brazil, 2000; Lee y Landreth, 2010; Rogers, 2002; Webster et al., 2001). En la *Figura 11* se muestra la morfología que pueden adoptar los astrocitos y la microglía cuando son activados.

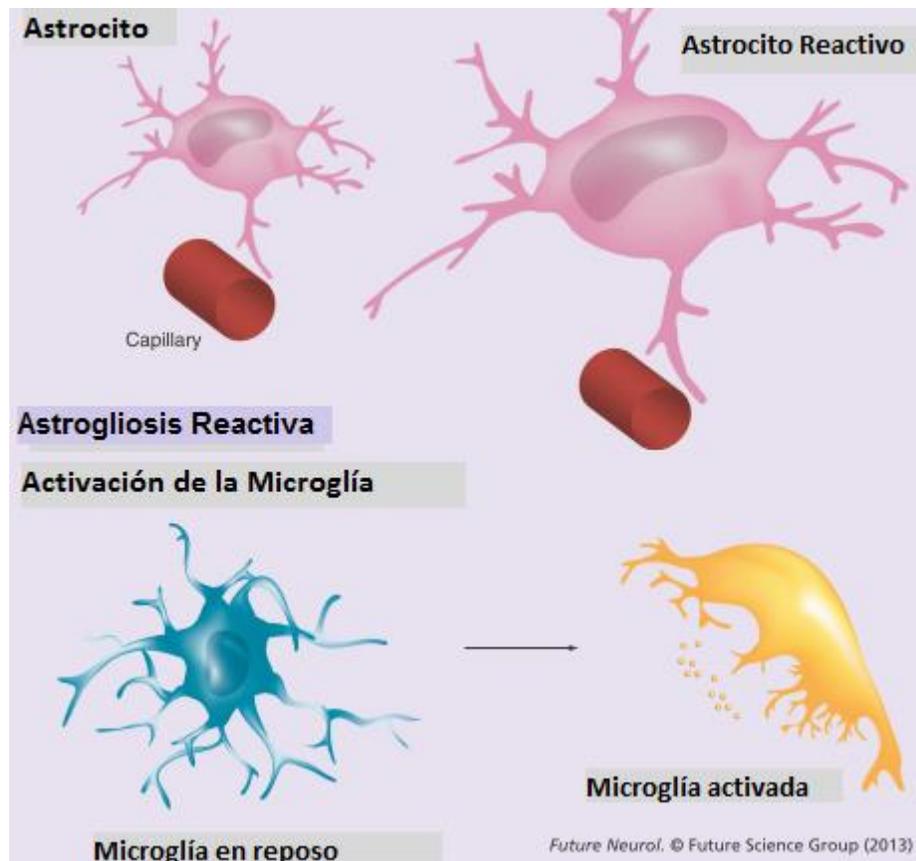


Figura 11. Patofisiología general de la neuroglia. Los astrocitos (rosa) y la microglía (azul) se encargan de mantener la homeostasis dentro del sistema nervioso central (SNC). La astrogliosis reactiva se desencadena por un amplio espectro de cambios específicos que involucran contextos patológicos como la EA. La microglía es un macrófago especializado dentro del SNC, responde rápidamente ante estímulos de traumatismo o infección cambiando su fenotipo activado “ameboide”, a este proceso se le conoce como activación de la microglía.. Tomada y modificada de Verkhratsky et al., 2013.

Principales Hipótesis para explicar las causas de la EA

Existe evidencia sólida, aunque todavía no concluyente, que indica que la EA es causada, en parte, por la toxicidad del péptido βA , ya sea en la forma de microagregados o depósitos amiloides. Múltiples formas de βA se derivan del corte proteolítico de la APP, sin embargo las especies dominantes son $\beta A40$ y $\beta A42$ (Kang et al., 1987). La “hipótesis amiloide” en términos generales postulaba que las cantidades excesivas del péptido βA en el cerebro, en particular $\beta A42$, son responsables de ciertos aspectos de la patología relacionada con la EA, incluyendo las placas amiloides, las marañas neurofibrilares, la pérdida de sinapsis, y finalmente la muerte de las neuronas (Blennow et al., 2006; Hardy y Selkoe, 2002; Tanzi y Bertram, 2005). Sin embargo el significado preciso de la hipótesis amiloide cambió con los

años, y difiere en opiniones entre científicos. Originalmente, se pensó que el amiloide era el patogénico, de ahí el término “hipótesis amiloide”. Y, la versión más actual de esta hipótesis postula que los microagregados de β A (especialmente β A42), también denominados como Ligandos difusibles derivados de β A (ADDLs), constituyen la especie neurotóxica que en conjunto con otras condiciones como el estrés oxidativo, inflamación, daño mitocondrial, causan la EA (Haass & Selkoe, 2007; Krafft & Klein, 2010; Sheng et al., 2012).

Cerca de 100 mutaciones en Presenilina-1 y Presenilina-2 (PS1 y PS2, subunidades catalíticas del complejo enzimático de la γ -secretasa) así como múltiples mutaciones puntuales en la APP que están agrupadas en y alrededor de la secuencia de β A, son descritas en individuos con la EAF. Llama la atención, que la mayoría de estas mutaciones aumentan ya sea la producción general de β A o la proporción de β A42/ β A40 (Bettens, et al., 2010; Blennow et al., 2006; Tanzi y Bertram, 2005). Además, las mutaciones en el sitio de corte de APP para la β -secretasa (como la mutación Swedish para APP) aumentan la producción de β A debido a que la APP para la β -secretasa (como la mutación Swedish para APP) aumenta la producción de β A debido a que APP adquiere una conformación más adecuada como sustrato para β -secretasa. También las mutaciones que rodean el sitio de corte de la γ -secretasa en APP favorecen la producción de β A42 que es más amiloidogénico que β A40. Las mutaciones en la región central del péptido β A aumentan o alteran las propiedades de agregación del β A (Sheng et al., 2012). Finalmente, las duplicaciones del gen de la APP, como en los individuos con Síndrome de Down, pueden conducir también a una EA temprana por el incremento de la producción de β A (Rovelet-Lecrux et al., 2006).

Respecto a la “hipótesis oligomérica”, hace ya más de 20 años se demostró *in vitro* que el β A monomérico no-tóxico se convierte en una especie tóxica después de la incubación por unos días en una solución “buffer” (Pike, 1991). La toxicidad fue asociada con la aparición de “especies de alto peso molecular” en SDS-PAGE. La microscopía de fuerza atómica, la ultracentrifugación y las técnicas de filtración en gel demostraron más tarde la presencia de “protofibrillas de β A metaestables” (Harper, 1997; Walsh, 1997) en preparaciones de β A generadas *in vitro*. Estas protofibrillas tienen un diámetro menor que las fibrillas de amiloide y un alto contenido de láminas- β , y se sugiere que estén en vía a la formación de fibrillas de amiloide. Varios investigadores han demostrado que las especies oligoméricas de β A solubles pueden ser extraídas con soluciones de buffer salino desde el

tejido cerebral de pacientes con EA y que la presencia de tales especies solubles está más fuertemente correlacionado que las placas amiloides con los síntomas de la enfermedad (Mc Donald et al., 2010; McLean et al., 1999). Existen por lo menos dos mutaciones dentro de la APP en la región central del péptido β A que parecen incrementar la tendencia del β A mutado a oligomerizarse (Nilsberth et al., 2001; Tomiyama et al., 2008)

Para concluir con esta hipótesis, es necesario resaltar que en concentraciones nanomolares a micromolares, los oligómeros de β A solubles deterioran la transmisión sináptica excitatoria, inhiben la potenciación de largo plazo (LTP del inglés Long-Term Potentiation, la cual se correlaciona con el aprendizaje y la memoria), induce la pérdida de espinas dendríticas, y afectan la memoria espacial en roedores (Crews y Masliah, 2010; Haass y Selkoe, 2007; Selkoe, 2002). Además de los efectos en la sinapsis, los oligómeros de β A solubles pueden provocar otros rasgos de la EA, tales como la hiperfosforilación de tau, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la muerte neuronal (Ashe y Zahs, 2010; Lambert et al., 1998).

Por otra parte la “hipótesis de tau” propone que la hiperfosforilación de tau aumenta su tendencia a agregarse y promueve la formación de los PHF, los cuales más tarde se convertirían en NFT (Grundke-Iqbal et al., 1986). La función de tau en la EA parece crítico ya que la hiperfosforilación de tau en residuos específicos afecta su habilidad para unirse y estabilizar a los microtúbulos (Iqbal et al., 2005). Los primeros estudios, enfocados a la proteína tau, demostraron que los microtúbulos dañados en neuronas en pacientes con la EA eran reemplazados por PHF-NFT, y se sugirió que la desestabilización del citoesqueleto neuronal podía jugar un papel importante en la patogénesis de la EA (Grundke-Iqbal et al., 1986).

En conclusión, a pesar de una gran cantidad de datos que incluyen descripciones de las mutaciones en APP y los genes de la presenilina provocando la EA, isoformas de los genes ApoE que predisponen a la EA, los modelos de ratón que reproducen algunas de estas condiciones genéticas, y los estudios bioquímicos de β A y del procesamiento de APP, la discusión acerca de la patogénesis de la EA persiste en la comunidad científica. Dadas estas incertidumbres, parece probable que el progreso significativo en la comprensión de la

neurodegeneración requerirá una mejor comprensión de la neurobiología del envejecimiento y de la regulación molecular de la sinapsis en los cerebros maduros (Sheng et al., 2012).

Enfoques
Terapéuticos y
modelos animales de
la EA

Terapias contra la Enfermedad de Alzheimer

Debido a la complejidad multifactorial de los mecanismos patogénicos, no se ha logrado desarrollar un tratamiento curativo de la EA. Las opciones terapéuticas en la actualidad están dirigidas a respuestas sintomáticas y focalizadas en eventos específicos y tardíos de la patogenia de la EA (Luna-Muñoz et al., 2010). Los objetivos clínicos en el tratamiento de la EA son: a) aliviar los síntomas cognitivos; b) aliviar el SCPD (Síntomas Conductuales y Psicológicos de Demencia); y c) ralentizar el progreso de la enfermedad (Chu, 2012).

Farmacoterapia actual

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) inhiben la degradación de la acetilcolina permitiendo mayor disponibilidad de ésta y son considerados como terapia adecuada para la EA desde 1986, cuando Summers y cols. observaron en un estudio abierto efectuado con *tacrina*, un AChEI, una mejoría cognitiva significativa (Summers, 1986). No obstante, este medicamento cae en desuso rápidamente (después de los 6 meses (Klafki, 2006)) por la frecuencia de administración requerida, por sus frecuentes efectos gastrointestinales y por el riesgo de hepatotoxicidad, lo anterior condujo a un rápido reemplazo de éstos medicamentos, tales como: donepezilo, rivastigina y galantamina, las cuales ofrecen una evidente tolerancia. Los AChEI han estado tradicionalmente indicados en etapas leves y moderadas de la enfermedad, pero se han aprobado también la utilización de donepezilo en etapas severas. Es importante mencionar, que después de 6-10 meses de uso, estos medicamentos ya no tienen el efecto positivo, y la enfermedad sigue avanzando.

La droga utilizada actualmente en el tratamiento de la EA es la memantina, aprobada por la FDA (*Food & Drug Administración*) en el 2003 para ser empleada en la EA moderada a severa. Pertenece a una clase de medicamentos que son antagonistas de los receptores NMDA y actúa impidiendo la excitación neuronal anormal (Luna-Muñoz et al., 2010). Se ha reportado que la memantina puede reducir los síntomas psicológicos y de comportamiento relacionados con la demencia (Maidment et al., 2008). Sin embargo, también se ha reportado que después de 6 meses de tratamiento con memantina en los pacientes con EA

de moderada a severa la mejoría cognitiva es difícilmente detectable a nivel clínico (Castellani, Rolston, & Smith, 2010).

Candidatos a fármacos con posibles efectos modificadores del curso de la enfermedad

Avances en la investigación de la patogénesis molecular de la EA también han dado lugar a nuevos candidatos a fármacos con potencial para modificar el curso de la enfermedad, los cuales están actualmente en ensayos clínicos. El enfoque principal ha sido el de inhibir la producción y agregación de β A y disminuir la carga del péptido β A en el cerebro. Inhibidores potenciales de la β - y γ -secretasa (las cuales se requieren para la producción de β A) se encuentran bajo investigación, pero una estrategia alternativa como es la inmunoterapia de β A está atrayendo más atención (Delrieu, 2012)

Inmunoterapia

Con el desarrollo de modelos de animales para la EA, el concepto inmunológico en el tratamiento de EA se convirtió en un enfoque terapéutico para estimular la eliminación de los agregados β -amiloides en el cerebro, ya sea con la inmunización pasiva o la inmunización activa. El enfoque de la inmunización activa emplea epítomos del péptido Beta-amiloide y/o conjugados del péptido beta-amiloide, así como diferentes rutas de administración y tipos de adyuvantes. El enfoque de la inmunización pasiva consiste en administrar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos contra epítomos determinados del péptido beta-amiloide. Este procedimiento proporciona anticuerpos directamente al cuerpo, en lugar de exigir una respuesta del propio sistema inmunológico (Solomon, 2008).

En 1999, Dale Schenk y colaboradores reportaron por primera vez que la inmunización de ratones transgénicos PDAPP con una vacuna que contenía A β fibrilar inducía anticuerpos anti- β A e inhibía la deposición de placas de β -amiloide, neuritis distróficas y astrogliosis en el cerebro de ratones (Schenk et al., 1999). Es importante destacar que cuando los ratones viejos, que ya habían desarrollado placas de β A, fueron inmunizados con el péptido β A, las placas amiloides fueron eliminadas del cerebro (Pfeifer

et al., 2002). Posteriormente, otros investigadores demostraron que con la inmunoterapia anti- β A hay mejorías en el comportamiento cognitivo en ratones APP-transgénicos. Por lo tanto se sugirió que la inmunoterapia anti- β A representa una estrategia potencialmente poderosa para la reducción de las formas patológicas de A β y posiblemente formas aberrantes de tau en el cerebro de pacientes con EA (Vasilevko et al., 2010)

La inmunoterapia basada en β -amiloide fue trasladada rápidamente a ensayos en humanos. Sin embargo, el ensayo original que consistió en la inmunización activa con β A42 fibrilar + el adyuvante QS21, conocido como el ensayo de la vacuna AN-1792, se detuvo en la fase II debido a que se observó meningoencefalitis en ~6% de los pacientes vacunados (Golde, et al., 2009). Análisis post-mortem de dos casos con meningoencefalitis mostró activación glial robusta, infiltración de células T y la eliminación de β A (Vasilevko et al., 2010).

Tanto la inmunización pasiva como la activa en algunos protocolos aumentan el riesgo de eventos cerebro-vasculares adversos, incluyendo la carga de microhemorragias corticales y lesiones microvasculares, anormalidades en la materia blanca y edema vasogénico (Solomon y Frenkel, 2010). Sin embargo, debido a la eficacia constante observada en modelos preclínicos y la escasez de terapias alternativas para la EA, cientos de ensayos de inmunoterapia activa y pasiva se están llevando a cabo actualmente en humanos (Vasilevko et al., 2010). En la Figura 12 se puede observar los dos diferentes enfoques inmunoterapéuticos así como también los ensayos clínicos que se han llevado a cabo para cada uno de éstos. A continuación se retomará únicamente el enfoque de la inmunización pasiva debido a que está íntimamente relacionado con este proyecto de tesis.

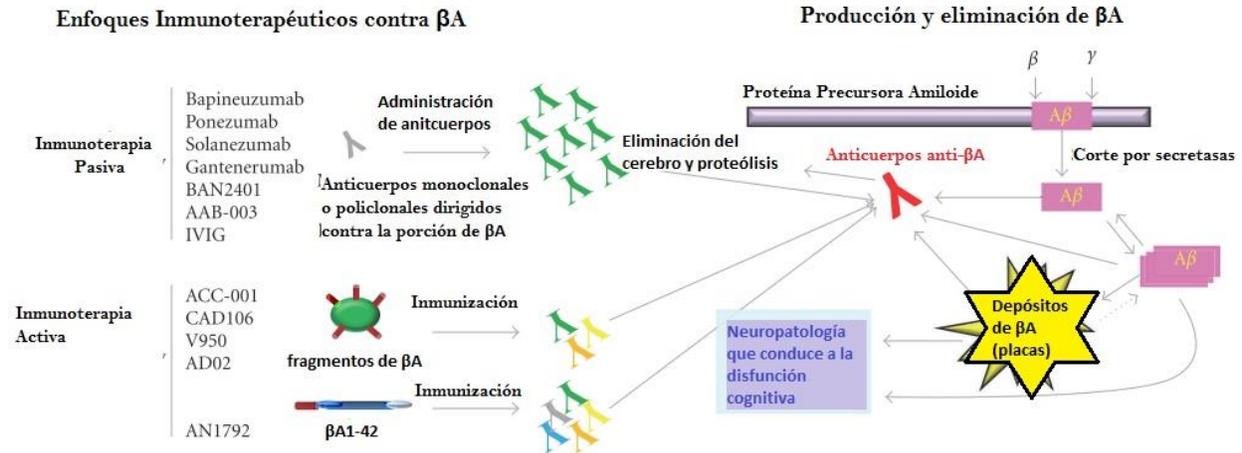


Figura 12. Inmunoterapia Pasiva e Inmunoterapia Activa para la EA. La inmunoterapia pasiva consiste en la administración de anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos específicos contra β A, dichos anticuerpos pueden ayudar a la remoción de los agregados amiloides y/o inhibir la formación de nuevos agregados. Mientras que la inmunoterapia activa involucra la administración del péptido de longitud completa o fragmentos del péptido acoplados a proteínas acarreadoras, los cuales pueden generar una respuesta inmunológica llevando a la generación de anticuerpos contra β A. En la imagen se muestran algunos de los compuestos inmunoterapéuticos, los cuales se encuentran en ensayos clínicos (clinicaltrials.gov). Tomado de Lobello, Ryan, Liu, Rippon, & Black, 2012.

