



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE LA INMUNOGENICIDAD DEL PÉPTIDO
A β pGlu11-42 Y SU CAPACIDAD PROTECTORA EN UN
MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B Í O L O G A

P R E S E N T A:

EMILIA GONZÁLEZ AVILA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. GOHAR GEVORGYAN

2017



CD.MX.



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.

Comité tutorial

1. Datos del alumno

González

Avila

Emilia

5557681189

Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Biología

106000166

2. Datos del tutor

Dra.

Gohar

Gevorgyan

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Jacqueline

Fernández

Vargas

4. Datos del sinodal 2

Dr.

José Sullivan

López

González

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Julio Alejandro

Prieto

Sagredo

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Gonzalo Asariel

Acero

Galindo

7. Datos del trabajo escrito.

Estudio sobre la inmunogenicidad del péptido *aβglu11-42* y su capacidad protectora en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer

100p

2017

Índice

- Abreviaturas
- Resumen
- 1 Introducción
 - 1.1 La Enfermedad de Alzheimer
 - 1.1.1 Historia
 - 1.1.2 La demencia
 - 1.1.3 Bases genéticas de la enfermedad
 - 1.1.4 Epidemiología
 - 1.1.5 Sintomatología
 - 1.2 Cambios en el cerebro con EA
 - 1.2.1 Cambios microscópicos
 - 1.2.1.1 Placas seniles
 - 1.2.1.2 Marañas neurofibrilares
 - 1.2.1.3 Angiopatía cerebral amiloide
 - 1.2.1.4 Pérdida sináptica
 - 1.2.2 Cambios macroscópicos
 - 1.3 La proteína precursora amiloide
 - 1.4 El péptido β amiloide
 - 1.5 Hipótesis de la cascada amiloide
 - 1.6 Péptidos aminotruncados
 - 1.6.1 β A piroGlu11-42
 - 1.7 Diagnóstico
 - 1.8 Terapias para la EA
 - 1.8.1 Inmunoterapia
 - 1.8.1.1 Mecanismos de acción de la inmunoterapia
 - 1.9 Modelos no humanos de la EA
- 2 Antecedentes
- 3 Justificación y objetivos
 - 3.1 Justificación
 - 3.2 Objetivo general
 - 3.2.1 Objetivos particulares
- 4 Material y métodos
 - 4.1 Material biológico
 - 4.2 Administración del inmunógeno
 - 4.3 Obtención de sueros

- 4.4 Preparación de tejido cerebral
 - 4.5 Preparación de los péptidos
 - 4.6 Inmunofluorescencia
 - 4.7 Conteo del área cubierta por placas amiloides
 - 4.8 Preparación de homogenizados de cerebro
 - 4.9 Cuantificación de proteínas
 - 4.10 Evaluación de la presencia de anticuerpos en suero mediante ELISA
 - 4.11 Determinación de isotipos de IgG mediante ELISA
 - 4.12 Determinación de reactividad cruzada mediante ELISA
 - 4.13 Evaluación de reactividad cruzada mediante western blot
 - 4.14 Dot blot para evaluar la carga amiloide mediante
 - 4.15 Prueba del nido
 - 4.16 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo
 - 4.17 Análisis estadístico
- 5 Resultados
- 5.1 Evaluación de la presencia de anticuerpos anti A β 1-42 y anti A β pE11-42 en el suero de ratones C57BL/6 a través del tiempo.
 - 5.2 Reconocimiento de tres péptidos amiloides por sueros anti A β 1-42 y anti A β pE11-42
 - 5.3 Evaluación de la presencia de anticuerpos anti A β pE11-42 en el suero de ratones 3xTg-AD viejos a través del tiempo
 - 5.4 Pruebas de conducta en ratones 3xTg-AD viejos
 - 5.4.1 Prueba de construcción de nido
 - 5.4.2 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo
 - 5.5 Análisis de la carga amiloide en cerebros de ratones 3xTg-AD viejos
 - 5.6 Evaluación del área cubierta por placas amiloides microglía en el cerebro de los ratones 3xTg-AD de 18 meses.
 - 5.7 Análisis de la ubicación de las placas amiloides con respecto a la microglía en el cerebro de los ratones 3xTg-AD de 18 meses.
 - 5.8 Evaluación de la presencia de anticuerpos anti A β pE11-42 en el suero de ratones 3xTg-AD jóvenes a través del tiempo.
 - 5.9 Estudio de los isotipos de anticuerpos IgG anti A β pE11-42 en el suero de ratones 3xTg-AD jóvenes.

5.10 Reactividad cruzada de los sueros anti A β pE11-42
producidos en ratones 3xTg-AD jóvenes.

5.11 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo en ratones
3xTg-AD jóvenes.

- 6 Discusión
- 7 Conclusiones
- 8 Perspectivas

A mis abuelos

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por más de diez años de educación y por permitirme ser parte de ella.

A la Facultad de Ciencias por todas sus enseñanzas, buenas y malas y particularmente, por toda la gente que conocí mediante ella.

A la Dra. Gohar por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme en mis proyectos.

Al Biól. Gonzalo por hacer cada momento en el laboratorio más agradable y contestar todas mis preguntas extrañas.

A mis papás y a mi hermano por su cariño y apoyo incondicional, me temo que no tengo palabras para decirles cuánto se los agradezco.

A mi familia por su cariño y enseñanzas, estoy orgullosa de ser parte de ustedes.

A Pau, Gera y Erick porque ni la facultad ni mi vida hubieran sido lo mismo sin ustedes.

A mis hermanas Nelly y Karen y al resto de nuestra peculiar familia en Nuevo México por tantas experiencias compartidas en tan poco tiempo.

A Jess, Moni y Anita, que a pesar del poco tiempo que llevan en mi vida, han tenido un gran impacto.

A Brian por su apoyo para terminar este escrito, así como en el resto de la vida. Gracias por tanto.

A todos esos amigos como Ángel, Adrián, Gloria de tantos años que a pesar del paso del tiempo siguen siendo tan importantes como antaño.

A todas las personas con las que he coincidido durante mi vida académica, que me han ayudado a crecer más de lo que se imaginan y que no olvido, pero que sería imposible mencionar aquí.

Abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
EAIP	Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz
EAIT	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
APP	Proteína precursora amiloide
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
AB	Péptido beta amiloide
NFT	Marañas neurofibrilares
QC	Glutaminil ciclasa
APOE	Apolipoproteína E
CAA	Angiopatía cerebral amiloide
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
MP	Membrana plasmática
RE	Retículo endoplásmico
AICD	Dominio intracelular de APP
CTF	Fragmento carboxilo-terminal
CSF	Líquido cefalorraquídeo
ABPE11-42	Péptido beta amiloide piroglutamado en la posición 11
BAPE3-42	Péptido beta amiloide piroglutamado en la posición 3

Resumen

Se evaluó la capacidad protectora de la inmunización activa con el péptido A β piroGlu11-42 en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer 3xTg-AD en diferentes edades.

La inmunización de ratones silvestres C57BL/6J de 6 a 8 semanas con A β piroGlu11-42 y A β 1-42 demostró la capacidad de estos animales de desarrollar una respuesta inmune humoral en contra de dichos péptidos, evidenciada por la presencia de anticuerpos de clase IgM e IgG contra ambos péptidos. Al evaluarse la reactividad cruzada de los sueros anti- A β 1-42 y anti- A β piroGlu11-42 contra A β 1-42, A β piroGlu3-42 y A A β piroGlu11-42 se encontró que el suero anti-A β 1-42 reconocía únicamente a su inmunógeno, es decir a A β 1-42, mientras que el suero anti- A β piroGlu11-42 era capaz de reconocer a diferentes formas de agregación de los tres péptidos.

La evaluación de la capacidad protectora del péptido A β piroGlu11-42 en ratones transgénicos 3xTg-AD de 12 meses, que produjeron anticuerpos de clase IgM e IgG contra el péptido A β piroGlu11-42, no demostró diferencias significativas en la memoria a corto plazo, respecto al control, mediante una prueba de reconocimiento de objeto nuevo a los 18 meses de edad. Tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos en la carga amiloide ni el área cubierta por placas amiloides. Se propone que la ausencia de efectos observables por el tratamiento se debe a la edad avanzada en la que se dio inicio a la inmunización.

En un segundo grupo de ratones 3xTg-AD, se procedió a evaluar si, empezando el tratamiento en una edad más temprana (6 meses), se observaba un efecto benéfico. Se demostró su capacidad de producción de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-A β piroGlu11-42 y la reactividad cruzada del suero anti-A β piroGlu11-42 contra A β 1-42, A β piroGlu3-42 y A β piroGlu11-42. Las pruebas conductuales realizadas a los 11 y 17 meses mostraron diferencias significativas, en donde el grupo experimental obtuvo mejores resultados, lo cual sugiere el uso potencial de A β piroGlu11-42 en un esquema de inmunización activa y como un potencial blanco para ser evaluado en terapias para la enfermedad de Alzheimer.

1 Introducción

1.1 La Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo e irreversible que lleva a la pérdida de habilidades como la memoria y el pensamiento y que, finalmente, incapacita al individuo para realizar hasta las tareas cotidianas más simples. Es la forma más común de demencia y comprende aproximadamente dos tercios de todos los casos de demencia (LaFerla & Freen, 2012). En la EA, el daño y la muerte de las células del cerebro afectan habilidades básicas corporales como caminar o tragar. Los pacientes que están en las etapas finales de la enfermedad se ven obligados a permanecer encamados y requieren cuidados ininterrumpidos y, finalmente, la enfermedad resulta fatal (Korolev, 2014).