Inmunoterapia Pasiva

La inmunoterapia pasiva para la EA requiere la administración continua de anticuerpos humanos anti- β A. Se conocen varios métodos para obtener anticuerpos humanos anti- β A. Un método consiste en la humanización de anticuerpos anti- β A murinos mediante la sustitución de una parte de la secuencia de la inmunoglobulina murina por la secuencia de la Ig humana usando tecnología de DNA recombinante (Solomon, 2008). También existen métodos alternativos como la generación de anticuerpos humanos monoclonales anti- β A *in vitro* por técnicas de “despliegue de fago” (phage display) (McCafferty, 1990), o por inmunización de animales transgénicos que tienen el loci de sus inmunoglobulinas remplazado por genes humanos (Kuroiwa, 2002).

En comparación con la inmunización activa, la inmunización pasiva es la más difícil para los pacientes, debido a que se requiere que frecuentemente sean administrados los anticuerpos anti- β A para mantener los niveles de éstos en estado estacionario. Es importante saber que los anticuerpos son capaces de entrar al sistema nervioso central, aunque el acceso es limitado: solo el 0.1% al 0.5% de una dosis intravenosa se ha demostrado que pasa a través de la barrera Hematoencefálica (BHE) al cerebro (Banks,

2001). Otra ventaja de la inmunización pasiva es que no desencadena la respuesta inmune robusta pro-inflamatoria ya que los anticuerpos anti-A β se inyectan directamente es por esto que puede ser una estrategia relativamente más segura para revertir los efectos de la EA porque (Fu, et al., 2010).

Aunque se ha observado la presencia de microhemorragias con algunos anticuerpos monoclonales los cuales producen un aumento en la deposición de A β vascular (Pfeifer et al., 2002; Racke et al., 2005; Wilcock, et al., 2004). Aún 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). Este hecho es de particular atención puesto que el 83% de los pacientes con EA tienen depósitos de A β en los vasos sanguíneos (Town, 2009).

Mecanismos de acción de la inmunoterapia

Los mecanismos de inmunoterapia para la EA aún no se comprenden con claridad. Sin embargo hay cuatro hipótesis, que se describen gráficamente en la *Figura 13*, las cuales no son mutuamente excluyentes y se abordan a continuación:

1. Fagocitosis mediada por Microglía

Fue sugerida por Schenk y cols., 1999 en la descripción original de la vacunación con β A. Los autores sugerían que la fagocitosis por el receptor-Fc de la microglía podría disminuir las placas de β A existentes. En este escenario, una pequeña proporción del anticuerpo administrado periféricamente (0.1%) alcanza el CNS, se une a los depósitos de amiloide y activa la microglía endógena para fagocitar el complejo anticuerpo- β A como se muestra en la *Figura 13-a*. Este mecanismo requiere que los anticuerpos alcancen los depósitos en el parénquima cerebral (Citron, 2010).

2. Disgregación catalítica

La disgregación catalítica sugiere que la interacción entre el anticuerpo y el depósito amiloide es más fuerte que la interacción entre monómeros, causando que los agregados de β A se disuelvan y formen monómeros del péptido β A (*Figura 13-b*). Hay estudios donde los fragmentos de $F(ab')_2$ se aplicaron directamente en el cerebro (Bacskai et al., 2002; Wilcock, et al., 2004) reduciendo la carga de β A indicando un mecanismo de eliminación que no está mediado por Fc, sino posiblemente a través de una interacción directa con los depósitos β A (Wilcock y Colton, 2008).

3. Eliminación periférica

Este mecanismo sugiere que el anticuerpo captura el β A en la sangre y produce un flujo neto de β A del cerebro hacia la periferia, el cual, después de un periodo de tiempo, conduciría a la disminución de la carga amiloide del parénquima (Wilcock y Colton, 2008) (*Figura 13-c*). En ese estudio se encontró que el anticuerpo monoclonal 266 (Dodart et al., 2002) dirigido hacia la región central del péptido β A, que a concentraciones picomolares muestra afinidad por el β A soluble y no se une a placas, es capaz de reducir los niveles de amiloide después de administrarse vía intravenosa sin necesidad de que el anticuerpo entre al cerebro.

4. Bloqueo de oligómeros tóxicos

Este mecanismo propone que se puede observar un efecto benéfico cuando da la eliminación o el bloqueo de oligómeros tóxicos de β A (ver *Figura 13-d*). Varios estudios en modelos de ratones transgénicos han observado efectos beneficiosos en el rendimiento cognitivo (Dodart et al., 2002) que eran mucho más pronunciadas que la reducción de la carga amiloide tras la administración de anticuerpos.

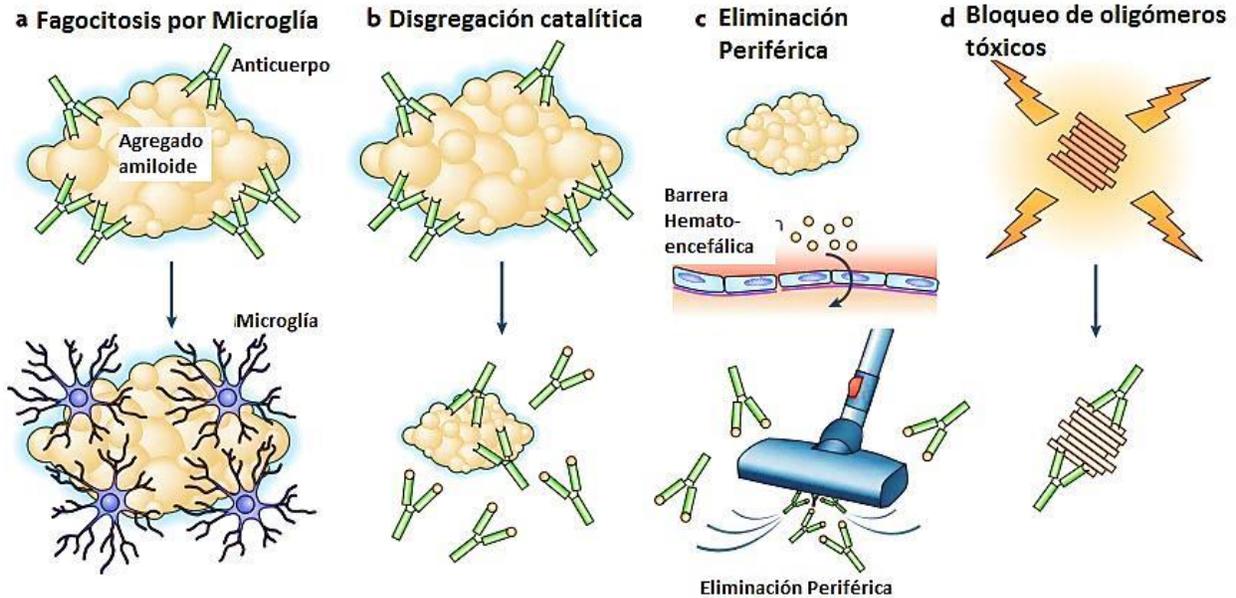


Figura 13. Mecanismos de acción propuestos para la inmunoterapia en la reducción del β A. En esta figura se muestran cuatro hipótesis **a:** *Activación de la microglía*. En este caso, los agregados del péptido A β (mostrados en blanco) son opsonizados por los anticuerpos (mostrados en verde) los cuales entran al cerebro desde el torrente sanguíneo. La microglía reconoce el A β opsonizado y fagocita el complejo anticuerpo-A β vía receptor Fc γ ; **b:** *Disgregación Catalítica*. En este caso, los anticuerpos se unen a los agregados de A β . Esto resulta en la disolución de los agregados amiloide y la formación de monómero de A β ; **c:** *Eliminación Periférica*. En este caso, los anticuerpos circulantes en el torrente sanguíneo se unen al A β soluble monomérico circulante. El secuestro del A β circulante produce un cambio en la concentración del gradiente del A β entre el cerebro y la sangre causando la salida del A β fuera del cerebro; **d:** *Bloqueo de Oligómeros*. Los anticuerpos se unen rápidamente a especies de A β oligoméricas, bloqueando sus efectos tóxicos sin un impacto en la carga amiloide. Tomado y modificado de Citron, 2010.

Modelos Animales para la EA

Como se mencionó anteriormente el desarrollo de los modelos animales fue de gran importancia para la EA ya que permitió el descubrimiento de mecanismos involucrados en esta enfermedad. Se puede encontrar que los modelos animales para la EA varían desde *Caenorhabditis elegans* hasta primates no humanos de edad avanzada, pero los modelos roedores son los más utilizados (Shineman et al., 2011). En la investigación actual en el campo de la EA, los modelos de ratón transgénico están siendo usados para caracterizar las consecuencias fisiológicas y de comportamiento de la neuropatología de la EA con el fin de investigar la pregunta fundamental de las causas anatómicas subyacentes de la demencia así como desarrollar estrategias terapéuticas o preventivas (Games et al., 1995).

Es importante recordar que la validez de un modelo de ratón de una enfermedad está estrechamente vinculada a la capacidad del animal para reproducir algunas manifestaciones de ella (Buccafusco, 2009), aunque ningún modelo murino recapitula completamente el espectro neuropatológico entero de la EA (Wong, Cai, Borchelt, & Price, 2002). Es de vital importancia mencionar el modelo de ratón 3xTg-AD, modelo con el cual se centra este proyecto y que es ineludible hablar de él. Oddo S. y colaboradores en el 2003 desarrollaron el modelo de ratón 3xTg-AD (con el que se trabaja en el laboratorio), que combina ambas patologías, la amiloide y la de la proteína tau, a comparación de otros modelos transgénicos que solo expresan la patología amiloide. Este modelo de ratón contiene tres transgenes: $PS1_{M146V}$, $hAPP_{Sw}$ y tau_{P301L} . El gen $PS1$ forma parte del complejo de la enzima γ -secretasa la cual realiza el corte proteolítico de la APP en la región transmembranal, mientras que la presencia del gen de la $hAPP_{Sw}$ con la mutación Swedish resulta en formación de βA y agregados amiloides y la presencia del gen tau_{P301L} causa la formación de las marañas neurofibrilares. En los cerebros de estos ratones, se observan agregados amiloides intracelulares (4-6 meses de edad) y posteriormente agregados extracelulares en la corteza cerebral y en el hipocampo (~12 meses de edad), a la par que se empiezan a desarrollar los NFT's en el hipocampo (~12-18 meses de edad). El ratón 3xTg-AD exhibe déficit en la plasticidad sináptica precediendo a la formación de placas amiloides y marañas intracelulares (Oddo et al., 2003). Se ha observado la reducción de placas amiloides y marañas celulares en respuesta a un tratamiento de inmunoterapia con anticuerpos contra βA (Oddo et al., 2003).

Antecedentes

Como se había abordado más adelante la vacuna AN1792 fue el primer ensayo clínico en humanos hasta que se interrumpieron debido a la ocurrencia de meningoencefalitis, este ensayo abrió el camino para los ensayos clínicos de inmunoterapia activa actualmente en curso. En un estudio de muestras de los sueros de pacientes inmunizados con AN1792 (M. Lee et al., 2005) establecieron que la respuesta de los anticuerpos predominante en estos pacientes estaba dirigida contra la región N-terminal de del β A, específicamente, contra los residuos β A₁₋₈. Posteriormente, esta región fue el blanco en los diferentes protocolos de inmunoterapia. Por ejemplo, Vanutide cridificar (ACC-001) es un conjugado de múltiples copias del péptido β A₁₋₇ ligadas a una variante no tóxica de la toxina diftérica. Los datos preclínicos indican que el Vanutide cridificar (Elan Corporation Inc.) genera anticuerpos anti- β A sin inducir una respuesta de células T dirigida hacia β A, y que revierte el deterioro cognitivo en modelos murinos de la EA (Hagen et al., 2011). Vanitude cridificar se encuentra actualmente en la fase 2 de los ensayos clínicos en pacientes con la EA de leve a moderada y EA temprana (<http://www.clinicaltrials.gov/>). Otra vacuna que también contiene epítipo de células-B de β A al igual que ACC-001 es V-950 desarrollado por Merk Inc., la cual se encuentra en estudios clínicos. Otra vacuna que cobró atención fue CAD-106 elaborada por Novartis Inc., la cual consiste en el péptido β A₁₋₆ y la partícula parecida a un virus Q β , conjugados estos dos inducen anticuerpos anti- β A y reducen la acumulación de amiloide sin estimular las células T autoreactivas y sin causar microhemorragias. Sin embargo, la fase I de los estudios clínicos indicó que no hay diferencias notables entre los pacientes inmunizados con CAD-106 y los pacientes inmunizados con el placebo (Winblad et al., 2012).

Asimismo los estudios de inmunoterapia pasiva para la EA se están investigando en paralelo con las terapias activas descritas anteriormente. Hasta la fecha, la mayor cantidad de datos publicados sobre la inmunoterapia pasiva se refieren a bapineuzumab, el cual fue co-desarrollado por Pfizer Inc. y Janssen Alzheimer Immunotherapy Reserch & Development, LLC. Bapineuzumab y Solanezumab (Eli Lilly), fueron los primeros anticuerpos anti- β A en llegar a la fase III de los estudios clínicos. El primero es anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 anti- región N-terminal del péptido β A₁₋₅, basado en el anticuerpo murino 3D6. Mientras

que el segundo es un anticuerpo monoclonal humanizado basado en el anticuerpo murino 266 dirigido contra la región central del péptido βA_{13-28} (Wang et al., 2012). Los estudios de fase II mostraron que la inmunización con bapineuzumab reduce significativamente los niveles de βA en el cerebro, tau-hiperfosforilada en el LCR (líquido cefalorraquídeo), y los niveles de tau total comparados con los pacientes tratados con el placebo (Blennow et al., 2010; Laskowitz y Kolls, 2010; Rabinovici y Jagust, 2009). No obstante, los pacientes administrados con bapineuzumab no mostraron un beneficio cognitivo significativo. Altas dosis de bapineuzumab mostraron efectos adversos. Cerca del 10% de los pacientes tratados con el bapineuzumab desarrollaron edema cerebral vasogénico y microhemorragias (Laskowitz y Kolls, 2010). A pesar de esto, un ensayo clínico de fase III está actualmente en curso e incluye 4 pruebas: 2 estudios en portadores del gen ApoE4 (clinicaltrials.gov identifier NCT00575055; NCT00676143) y dos ensayos en no-portadores de ApoE4 (NCT00574132; NCT00667810). En contraste con bapineuzumab que se une a la placa amiloide con mayor afinidad, solanezumab se une selectivamente al βA soluble y tiene de poca a ninguna afinidad por la forma fibrilar de βA . Los resultados indican que al igual que m266, solanezumab puede promover la eliminación de βA por el mecanismo de eliminación periférica. No se observó una mejora en el deterioro cognitivo con la administración del solanezumab en las fase II del ensayo clínico. En el ensayo clínico de fase II con 52 pacientes reclutados, mostró que no hay evidencia de meningoencefalitis, microhemorragias, o edema vasogénico (Samadi & Sultzer, 2011; Siemers et al., 2008). Tres estudios de fase III—2 evaluando los efectos de solanezumab en la progresión de la enfermedad, y un estudio de extensión de control de seguridad para los participantes en esos estudios— están en curso (NCT00904683, NCT00905372, NCT01127633). Diversos anticuerpos contra βA están bajo estudios clínicos. Tales como Ponezumab dirigido contra la región de βA_{33-40} , el cual se encuentra en ensayo clínico de fase II (NCT00722046 and NCT00945672); MABT-5202A, que se une a monómeros de βA , oligómeros y fibrillas con igual afinidad; GSK-93376; y finalmente gantenerumab, el cual actualmente finalizó la fase II de los estudios clínicos y se encuentra reclutando participantes para el estudio de fase III (NCT01224106).

Como se puede notar los ensayos clínicos para la EA están basados en el péptido βA_{1-42} que junto con βA_{1-40} conforman las principales especies detectadas en el cerebro

humano. Sin embargo, se ha reportado que una proporción significativa de β A en la EA también se compone de especies truncadas modificadas en el extremo N-terminal conocidas como amino-truncadas (Güntert et al., 2006; Hasegawa et al., 1992; Saido et al., 1995; Schilling, Appl, et al., 2008). Entre todas las especies amino-truncadas los péptidos β A piroglutamados-modificados (β A[pE]) han demostrado ser los componentes más predominantes en los cerebros de pacientes con la EA (Gunn, et al., 2010; Güntert et al., 2006; Hosoda et al., 1998; Jawhar, et al., 2011; Sullivan et al., 2011). También estudios ulteriores al descubrimiento de los péptidos amino-truncados estimaron que el β A3-42[pE] y β A11-42[pE] representan cerca de la mitad del total de β A presente en cerebros de pacientes con EA (He y Barrow, 1999). Esta ciclación del péptido β A protege a este de la degradación por la mayoría de las aminopeptidasas confiriéndole hidrofobicidad y dejando que se acumule y se agregue. Estudios sobre las propiedades bioquímicas de los péptidos β A piroglutamados (β A[pE]) demostraron que forman una estructura de β -plegada con mayor facilidad que los péptidos β A de longitud completa, sugiriendo que éstas especies actúen posiblemente como semillas de agregación para la formación de agregados amiloides (He y Barrow, 1999).

También se ha demostrado que la inhibición de la glutaminil ciclasa (QC), una enzima responsable de la formación del péptido piroglutamado (Cynis et al., 2006), reduce la cantidad de placas en dos diferentes modelos de ratones transgénicos de la EA acompañado por el alivio de la inflamación (Wirhth et al., 2010) y una mejora significativa de la memoria (Schilling, Zeitschel, et al., 2008). Adicionalmente, el grupo de investigadores al que pertenezco, desarrollaron anticuerpos policlonales en conejos anti-A β 11-42(pE) e identificaron dos epítomos de células B. Uno en la región N-terminal que corresponde a los amino ácidos 11-15 y otro en la región central que corresponde a los aminoácidos 20-24, (Perez-Garmendia, 2010). También demostraron que los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] son capaces de neutralizar el efecto tóxico de los oligómeros del péptido β A-11-42[pE] en células de neuroblastoma humano diferenciadas de (IMR-32). Se propone que las especies aminotruncadas modificadas no solo tienen un papel importante en el proceso amiloidogénico, sino que también tienen un efecto tóxico sobre las células neuronales (Perez-Garmendia et al., 2010). Todos estos trabajos llevaron a la conclusión de que los péptidos de β A-piroglutamados representan un blanco terapéutico importante.

Planteamiento del Problema

Avances recientes en la comprensión de la patogénesis de la EA han conducido al desarrollo de numerosos compuestos que podrían modificar el progreso de la enfermedad. El péptido β A representa un blanco molecular importante para la intervención en la EA. Diferentes tipos de inmunoterapia contra el péptido β A para la EA se encuentran bajo investigación, tales como: la inmunización directa con el péptido β A42 o con sus fragmentos sintéticos conjugados a una proteína acarreadora (inmunización activa) y la administración de anticuerpo policlonales, monoclonales o fragmentos de anticuerpos dirigidos contra el péptido β A (inmunización pasiva). Los estudios preclínicos demostraron que la inmunoterapia puede proporcionar protección y la reversión de la patología de la EA en modelos animales. Sin embargo, también se han descrito varios adversos.

Se ha sugerido que con la inmunoterapia pasiva es posible disminuir la carga amiloide en ratones transgénicos para la EA (Bard et al., 2000; Morgan et al., 2000; Lombardo et al., 2003). Junto con la eliminación de los agregados amiloides, la inmunoterapia reestablece la arquitectura de las neuritas, incrementa la densidad de sinapsis y mejora el comportamiento (Dodart et al., 2002; Kotilinek et al., 2002; Wilcock et al., 2006; Thakker et al., 2009).

En este proyecto se pretende evaluar la capacidad protectora mediante la inmunización pasiva de los anticuerpos policlonales de conejo anti- β A11-42[pE] en modelos murinos de la EA. Éste anticuerpo policlonal anti- β A11-42[pE] reconoce la parte central del péptido A β , es por esto que es capaz de reconocer el péptido de longitud completa β A-1-42, así como también los péptidos amino-truncados β A-3-42[pE] y β A-11-42[pE] (Perez-Garmendia et al., 2010). Por esta razón se evaluará si la administración de estos anticuerpos puede reducir la presencia de agregados amiloides formados por el péptido de longitud completa β A-1-42 en el modelo de ratón 3xTg-AD. Adicionalmente, se evaluará la presencia de microhemorragias para determinar si los anticuerpos tienen efectos secundarios.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto de tesis es la evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti- β A11-42[pE] por inmunización pasiva en el modelo de ratón transgénico de la EA (3xTg-AD).

Objetivos Particulares

- ◆ Determinar cuántos días permanecen en circulación los anticuerpos a partir de una sola administración vía intravenosa.
- ◆ Determinar por métodos inmunohistoquímicos y bioquímicos la posible disminución de la carga amiloide después de administración de los anticuerpos anti- β A11-42[pE].
- ◆ Evaluar la presencia de microhemorragias para determinar si los anticuerpos anti- β A -11-42[pE] tiene efectos secundarios.

Material y Métodos

Animales Experimentales

En este proyecto se usaron ratones de 6 y de 8 meses de edad de la cepa C57BL/6, y ratones transgénicos 3xTg-AD de 6 a 11 meses de edad (cepa B6; 129-Psen1^{tm1Mpm}Tg (APPSwe tauP301L) 1Lfa/J, The Jackson Laboratory, USA). Los ratones se mantuvieron en las instalaciones del Bioterio “A” del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) en condiciones asépticas con suministro de agua y alimento *ad libitum*.

Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-A β -11-42 [pE] mediante ELISA

La evaluación de la reactividad del anticuerpo purificado anti- β A-11-42[pE] se llevó a cabo por **ELISA** (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando placas de microtitulación de 96 pozos (MaxiSorp, Thermo, NY, USA). La placa se sensibilizó con un volumen de 100 μ L/pozo de los péptidos sintéticos A β -1-42, A β -3-42[pE], A β -11-42[pE] y un péptido no relacionado PAF3 a una concentración de 2 μ g/mL en buffer de carbonatos (pH 9.6) por toda la noche a 4 °C. Todos los lavados se realizaron con un ciclo automatizado de 4 lavados de 400 μ L/pozo con PBS 1X + Tween-20 al 0.2% (PBS-Tween) (Lavador WellWash4 Thermo, NY, USA). Se bloqueó con 200 μ L/pozo de PBS 1X + leche descremada al 2% durante una hora a 37 °C. Después de lavar, se incubó por una hora a 37 °C con 100 μ L/pozo del anticuerpo policlonal anti- β A-11-42[pE] purificado (40ug/mL), un anticuerpo purificado como control negativo (40ug/mL), suero de conejo anti- β A-3-42[pE] (dilución 1:500) y suero de conejo anti- β A-1-42 (dilución 1:500), todos en PBS/Leche al 2%/ Tritón X-100 al 0.2%. Después de otro ciclo de lavado con PBS-Tween, se agregó (100 μ L/pozo) del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de Conejo conjugado a peroxidasa (Invitrogen, OR, USA), dilución 1:2500 en PBS/Leche al 2%/Tritón al 0.2%. Se incubó 1 hora a 37 °C, se lavó y se agregó 100 μ L/pozo de 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt (Invitrogen, OR, USA). Se realizó la lectura de las densidades ópticas a 405nm usando un fotómetro de microplacas (Microplate Reader, Dynex Tech, VA, USA). Se procedió a graficar los resultados en el programa GraphPad Prism 6.

Determinación de la permanencia de anticuerpos anti-A β -11-42 [pE] en circulación mediante ELISA

Con el objetivo de determinar cuántos días permanecen los anticuerpos anti- β A11-42(pE) en sangre, se inmunizaron tres ratones de 6 meses de edad de la cepa C57BL/6 con 100 μ g del anticuerpo ya mencionado en una dosis única vía intravenosa. Previo a la inmunización se obtuvo el suero pre-inmune, sangrando a los ratones por la vena submandibular con ayuda de una aguja estéril. Los sueros se obtuvieron por dos ciclos de centrifugación (1500 rpm por 10 minutos), se etiquetaron y almacenaron en microtubos de 0.6 mL a 4°C. Posteriormente se colectaron muestras de suero a 1, 3, 7, 10, 14 días de ser administrado el anticuerpo. Los ratones fueron sacrificados según las especificaciones bioéticas del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

Los sueros se analizaron por **ELISA** utilizando placas de microtitulación 96 pozos (MaxiSorp). La placa se sensibilizó, en un volumen de 100 μ L/pozo, con 1 μ g/mL de un anticuerpo que reconoce las inmunoglobulinas de conejo (cabra Anti- IgG (H + L) de conejo) en buffer de carbonatos (pH 9.6) por toda la noche a 4°C. Todos los lavados y el bloqueo se realizaron como describimos anteriormente. Los muestras de sueros de los tres ratones obtenidos en los diferentes tiempos (0, 1, 3, 7,10 y 14 días), se agregaron en una dilución 1:100 por duplicado en PBS/Leche al 2%/ Tritón X-100 al 0.2% y se incubó la placa por una hora a 37°C. Después de otro ciclo de lavado con PBS/Tween-20 al 0.2%, se agregó anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en PBS/Leche al 2%/Tritón al 0.2% (100 μ L/pozo). Se incubó una hora a 37°C, se realizaron los lavados y se adicionaron 100 μ L/pozo del cromógeno ABTS (Invitrogen, OR, USA). Después de 15 minutos de incubación en oscuridad a 37°C, se realizó la lectura de las densidades ópticas a 405nm usando un lector de microplacas. Se procedió a graficar los resultados en el programa GraphPad Prism 6.

Protocolo de Inmunización de ratones 3xTg-AD

La evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] se realizó considerando dos esquemas de tratamiento: a) terapéutico y b) profiláctico. Cada esquema se llevó a cabo por inmunización vía intravenosa, en dos grupos de ratones 3xTg-AD, con el anticuerpo de conejo purificado anti- β A-11-42[pE] y un anticuerpo control de conejo. Los grupos Terapéutico (T) y Profiláctico (P) de ratones 3xTg-AD se inmunizaron cada 10 días

con 50µg vía intravenosa durante ≈5 meses para el grupo T y ≈6 meses para el grupo P. Los ratones del grupo P eran de 6-7 meses de edad y los ratones del grupo T de 10-11 meses de edad al momento de iniciar los experimentos.

Una vez terminados los tratamientos para cada grupo, los ratones se sacrificaron, se extrajeron los cerebros y se separaron los dos hemisferios. Un hemisferio se destinó para hacer extracción de proteínas y el otro para inmunohistoquímica (ver Figura 14). La mitad de los cerebros destinada para inmunohistoquímica se fijó en paraformaldehído al 4% toda la noche a 4°C, posteriormente se deshidrataron con gradientes de sacarosa (Sigma-Aldrich, USA) al 10%, 20% y 30% por 24 horas cada concentración, en seguida se introdujeron en una solución de Tissue-Tek (Sakura Finetek CA, USA) y sacarosa al 30% en proporción 1:1 por 24 horas a 4°C. Por último se hicieron cortes coronales de los cerebros en secciones de 40µm (desde aproximadamente 1.3mm de Bregma) usando un criostato (Kedee modelo KD-2850, Singapur) y se colectaron en flotación en un buffer de mantenimiento (30% glicerol, 30% etilenglicol en un buffer de fosfato 0.1M pH 8). Los cortes se almacenaron a -20° C hasta su uso.

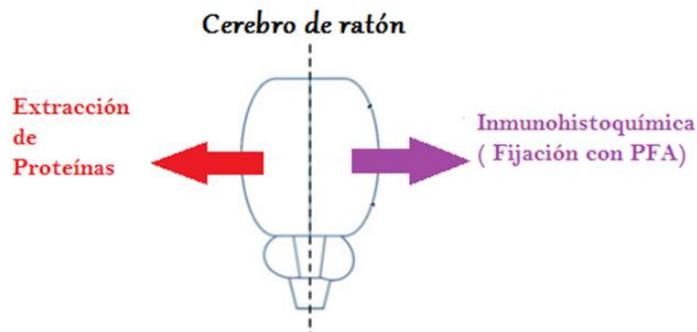


Figura 14. Procesamiento de los cerebros de ratón. Una vez hecha la extracción de los cerebros de los ratones se corta con una navaja de forma que queden divididos los dos hemisferios derecho e izquierdo. Un hemisferio se destina al análisis inmunohistoquímico y otro al bioquímico.

Análisis Inmunohistoquímico de tejidos de cerebro de ratones 3xTg-AD

Los cortes de tejidos se lavaron 5 veces con TBS1X y una vez con H₂OmQ a temperatura ambiente (RT). Se trataron los tejidos con buffer de citratos (10mM ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6.0) durante 1 hora a 70°C para la recuperación de epítomos y pasado este

tiempo se lavaron dos veces con TBS1X. Se permeabilizó con TBS1X-Tritón X-100 al 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente (TA), se bloqueó por 30 minutos con una solución de albúmina libre de IgG's (BSA) al 2% en TBS1X-Tritón X-100 al 0.1%. Posteriormente se agregaron como anticuerpos primarios el anticuerpo monoclonal de ratón BAM-10 (Sigma, MO, USA) y un control de isotipo IgG1 ratón anti IgA humano-, diluido 1:1000 en TBS1x-suero de cabra 5% (Sigma, MO, USA) a 4 °C toda la noche). Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lavados secuenciales con TBS1x, TBS1x-Tritón al 0.1% y TBS1x-Tritón 0.1%, BSA 2% por 5 minutos a TA cada lavado. Se agregó solución de quenching (3% H₂O₂ + 10% Metanol) durante 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena del tejido, y se lavó con TBS1x dos veces por 5 minutos. Se adicionó un anticuerpo secundario hecho en rata anti IgG1Ratón -Conjugado a HRP en TBS1x-suero de cabra 5%, a una dilución 1:500 durante dos horas a RT. Se realizaron nuevamente lavados secuenciales con TBS1x, TBS1x-Tritón al 0.1% y TBS1x-Tritón 0.1%, BSA 2% por 5 minutos a RT. Se preparó en fresco la solución del sustrato 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), como se describe a continuación: a partir de una solución stock de DAB (Sigma, MO, USA) al 1% se tomaron 40µL los cuales se agregaron a 5mL de PBS1X pH 7.2 y por último se agregaron 250µL de H₂O₂ al 3%. Se agregaron a los tejidos 500µL de solución de sustrato y se paró la reacción con TBS1x-Tritón al 0.1%. Posteriormente se montaron los tejidos en portaobjetos, se dejaron secar en la campana de flujo y se les agregó una gota de hematoxilina (Biocare Medical, CA, USA) por tejido por 15 segundos e inmediatamente se lavó con agua bidestilada. Se dejaron secar nuevamente en la campana de flujo y se agregó una gota de Xilol (J.T. Baker), para cubrir la superficie del tejido, por 5 minutos e inmediatamente se agregó el medio de montaje Permount (Fisher Scientific) y un cubreobjetos. Se observó en el microscopio de campo claro (Olympus IX51, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías (cámara Olympus DP-71, Tokio, Japón) de diferentes campos en aumentos 4X, 10X y 40X.

Análisis por Inmunofluorescencia de cerebros de ratones 3xTg-AD

Los tejidos se lavaron 5 veces con TBS1x a TA y se lavaron 1 vez con H₂O_{mq}. Se trataron los tejidos con Buffer de Citratos (10mM ácido cítrico + 0.05% Tween 20, pH 6.0) durante una hora a 70 °C y pasado este tiempo se lavaron dos veces con TBS1x. El tejido se permeabilizó con TBS1x-Tritón X-100 al 0.1% durante 15 min a RT. Después se bloqueó por 30 minutos con una solución de albúmina libre de IgG's (BSA) al 2% en TBS1x-Tritón X-100 al 0.1%. Se

incubó a 4 °C toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón BAM-10 (Sigma, MO, USA) y el control de isotipo IgG1 ratón anti IgA humana en dilución 1:1000 en TBS1x-Suero de cabra (Sigma, MO, USA) 5%. Al siguiente día, se hicieron lavados secuenciales con TBS1x, TBS1x-Tritón al 0.1% y + TBS1x-Tritón 0.1%, BSA 2% por 5 minutos a RT. Se agregó solución de quenching (3% H₂O₂ + 10% Metanol) durante 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena del tejido, y se lavó con TBS1x dos veces por 5 minutos. Se adicionó el anticuerpo secundario Alexa-488 cabra-anti- IgG1 de ratón (Invitrogen, OR, USA), a una dilución 1:1000 en TBS1X-suero de cabra 5% para todos los tejidos, por dos horas a RT. Se realizaron nuevamente lavados secuenciales con TBS1x, TBS1x-Tritón al 0.1% y TBS1X-Tritón 0.1%, BSA 2% por 5 minutos a RT. Se montaron los tejidos en portaobjetos, se agregó el medio de montaje VECTASHIELD® Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories) y finalmente se colocó un cubreobjetos y se observaron las preparación en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX51, Tokio, Japón).

Análisis histoquímico de microhemorragias en cortes de cerebro por tinción para Hemosiderina

Para esta tinción se utilizaron 10 secciones por tejido de cerebro de ratones: a) 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti-11-42[pE], b) 3XTg-AD inmunizados con el anticuerpo control (anti-adyuvante), c) 3xTg-AD sin tratamiento y d) C57-BL6 sin ningún tratamiento denotado como no-Tg (no transgénicos). Los tejidos se incubaron en una solución de Sulfuro de Amonio, para precipitar fraccionadamente las globulinas, durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron con agua bidestilada hasta remover todo el precipitado de sulfuro de amonio. Se agregó la solución de Ácido Clorhídrico 5% + Ferrocianuro Potásico al 20% por veinte minutos y se hicieron dos lavados con agua bidestilada durante cinco minutos. Se contratiñeron los tejidos con la solución *Nuclear fast red* (Nuclear fast red 0.1g + Al₂ (SO₄)₃ 5g) por 5 minutos y se lavó con agua bidestilada. Se montaron los tejidos en portaobjetos, se dejaron secar en la campana de flujo y se agregó una gota de Xilol (J.T. Baker), e inmediatamente se agregó el medio de montaje *Permount* (Fisher Scientific) junto con un cubreobjetos. Se observaron en el microscopio de campo claro (Olympus IX51, Tokio, Japón) a un aumento de 40X. Las microhemorragias (precipitados azules de hemosiderina) se contaron en toda la superficie del tejido por cada corte. Este proceso se repitió para las

10 secciones de tejido por cada hemisferio de cada ratón. Los resultados se tabularon en Excel®, y con el programa GraphPad Prism® 5.

Resultados

Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-A β -11-42 [pE] mediante ELISA

Previo al protocolo de inmunización, la reactividad del anticuerpo purificado anti- β A11-42 fue evaluada mediante el ensayo de ELISA con los péptidos: β A1-42, β A3-42[pE], β A11-42[pE] y un péptido no relacionado (PAF3). Como control positivo se comparó con la reactividad del suero de conejos inmunizados con el péptido β A1-42 o β A3-42[pE], para cada péptido respectivamente, y como control negativo con el suero de conejo administrado solo con adyuvante.