1.1.1 Historia

En el año de 1907, el doctor Alois Alzheimer describió por primera vez el cuadro clínico de una paciente de 51 años, Auguste D. ingresada a la Institución para Enfermos Mentales y Epilépticos de Fráncfort del Meno en noviembre de 1901, que presentaba desorientación espacio-temporal aunada a una rápida pérdida de memoria. El examen *post-mortem* reveló un cerebro atrófico, así como una patología neurofibrilar ampliamente extendida y depósitos inusuales en la corteza, las principales características histopatológicas de la enfermedad que consideramos actualmente como marcadores definitivos para el diagnóstico confirmatorio. Éstas reciben los nombres de: placas de péptido β amiloide ($A\beta$) y marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) de la proteína tau hiperfosforilada (Alzheimer, 1907).

1.1.2 La demencia

“Demencia” es un término utilizado para referirse a un síndrome clínico (un grupo de signos y síntomas que ocurren de manera simultánea) que se caracteriza por el declive gradual de las capacidades intelectuales -como la memoria, el lenguaje o el aprendizaje- en los

pacientes y que afecta su capacidad de llevar a cabo sus actividades diarias en mayor o menor medida, dependiendo de su gravedad.

Existen varios tipos de demencia, cada una de las cuales se asocia con una constelación de síntomas o afecciones cerebrales determinadas. No obstante, algunos estudios han revelado mediante observación a largo plazo y autopsias que, sobre todo en los grupos de gente de edad avanzada, en alrededor de la mitad de los casos se pueden encontrar alteraciones correspondientes a más de un tipo de demencia (conocida como “demencia combinada”) y la probabilidad de padecerla aumenta con la edad. Entre los tipos que suelen combinarse, podemos mencionar en primer lugar a la demencia vascular cuya evidencia patológica muchas veces coexiste con aquella de la EA. La segunda combinación más frecuente es la de la EA con la demencia con cuerpos de Lewis y la tercera según su frecuencia es la triada de la demencia vascular con la EA y la demencia con cuerpos de Lewis. Hasta la fecha, no existe cura para la EA ni ningún otro tipo de demencia (Alzheimer’s Association, 2016).

1.1.3 Bases genéticas de la enfermedad

De acuerdo con su heredabilidad, la EA se clasifica en dos grupos: EA familiar, que comprende aquellos casos en donde por lo menos dos generaciones de la familia han desarrollado la patología y representa un número minoritario de casos (entre el 1% y 6%) y la EA esporádica que es mucho más común, pero con múltiples factores de riesgo y etiología desconocida. El primer estudio formal sobre la aglomeración de pacientes con EA en algunas familias lo publicaron Sjörger y colaboradores en 1952 y desde entonces se ha demostrado en múltiples ocasiones que la EA se presenta con una alta frecuencia en los parientes de los pacientes con dicha enfermedad (Sjögren, et al., 1952).

En México se han reportado hasta el momento 11 familias con EA que exhiben un patrón autosómico dominante en su herencia (Alonso-Vilatela, et al., 2012). Se reconocen dos subtipos de la enfermedad de acuerdo con la edad a la que comienza: la EA de inicio precoz (EAIP) y la EA de inicio tardío (EAIT). En la primera el rango de edad es de entre 30 y 65 años y en la segunda engloba a personas que comienzan a exhibir los síntomas entre los 60 y 65

años de edad. Ambas formas pueden ocurrir en personas con historial familiar de padecimiento de EA (EA familiar). El 60% de los casos de pacientes con EAIP tienen múltiples familiares con EA y el 13% de ellos se heredan de manera autosómica dominante, afectando al menos a tres generaciones. No obstante, en las familias con EAIT también puede ocurrir la EAIP. La mayoría de los casos de EA se deben a un complejo desorden en la interacción de múltiples genes de susceptibilidad y factores ambientales, aunque unos pocos se deben a cambios en un solo gen. (Bekris, et al., 2010).

La EAIT es un desorden complejo con etiología heterogénea, su potencial hereditario es de 70 a 80%. Sin embargo, la EAIP posee un componente genético muy fuerte, lo que queda demostrado por hecho de que su respectivo potencial hereditario va desde 92 hasta 100% (Wingo, et al., 2012). Los genes que se han asociado con la EA autosómica dominante hasta el momento son tres: el gen de la proteína precursora amiloide (APP), el gen de la presenilina 1 (PSEN1) y el gen de la presenilina 2 (PSEN2) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes relacionados con la EAIP. Adaptada de Cacace, *et al.*, 2016 y de Alonso-Vilatela, *et al.*, 2012.

Gen	Locus	Proteína	Herencia	Edad de inicio (años)	Contribución a formas heredadas	Mutaciones (N)
APP	21q21.1– 21q21.3	Beta amiloide A4	Autosómica dominante	40-60	≤5%	54
PSEN1	14q24.3	Presenilina-1	Autosómica dominante	30-58	≤50-75%	215
PSEN2	1q31-q42	Presenilina-2	Autosómica dominante	45-88	≤1%	31

A continuación, se describen brevemente los tres genes previamente mencionados, así como su impacto sobre el desarrollo de la EA:

et al., 1992; Sherrington, et al., 1995). Las mutaciones en él son la causa más común de la EA familiar y representan entre el 18 y el 50% de los casos autosómicos dominantes de EAIP (Theuns, et al., 2000). Se han identificado más de 180 mutaciones, la mayoría parecen ser de pérdida de sentido y causan sustituciones de aminoácidos a lo largo de la proteína (Cruts, et al., 2012); gran parte de las mutaciones anteriormente mencionadas presentan penetrancia génica completa (es decir que el 100% de los individuos de una población presenta el fenotipo asociado a su genotipo) aunque también se han descrito algunas de penetrancia génica incompleta, en donde no todos los individuos lo presentan (Rossor, et al., 1996). La presenilina 1 es una proteína membranal que forma parte del sitio catalítico del complejo de γ -secretasa, es una proteína integral de membrana que suele encontrarse en la superficie de la célula, pero también en algunos organelos como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias. El resultado de las mutaciones en PSEN1 es que aumenta la proporción $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, la primera proteína tiene 42 aminoácidos de longitud y la segunda 40, y su relación es importante porque la primera es más propensa a agregarse, además de que resulta más tóxica (Dong-Hee, et al., 2014).

- III. Presenilina 2: El gen PSEN2 se encuentra en el cromosoma 1 y recibió su nombre por su gran similitud con la Presenilina 1 tanto en su secuencia como en la estructura de la proteína (Cruts, et al., 1996). Las mutaciones de pérdida de sentido en este gen tienen penetrancia génica variable dependiendo de su ubicación, pero en general, menor a la de aquellas en PSEN1 (Sherrington, et al., 1996), de hecho, solo el 5% de los casos familiares de EAIP se atribuyen a mutaciones en su secuencia (Bird, 2012). La Presenilina 2 ha sido descrita como parte de las moléculas que forman a la aspartil proteasa γ -secretasa. Aún no está bien clara la función de PSEN2 sobre la enfermedad de Alzheimer, pero recientemente se encontró evidencia de que el gen mutado incrementa la actividad de β -secretasa mediante la activación de cinasas

reguladas por señales extracelulares dependientes de especies reactivas de oxígeno (Park, et al., 2012)

Otros marcadores genéticos asociados con la EA

El gen *APOE* ha sido asociado con la EAIT familiar y la EAIT esporádica en numerosos estudios realizados en diferentes grupos étnicos. Codifica a la proteína apolipoproteína E (*APOE*), una de las principales proteínas acarreadoras de colesterol que además transporta lípidos y ayuda en la reparación de heridas en el cerebro; en los humanos, el gen *APOE* tiene tres alelos polimórficos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ con una frecuencia mundial de 8.4%, 77.9% y 13.7%, respectivamente (Liu, et al., 2013). La frecuencia del último incrementa de manera dramática hasta el 40% en pacientes con EA (Farrer, et al., 1997). Corder *et al.*, demostraron que, de los posibles genotipos, que supone el menor riesgo para que una persona desarrolle EA es $\epsilon 2/\epsilon 3$, en donde el alelo $\epsilon 2$ tiene incluso efecto protector (Corder, et al., 1994). En 1991 se identificó por primera vez un locus de riesgo para el desarrollo de EAIT en el cromosoma 19, el alelo $\epsilon 4$ de la *APOE* (Pericak-Vance, et al., 1991). El hecho de poseer el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo de presentar EAIT entre 3 y 15 veces de manera dosis dependiente pero también puede incrementar el riesgo de EAIP en los portadores que tienen por lo menos una copia (Saunders, et al., 1993). Resulta interesante que en los portadores del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* homocigotos, el riesgo de padecer la EAIP incrementa significativamente de manera independiente de otros factores genéticos (Corder, et al., 1993; Cacace, et al., 2016). Por otro lado, en aquellos portadores heterocigotos para el mismo alelo el riesgo para la EAIP incrementa significativamente solo en aquellos casos con historia familiar positiva para la enfermedad, lo que sugiere que la presencia de un solo alelo no es suficiente para incrementar el riesgo antes de los 65 años de edad (van Duijn, et al., 1994; Farrer, et al., 1997).

Hasta el momento se han publicado dos estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) gracias a los cuales se han podido mapear variantes comunes de riesgo en >20 loci genéticos (Harold, et al., 2009; Lambert, et al., 2009). Adicionalmente, la secuenciación de nueva generación está utilizándose para identificar

variantes raras (con frecuencia alélica menor al 1% en la población general) que tengan fuertes efectos sobre genes nuevos o ya asociados con EAIT (Steinberg, et al., 2015; Jonsson, et al., 2013).

1.1.4 Epidemiología

La EA es la primera causa de demencia a nivel mundial; en los Estados Unidos de América solamente, se han reportado alrededor de 5 millones de casos de pacientes con EA equivalentes a 1 individuo afectado por cada 9 en personas mayores a 65 años de edad. De acuerdo con el reporte mundial sobre la EA, en el año 2015 se estimó que había 46.8 millones de personas alrededor del mundo viviendo con esta enfermedad. En 20 años, se ha predicho que la cifra se duplicará pues se calcula que al año aparecen 9.9 millones de casos nuevos. De la primera cifra, aproximadamente el 58% de esas personas viven en países clasificados por el Banco Mundial como de bajos o medianos ingresos. Por su parte, la prevalencia mundial estimada de la demencia varía dependiendo de la región entre 4.6% en Europa central hasta 8.7% en el Norte de África y Medio Oriente, en Latinoamérica, la prevalencia alcanza hasta el 8% (Prince, et al., 2015; Alzheimer's Association, 2016).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Geriatría en 2014, en México había más de 10 millones de adultos mayores de 60 años aunque se piensa que esta cifra subestima la cantidad de casos reales en población mexicana, y, teniendo en cuenta uno de los factores de riesgo para desarrollar la EA, esto supone un riesgo importante para la población. La población mexicana ha experimentado un proceso acelerado de transición demográfica. En el año de 2014, el promedio de vida era de 76 años, y se espera que para el 2050 rebase los 80 años de edad. Así mismo la natalidad se ha reducido de una manera considerable (González-González & López-Esqueda, 2014).

Dados los escasos datos sobre la prevalencia de la EA en el país, la prevalencia de la demencia se puede usar para estimar su alcance y distribución ya que representa entre el 60 y el 70% de los casos de demencia: en 2014 se estimaba que era de 800 000 habitantes y la proyección para 2050 indica que alcanzará los 3 millones (Gutiérrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). En la tabla 2 se muestra un estudio realizado en 2008 por Llibre y colaboradores

que establece la prevalencia de la demencia en México con respecto a dos factores de riesgo que son la edad y el sexo. La prevalencia de la demencia era de 7.4% en zonas urbanas y 7.3 en zonas rurales (Llibre-Rodríguez, et al., 2008). En general, los datos confirman que la prevalencia de la EA incrementa con la edad, además de ser más común en las mujeres hasta antes de los 80 años. La EA se presenta con mayor frecuencia en los hombres después de dicha edad. Asimismo, se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el nivel de educación de los individuos y la frecuencia con que manifiestan demencia (Mejía-Arango & Gutierrez, 2011).

Tabla 2. Prevalencia de demencia (IC 95%) por grupo de edad y sexo según el área de residencia en México. Tomada de (González-González & López-Esqueda, 2014)

<i>Área por sexo</i>	<i>65-69 años</i>	<i>70-74 años</i>	<i>75-79 años</i>	<i>≥ 80 años</i>	<i>Prevalencia cruda IC 95%</i>	<i>Prevalencia estandarizada^a</i>
<i>Urbana</i>						
<i>Hombres</i>	0	5.1% (1.1–9.1)	3.8% (0.0–8.1)	16.3% (7.5–25.0)	8.6% (6.8–10.4)	7.4% (5.9–8.9)
<i>Mujeres</i>	0.5% (0.0–1.6)	4.3% (1.5–7.0)	13.5% (7.4–19.5)	25.2% (18.1–32.3)		
<i>Rural</i>						
<i>Hombres</i>	0	2.9% (0.0–6.2)	6.9% (1.5–12.3)	20.7% (12.9–28.6)	8.5% (6.7–10.3)	7.3% (5.7–9.0)
<i>Mujeres</i>	2.0% (0.1–4.0)	6.0% (2.2–9.9)	9.7% (4.6–14.8)	22.9% (15.3–30.6)		

1.1.5 Sintomatología

Al igual que la mayoría de las enfermedades, la EA afecta de manera diferente a cada persona. La constelación de síntoma es la misma en las diferentes variantes de la enfermedad (EAIP, EAIT, EAF), las variaciones se encuentran en la edad en la que aparecen

y en la velocidad con la que progresan. El síntoma inicial más común es la dificultad para recordar información nueva que empeora con el tiempo y algunos de los síntomas más comunes son los siguientes (Alzheimer's Association, 2016):

- Pérdida de memoria que afecta la vida diaria
- Problemas para planear actividades o resolver problemas.
- Confusión respecto al tiempo o lugar en que se encuentra.
- Dificultad para entender imágenes y relaciones espaciales.
- Problemas nuevos con palabras al hablar o al escribir.
- Dejar objetos en un lugar que no les corresponde y pérdida de la capacidad de “volver sobre sus propios pasos”.
- Empobrecimiento del juicio.
- Alejarse de actividades sociales o del trabajo.
- Cambios de humor y/o personalidad como apatía y depresión.

De la misma manera que la sintomatología, la velocidad con que progresa la EA varía entre individuos y la pérdida paulatina de capacidades los hace propensos a otras enfermedades. Por ejemplo, se ha demostrado que las infecciones agravan y aceleran el proceso patológico de la enfermedad. De la misma manera, los pacientes con EA son más propensos a padecer enfermedades infecciosas y tienen mayor probabilidad de requerir ingresar a un hospital para su tratamiento. De hecho, la neumonía es la principal causa de muerte entre los pacientes con EA (Montacute, et al., 2017).

1.2 Cambios en el cerebro del paciente con EA

1.2.1 Cambios microscópicos

Algunas de las lesiones más estudiadas son: las placas seniles, las marañas neurofibrilares, la angiopatía cerebral amiloide y la pérdida sináptica. No obstante, existen otras como la degeneración granulovacuolar o los cuerpos de Hirano (Perl, 2010).

1.2.1.1 Placas seniles

Las placas seniles son estructuras complejas caracterizadas por la presencia del péptido β A en su núcleo que se localizan en el espacio extracelular de las neuronas en el cerebro. De acuerdo con su morfología, las placas seniles se clasifican en placas compactas y placas difusas. Las primeras están formadas por un núcleo de agregados de amiloides fibrilares que se proyectan hacia la periferia en donde interaccionan con prolongaciones de neuronas en proceso de degeneración (distróficas), astrocitos y microglía. Aquellas placas que se encuentran completamente formadas contienen el tipo de núcleo anteriormente descrito rodeado por neuronas que se están degenerando (neuritas distróficas). Por otra parte, las placas difusas carecen de neuritas rodeándolas y se distribuyen por el cerebro (Tschanz, 2011).

Las placas seniles se encuentran también en el cerebro de individuos ancianos sin demencia, pero en menor cantidad y generalmente no cumplen con el criterio para el diagnóstico de EA. Asimismo, se ha demostrado que los núcleos de las placas contienen diferentes clases de proteínas, además de los péptidos amiloides, como heparán sulfato, apolipoproteína E, proteínas del complemento, entre otras (Perl, 2010).

1.2.1.2 Marañas neurofibrilares

A nivel ultra estructural, las marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) se componen de fibrillas de ≈ 10 nm de diámetro que suelen estar enredadas en parejas de manera helicoidal. Se forman por la proteína tau hiperfosforilada, que es una proteína asociada a microtúbulos expresada principalmente en neuronas que juega un papel importante en estabilizar al citoesqueleto. El mecanismo celular responsable de tal anomalía aún no es claro y tampoco si estas lesiones son un factor causal de la enfermedad de Alzheimer o si más bien son daño colateral. La fosforilación de tau es regulada por el balance entre la actividad de tau cinasa y fosfatasa de tal manera que se ha propuesto que la perturbación de dicho equilibrio sea el origen de la fosforilación anormal de la proteína (Martin, et al., 2013). La proteína tau es capaz de sufrir diversas modificaciones post traduccionales, la más común de ellas es la fosforilación con 85 sitios putativos dentro de su cadena -de los cuales, 28 se encuentran fosforilados únicamente en pacientes con EA-,

pero muchas han sido propuestas como implicadas en su agregación durante la EA (Martina, et al., 2011).

Las NFT tienen asociadas otras proteínas como la ubiquitina, colinesterasa e incluso péptidos amiloides. La distribución de las NFT sigue un patrón bastante predecible: tienen importante presencia en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, en CA1, en amígdala y las capas más profundas de la neocorteza. Por otra parte, se ha demostrado que la distribución y extensión de las NFT en pacientes con EA correlaciona con la progresión de la enfermedad tanto en el grado de la demencia como en la duración por lo que se ha propuesto como biomarcador.

1.2.1.3 Angiopatía cerebral amiloide (CAA)

También es conocida como angiopatía cerebral congófica por la capacidad del colorante rojo Congo de unirse a las lesiones cerebrovasculares y parenquimales. Las lesiones previamente mencionadas se deben a la acumulación del péptido A β en las paredes de pequeñas arterias y arteriolas de las leptomeninges y en la materia gris de la corteza cerebral. Los depósitos parenquimales están compuestos principalmente por A β 42, al igual que aquellos en la red capilar mientras que los depósitos vasculares (especialmente aquellos en vasos de las leptomeninges) contienen una mayor cantidad de péptidos A β 40 organizados en capas concéntricas que remplazan capa celular de músculo liso; por su parte, los depósitos amiloides en las arteriolas y pequeñas arterias corticales se forman por una mezcla de ambas especies. Las razones y la importancia de la presencia de este patrón de distribución de los péptidos amiloides todavía son poco claras (Ghisso, et al., 2010). La acumulación del péptido no parece interferir con las funciones de los vasos sanguíneos hasta que se vuelve severa, pues se genera una tendencia a la ruptura vascular espontánea que lleva a la acumulación focal de sangre en el tejido cerebral. Dichas hemorragias suelen ser pequeñas (incluso microscópicas) y múltiples, y ocurren en la materia blanca de los polos frontal y/u occipital. Aunque es relativamente raro, las hemorragias también pueden ser grandes y múltiples y se llaman hemorragias lobares y representan una de las pocas complicaciones intracerebrales fatales de la EA (Perl, 2010).