En la **Figura 15** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA al analizar la reactividad del anticuerpo anti β A11-42[pE]. Se observó que el anticuerpo purificado anti- β A-11-42[pE] reconoce los 3 péptidos β A: 1-42 (de longitud completa), 3-42 [pE] y 11-42 [pE]. El suero de conejo anti β A1-42 reconoció los péptidos β A: 1-42 y 3-42[pE]. Asimismo el suero anti- β A-3-42[pE] reconoce exclusivamente al péptido β A-3-42[pE] como se ha descrito previamente en el laboratorio por Acero et al., 2009. No hay reconocimiento del anticuerpo anti β A-11-42[pE] y el péptido no relacionado, así como también, no hay reconocimiento del anticuerpo purificado de conejo control (administrado solo adyuvante) hacia ninguno de los péptidos ya mencionados.

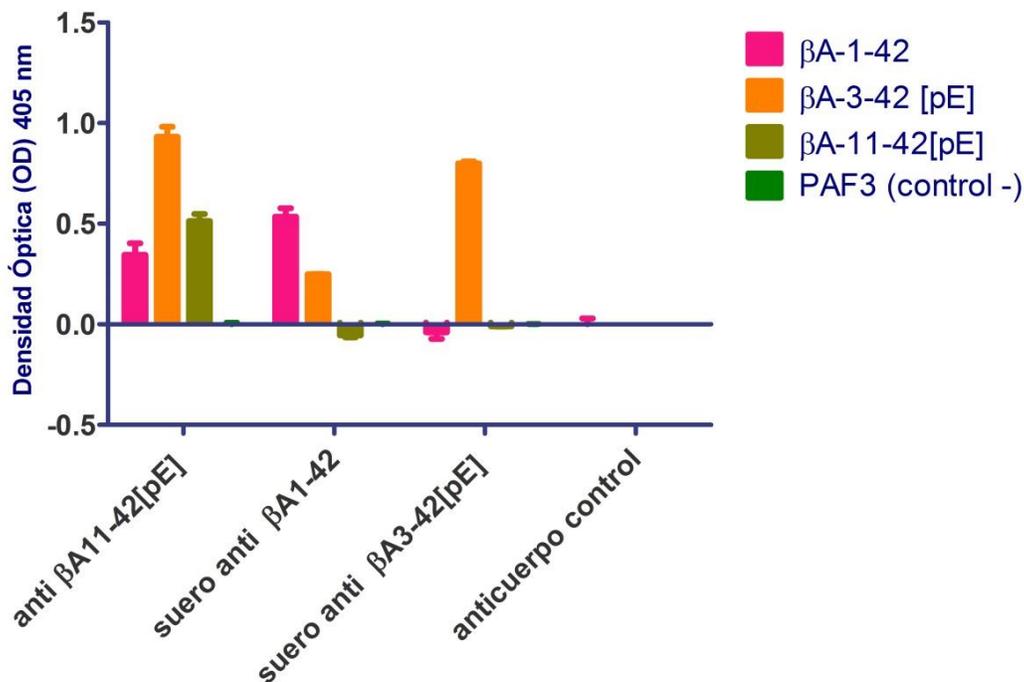


Figura 15. Reactividad cruzada por ensayo de ELISA del anticuerpo anti-βA-11-42[pE]. El anticuerpo fue evaluado con los péptidos βA1-42, βA3-42[pE], βA11-42[pE] y un péptido no relacionado (PAF3). Los sueros de conejo anti βA-1-42 y 3-42[pE] fueron utilizados como control positivo y el purificado anti-adyuvante como control negativo. Se observó que el anticuerpo anti-βA-11-42[pE] reconoce a las tres especies de péptidos βA como se reportó en el laboratorio anteriormente por Perez-Garmendia en el 2010.

Permanencia de anticuerpos en circulación mediante ELISA

Como se describió previamente, se les administró una dosis única (100µg/ml) vía intravenosa del anticuerpo anti-βA11-42 [pE] a tres ratones de la cepa C57BL/6. Se obtuvieron muestras del suero de cada ratón en días preestablecidos durante 14 días.

En la **Figura 16** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de permanencia de los anticuerpos anti-βA-11-42[pE] mediante el ensayo de ELISA. Se observó que en el tiempo cero (previo a la administración de anticuerpos) no hay presencia de inmunoglobulinas de conejo en el flujo sanguíneo de ratones. Transcurridas 24 horas de la administración del anticuerpo anti-βA11-42 [pE], los ratones muestran niveles altos detectables de IgG de conejo, medidos por ELISA, lo que nos indica que los anticuerpos purificados de conejo anti-βA-11-42[pE] permanecen en el torrente sanguíneo de los tres ratones. Transcurridos los días se ve un efecto de decremento en los niveles detectables de inmunoglobulinas de conejo en el flujo sanguíneo de los ratones. Es importante resaltar que

aunque los niveles de anticuerpos en sangre son diferentes para cada ratón, transcurridos los 14 días, la cantidad de anticuerpos circulantes sigue siendo detectable (≤ 0.5). Por lo tanto, en éste experimento podemos concluir que las inmunoglobulinas de conejo permanecen en la sangre transcurridos 14 días después de una sola administración, por lo cual, en los futuros experimentos, el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] puede ser administrado cada 10 días y así tener los niveles de anticuerpos disponibles y detectables.

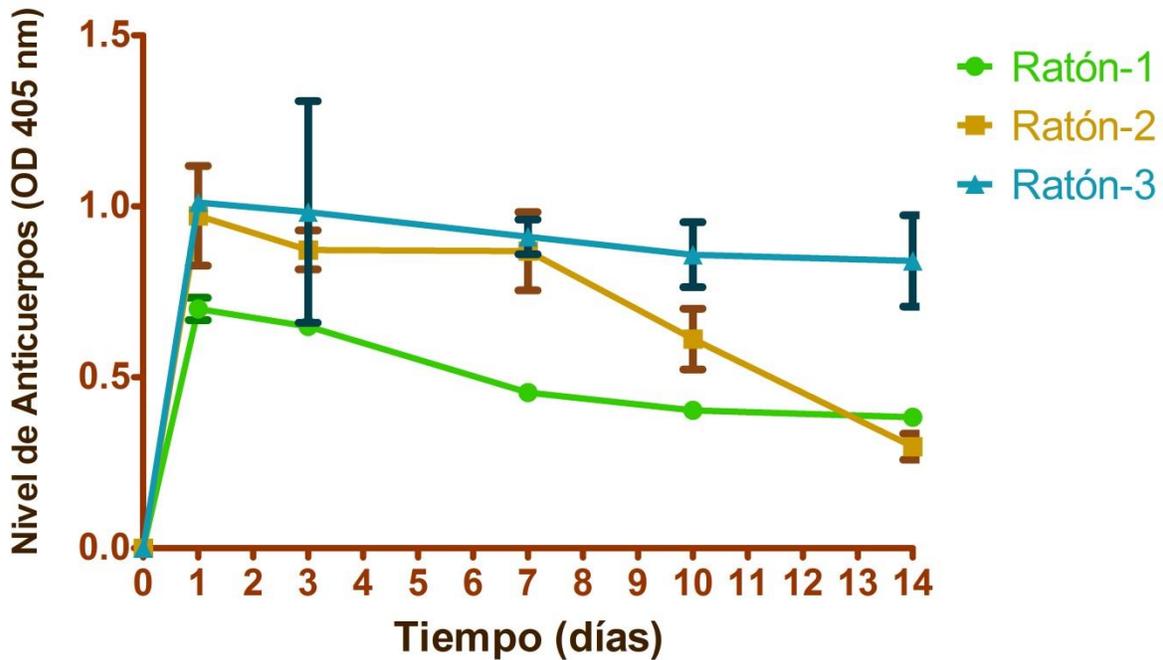


Figura 16. Determinación de la permanencia de anticuerpos anti- β A-11-42[pE] en circulación mediante ELISA. En el tiempo 0 (antes de administración de anticuerpos) no se detecta la presencia de inmunoglobulinas de conejo en sangre de ratones. El efecto de la inmunización es claro, ya que, después de 24 horas de haber sido administrado el anticuerpo, los niveles de inmunoglobulinas de conejo en ratones suben considerablemente respecto al suero pre-inmune. A pesar de que la respuesta de los tres ratones es diferente, se observa que en los tres ratones conforme avanzan los días los niveles de anticuerpos en circulación disminuyen. Por lo tanto, se puede administrar el anticuerpo cada 10 días, ya que a los 10 días los niveles de anticuerpos se mantienen en un nivel detectable y disponible en el torrente sanguíneo de los ratones para que puedan atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a cerebro.

Análisis Inmunohistoquímico de cerebros de ratón 3xTg-AD administrados con anti- β A-11-42[pE]

Con la finalidad de determinar si el anticuerpo anti β A-11-42[pE] es capaz de disminuir la carga del péptido β A después de haber sido administrado vía intravenosa, se realizó un análisis inmunohistoquímico de los cortes de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados.

Para éste análisis inmunohistoquímico se empleó el anticuerpo monoclonal anti β -amiloide BAM10 (Sigma) y como control se utilizó un anticuerpo no relacionado del mismo isotipo.

En la **Figura 17** lo que se observa son los tejidos de cerebros de ratones de cada grupo:

- ▶ Ratón Silvestre (**WT**), como control, en el cual no se observa inmunoreactividad con ninguno de los dos anticuerpos utilizados para el análisis. Este ratón tenía aproximadamente 9 meses de edad (mo) cuando se le sacrificó.
- ▶ Ratón 3xTg-AD sin tratamiento, el cual sirvió como control positivo para comparar con los ratones 3xTg-AD tratados. Éste ratón tenía 14 meses de edad cuando se le sacrificó.
- ▶ El grupo de ratones 3xTg-AD a los que se les administraron los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] o los anticuerpos control como tratamiento terapéutico (**Grupo T**). Estos ratones tenían al inicio del experimento entre 10 y 11 meses de edad, después del cuadro de inmunizaciones alcanzaron \approx 14 meses de edad.
- ▶ El grupo de ratones 3xTg-AD a los que se les administro el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] o el anticuerpo control como tratamiento profiláctico (**Grupo P**). Estos ratones tenían al inicio del experimento entre 6 y 7 meses de edad, después del cuadro de inmunizaciones alcanzaron una edad de \approx 14 meses de edad.

Las **Figuras 17, 17.1, 17.2, 17.3 y 18** revelan los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico. Se observa que en ratones 3xTg-AD de \approx 14 meses de edad, solo están presentes agregados intracelulares de β A (no se observaron placas extracelulares salvo en dos ratones del grupo **T** los cuales están señalados con flechas en la **Figura 18**).

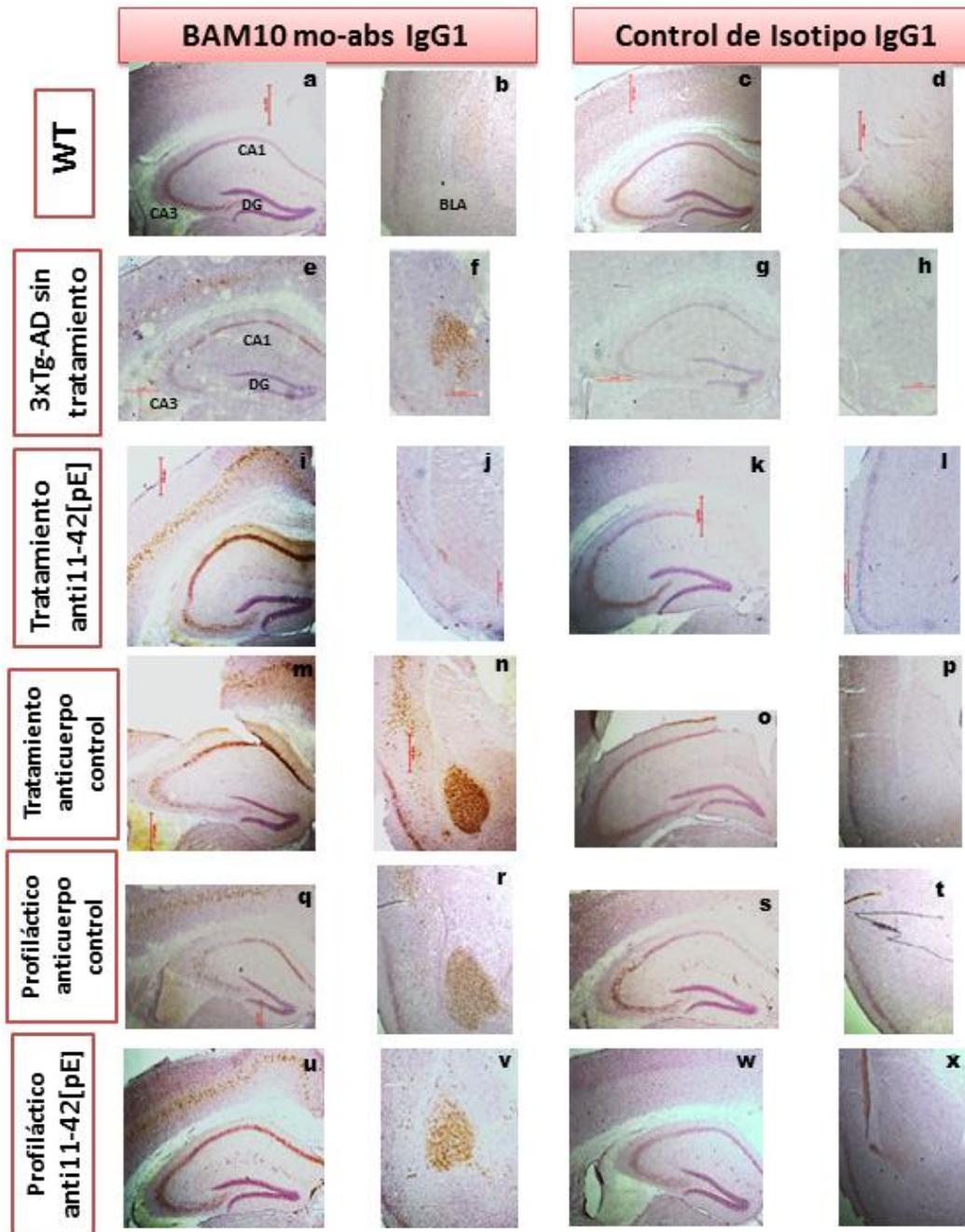


Figura 17. Análisis Inmunohistoquímico de Ratones 3xTg-AD inmunizados con anti- β A-11-42[pE]. En esta figura se muestra los resultados de manera general donde cada fila representa: los dos esquemas de inmunización con sus respectivos controles, y los dos controles negativos el ratón 3xTg-AD sin tratamiento y el WT sin tratamiento. De [a-d] se muestra la región del hipocampo (CA1, CA3 y DG) y la región del núcleo basolateral de la amígdala (BLA) del ratón WT donde [a y b] representan el análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo anti- β A BAM10 (señal café) y [c y d] el análisis con el anticuerpo control. Estas imágenes fueron tomadas a un aumento de 4X. Los agregados intracelulares de β A se observan en café.

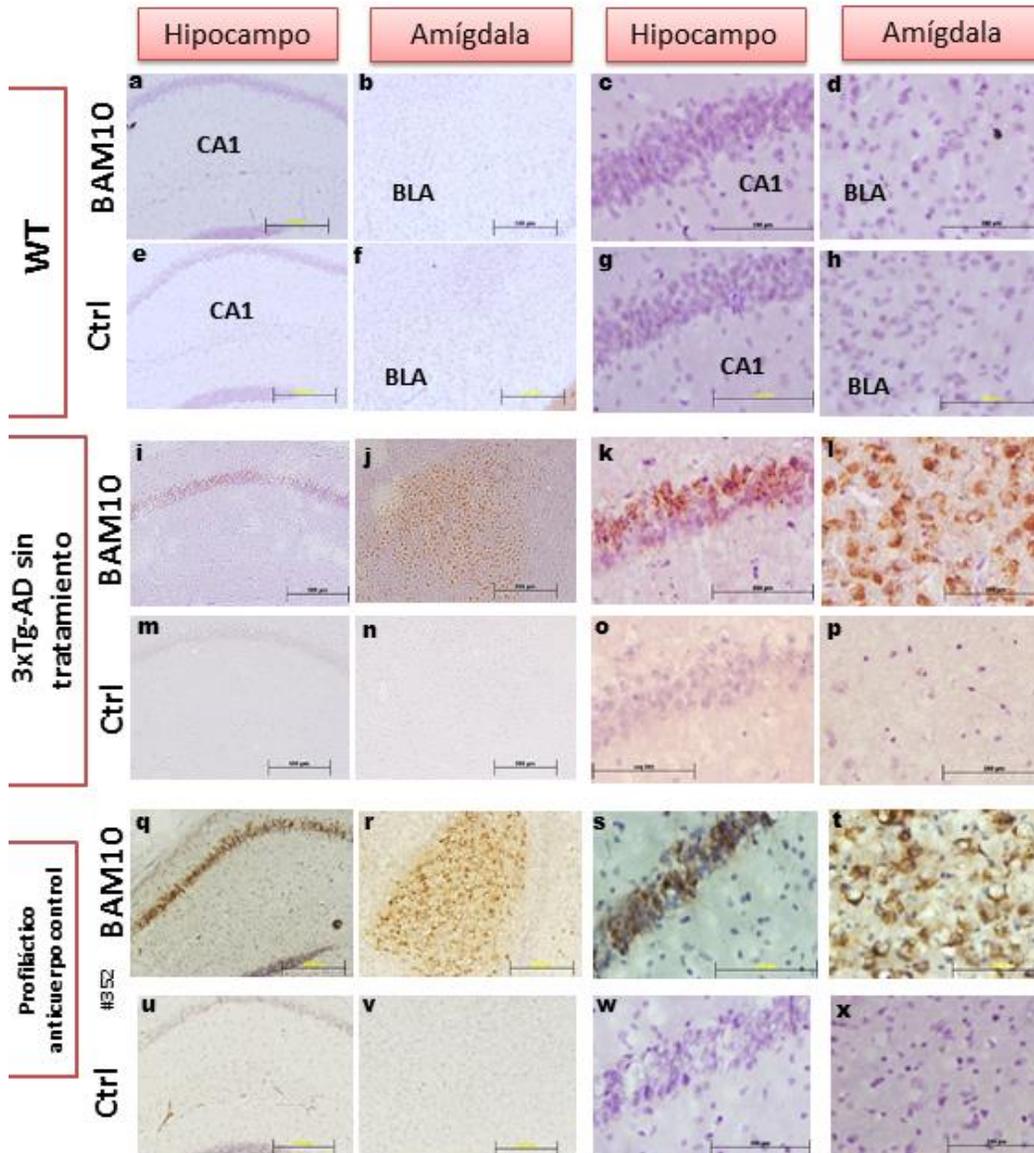


Figura 17.1 Análisis Inmunohistoquímico de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con anti- β A-11-42[ρ E]. Los agregados intracelulares de β A se observan en café mientras que en morado/azul se observan los núcleos celulares de las neuronas. En esta figura se muestran los mismos resultados que en la *Figura 17* pero vista a un mayor aumento, Barra de escala: 500 μ m (lado izquierdo) y 200 μ m (lado derecho). En la parte superior de la figura se muestra la región del cerebro a la que se refiere la imagen. En los recuadros de la izquierda se muestra el tratamiento que se le administró a cada ratón junto con el número de identificación de éstos y el anticuerpo que se usó para el análisis: BAM10 (señal café) o Ctrl (control negativo). En estas paneles podemos observar que el ratón 3xTg-Ad sin tratamiento [i-l] presenta la misma cantidad de agregados intracelulares que el ratón que recibió el esquema profiláctico con el anticuerpo control [q-t]. El ratón WT [a-h] no muestra inmunoreactividad con el anticuerpo BAM10 o el Ctrl.