1.2.1.4 Pérdida sináptica

Con la progresión de la EA, se observa un declive en la función cognitiva, la pérdida y disfunción sináptica y la muerte neuronal aumentan y el cerebro reduce su tamaño importantemente sobre todo en el hipocampo y la corteza entorrinal (Sheng, et al., 2012). Las sinapsis consisten principalmente de membranas neuronales y las pérdidas de ambas (sinapsis y neuronas) que ocurren en la EA se ha relacionado con la degeneración y alteración en la composición y estructura de dichas membranas (Pettegrew, et al., 2001). La pérdida sináptica en los cerebros de pacientes con la EA es sustancial en las regiones mesiotemporales. Incluso en los pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI, un estado transicional entre el envejecimiento normal y la demencia) presentan una pérdida sináptica considerable. De hecho, otros eventos neuropatológicos como las placas amiloides o las marañas neurofibrilares no son buenos predictores de la progresión de la EA, pero la pérdida sináptica es la que mejor se correlaciona con la disfunción cognitiva en la enfermedad. También es importante mencionar que la pérdida sináptica es mayor en las áreas cercanas a las placas amiloides, lo que sugiere que estas probablemente contengan elementos sinaptotóxicos. Se ha demostrado que los oligómeros de A β inhiben la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), un evento electrofisiológico que se relaciona con la formación de recuerdos. Asimismo, esta forma de A β , el A β oligomérico también es capaz de facilitar la inducción de depresión a largo plazo (LTD) en sinapsis del hipocampo (Koffie, et al., 2011).

1.2.2 Cambios macroscópicos

No hay ninguna señal macroscópica en el cerebro de los pacientes con EA que permita diferenciarlos de aquellos cerebros de individuos ancianos que tuvieron funciones cognitivas normales; los cerebros de la mayoría de los pacientes con EA exhiben un leve grado de atrofia cerebral cortical principal -pero no exclusivamente- en la corteza de asociación frontotemporal. Al intentar medir características como el peso del cerebro o el grosor de la corteza cerebral, prácticamente no hay diferencias entre pacientes que padecen EAIT y controles sanos de la misma edad por lo que difícilmente se pueden tomar

estos parámetros como características diagnósticas. No obstante, en el caso de los cerebros de pacientes con EAIP la diferencia en el peso y/o el grado de atrofia en la corteza cerebral sí revela significativas diferencias cuando se compara con controles sanos de la misma edad (Perl, 2010).

1.3 La proteína precursora amiloide (APP)

La proteína precursora amiloide APP pertenece a una familia de proteínas que contiene a otros dos miembros: la proteína tipo-APP 1 (APLP1) y proteína tipo-APP 2 (APLP2) en mamíferos. Se trata de una familia de proteínas antigua y evolutivamente muy conservada en eucariontes multicelulares desde la divergencia entre protostomados y deuterostomados (Coulson, et al., 2000). Las tres proteínas son de tipo I, es decir, transmembranales de un solo paso con su región amino terminal orientada hacia el lumen o espacio extracelular y su C-terminal dentro del citosol y poseen estructuras similares y tienen funciones en común como la mediación de la adhesión célula-célula y la comunicación celular, sin embargo, A β solo puede ser producido a partir de APP (Caldwella, et al., 2013). El splicing alternativo de la APP puede dar lugar a diferentes isoformas en mamíferos, las 3 principales son APP₆₉₅, APP₇₅₁ y APP₇₇₀, de acuerdo con el número de aminoácidos que presentan. La primera de ellas, APP₆₉₅ se expresa predominantemente en el sistema nervioso central mientras que las otras dos son proteínas de expresión ubicua. Las dos isoformas más largas contienen un dominio de homología de Inhibidor de la Proteasa Kunitz (KPI) de 56 aminoácidos de longitud dentro de su parte extracelular. Como se mencionó anteriormente, la isoforma APP₆₉₅ es la predominante en el sistema nervioso central y se cree que puede estar involucrada en la formación de las neuritas distróficas (O'Brien & Wong, 2011). Es de notarse el hecho de que no en todas las especies se genera el péptido A β 42 ni otros de los péptidos derivados del procesamiento de APP y se cree que esto puede estar relacionado con el ambiente fisiológico de cada especie, que parece ser tan crítico para la formación del péptido como la propia secuencia de aminoácidos (Tharp & Sarkar, 2013).

El papel fisiológico de APP aún no ha sido del todo esclarecido, hasta el momento se tiene evidencia para al menos 14 funciones, algunas de las cuales son: regular la formación de sinapsis, mediar el transporte neuronal anterógrado, regular el estrés oxidante en las neuronas, es una proteína de adhesión celular y migración neuronal que participa durante el desarrollo, facilita la señalización interneuronal, es un factor asociado a la plasticidad neuronal y la memoria, mediador en la regulación hormonal en humanos, es un factor de crecimiento de la superficie celular, entre otras funciones. *Grosso modo*, las funciones que se le han atribuido a la proteína precursora amiloide hasta el momento, se pueden dividir en neurotróficas o amiloidogénicas y patológicas (Zhao, et al., 2015). Para evaluar si la en los ratones resulta deletérea, se han creado modelos deficientes en APP, APLP1 y APLP2. Al provocar mutaciones en un solo gen, los ratones son viables y fértiles (Heber, et al., 2000). Sin embargo, las dobles mutaciones causan la muerte postnatal temprana, pero sin alteraciones morfológicas en algunos individuos, lo que sugiere una función parcialmente redundante y esencial de las proteínas de la familia APP. Aquellos individuos dobles mutantes que sobreviven, presentan otras patologías como déficit en la formación de sinapsis neuromusculares en ratones $APP^{-/-}APLP2^{-/-}$ (Wang, et al., 2005). Respecto a los triples mutantes, el porcentaje de sobrevivencia es muy bajo (0.6%) y de ellos, el 81% presentan anormalidades craneanas (Herms, et al., 2004).

El tráfico de la APP en una célula no polarizada se ilustra en la figura 2. Mientras que APP está migrando desde el retículo endoplásmico (RE) hasta la membrana plasmática (MP), es

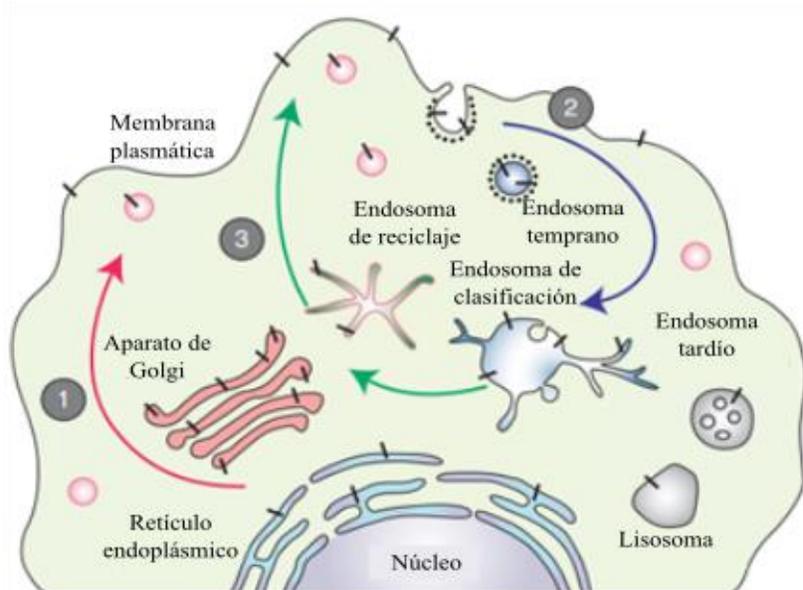


Figura 2. Vías de tráfico de APP en una célula de mamífero no polarizada. Las líneas negras simbolizan las moléculas de APP que se están generando y que maduran mediante la vía secretora constitutiva (1). Una vez en la superficie, es rápidamente internalizada (2) y pasa por organelos endocíticos y de reciclaje a la red trans Golgi o a la superficie celular (3) Modificada de Haass, et al., 2012.

modificada postraduccionalmente por N- y O-glicosilación, fosforilación citoplasmática y de ectodominio y sulfatación de tirosina. Es solo un pequeño porcentaje de la APP que se produce el que llega a la MP ($\approx 10\%$), la mayor parte se encuentra en el aparato de Golgi y la red trans-Golgi. Una vez que ha salido del aparato de Golgi, la APP puede ser transportada a la superficie de la célula o a un compartimento endosómico mediante vesículas. Cuando APP no se desprende de la superficie celular, es internalizada nuevamente tras algunos minutos por la presencia del motivo de internalización YENPTY en su C-terminal. Después de la endocitosis, APP pasa a endosomas y parte de esas moléculas se recicla a la superficie celular, mientras que otra pequeña fracción es degradada dentro de los lisosomas (Haass, et al., 2012).