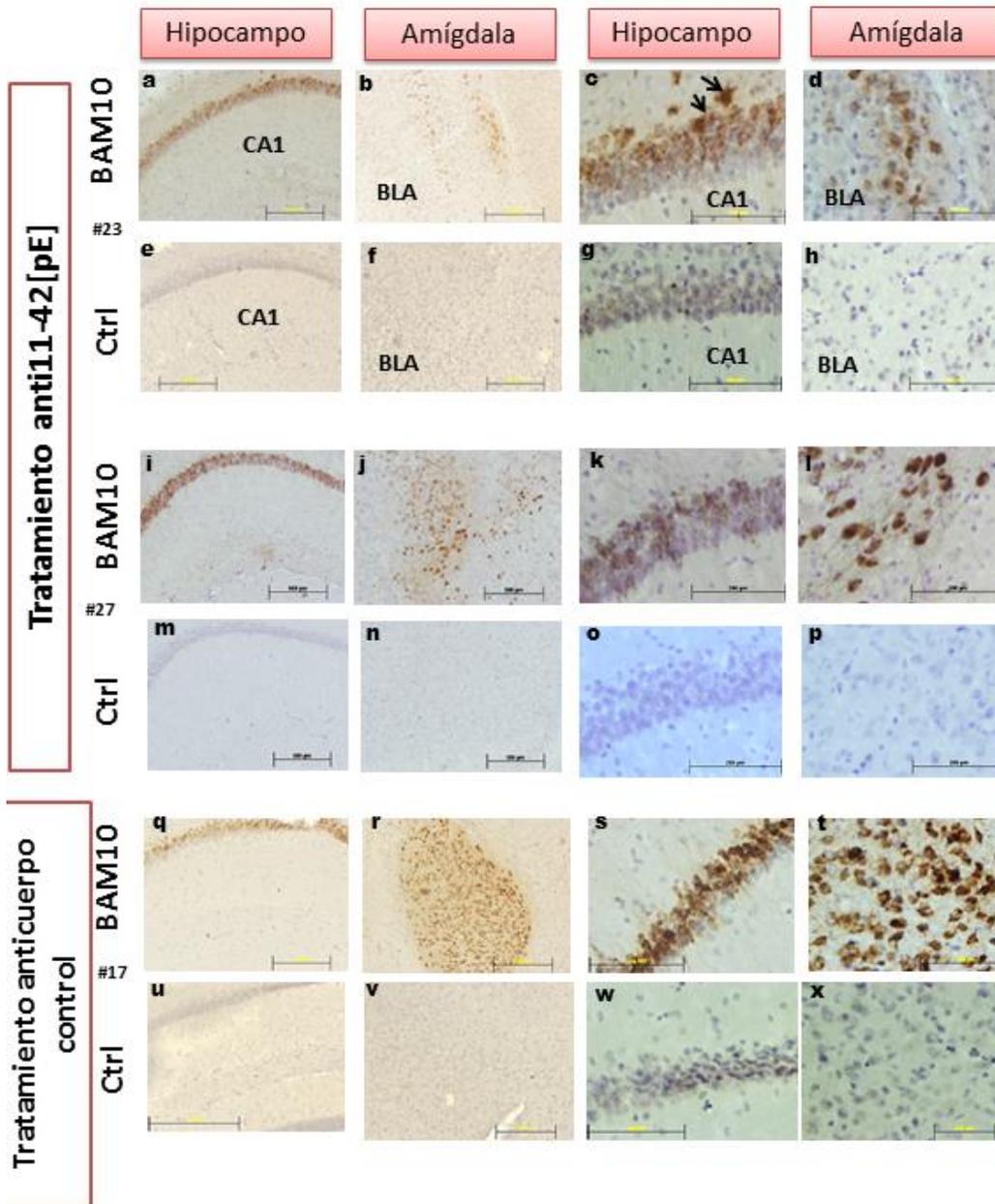


Figura 17.2 Análisis Inmunohistoquímico de cerebros ratones 3xTg-AD inmunizados con anti- β A-11-42[pE]. Los agregados intracelulares de β A se observan en café mientras que en morado/azul se observan los núcleos celulares de las neuronas. En la parte superior de la figura se muestra la región del cerebro a la que se refiere la imagen. En los recuadros de la izquierda se muestra el tratamiento que se le administró a cada ratón junto con el número de identificación de éstos y el anticuerpo que se usó para el análisis: BAM10 (señal café) o Ctrl (control negativo). Barra de escala: 500 μ m (lado izquierdo) y 200 μ m (lado derecho). En esta imagen se compara los ratones dentro del esquema de tratamiento terapéutico: los administrados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] [a-p] y control [q-x]. No se observa ninguna diferencia entre los inmunizados con el anticuerpo de interés y el control. En el panel [c] se puede observar el comienzo de la agregación extracelular del β A en la región del hipocampo.

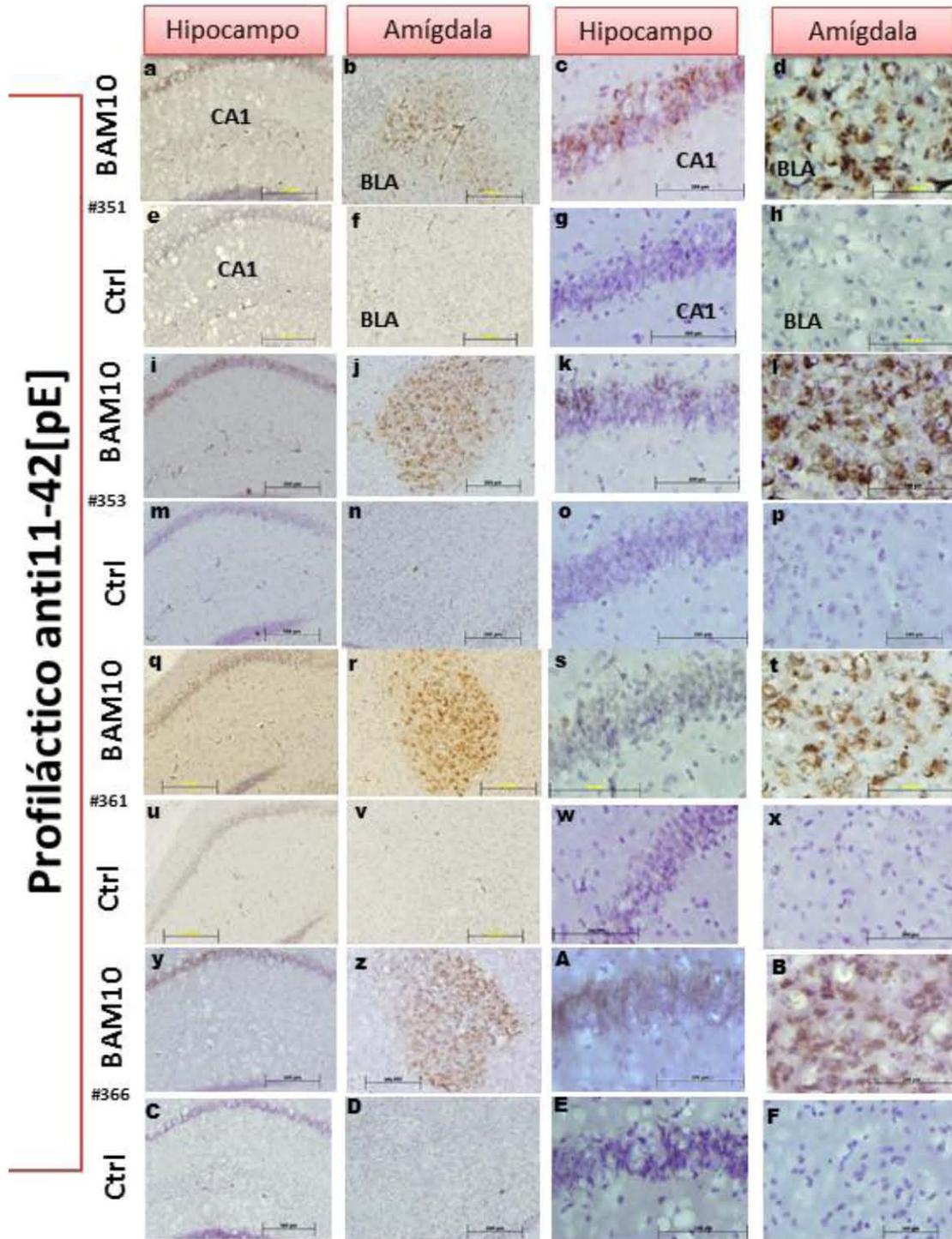


Figura 17.3 Análisis Inmunohistoquímico de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con anti- β A-11-42[pE]. En la parte superior de la figura se muestra la región del cerebro a la que se refiere la imagen. En los recuadros de la izquierda se muestra el tratamiento que se le administró a cada ratón junto con el número de identificación de éstos y el anticuerpo que se usó para el análisis: BAM10 (señal café) o Ctrl (control negativo). Barra de escala: 500 μ m (lado izquierdo) y 200 μ m (lado derecho). En esta imagen muestra los cuatro ratones del esquema de tratamiento profiláctico administrados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE]. Si se observa las imágenes [c, k, s, A] se aprecia la disminución de los agregados intracelulares en la región del hipocampo comparados con los administrados con anticuerpo control 17.1 [q-t], el 3xTg-AD sin tratamiento

[Figura 17.1 i-l], y los ratones 3xTg-AD del Grupo Terapéutico [Figura 17.2]. Los agregados intracelulares de β A se observan en café los núcleos celulares en morado/azul.

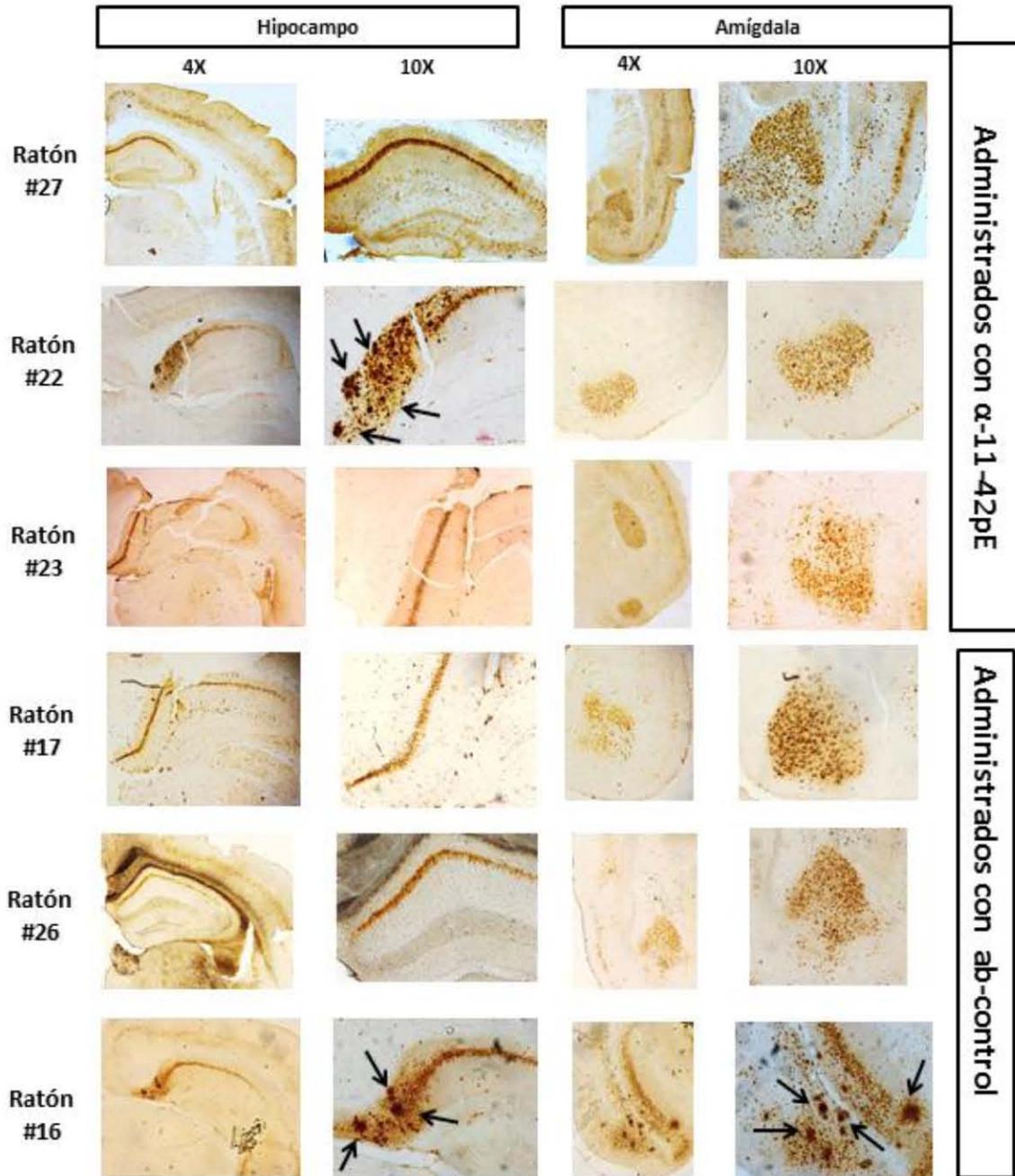


Figura 18. Análisis Inmunohistoquímico de los cerebros de ratón 3xTg-AD correspondientes al grupo Tratamiento. Esta figura corresponde al grupo T de ratones los cuales tenían 10-11 meses cuando se empezó el tratamiento con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] y el anticuerpo control. Se muestran las regiones del hipocampo (4x y 10x) y amígdala (4x y 10x), donde se observan los agregados intracelulares (señal café) revelados con DAB utilizando el anticuerpo monoclonal BAM10 (Sigma). A simple vista y de manera general no se observa ninguna diferencia entre los inmunizados con el anti- β A-11-42[pE] y los

inmunizados con el anticuerpo control. Las placas extracelulares de β A están marcadas con una flecha, y solo están presentes en dos de los ratones tanto el inmunizado con el anticuerpo de interés como el inmunizado con el anticuerpo control.

Haciendo la comparación entre todos los grupos de ratones arriba mencionados en ese estudio preliminar, se pudo observar una disminución en la carga de los agregados intracelulares de β A en los ratones 3xTg-AD del **Grupo P** tratados con los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] (Ver figura **17.3**). Esa disminución es visible en la región del hipocampo (ver **Figura 17.3 b, j, r y z**, mientras que en la región del núcleo basolateral de la amígdala (BLA) la carga intracelular de β A permanece igual en los dos grupos de ratones 3xTg-AD (Ver **Figura 17.3 d, l, t y B**). Comparando el **Grupo P (Figura 17.3)** con el **Grupo T (Figura 17.2 y 18)** se observa la diferencia en agregados intracelulares en la región del hipocampo, mientras los ratones 3xTg-AD del **Grupo T** muestran agregados intracelulares densos y ampliamente distribuidos en la región CA1 y CA3 del hipocampo, en los ratones 3xTg-AD del **Grupo P** los agregados intracelulares son menos densos y se encuentran en menor cantidad (ver **Figura 17** panel u-x y **17.3**) En el **Grupo T** no se observó ninguna diferencia entre los tres ratones administrados con el anticuerpo anti β A-11-42[pE] comparados con los otros tres administrados con el anticuerpo control (ver **Figura 17.2 y 18**).

Si se hace la comparación en la región del hipocampo de los ratones 3xTg-AD del **Grupo P** (14mo) y el ratón 3xTg-AD sin tratamiento (14mo), se puede observar una diferencia en la acumulación de los agregados intracelulares de β A, por lo que pudiese ser que la administración del anticuerpo anti- β A-11-42[pE] como tratamiento profiláctico, parece retrasar la progresión de este marcador histopatológico.

De todos los ratones 3xTg-AD (**T y P** n=12) analizados en ese trabajo se detectaron agregados amiloides extracelulares en dos ratones del grupo **T** (3xTg-AD: 22, 16) en la región del subículo y la región de la amígdala (**ver Figura 18**). Mientras que los agregados amiloides intracelulares se encuentran presentes en todos los ratones tanto inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] como con el anticuerpo control en las regiones del hipocampo, corteza cerebral, subículo y núcleo basolateral de la amígdala.

Análisis por Inmunofluorescencia de cerebros de ratones 3xTg-AD administrados con anti- β A-11-42[pE].