Durante su paso hacia la superficie celular y en la vía endocítica, APP sufre proteólisis por enzimas secretasas, la cual puede desembocar en la liberación de $A\beta$ o de otro péptido no tóxico llamado APP soluble (sAPP). En el primer caso, APP puede ser procesada en la superficie celular directamente por α -secretasa y γ -secretasa sin generar $A\beta$; en el segundo caso, APP es reinternalizada en pozos cubiertos por clatrina hacia otros compartimentos endosómicos que contienen a las proteasas BACE1 y γ -secretasa, resultando en la

producción de A β que se libera al espacio extracelular después de que la vesícula se recicla o se degrada en los lisosomas (Vassar, et al., 1999; O'Brien & Wong, 2011).

La primera de éstas dos vías se conoce como amiloidogénica y la segunda como no amiloidogénica (Fig. 3). Ambas se expresan de manera constitutiva en el cerebro, pero la proporción en la que se lleva a cabo cada una es uno de los factores determinantes para la formación de placas, la proporción se ve sesgada hacia la vía amiloidogénica bajo condiciones patológicas

En la vía amiloidogénica (Fig 3c), APP es cortada entre los aminoácidos metionina 596 y aspartato 597, sitio en donde se encuentra el primer aminoácido de A β (Asp 1) por la enzima BACE1 (enzima de corte amiloide en el sitio β o β -secretasa) una aspartil proteasa descubierta por diferentes grupos de investigación entre 1999-2000 (Cole & Vassar, 2007). En seguida del corte, se libera un fragmento de APP soluble cortado en el sitio β (sAPP β) y queda otro fragmento C-terminal (CTF) de 99 aminoácidos –conocido como C99- unido a la membrana. Posteriormente, C99 sufre un corte proteolítico en su región intramembranal por un complejo llamado γ -secretasa (que incluye a las presenilinas) para liberar al péptido A β de longitud completa, llamado de esta manera porque su secuencia comienza desde el residuo de ácido aspártico en el extremo N-terminal. El procesamiento amiloidogénico requiere el tránsito de APP por los organelos endocíticos para poder ser procesada por β -secretasa (Haass, et al., 2012)

Por otra parte, en la vía no amiloidogénica (Fig 3b), APP es cortada por una α -secretasa justo dentro de la región A β dando como resultado la liberación del fragmento de APP soluble cortado en el sitio α (sAPP α). El CTF que permanece en la membrana en este caso es de 83 aminoácidos y recibe el nombre de C83. C83 se procesa por γ -secretasa y culmina con el desprendimiento de p3. En ambos casos, la actividad de γ -secretasa sobre APP puede liberar un fragmento del dominio intracelular de APP (AICD). Posterior a la síntesis del péptido o durante la misma, este puede sufrir modificaciones en la región N-terminal. Mientras que A β es neurotóxico, hay evidencia que apunta hacia el papel neuroprotector de sAPP α pues juega un papel importante en la plasticidad y supervivencia neuronal (Zhang, et al., 2011).

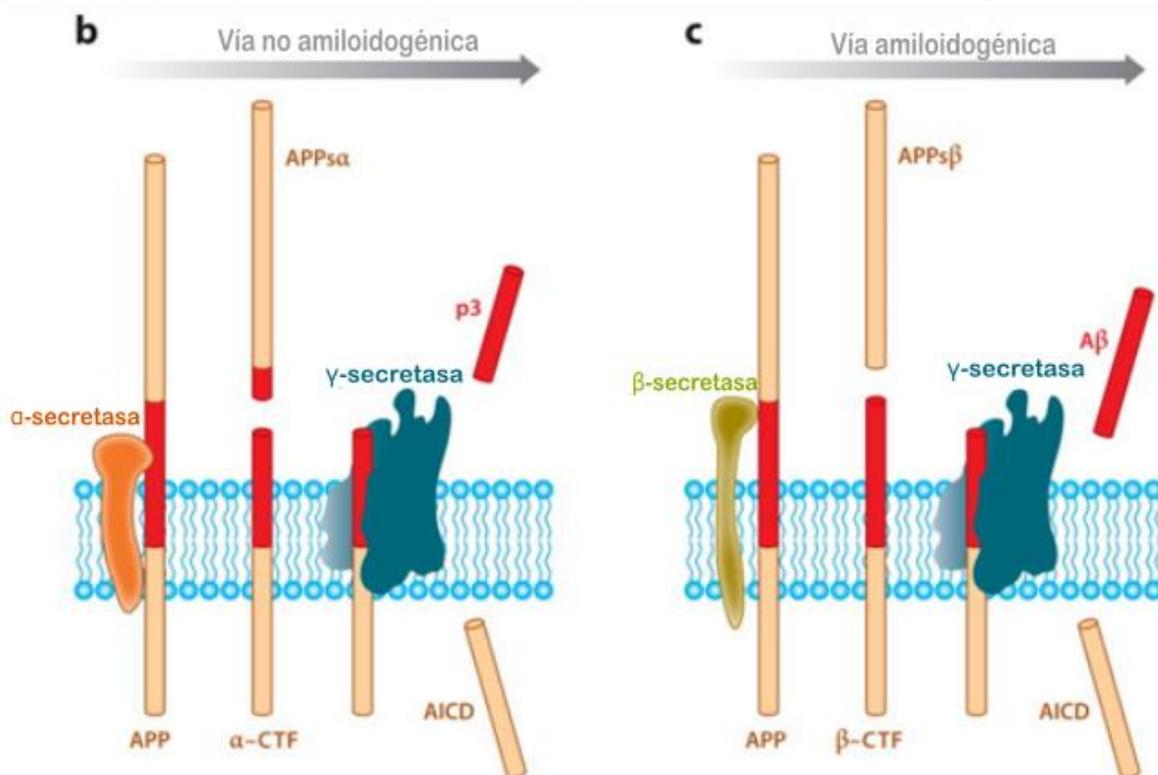


Figura 3. El corte proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) se puede dar por una de dos posibles vías: amiloidogénica y no amiloidogénica. AICD: dominio intracelular de APP, por sus siglas en inglés; α -CTF: fragmento carboxilo terminal después del corte por α -secretasa; β -CTF: fragmento carboxilo terminal después del corte por β -secretasa; APPs α : fragmento soluble de APP después del corte por α -secretasa; APPs β : fragmento soluble APP después del corte por β -secretasa. Modificada a de O'Brien & Wong, 2011

El procesamiento no amiloidogénico por su parte, ocurre principalmente en la superficie celular, que es donde se encuentra la mayor presencia de las α -secretasas (Haass, et al., 2012).

Dado que las neuronas son células polarizadas, hay muchos esfuerzos para entender cómo es que APP llega a ciertos destinos solamente y dónde es procesada para dar lugar a sus productos. Se ha demostrado que varios de los productos de su procesamiento como sAPP, p3 y A β están selectivamente dirigidos al compartimento basolateral, al igual que la APP en la superficie y que dicha dirección está dada tanto por la cadena de aminoácidos de la proteína como por el pH del compartimiento (Haass, et al., 1994; De Strooper, et al., 1995). Estas observaciones tienen fuertes implicaciones sobre la producción de A β , por ejemplo, se sabe que la fracción de A β 1-x que se encuentra en la superficie basolateral es mínima, lo que tiene sentido ya que BACE1 se encuentra principalmente en la superficie apical de las células polarizadas y ADAM10, la principal enzima con actividad de α -secretasa en neuronas, en la superficie basolateral. Por su lado, γ -secretasa se expresa en ambos polos de la célula (Haass, et al., 2012).

1.4 El péptido β amiloide

La secuencia de aminoácidos de A β inicialmente supuso un reto para ser determinada por su alta heterogeneidad tanto en su extremo amino como en el carboxilo terminal. En 1984, el grupo de Glenner finalmente tuvo éxito en determinarla por primera vez (Glenner & Wong, 1984). Actualmente se sabe que existen dos variantes principales de A β : aquella de 40 residuos de aminoácidos (A β 40), que es la más abundante en el cerebro de personas mayores sanas y la de 42 aminoácidos (A β 42) que representa tan solo en 10% del péptido A β encontrado en el tejido cerebral de estos mismos individuos. Por otro lado, las placas amiloides que aparecen en los cerebros de pacientes con la EA se conforman principalmente de A β 42 (LaFerla, et al., 2007). Es importante recalcar que la variante más larga, A β 42 es más hidrofóbica, tiene mayor tendencia a agregarse y sus agregados son más tóxicos, promueven la disfunción mitocondrial, inducen la expresión de genes apoptóticos, forman canales iónicos que causan la pérdida de la homeostásis de calcio y forman especies reactivas de oxígeno (Nagy, 2005).

El estudio del efecto de su secuencia sobre su habilidad para formar fibrillas llevó al descubrimiento de un núcleo hidrofóbico entre los residuos 17 y 21, además, los

aminoácidos del extremo C-terminal le proporcionan estabilidad, favoreciendo el proceso de oligomerización y polimerización de las fibrillas (Tycko, 2003).

Se ha propuesto que el A β monomérico existe en solución en equilibrio entre las conformaciones α -hélice y β -plegada (Paso I, figura 4) y de dicha mezcla solo los de la segunda conformación pueden contribuir a la formación de oligómeros de bajo peso molecular enriquecidos de β -plegadas, aunque también hay reportes que dichos oligómeros se forman en realidad por los conformeros α -hélice (Paso II, figura 4). Cualquiera que sea la conformación de la que resulten, los oligómeros de bajo peso molecular sí presentan un alto contenido de β -plegadas aunque aún hay controversia respecto a su topología pues mientras algunos grupos reportan que es exclusivamente antiparalela, otros argumentan que es una mezcla de estructuras paralelas y antiparalelas (Paso III, figura 4). De acuerdo con algunas investigaciones sobre la vía de agregación de A β , para poder formar las protofibrillas (que son las que a su vez constituyen las fibrillas amiloides), los oligómeros necesitan convertirse a una topología paralela (Paso IV, figura 4). Cuando las protofibrillas se asocian a lo largo, dan lugar a fibrillas amiloides maduras cuya estructura ha sido extensamente analizada y se ha llegado al consenso de que aquellas que se acumulan en los cerebros de pacientes con EA, son estabilizadas por un esqueleto de dos β -plegadas paralelas intermoleculares conectadas por una región de loop (Paso V, figura 4) (Broersen, et al., 2010; Di Carlo, 2010).

Inicialmente se pensó que A β era un péptido tóxico y anormal que se encontraba exclusivamente en cerebros de personas ancianas o dementes, pero desde hace algunos años hay evidencias de que el péptido cumple también una función fisiológica, pues se encuentra en los fluidos corporales de diferentes especies (Seubert, et al., 1992). En plasma, líquido cefalorraquídeo (CSF) y otros fluidos biológicos, A β se encuentra en estado monomérico y en bajas concentraciones donde se ha demostrado que participa en diversas funciones biológicas como: estimulación de la proliferación y adhesión celular, antioxidante, liberación de vesículas sinápticas, regulación de la homeostásis sináptica, neuroprotección, neurotrófico, regulación negativa de la transmisión sináptica excitadora y quelación de iones metálicos tóxicos, entre otras (Giuffrida, et al., 2010).

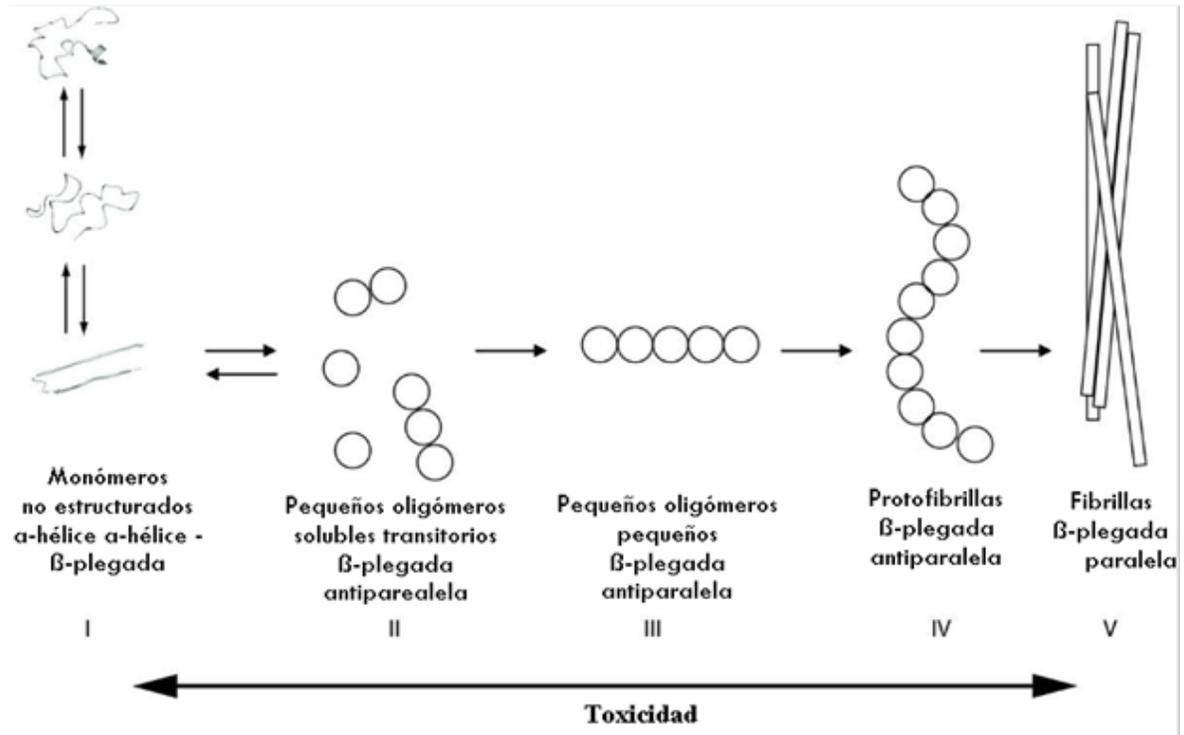


Figura 4. Esquema de agregación del péptido β -amiloide en cinco etapas desde el estado monomérico hasta la formación de fibrillas pasando por diferentes formas oligoméricas tóxicas. Modificado de Broessen, et al., 2010

1.5 Hipótesis de la cascada amiloide

Entre 1991 y 1992, diferentes grupos de investigación propusieron un mecanismo para explicar la patología molecular de la enfermedad: la hipótesis de la cascada amiloide, la cual propone que la acumulación del péptido A β es la causa principal de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 1991; Hardy & Higgins, 1992).

Es una hipótesis que ha recibido diversas críticas y se ha modificado considerablemente a través de los años de acuerdo a ellas para dar razón del inicio de la enfermedad, actualizándose gracias a los nuevos descubrimientos en los campos de genética, bioquímica y biología molecular, entre otros (Selkoe & Hardy, 2016). Hasta el momento, este es uno de los modelos dominantes de la patogénesis de la EA y, a pesar de las modificaciones ya mencionadas, guía el desarrollo de muchos potenciales tratamientos y métodos diagnósticos (Selkoe & Hardy, 2016). La hipótesis original proponía a las placas amiloides como elementos clave en el desarrollo de la enfermedad, pero tras algunas observaciones de que las mutaciones en la forma familiar de la EA, aumentan los niveles de A β 42, se propuso a dicho péptido como central en la enfermedad. Otra variación de la teoría dice que los niveles absolutos de A β 42 no son tan importantes como el ratio entre ellos y A β 40. Finalmente, la idea más aceptada actualmente es que los oligómeros solubles de A β son patológicos y, por tanto, los causantes de la EA (Fig 5) (Pimplikar, 2009).

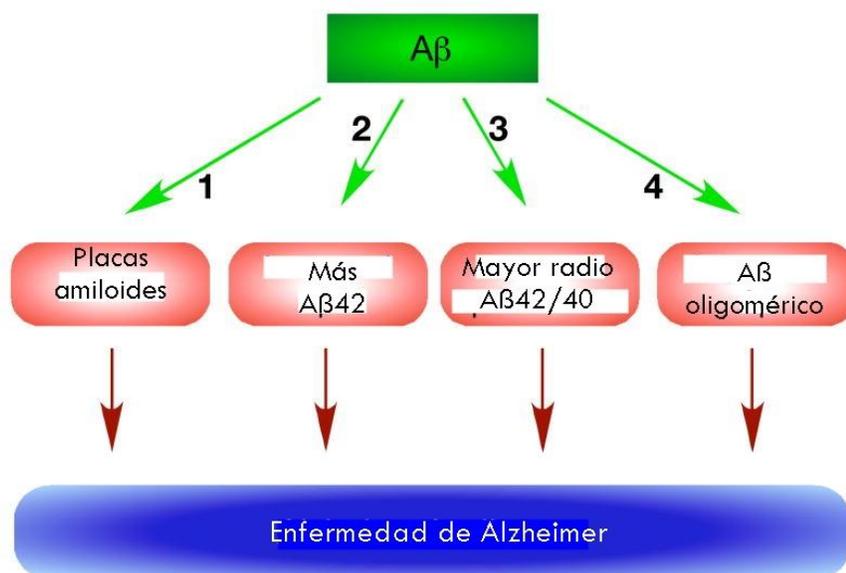


Figura 5. Algunas de las actualizaciones que se han agregado a la hipótesis de la cascada amiloide. Modificado de Pimplikar, 2009.

En la revisión más reciente de los creadores de la hipótesis, la patogénesis de la EA se describe en secuencia de eventos mostrada en la figura 6 (Selkoe & Hardy, 2016):