Adicionalmente, se realizó el análisis de los cortes de cerebros en los grupos de ratones 3xTg-AD inmunizados con anti β A-11-42[pE] mediante técnica de inmunofluorescencia. Los resultados se muestran en la **Figura 19** y **19.1**. Observamos los mismos agregados intracelulares en la región del hipocampo (**Figura 19.1** panel **d**), se observan también los agregados intracelulares en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) (**Figura 19** paneles **j** y **m** y **19.1** panel **j**) y así mismo los mismos agregados intracelulares en la corteza cerebral (**Figura 19.1** panel **a**). También si se observa la **Figura 19** en el panel **a** y **d** se observan las placas extracelulares acotadas a la región del subículo.

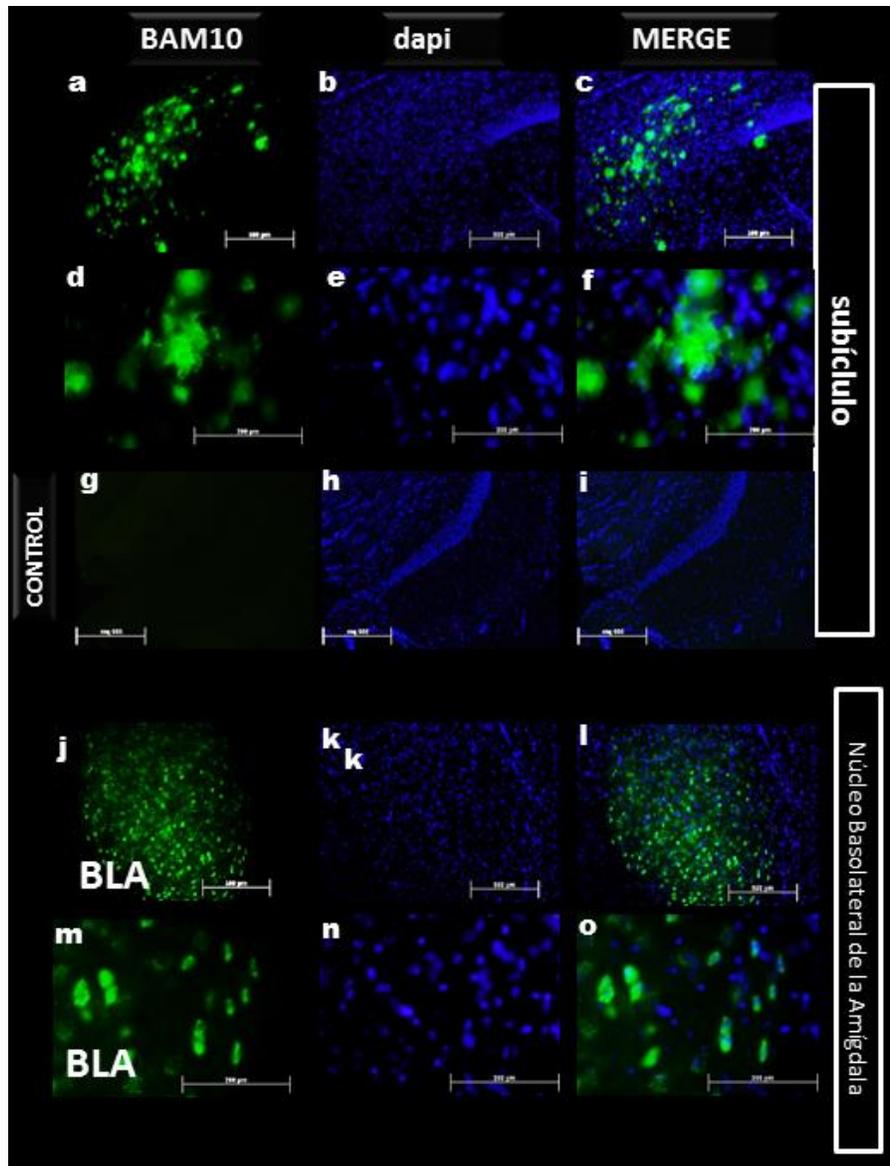


Figura 19. Análisis por Inmunofluorescencia de tejidos de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE]. En esta figura se muestra los resultados obtenidos del ratón 3xTg-AD #22 administrado el anticuerpo anti- β A-11-42[pE]. Para el análisis por inmunofluorescencia se utilizó en anticuerpo monoclonal BAM10 (verde), donde se observa la presencia de placas extracelulares y agregados intracelulares de β A según corresponda, en azul (dapi) se muestran los núcleos celulares y el Merge nos proporciona el traslape de las dos imágenes para ver cómo es la interacción entre éstas. La señal solo se vio presente en la región del subículo [a-f] con presencia de abundantes placas difusas en la región del subículo, por otra parte se muestra la imagen correspondiente al control de isotipo para el análisis Inmunohistoquímico [g-h], en donde no hay señal. También se muestra la región del núcleo basolateral de la amígdala (BLA) [j-o] donde no se observan placas amiloides pero si presencia de agregados intracelulares de β A [o]. Barra de escala: 500 μ m y 200 μ m (respectivamente).

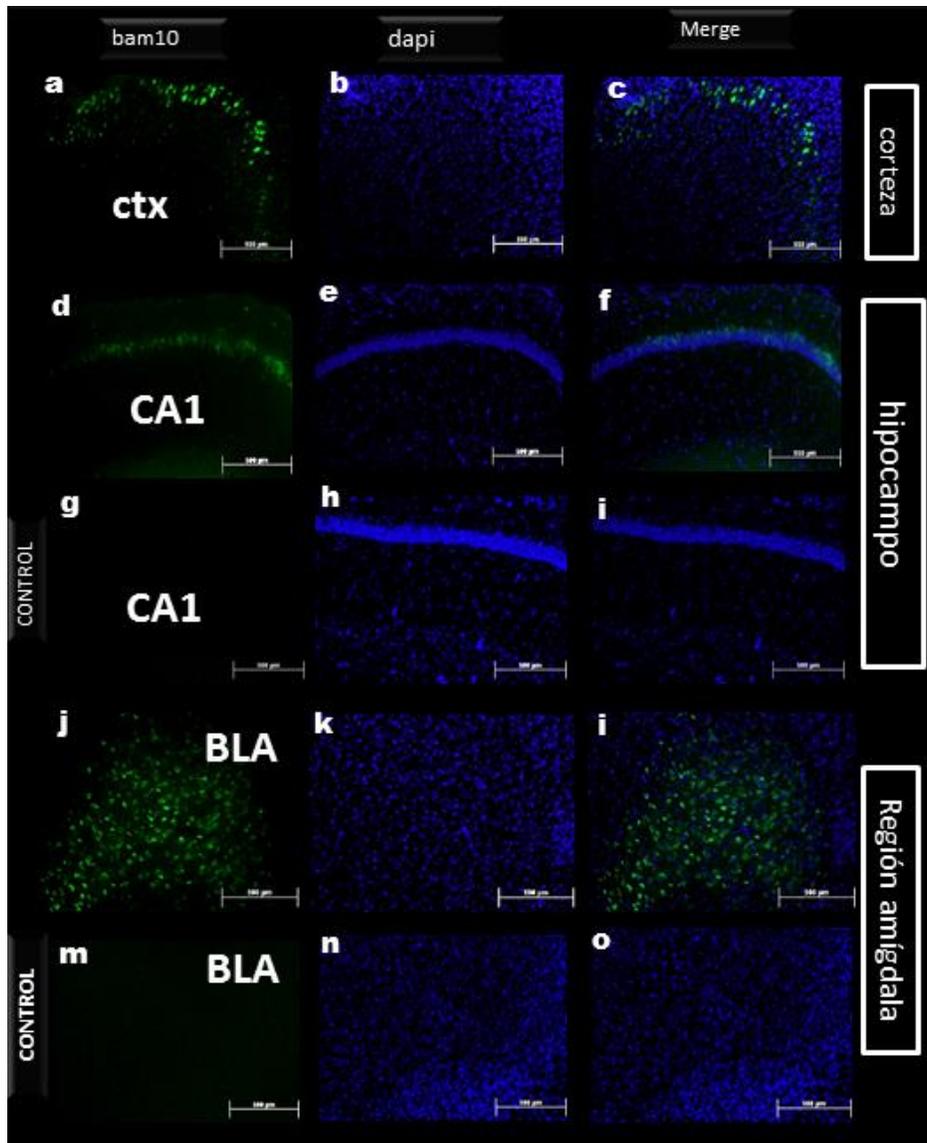


Figura 19.1 Análisis por Inmunofluorescencia de tejidos de cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE]. Son los resultados del ratón 3xTg-AD #26 el cual tenía 13mo después de 5 meses de ser administrado el anticuerpo control (anti-adj). Con el anticuerpo BAM10 (verde), se observan los agregados intracelulares de β A, en azul (dapi) se muestran los núcleos celulares y el Merge nos proporciona el traslape de las dos imágenes. Los agregados intracelulares de β A se encuentran presentes, en la corteza cerebral (ctx), la región del hipocampo (CA1) y el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). A comparación de la Figura 19, no hay presencia de placas amiloides pero si hay señal en la corteza cerebral [a-c] y [d-f], el hipocampo y la amígdala [j-i]. Barra de escala: 500 μ m

Los resultados obtenidos por el análisis histológico de las muestras de los ratones 3xTg-AD nos indican, que, cuando éstos han alcanzado una edad \approx 14 meses los agregados amiloides extracelulares están acotados a ciertas regiones del cerebro (BLA y subículo). Sin embargo, los ratones 3xTg-AD presentan múltiples agregados intracelulares distribuidos a lo

amplio de la corteza cerebral, en la región del hipocampo (desde CA1 hasta CA3), en el núcleo basolateral de la amígdala.

Análisis histoquímico de microhemorragias en cortes de cerebro por tinción para Hemosiderina

Es importante evaluar la presencia de microhemorragias debido a que hay evidencia que indica que la inmunoterapia contra β A exacerba la angiopatía amiloide cerebral (CAA) y microhemorragias tanto en modelos animales así como en la EA en humanos (Wilcock & Colton, 2009). Por ese motivo, en este proyecto se evaluó la presencia de microhemorragias en los ratones 3xTg-AD los cuales previamente fueron sometidos a un cuadro de inmunizaciones con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE].

Analizamos la frecuencia de microhemorragias en ratones no-Tg ($n=2$) de ≈ 9 meses de edad, sin ningún tratamiento, contra ratones 3xTg-AD ($n=4$) del **Grupo P** inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] y el anticuerpo control ($n=1$) de 14 meses de edad. También incluimos en ese análisis un ratón 3xTg-AD sin tratamiento con edad de 18 meses. No se analizó el **Grupo T** de ratones 3xTg-AD ya que éstos fueron perfundidos.

Los resultados nos indican que los ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] presentan mayor frecuencia de microhemorragias comparados con el ratón 3xTg-AD sin tratar (**Figura 20 F**) y los ratones no-Tg (**Figura 20 H**). Por otra parte, el ratón 3xTg-AD inmunizado con el anticuerpo (**Figura 20 E**) control reveló también mayor frecuencia de microhemorragias comparados con el ratón 3xTg-AD sin tratar y el no-Tg. Aunque en la **Figura 20** solo se muestra la región CA1 del hipocampo, las microhemorragias se encontraron distribuidas en todo el hemisferio cerebral.

Cabe señalar que faltarían más estudios para poder afirmar resueltamente que el incremento en el número de microhemorragias es debido a que recibieron la inmunización con el anticuerpo en cuestión.

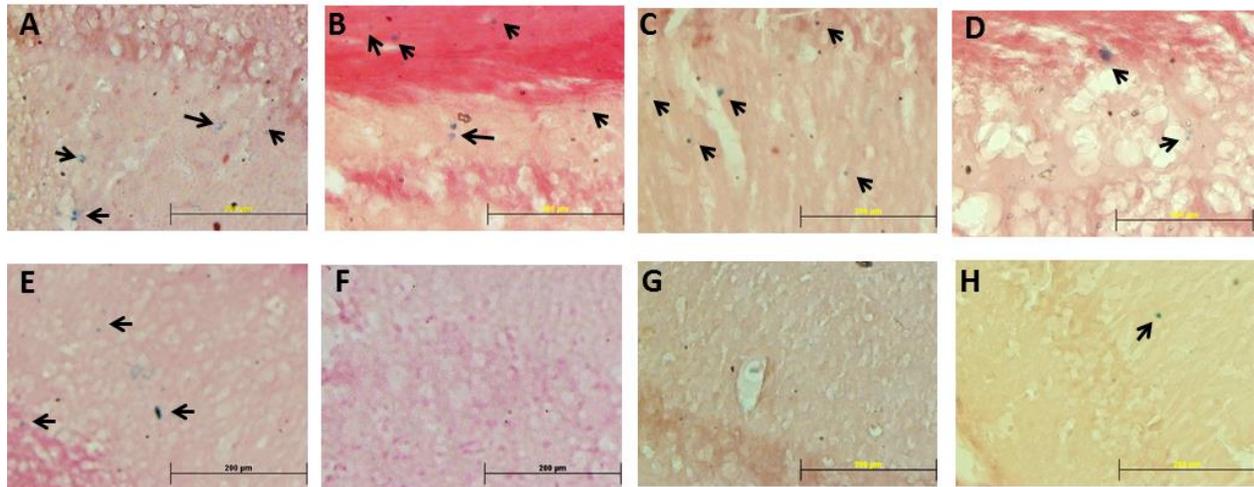


Figura 20. Evaluación de microhemorragias en ratones 3xTg-AD administrados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE]. La tinción para hemosiderina reveló que la presencia de microhemorragias es más frecuente en los ratones inmunizados con el anticuerpo anti β A-11-42[pE] (A-D) en comparación con los ratones control: ratón 3xTg-AD sin tratamiento (F), ratones no transgénicos (G y H). Por otra parte el ratón que fue administrado con anticuerpo control (E) presenta la misma frecuencia de microhemorragias que los ratones administrado con el anticuerpo anti β A-11-42[pE]. Barra de escala = 200 μ m

Discusión

La mayoría de los estudios de inmunoterapia para la EA se han enfocado en el péptido β A-1-42. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que del 25 al 30% del A β total encontrado en cerebros de pacientes con la EA y Síndrome de Down, este porcentaje, corresponde a especies piroglutamadas (Jawhar, Wirths, & Bayer 2011), es por esto que los péptidos β A-piroglutamados tienen que ser considerados durante desarrollo de protocolos inmunoterapéuticos. Estudios sobre las propiedades bioquímicas de los péptidos β A piroglutamados modificados (β A[pE]) demostraron que forman una estructura de β -plegada con mayor facilidad que los péptidos β A de longitud completa, sugiriendo que éstas especies posiblemente actúen como semillas de agregación para la formación de agregados amiloides (He & Barrow, 1999). Por lo que se propone que la especie β A-11-42[pE] juega un papel importante en el proceso de formación de los agregados tóxicos del péptido β A (Schlenzig et al., 2009).

Sobre la base de los datos presentados anteriormente, en nuestro laboratorio se caracterizaron los anticuerpos policlonales de conejo anti- β A-11-42[pE] y se encontró que estos anticuerpos reconocen a las 3 principales especies patológicas del péptido β A encontrados en cerebros de pacientes con la EA: el péptido de longitud completa β A-1-42 y las especies aminotruncadas/piroglutamadas β A-3-42[pE] y β A-11-42[pE] (Perez-Garmendia et al., 2010). Asimismo, se demostró que el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] reconoce la porción central del péptido de longitud completa. A pesar de que los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] reconocen a los 3 péptidos mencionados arriba, éstos no reconocen todos sus estados de agregación. Los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] reconocen a los monómeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de bajo peso molecular de las especies aminotruncadas β A-3-42[pE] y β A-11-42[pE]. Además, estos anticuerpos reconocen a los oligómeros del péptido β A-1-42 sin reconocer al monómero (Perez-Garmendia et al., 2010). También, se demostró mediante la técnica de inmunohistoquímica que los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] se unen a los agregados amiloides naturales en cerebros de pacientes con la EA (Perez-Garmendia et al., 2010). El siguiente paso era evaluar la efectividad de los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] en modelos animales de la EA, evaluación que se hizo en esta tesis.

En este proyecto de tesis, se demostró que después de la administración vía intravenosa el anticuerpo anti- β A11-42[pE] permanece en circulación hasta después de 10 días. Por lo que los ratones pueden ser inmunizados cada 10 días, con la finalidad de que: los anticuerpos estén presentes en la sangre y disponibles para atravesar la barrera hematoencefálica. También se mostró que cuando se administra una dosis vía intravenosa de 50 μ L cada 10 días del anticuerpo anti- β A11-42[pE] en ratones 3xTg-AD como tratamiento profiláctico, el anticuerpo es capaz de disminuir los agregados intracelulares de β A (ver *Figura 17, 18 y 20*). Sin embargo cuando se administra como terapia de tratamiento a ratones 3xTg-AD, cumplidos los 10 meses de edad, el anticuerpo anti- β A11-42[pE] no disminuye los agregados presentes ya en el tejido (ver *Figura 21*). Así mismo, se reveló que a partir de los 5 meses de edad los ratones 3xTg-AD muestran agregados intracelulares de β A, los cuales se extienden por toda la corteza cerebral, el subículo, el hipocampo y el núcleo basolateral de la amígdala. La presencia de las placas de β A comienzan a ser visibles hasta los 18 meses de edad, y no es hasta los 23 meses de edad de los ratones 3xTg-AD presentan una cantidad homogénea y cuantificable de placas.