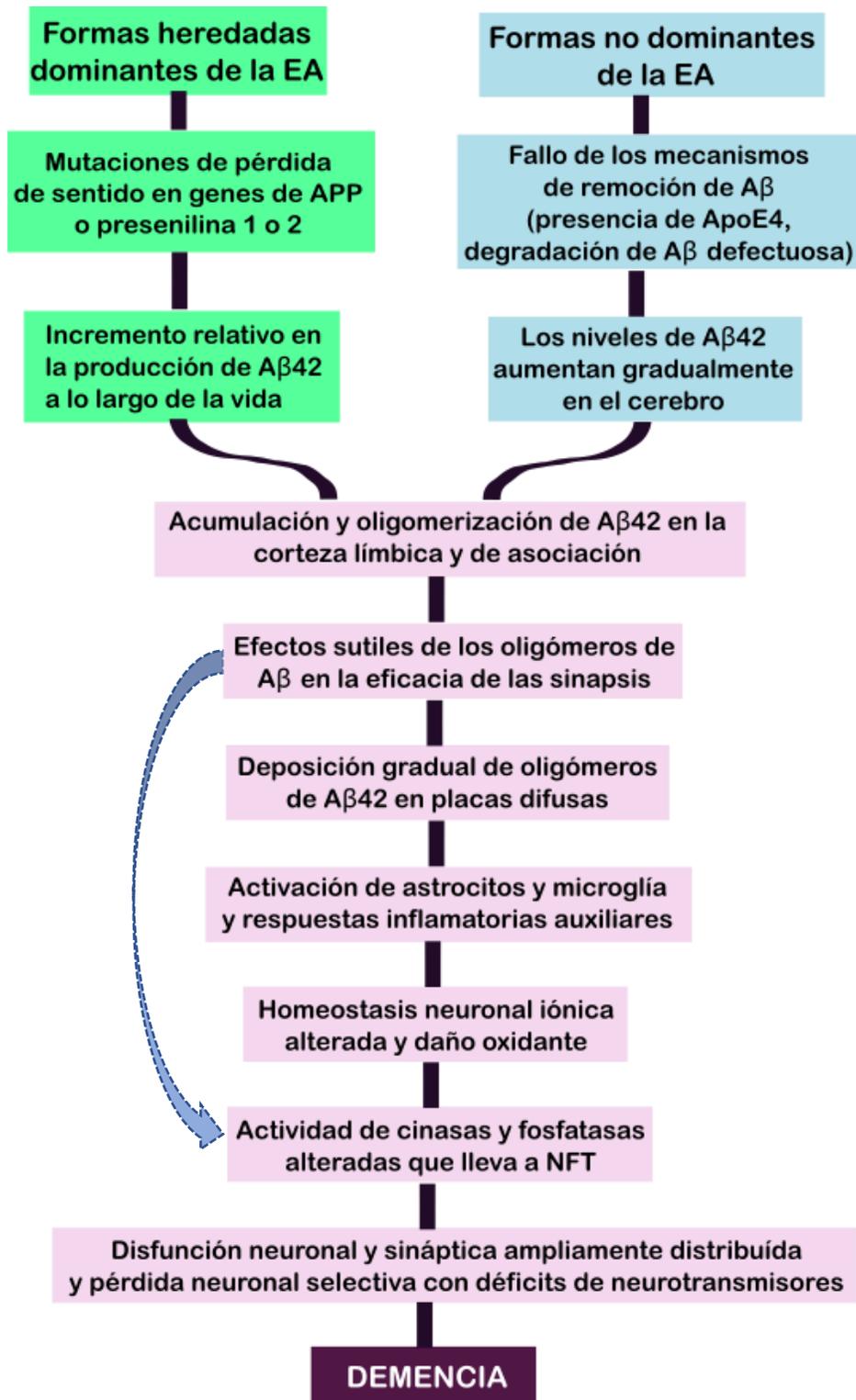


Figura 6. Secuencia de los eventos patogénicos principales que llevan al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer propuestos por la hipótesis de la cascada amiloide. La flecha indica que los oligómeros de Aβ pueden dañar directamente las sinapsis y neuritas de las neuronas, además de activar microglía y astrocitos. Modificada de Selkoe & Hardy, 2016

La hipótesis de la cascada amiloide se sustenta -entre otras- en las siguientes evidencias (Selkoe & Hardy, 2016):

- ✓ En los cerebros de todos los pacientes con EA se acumula A β en las regiones especializadas en las funciones cognitivas y de memoria para posteriormente desarrollar una citopatología glial y neurítica.
- ✓ Mutaciones dentro y cercanas a la región de A β en la APP provocan formas tempranas de la enfermedad.
- ✓ Mutaciones en los genes de PS1 y PS2 también inducen la aparición temprana de la EA.
- ✓ Los pacientes con síndrome de Down poseen 3 copias de APP e invariablemente exhiben las marcas neuropatológicas de la EA.
- ✓ Las mutaciones de pérdida de sentido que en la APP que disminuyen la producción o agregación de A β protegen al portador contra la EA y el declive cognitivo debido a la edad.
- ✓ Se ha demostrado que los oligómeros humanos de A β 42 pueden inducir la hiperfosforilación de tau en residuos relacionados con la EA.

1.6 Péptidos aminotruncados

En el año de 1985, el grupo de Masters y colaboradores hizo el primer estudio sobre la composición química de las placas amiloides y encontraron que el péptido de longitud completa no era el único que formaba estas placas (Masters, et al., 1985). A partir de entonces, se ha prestado especial atención a las especies modificadas del péptido A β y se ha reportado que hasta el 60% del total del péptido que se encuentra en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer se compone de especies aminotruncadas y, además, esto no solo ocurre en los pacientes que se encuentran en etapas tardías de la enfermedad, sino también en las más tempranas (Sergeant, et al., 2003). Incluso se ha demostrado que cuando los pacientes pasan de las etapas Braak IV a VI el contenido de especies amino truncadas de las placas compactas incrementa \approx 20% (las etapas de Braak se usan para describir la progresión de la EA con base en las regiones del cerebro en las que se

observan NFTs) (Güntert, et al., 2006). Se cree que muchas de las especies aminotruncadas del péptido son meramente productos de degradación por la proteólisis progresiva de los aminoácidos del extremo N-terminal del péptido de longitud completa una vez que éste se ha depositado en las placas seniles. Sin embargo, no ocurre así en todos los casos. La actividad enzimática precisa mediante la que se generan los diferentes péptidos aminotruncados no se conocen a detalle, aunque existen varias teorías propuestas (Bayer & Wirths, 2014).

En 2010, Portelius et al. usaron la espectrometría de masas para determinar el patrón de las isoformas dominantes de A β en el cerebelo, corteza e hipocampo de pacientes con EA (familiar y esporádica). Llegaron a la conclusión de que A β 1-42, A β piroGlu3-42, A β 4-42 y A β 1-40 eran las especies dominantes en las tres regiones analizadas con la presencia adicional de A β piroGlu11-42 y A β piroGlu3-40 en la corteza. (Portelius, et al., 2010)

Las especies aminotruncadas más abundantes en el cerebro de pacientes con EA son A β 3-42 y A β 11-42. Adicionalmente éstos dos péptidos pueden sufrir una modificación post traduccional, el glutamato en la posición amino terminal se cicla y da como resultado A β piroGlu3-42 y A β piroGlu11-42. La modificación de piroglutamato (pE o piroGlu) les confiere resistencia a proteasas y pérdida de carga en el extremo amino terminal que resulta en su agregación más acelerada a comparación con A β de cadena no modificada (Schilling, et al., 2008). También se ha evidenciado que algunas isoformas de apolipoproteína E se unen con menos avidez a especies modificadas de A β , incluyendo a las piroglutamadas (Munson, et al., 2000).

La generación de péptidos piroglutamados conlleva dos pasos ilustrados en la figura 7: el primero consiste en la remoción de los primeros dos o diez aminoácidos (en el caso de β A piroGlu11-42 o β A piroGlu3-42, respectivamente) que deja expuesto el glutamato del extremo N-terminal (Jawhar, et al., 2011). El segundo es la ciclación del glutamato en la posición amino terminal mediada por la enzima glutaminil ciclasa (QC), cuya acción tanto in vivo como in vitro fue comprobada hace algunos años (Schilling, et al., 2008; Cynis, et al., 2008). El mismo estudio realizado por Schilling y colaboradores, demostró también que la

QC en la neocorteza de los pacientes con EA se encuentra sobreexpresada. Su coexpresión con APP en células HEK293 aceleró la formación de péptidos piroglutamados y al inhibirla, también se suprimió la formación de estos últimos. Esta clase de péptidos es un blanco inmunoterapéutico atractivo porque parece tener un papel fundamental en la oligomerización de A β , así como en su sedimentación y estabilización. Aunado a lo anterior, estos péptidos tienen un efecto neurotóxico *per se*, mayor al del péptido de longitud completa, así como mayor capacidad de agregación por lo que se ha propuesto que forman el núcleo de las placas patológicas de A β . Asimismo, comparados con sus contrapartes no piroglutamadas, su solubilidad a pH fisiológico disminuye al mismo tiempo que su hidrofobicidad aumenta (Schlenzig, et al., 2009; Bayer & Wirths, 2014)

1.6.1 A β piroglutamato 11-42 (A β piroGlu11-42 o A β pE11-42)

Como se mencionó previamente, la producción de algunas especies aminotruncadas no parece requerir de un corte proteolítico específico, sino que proviene de la proteólisis sucesiva de aminoácidos. Sin embargo, se tiene fuerte evidencia que parece indicar que el péptido A β piroGlu11-42 proviene del procesamiento específico de la APP por la enzima BACE1, una isoforma de BACE, que corta a la APP en el sitio β' , el cual se encuentran entre los aminoácidos tirosina 10 (Y10) y glutamato 11 (E11) dando como resultado un al fragmento C89 (Liu, et al., 2002). La enzima BACE puede cortar en el sitio β o β' y en el análisis de su reactividad *in vitro* se observó que el sitio de corte depende en gran medida de la localización intracelular en que se lleve a cabo: en el RE, la proteólisis es más frecuente en el sitio β , mientras que en la red trans-Golgi, sucede de manera preferencial en el sitio β' (Huse, et al., 2002). De acuerdo con Deng y colaboradores, bajo condiciones normales, el sitio Glu11 es el más común para la escisión de APP por BACE1 y la preferencia no depende solamente del compartimiento subcelular en donde se lleve a cabo sino también de la secuencia de APP que se encuentre en la proximidad de los sitios de corte β y β' . Por ejemplo, cuando BACE1 se encuentra marcada por motivos de recuperación al RE en su extremo citoplásmico se retiene en este organelo, lo que lleva a su acumulación y finalmente, al corte predominante de APP en el sitio Asp1. Por el contrario, cuando exhibe el dominio intracelular de furina murina, permanece en la red trans-Golgi y resulta en mayor

frecuencia de corte en el sitio Glu11, esta enzima se encuentra principalmente en la red trans Golgi y en los endosomas (Huse, et al., 2002; Deng, et al., 2013; Zeng & Song, 2013).