El modelo 3xTg-AD, con el que se trabajó, expresa los transgenes PS1_{M146V}, hAPP_{Swe} y tau_{P301L}. Según algunos reportes anteriores este modelo desarrolla depósitos amiloides extracelulares desde los 6 meses edad, y una patología relacionada con tau empezando a los 10-12 mo, primero en el hipocampo y luego progresa a la corteza cerebral (Oddo, 2003; Oddo et al., 2003). También los déficits en la LTP se correlacionan con la acumulación del β A intraneuronal. Sin embargo, se ha reportado que hay variabilidad en la patología de este modelo. Algunos ratones, han presentado un retraso en la expresión de la patología, con deposición de las placas empezando después de los 15 a 18 meses de edad (Mastrangelo & Bowers, 2008; Oh et al., 2010; Zaheer et al., 2013). A pesar de que son varios los casos que reportan un retraso en la patología en este modelo de ratón, en la literatura siguen apareciendo los reportes afirmando que los depósitos extracelulares de β A en el ratón 3xTg-AD comienzan a partir de los 6 meses (Hall & Roberson, 2012; Shineman et al., 2011). Cabe señalar, que el retraso que observamos en la expresión de la patología en éste modelo no es único. Se sabe que muchas líneas transgénicas muestran una alta variabilidad en el grado y el curso de la expresión del fenotipo de la enfermedad. Existen factores comunes

que afectan la variabilidad del fenotipo, los cuales comprenden: factores ambientales (estado de salud, dieta, ruido y vibración, ciclo de luz, número de ratones por caja) y factores biológicos (edad, sexo, deriva genética, número de copias de transgenes, nivel de expresión del transgen) (Hampshire & Davis, 2005; Murray & Parker, 2005; Pritchett & Taff, 2006).

En nuestra línea de ratones 3xTg-AD constantemente confirmamos la presencia de los transgenes, sin embargo detectamos agregados extracelulares en un número reducido de ratones. A pesar de esto, en los estudios de tareas cognitivas (tal como el reconocimiento de objetos o el laberinto de agua de Morris) nuestros ratones presentan el deterioro cognitivo similar al descrito en la literatura en las mismas edades que en otros laboratorios. Estos resultados pueden ser explicados por la presencia de β A intracelular. Recientemente, los autores (Dr. Frank LaFerla y col.) de esa línea de ratones transgénicos reportaron el desarrollo de nuevos animales con los mismos genes humanos y que tienen más agregados extracelulares. Actualmente, en nuestro laboratorio están estableciendo esa nueva línea para futuras evaluaciones de protocolos inmunoterapéuticos.

El papel de β A intracelular en el modelo 3xTg-AD así como en otros modelos animales y en la EA es muy interesante, ya que se presenta en etapas tempranas, antes de la aparición del amiloide extracelular.

La poza intracelular (o intraneuronal) de β A tiene un doble origen: una producción lenta a partir de APP dentro de las neuronas y la internalización desde el espacio extracelular. Estos dos mecanismos son bastante diferentes y son regulados de manera distinta. Así mismo estudios recientes sugieren que la acumulación de β A intracelular puede ser un evento temprano en la patogénesis de la EA y personas con el síndrome de Down. En los pacientes con MCI (*del inglés Mild Cognitive Impairment*), se ha observado inmunoreactividad del β A intraneuronal en regiones del cerebro que son más propensas a desarrollar la EA temprana, tales como el hipocampo y la corteza entorrinal (Gouras et al., 2000).

Los eventos moleculares implicados en la internalización de β A dentro de la neurona en la EA no son claros. La endocitosis mediada por clatrina ha sido considerada como el principal mecanismo de internalización de β A hasta hace poco, sin embargo muchos otros

procesos de endocitosis independientes de clatrina pueden mediar esta internalización (Mohamed & Posse De Chaves, 2011). El primer mecanismo descubierto de endocitosis de β A mediado por clatrina involucra los receptores que se unen a apoE, y pertenecen a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (*LDLR del inglés Low-Density Lipoprotein Receptor*). De los varios receptores que pertenecen a la familia LDLR y se unen a ApoE, la evidencia apunta a la lipoproteína de baja densidad de receptores relacionados con la proteína 1 (LRP1) como la más importante en la internalización de β A. Es importante recordar que apoE es una proteína polimórfica que transporta el colesterol extracelular (Mohamed & Posse De Chaves, 2011).

Es importante resaltar que la acumulación intracelular de proteínas no es específica para la EA, ya que se ha observado también en otras enfermedades neurodegenerativas como los agregados nucleares tóxicos de la huntingtina en la Enfermedad de Huntington (Davies et al., 1997; Scherzinger et al., 1997), y la acumulación intracelular de la α -sinucleína en la Enfermedad de Parkinson (Spillantini et al., 1997). Las acumulaciones de PrP en vesículas intracelulares en la Enfermedad de Creutzfeld-Jakob y las acumulaciones de la proteína nuclear de la Ataxina3 en la Enfermedad de Machado-Joseph (también llamada SCA3 (Paulson, 2012)) se han conocido desde hace mucho tiempo. Lo mismo ocurre en la Diabetes-IAPP-II donde los depósitos intracelulares de amilina preceden a la degeneración de las células de los islotes del páncreas (Hartmann, 1999; Hiddinga & Eberhardt, 1999; O'Brien, Butler, Kreutter, Kane, & Eberhardt, 1995).

Finalmente, la evaluación de las microhemorragias observadas en el presente trabajo en los ratones 3xTg-AD después de 7 meses de ser inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] es mayor comparado con ratones 3xTg-AD y no-transgénicos sin tratamiento (ver *Figura 22*). Adicionalmente no se observa una diferencia entre la frecuencia de microhemorragias entre los ratones 3xTg-AD inmunizados con el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] y el inmunizado con el anticuerpo control. La frecuencia de microhemorragias desarrolladas en los ratones 3xTg-AD que fueron tratados con el anticuerpo anti β A-11-42[pE] y el anticuerpo control puede estar relacionada con la administración de inmunoglobulinas de conejo en ratón, sin embargo se necesitan más estudios con mayor cantidad de ratones.

Lo que se sabe de las microhemorragias, es que, la deposición del amiloide en los vasos sanguíneos en el cerebro conduce a un debilitamiento en la pared vascular tanto en modelos murinos de EA como en humanos (Maeda et al., 1993; Winkler et al., 2001). Pfeifer et al., (2002), demostraron que con la inmunización pasiva contra β A incrementa el riesgo de hemorragia cerebral por el debilitamiento de la pared vascular amiloidótica. Adicionalmente se sugiere que un posible mecanismo es que la unión del anticuerpo al amiloide vascular desencadene una reacción inflamatoria local, la cual podría ser suficiente para desestabilizar la pared de vaso ya debilitada (Maeda et al., 1993). También se ha determinado que la inmunización de ratones transgénicos con anticuerpos dirigidos hacia la porción N-terminal del péptido β A1-42 duplica el riesgo de desarrollar microhemorragias (Pfeifer et al., 2002). Como se menciona arriba puede haber múltiples explicaciones para la presencia de microhemorragias, y en este caso se necesitaría un estudio con una mayor cantidad de ratones transgénicos y no-transgénicos para poder afirmar definitivamente que es el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] el que las causa.

En el presente trabajo la información obtenida es importante para toda la comunidad científica que se interese por la EA así como también para el grupo de trabajo en el que se realizó este proyecto. Ya que, a pesar de ser resultados en su mayoría cualitativos, aportan nueva información acerca de la vacunación en modelos biológicos de la EA, como lo es el ratón 3xTg-AD. Este trabajo podrá servir como base para el mejoramiento del desarrollo de diseños de protocolos de inmunización pasiva.

En un futuro se podrían volver a evaluar la capacidad protectora de los anticuerpos anti- β A-11-42[pE] teniendo en cuenta lo siguiente:

- Tener dos grupos control (además del grupo control de vacunación); ratones silvestres (sin tratar) y ratones transgénicos (sin tratar).
- Tener una $N \geq 30$ y considerar las posibles bajas que se puedan dar a lo largo del estudio.
- Empezar la administración de la vacuna antes de los 6 meses de edad de los ratones.

- Emplear estudios de comportamiento para la medición de la función neuronal, por ejemplo; el laberinto de agua de Morris, la prueba de reconocimiento de objeto, condicionamiento del miedo, y demás.
- Detección y cuantificación de microhemorragias con la tinción para hemosiderina y la medición de la integridad de los vasos sanguíneos y/o la contratinción con componentes de vasos sanguíneos que estén presentes en condiciones saludables (actina).
- Detección de la inflamación por medio de la activación de la microglía (anti-Iba1) o la astrogliosis reactiva (anti-GFAP).
- Cuantificación de la disrupción (permeabilidad) de la barrera hematoencefálica mediante el ensayo por la tinción azul Evans.

Conclusiones

- Se demostró que después de administración intravenosa el anticuerpo anti- β A11-42[pE] permanece en circulación hasta después de 14 días. Eso permite optimizar el protocolo de inmunizaciones administrando anticuerpos con menos frecuencia.
- Se demostró que el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] tiene un efecto moderado en la disminución de β A intracelular en los ratones jóvenes (protocolo profiláctico).
- Se demostró que el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] induce microhemorragias después de administración intravenosa aunque ese efecto es moderado.
- Se requieren más estudios en varios modelos animales para poder concluir si el anticuerpo anti- β A-11-42[pE] puede ser un inmunoterapéutico prometedor para la EA.

Referencias

- Acero, G., Manoutcharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M. E., Govezensky, T., Coronas, G., ... Gevorkian, G. (2009). Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Abeta-specific antibodies produced in rabbits. *Journal of neuroimmunology*, 213(1-2), 39–46. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.06.003
- Alzheimer's Association. (2012). 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 8(2), 131–168. doi:10.1016/j.jalz.2012.02.001
- Ashe, K. H., & Zahs, K. R. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66(5), 631–45. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.031
- Bacskaï, B. J., Kajdasz, S. T., McLellan, M. E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D., & Hyman, B. T. (2002). Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), 7873–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223540>
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., ... 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. *Nature Medicine*, 6(8), 916–919. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932230>
- Bettens, K., Slegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Human molecular genetics*, 19(R1), R4–R11. doi:10.1093/hmg/ddq142
- Bitan, G., Lomakin, A., & Teplow, D. B. (2001). Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 35176–84. doi:10.1074/jbc.M102223200
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387–403. doi:10.1016/S0140-6736(06)69113-7
- Blennow, K., Zetterberg, H., Wei, J., Liu, E., Black, R., & Grundman, M. (2010). Immunotherapy with bapineuzumab lowers CSF tau protein levels in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 6(4), S134–S135. doi:10.1016/j.jalz.2010.05.419
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>
- Brazil, M. I., Chung, H., & Maxfield, F. R. (2000). Effects of incorporation of immunoglobulin G and complement component C1q on uptake and degradation of Alzheimer's disease amyloid fibrils by microglia. *The Journal of biological chemistry*, 275(22), 16941–7. doi:10.1074/jbc.M000937200
- Buccafusco, J. J. (2009). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5228/>
- Butterfield, D. A., Swomley, A. M., & Sultana, R. (2013). Amyloid β -Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants & redox signaling*, 00(00). doi:10.1089/ars.2012.5027
- Calhoun, M. E. (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular

- amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 14088–14093. doi:10.1073/pnas.96.24.14088
- Cappai, R., & White, A. R. (1999). Amyloid β . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(9), 885–889. doi:10.1016/S1357-2725(99)00027-8
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month: DM*, 56(9), 484–546. doi:10.1016/j.disamonth.2010.06.001
- Chu, L. (2012). Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*, 18(3), 228–237. Retrieved from http://www.hkmj.org/article_pdfs/hkm1206p228.pdf
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(5), 387–98. doi:10.1038/nrd2896
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 19(R1), R12–20. doi:10.1093/hmg/ddq160
- Cynis, H., Schilling, S., Bodnár, M., Hoffmann, T., Heiser, U., Saido, T. C., & Demuth, H.-U. (2006). Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1764(10), 1618–25. doi:10.1016/j.bbapap.2006.08.003
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., ... Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90(3), 537–548. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/90017/>
- De Strooper, B., & Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci*, 113(11), 1857–1870. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/113/11/1857>
- Delaère, P., Duyckaerts, C., Masters, C., Beyreuther, K., Piette, F., & Hauw, J.-J. (1990). Large amounts of neocortical β A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neuroscience Letters*, 116(1-2), 87–93. doi:10.1016/0304-3940(90)90391-L
- Delrieu, J., Ousset, P. J., Caillaud, C., & Vellas, B. (2012). "Clinical trials in Alzheimer's disease": immunotherapy approaches. *Journal of neurochemistry*, 120 Suppl, 186–93. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07458.x
- De-paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. (J. R. Harris, Ed.), 65. doi:10.1007/978-94-007-5416-4
- Dickson, D W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 56(4), 321–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100663>
- Dickson, Dennis W., Crystal, H. A., Mattiace, L. A., Masur, D. M., Blau, A. D., Davies, P., ... Aronson, M. K. (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiology of Aging*, 13(1), 179–189. doi:10.1016/0197-4580(92)90027-U
- Dirección General de Equidad y Desarrollo Social / Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares. (1999). *La Enfermedad de Alzheimer: Recomendaciones para un cuidado de calidad* (p. 41). México, Distrito Federal: Corporación Mexicana de Impresión, S.A. de C.V. Retrieved from http://www.sideso.df.gob.mx/documentos/la_enfermedad_de_alzheimer.pdf
- Dodart, J.-C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., ... Paul, S. M. (2002). Immunization reverses memory

- deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, 5(5), 452–457. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11941374>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta neuropathologica*, 118(1), 5–36. doi:10.1007/s00401-009-0532-1
- Evin, G., & Weidemann, A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides*, 23(7), 1285–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128085>
- Fodero-Tavoletti, M. T., Villemagne, V. L., Rowe, C. C., Masters, C. L., Barnham, K. J., & Cappai, R. (2011). Amyloid- β : The seeds of darkness. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(9), 1247–1251. doi:10.1016/j.biocel.2011.05.001
- Fu, H. J., Liu, B., Frost, J. L., & Lemere, C. A. (2010). Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(2), 197–206. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2895488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., ... Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523–7. doi:10.1038/373523a0
- Gilbert, B. J. (2013). The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of clinical pathology*, 1–5. doi:10.1136/jclinpath-2013-201515
- Glenner, G. G., Henry, J. H., & Fujihara, S. (1981). Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Annales de pathologie*, 1(2), 120–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169353>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–6. doi:10.1038/349704a0
- Golde, T. E. (2006). Disease modifying therapy for AD? *Journal of neurochemistry*, 99(3), 689–707. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04211.x
- Golde, T. E., Das, P., & Levites, Y. (2009). Quantitative and mechanistic studies of Abeta immunotherapy. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(1), 31–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275635>
- Goodsell, D. S. (2006). Amyloid-beta Precursor Protein. *RCSB Protein Data Bank*, (July). doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2006_7
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., ... Relkin, N. R. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *The American journal of pathology*, 156(1), 15–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. a. (2010). Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(12), 1915–8. doi:10.1016/j.biocel.2010.08.015

- Güntert, A., Döbeli, H., & Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*, *143*(2), 461–475. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008022>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*(2), 101–112. doi:10.1038/nrm2101
- Hagen, M., Seubert, P., Jacobsen, S., Schenk, D., Pride, M., Arumugham, R., ... Kinney, G. (2011). The A β peptide conjugate vaccine, acc-001, generates n-terminal anti-A β antibodies in the absence of A β directed t-cell responses. *Alzheimer's & Dementia*, *7*(4), S460–S461. doi:10.1016/j.jalz.2011.05.1333
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, *88*(1), 3–12. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.11.017
- Hampshire, V., & Davis, J. A. (2005). The role of the veterinary staff in mouse breeding colony management. *Lab animal*, *34*(4), 45–49. doi:10.1038/labana0405-45
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5580), 353–6. doi:10.1126/science.1072994
- Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., & Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chemistry & biology*, *4*(2), 119–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190286>
- Hartmann, T. (1999). Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *249*(6), 291–298. doi:10.1007/s004060050102
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., & Ihara, Y. (1992). Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(24), 17047–17054. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1512246>
- He, W., & Barrow, C. J. (1999). The A beta 3-pyroglutanyl and 11-pyroglutanyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*, *38*(33), 10871–7. doi:10.1021/bi990563r
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A., & Evans, D. A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of neurology*, *60*(8), 1119–22. doi:10.1001/archneur.60.8.1119
- Heneka, M. T., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research reviews*, *63*(1-2), 189–211. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.004
- Hiddinga, H. J., & Eberhardt, N. L. (1999). Intracellular amyloidogenesis by human islet amyloid polypeptide induces apoptosis in COS-1 cells. *The American journal of pathology*, *154*(4), 1077–1088.
- Hosoda, R., Saido, T. C., Otvos, L., Arai, T., Mann, D. M., Lee, V. M., ... Iwatsubo, T. (1998). Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *57*(11), 1089–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825946>
- Hu, J., Akama, K. T., Krafft, G. A., Chromy, B. A., & Van Eldik, L. J. (1998). Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain research*, *785*(2), 195–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518610>

- Iqbal, K., Alonso, A. del C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., ... Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*, *1739*(2-3), 198–210. doi:10.1016/j.bbadis.2004.09.008
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *12*(2), 65–72. doi:10.1038/nrn2967
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994). Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron*, *13*(1), 45–53. doi:10.1016/0896-6273(94)90458-8
- Jawhar, S., Wirths, O., & Bayer, T. A. (2011). Pyroglutamate amyloid- β (A β): a hatchet man in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, *286*(45), 38825–32. doi:10.1074/jbc.R111.288308
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of Neural Science* (5th ed., p. 1760). McGraw Hill Professional. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=s64z-LdAlsEC&pgis=1>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., ... Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, *325*(6106), 733–6. doi:10.1038/325733a0
- Kidd, M. (1963). Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature*, *197*(4863), 192–193. doi:10.1038/197192b0
- Klafki, H.-W., Staufenbiel, M., Kornhuber, J., & Wiltfang, J. (2006). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, *129*(Pt 11), 2840–55. doi:10.1093/brain/awl280
- Kochanek, K., Xu, J., Murphy, S., Mimiño, A., & Kung, H. (2011). Deaths: preliminary data for 2008. *National Vital Statistics Reports*, *59*(4). Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=x5-HhVKLf_QC&oi=fnd&pg=PA2&dq=Deaths+:+Preliminary+Data+for+2009&ots=2DuA8DSHGX&sig=M44Wg9TwgNeutemFehhA6r3JhTQ
- Koenigsknecht-Talboo, J., & Landreth, G. E. (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(36), 8240–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.1808-05.2005
- Kotilinek, L. A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B. T., ... Ashe, K. H. (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6331–6335. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12151510
- Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* (8th ed., Vol. 113, pp. 593–632). Leipzig: Barth. doi:10.1001/jama.1939.02800520075036
- Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2010). ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *59*(4-5), 230–42. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.07.012
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6448–53. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Laskowitz, D. T., & Kolls, B. J. (2010). A phase 2 multiple ascending dose trial of

- bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 74(24), 2026; author reply 2026–7. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e03844
- Lee, C. Y. D., & Landreth, G. E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(8), 949–60. doi:10.1007/s00702-010-0433-4
- Lee, M., Bard, F., Johnson-Wood, K., Lee, C., Hu, K., Griffith, S. G., ... Seubert, P. (2005). Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Annals of neurology*, 58(3), 430–5. doi:10.1002/ana.20592
- Llibre Rodriguez, J. J., Ferri, C. P., Acosta, D., Guerra, M., Huang, Y., Jacob, K. S., ... Prince, M. (2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet*, 372(9637), 464–74. doi:10.1016/S0140-6736(08)61002-8
- Lobello, K., Ryan, J. M., Liu, E., Rippon, G., & Black, R. (2012). Targeting Beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012, 628070. doi:10.1155/2012/628070
- Lombardo, J. A., Stern, E. A., McLellan, M. E., Kajdasz, S. T., Hickey, G. A., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T. (2003). Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations. *Journal of Neuroscience*, 23(34), 10879–10883. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645482>
- Luna-Muñoz, J. C., Fuentes, P., Hernández, C. N., Martínez, F. D., Zamudio, S., De la Cruz, F., ... Mena, L. R. (2010). Nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Mex Neuroci*, 11(1), 39–45. Retrieved from http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=62160&id_seccion=1130&id_ejemplar=6250&id_revista=91
- Maeda, A., Yamada, M., Itoh, Y., Otomo, E., Hayakawa, M., & Miyatake, T. (1993). Computer-assisted three-dimensional image analysis of cerebral amyloid angiopathy. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 24(12), 1857–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248968>
- Maidment, I. D., Fox, C. G., Boustani, M., Rodriguez, J., Brown, R. C., & Katona, C. L. (2008). Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis. *The Annals of pharmacotherapy*, 42(1), 32–8. doi:10.1345/aph.1K372
- Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., & Mandelkow, E.-M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(1), 83–90. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x
- Mandybur, T. I. (1975). The incidence of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neurology*, 25(2), 120–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/46597>
- Mandybur, T. I., & Chuirazzi, C. C. (1990). Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology*, 40(4), 635–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690867>
- Maslow, K., Langa, K. M., Kabeto, M. U., & Weir, D. R. (2006). *Early-Onset Dementia: A National Challenge, a Future Crisis* (p. 72). Retrieved from http://www.alz.org/news_and_events_alzheimer_news_06-06-2006.asp
- Mastrangelo, M. A., & Bowers, W. J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC neuroscience*, 9, 81. doi:10.1186/1471-2202-9-81

- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, *430*(7000), 631–9. doi:10.1038/nature02621
- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, *349*(9064), 1546–9. doi:10.1016/S0140-6736(96)10203-8
- Mayeux, R., Ottman, R., Maestre, G., Ngai, C., Tang, M. X., Ginsberg, H., ... Shelanski, M. (1995). Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, *45*(3 Pt 1), 555–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7898715>
- Mc Donald, J. M., Savva, G. M., Brayne, C., Welzel, A. T., Forster, G., Shankar, G. M., ... Walsh, D. M. (2010). The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain: a journal of neurology*, *133*(Pt 5), 1328–41. doi:10.1093/brain/awq065
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., ... Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, *46*(6), 860–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10589538>
- Meraz-Ríos, M. A., Lira-De León, K. I., Campos-Peña, V., De Anda-Hernández, M. A., & Mena-López, R. (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, *112*(6), 1353–67. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06511.x
- Mohamed, A., & Posse De Chaves, E. (2011). Aβ Internalization by Neurons and Glia. *International journal of Alzheimers disease*, *2011*, 127984. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042623&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., ... Arendash, G. W. (2000). Ab peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, *408*(6815), 982–985. doi:10.1038/35050116
- Mortimer, J. A., van Duijn, C. M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A. B., Heyman, A., ... Rocca, W. A. (1991). Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *International journal of epidemiology*, *20* Suppl 2, S28–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1833351>
- Moulin, F., & Thévenet, S. (2011). *En torno al Alzheimer: Respuestas a las dudas más frecuentes* (p. 125). España: Octaedro.
- Murray, K. A., & Parker, N. J. (2005). Breeding genetically modified rodents: tips for tracking and troubleshooting reproductive performance. *Lab animal*, *34*(4), 36–41. doi:10.1038/labon0405-36
- Nalbantoglu, J., Gilfix, B. M., Bertrand, P., Robitaille, Y., Gauthier, S., Rosenblatt, D. S., & Poirier, J. (1994). Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: results of an autopsy series and an analysis of several combined studies. *Annals of neurology*, *36*(6), 889–95. doi:10.1002/ana.410360614
- Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., ... Greengard, P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(18), 8378–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nestler, E., Hyman, S., & Malenka, R. (2008). *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience* (second., p. 516). McGraw-Hill. doi:10.1036/0071481273

- Newell, K. L., Hyman, B. T., Growdon, J. H., & Hedley-Whyte, E. T. (1999). Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *58*(11), 1147–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10560657>
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., ... Lannfelt, L. (2001). The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nature neuroscience*, *4*(9), 887–93. doi:10.1038/nn0901-887
- O'Brien, T. D., Butler, P. C., Kreutter, D. K., Kane, L. A., & Eberhardt, N. L. (1995). Human islet amyloid polypeptide expression in COS-1 cells. A model of intracellular amyloidogenesis. *The American journal of pathology*, *147*(3), 609–616. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1870988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oddo, S. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(8), 1063–1070. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, *39*(3), 409–421. doi:10.1016/S0896-6273(03)00434-3
- Oh, K.-J., Perez, S. E., Lagalwar, S., Vana, L., Binder, L., & Mufson, E. J. (2010). Staging of Alzheimer's pathology in triple transgenic mice: a light and electron microscopic analysis. *International journal of Alzheimer's disease*, *2010*. doi:10.4061/2010/780102
- Ott, A., Breteler, M. M. B., van Harskamp, F., Claus, J. J., van der Cammen, T. J. M., Grobbee, D. E., & Hofman, A. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ*, *310*(6985), 970–973. doi:10.1136/bmj.310.6985.970
- Paresce, D. M., Ghosh, R. N., & Maxfield, F. R. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, *17*(3), 553–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816718>
- Paulson, H. (2012). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handbook of clinical neurology*, *103*, 437–49. doi:10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9
- Perez-Garmendia, R., Ibarra-Bracamontes, V., Vasilevko, V., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Govezensky, T., ... Gevorgian, G. (2010). Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: relevance for immunotherapy. *Journal of neuroimmunology*, *229*(1-2), 248–55. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.020
- Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., ... Jucker, M. (2002). Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5597), 1379. doi:10.1126/science.1078259
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., & Koistinaho, M. (2008). Transplanted astrocytes internalize deposited beta-amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, *56*(2), 154–63. doi:10.1002/glia.20599
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., & Cotman, C. W. (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain research*, *563*(1-2), 311–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786545>
- Pimplikar, S. W., Nixon, R. a, Robakis, N. K., Shen, J., & Tsai, L.-H. (2010). Amyloid-

- independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45), 14946–54. doi:10.1523/JNEUROSCI.4305-10.2010
- Prelli, F., Castaño, E., Glenner, G. G., & Frangione, B. (1988). Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 51(2), 648–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3292706>
- Prince, M., & Jackson, J. (2009). *World Alzheimer Report 2009* (p. 96). Illinois, USA. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:World+Alzheimer+Report+2009#0>
- Pritchett, K., & Taff, R. (2006). Reproductive biology of the laboratory mouse. In J. Fox, S. Barthold, M. Davisson, C. Newcomer, F. Quimby, & A. Smith (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research Volume 3* (p. 816). USA. Retrieved from <http://store.elsevier.com/product.jsp?isbn=9780123694577&pagename=search>
- Purves, D. (2007). *Neurociencia* (3rd ed., p. 856). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=wjlhNQAAAJ&pgis=1>
- Rabinovici, G. D., & Jagust, W. J. (2009). Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behavioural neurology*, 21(1), 117–28. doi:10.3233/BEN-2009-0232
- Racke, M. M., Boone, L. I., Hepburn, D. L., Parsadainian, M., Bryan, M. T., Ness, D. K., ... DeMattos, R. B. (2005). Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(3), 629–36. doi:10.1523/JNEUROSCI.4337-04.2005
- Roberts, G. W., Gentleman, S. M., Lynch, A., Murray, L., Landon, M., & Graham, D. I. (1994). Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 57(4), 419–25. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1072869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rodríguez, J. J., & Verkhatsky, A. (2011). Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Molecular neurobiology*, 43(2), 87–96. doi:10.1007/s12035-010-8157-x
- Rogers, J., Strohmeier, R., Kovelowski, C. J., & Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*, 40(2), 260–9. doi:10.1002/glia.10153
- Rohan de Silva, H. A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L. S., Wilkinson, S. L., & Patel, A. J. (1997). Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain research. Molecular brain research*, 47(1-2), 147–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9221912>
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., ... Campion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics*, 38(1), 24–6. doi:10.1038/ng1718
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, 14(2), 457–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857653>
- Salbaum, J. M., Weidemann, A., Lemaire, H. G., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1988). The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *The EMBO journal*, 7(9),

- 2807–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=457072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Samadi, H., & Sultzer, D. (2011). Solanezumab for Alzheimer's disease. *Expert opinion on biological therapy*, *11*(6), 787–98. doi:10.1517/14712598.2011.578573
- Sandberg, A., Luheshi, L. M., Söllvander, S., Pereira de Barros, T., Macao, B., Knowles, T. P. J., ... Härd, T. (2010). Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(35), 15595–600. doi:10.1073/pnas.1001740107
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., St. George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., ... Roses, A. D. (1993). Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, *43*(8), 1467–1467. doi:10.1212/WNL.43.8.1467
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., ... Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, *400*(6740), 173–7. doi:10.1038/22124
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., ... Wanker, E. E. (1997). Huntingtin encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, *90*(3), 549–558. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/21647/>
- Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., ... Demuth, H.-U. (2008). Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *Journal of neurochemistry*, *106*(3), 1225–36. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05471.x
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., ... Rossner, S. (2008). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature medicine*, *14*(10), 1106–11. doi:10.1038/nm.1872
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., ... Demuth, H.-U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry*, *48*(29), 7072–8. doi:10.1021/bi900818a
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimers Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiological Reviews*, *81*(2), 741–767. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/81/2/741.full>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5594), 789–91. doi:10.1126/science.1074069
- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Südhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(5). doi:10.1101/cshperspect.a005777
- Shineman, D. W., Basi, G. S., Bizon, J. L., Colton, C. A., Greenberg, B. D., Hollister, B. A., ... Fillit, H. M. (2011). Accelerating drug discovery for Alzheimer's disease: best practices for preclinical animal studies. *Alzheimer's research & therapy*, *3*(5), 28. doi:10.1186/alzrt90
- Siemers, E. R., Friedrich, S., Dean, R. A., Sethuraman, G., DeMattos, R., Jennings, D., ... Seibyl, J. (2008). P4-346: Safety, tolerability and biomarker effects of an Aβ monoclonal antibody administered to patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *4*(4), T774. doi:10.1016/j.jalz.2008.05.2416
- Solomon, B. (2008). Passive immunotherapies for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *5*(3), 185–189. doi:10.1016/j.ddstr.2008.09.001
- Solomon, B., & Frenkel, D. (2010). Immunotherapy for Alzheimer's disease.

- Neuropharmacology*, 59(4-5), 303–9.
doi:10.1016/j.neuropharm.2010.04.004
- Soto, C., Brañes, M. C., Alvarez, J., & Inestrosa, N. C. (1994). Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Journal of neurochemistry*, 63(4), 1191–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931272>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–40.
doi:10.1038/42166
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., & Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 271(13), 1004–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139057>
- Sullivan, C. P., Berg, E. A., Elliott-Bryant, R., Fishman, J. B., McKee, A. C., Morin, P. J., ... Fine, R. E. (2011). Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neuroscience letters*, 505(2), 109–12.
doi:10.1016/j.neulet.2011.09.071
- Summers, W. K., Majovski, L. V., Marsh, G. M., Tachiki, K., & Kling, A. (1986). Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *The New England journal of medicine*, 315(20), 1241–5.
doi:10.1056/NEJM198611133152001
- Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B., & Bugiani, O. (1988). Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neuroscience letters*, 93(2-3), 191–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3241644>
- Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120(4), 545–55.
doi:10.1016/j.cell.2005.02.008
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., ... Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of neurology*, 30(4), 572–80.
doi:10.1002/ana.410300410
- Thakker, D. R., Weatherspoon, M. R., Harrison, J., Keene, T. E., Lane, D. S., Kaemmerer, W. F., ... Shafer, L. L. (2009). Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4501–4506. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2647980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thies, W., & Bleiler, L. (2012). 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 8(2), 131–68.
doi:10.1016/j.jalz.2012.02.001
- Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., ... Mori, H. (2008). A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Annals of neurology*, 63(3), 377–87. doi:10.1002/ana.21321
- Town, T. (2009). Alternative Abeta immunotherapy approaches for Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(2), 114–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2712251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vasilevko, V., Passos, G. F., Quiring, D., Head, E., Kim, R. C., Fisher, M., & Cribbs, D. H. (2010). Aging and cerebrovascular dysfunction: contribution of hypertension, cerebral amyloid angiopathy, and immunotherapy. *Annals of the New York Academy of*

- Sciences*, 1207, 58–70. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05786.x
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C.-Y., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), 399–412. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.017
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future Neurology*, 8(2), 149–158. doi:10.2217/fnl.12.90
- Vinters, H. V., Wang, Z. Z., & Secor, D. L. (1996). Brain Parenchymal and Microvascular Amyloid in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, 6(2), 179–195. doi:10.1111/j.1750-3639.1996.tb00799.x
- Walsh, D M, Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), 22364–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9268388>
- Walsh, Dominic M, & Teplow, D. B. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid β -protein. *Progress in molecular biology and translational science*, 107, 101–24. doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00012-6
- Wang, W., Fan, L., Xu, D., Wen, Z., Yu, R., & Ma, Q. (2012). Immunotherapy for Alzheimer ' s disease Mechanisms of Ab Immunotherapy Types of Ab Immunization. *Acta Biochim Biophys Sin*, 44(10), 807–814. doi:10.1093/abbs/gms065.Advance
- Webster, S. D., Galvan, M. D., Ferran, E., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C. G., & Tenner, A. J. (2001). Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), 7496–503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390503>
- Wegiel, J., Wang, K. C., Tarnawski, M., & Lach, B. (2000). Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation. *Acta neuropathologica*, 100(4), 356–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985692>
- Weingarten, M. D. (1975). A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1858–1862. doi:10.1073/pnas.72.5.1858
- Whitehouse, P. J., & Maurer, K. (2000). *Concepts of Alzheimer Disease: Biological, Clinical, and Cultural Perspectives* (pp. 5–29). JHU Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=ulvCcwKSuSgC&pgis=1>
- Wilcock, D. M., Alamed, J., Gottschall, P. E., Grimm, J., Rosenthal, A., Pons, J., ... Morgan, D. (2006). Deglycosylated anti-amyloid-beta antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 26(20), 5340–5346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707786>
- Wilcock, D. M., & Colton, C. A. (2008). Anti-Amyloid- β Immunotherapy in Alzheimer ' s Disease : Relevance of Transgenic Mouse Studies to Clinical Trials. *Medicine*, 15, 555–569.
- Wilcock, D. M., & Colton, C. A. (2009). Immunotherapy, vascular pathology, and microhemorrhages in transgenic mice. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(1), 50–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2659468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wilcock, D. M., Munireddy, S. K., Rosenthal, A., Ugen, K. E., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2004). Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration.

- Neurobiology of disease*, 15(1), 11–20.
Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751766>
- Wilcock, D. M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Subbarao, S., Freeman, M. J., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2004). Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *Journal of neuroinflammation*, 1(1), 24. doi:10.1186/1742-2094-1-24
- Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., ... Graf, A. (2012). Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet neurology*, 11(7), 597–604. doi:10.1016/S1474-4422(12)70140-0
- Winkler, D. T., Bondolfi, L., Herzig, M. C., Jann, L., Calhoun, M. E., Wiederhold, K. H., ... Jucker, M. (2001). Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(5), 1619–27. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222652>
- Wirh's, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P. J., ... Bayer, T. a. (2010). Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(1), 85–96. doi:10.1007/s00702-009-0314-x
- Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R., & Price, D. L. (2002). Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 5(7), 633–639. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085093>
- Wortmann, M. (2012). Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimer's research & therapy*, 4(5), 40. doi:10.1186/alzrt143
- Yokeş, M. B. (2007). Molecular genetics of Alzheimer disease. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6(2), 73–97.
- Zaheer, S., Thangavel, R., Wu, Y., Khan, M. M., Kempuraj, D., & Zaheer, A. (2013). Enhanced expression of glia maturation factor correlates with glial activation in the brain of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Neurochemical research*, 38(1), 218–25. doi:10.1007/s11064-012-0913-z
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4(1), 3. doi:10.1186/1756-6606-4-3
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular neurodegeneration*, 1, 5. doi:10.1186/1750-1326-1-5