El segundo paso para la formación de las especies piroglutamadas está dado por la acción de la enzima glutaminil ciclasa (Fig. 7) y resulta en la pérdida de seis cargas en el caso de AβpE11-42 y tres en el de AβpE3-42, aumentando su hidrofobicidad y propensión a agregarse. A esta propensión también contribuye el hecho de que las formas piroglutamadas de Aβ tienden a adoptar estructura de β-plegadas en ambientes acuosos e hidrofóbicos (Liu, et al., 2002; Gunn, et al., 2010). Con respecto a su localización celular, la conversión catalizada por la QC del glutamato a piroglutamato se ve favorecida bajo condiciones ácidas como aquellas presentes en compartimientos de la vía secretora (aparato de Golgi, RE, endosomas) en donde coinciden parcialmente APP y QC (Schilling, et

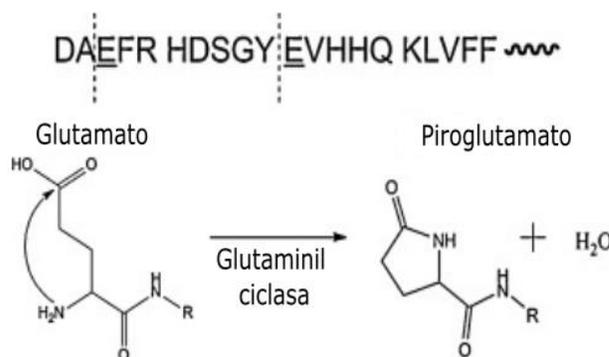


Figura 7. Producción de péptidos piroglutamados AβpE11-42 y AβpE3-42. Se compone primero por una proteólisis que deja un glutamato expuesto en el extremo amino terminal seguida de la acción de la QC sobre el mismo residuo. Modificado de Gunn, et al., 2010. al., 2004).

Se ha demostrado mediante estudios de inmunohistoquímica que los péptidos piroglutamados conforman hasta el 50% de las placas neuríticas en cerebros de pacientes con EA y, que AβpE11-42 se encuentra principalmente en el centro de estas placas en la corteza cerebral de pacientes con EA y está rodeado por Aβp3-42 y Aβ de longitud completa (Sullivan, et al., 2011; He & Barrow, 1999). También se ha observado a AβpE11-42 y a su isoforma no piroglutamada en depósitos amiloides vasculares y en niveles más altos en pacientes de edad avanzada con EA con respecto a adultos de la misma edad, pero mentalmente competentes, al igual que en pacientes más jóvenes con síndrome de Down (Liu, et al., 2006). Por lo anterior, se ha propuesto que pueden actuar como semillas para la formación de placas amiloides (Sullivan, et al., 2011). Además, dado que hay mayor concentración de péptidos amiloides modificados en los cerebros de pacientes con la

enfermedad de Alzheimer que en adultos mayores mentalmente sanos, éstos representan atractivos blancos terapéuticos y biomarcadores de las etapas tempranas de la enfermedad (Jawhar, et al., 2011).

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de “probable EA” era realizado tradicionalmente utilizando criterios clínicos y el único diagnóstico definitivo se realizaba *postmortem*, mediante el análisis histológico de cortes del cerebro. No obstante, el conocimiento que hemos obtenido acerca de la enfermedad en años más recientes ha permitido un gran cambio: actualmente es posible diagnosticar a pacientes vivos bajo el supuesto de que la enfermedad ocurre de manera progresiva, es decir que los cambios en el sistema nervioso de los pacientes con EA se presentan mucho antes de que el declive cognitivo empiece a ser evidente (Dubois, et al., 2016).

El Grupo Internacional de Trabajo (IWG, por sus siglas en inglés) propuso en 2014 nuevos criterios que permiten identificar las fases prodrómica y preclínica de la enfermedad mediante una serie de biomarcadores amiloides (como en la tomografía de emisión de positrones (PET) y/o los niveles de A β o tau en el fluido cerebroespinal) y características clínicas (Tabla 3). A pesar de que ya están disponibles estas herramientas de diagnóstico, su uso no se ha extendido por cuestiones tanto monetarias como de carencia de información y, hasta la fecha, está restringido a pocos hospitales.

Recientemente, se realizó un meta-análisis que evaluó 231 artículos (publicados entre 1984 y 2014) sobre biomarcadores de sangre y líquido cefalorraquídeo indicadores de neurodegeneración, metabolismo de APP, patología de tau, función de la barrera hematoencefálica y activación glial. De acuerdo con su reporte, los biomarcadores de neurodegeneración que diferenciaron exitosamente a los pacientes con EA de los controles fueron T-tau, P-tau, A β 1-42 y NFL en LCR y T-tau en plasma. Asimismo, los primeros tres también pudieron discernir entre los grupos con deterioro cognitivo leve causado por EA o deterioro cognitivo leve estable.

Tabla 3. Criterios del IWG para el diagnóstico de la EA en fase prodrómica o preclínica. Modificada de Dubois et al., 2016.

Criterios del IWG para el diagnóstico de la EA típica	
A. Fenotipo clínico específico	<ul style="list-style-type: none"> • Disfunción temprana y significativa de memoria episódica (aislada o asociada con otros cambios cognitivos o conductuales que sugieran deterioro cognitivo leve o de algún síndrome de demencia) que incluya las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cambios graduales y progresivos en el funcionamiento de la memoria reportado por el paciente o cuidador desde 6 meses atrás. ✓ Evidencia objetiva de un síndrome amnésico de tipo hipocampal (basado en un rendimiento significativamente deficiente en un examen de memoria episódica específicamente para la EA).
B. Evidencia de patología tipo EA <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Menor presencia de Aβ 1-42 junto con T-tau o P-tau aumentada en líquido cefalorraquídeo (LCR). • Mayor retención del rastreador en PET amiloide. • Mutación autosómica dominante de EA presente (en presenilina 1, presenilina 2 o proteína precursora amiloide)

Algunos otros nuevos marcadores como NSE (es la enolasa específica de neuronas, una proteína participante en el metabolismo de la glucosa y que se usa como indicador de daño cerebral), VLP-1 (la proteína tipo-vinilina 1 es una proteína sensora de calcio que se utiliza como biomarcador de pérdida neuronal), HFABP (proteína cardiaca de unión a los ácidos grasos, cuya presencia se ha relacionado con la progresión del MCI) y YKL-40 (una glicoproteína producida por los macrófagos cuyas concentraciones en suero se encuentra

elevadas en pacientes que sufren fenómenos inflamatorios) diferenciaron moderadamente entre pacientes con EA y controles mientras que con otros como los niveles en sangre de A β 42 y A β 40 no se encontró asociación (Olsson, et al., 2016).

1.8 Terapias para la EA

Actualmente no existen terapias que modifiquen el curso de la enfermedad, sino que se enfocan en tratar los síntomas sin atacar la etiología de la enfermedad por lo que surten efecto durante un corto periodo de tiempo después del cual el paciente volverá a su condición anterior. Los tratamientos disponibles por el momento son:

- ✚ Inhibidores de acetilcolinesterasa. La acetilcolina es un neurotransmisor que se sintetiza en la neurona pre sináptica y luego es liberado al espacio sináptico en donde interactúa con su receptor en la célula postsináptica para inducir la salida de potasio y la entrada de sodio, acción que llega a su fin cuando la enzima acetilcolinesterasa la degrada. El sistema colinérgico se ve afectado de manera temprana durante la EA debido a la pérdida de neuronas colinérgicas y a la pérdida de funciones enzimáticas en la síntesis y en el transporte de la acetilcolina cuyo resultado es la pérdida de memoria acompañada por el deterioro de funciones cognitivas y no cognitivas. El uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa busca inhibir la degradación de la acetilcolina para permitir que cumpla su función por un tiempo más prolongado. Se han aprobado hasta la fecha tres inhibidores de colinesterasa: donepezil (Pfizer, NY), rivastigmina (Novartis, Suiza) y galantamina (Janssen, Bélgica). Las tres están aprobadas para el tratamiento de EA leve a moderado y recientemente, la primera obtuvo aprobación para usarse en pacientes con EA severo. Se ha observado que retrasan el deterioro en las funciones cognitivas durante 6 a 12 meses en los tres estados, pero se recomienda usarlas al inicio de la enfermedad. Había un cuarto medicamento aprobado de esta clase, la tacrina pero aunque fue el primero en ser aprobado ya no es utilizado debido a la hepatotoxicidad que provoca (Contestabile, 2010).

- ✚ Antagonistas del receptor de NMDA: la memantina (Lundbeck, Dinamarca) está aprobada para usarse solo en casos de EA moderada a severa. Se trata de un antagonista no competitivo de afinidad moderada del N-metil-D-aspartato que tiene la función de proteger a las neuronas de la toxicidad mediada por el glutamato. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el cerebro y el incremento de sus niveles provoca una actividad excesiva del receptor de NMDA e incremento del calcio intracelular lo que puede desembocar en daño y muerte neuronal. Los ensayos clínicos han demostrado que el uso de la memantina durante 6 meses mejora las habilidades cognitivas, conducta y actividades diarias en los pacientes con EA moderada a severa (Anand, et al., 2014).

- ✚ Terapia combinada: en pacientes con EA moderada a severa se encontró una mejora significativa en la función cognitiva, del lenguaje y el estado global tras el uso de una combinación entre memantina y dopenzil comparado con la del grupo placebo (memantina y placebo). La misma mejora no ha sido observada en pacientes en la etapa leve de la enfermedad (Anand, et al., 2014).

Dado el periodo limitado de efectividad de las drogas previamente mencionadas hay numerosas alternativas terapéuticas en evaluación. Éstas se dividen básicamente en los siguientes grupos de acuerdo con su blanco (Anand, et al., 2014):

- ❖ Modulación de la neurotransmisión (Inhibidores de colinesterasa, modulación GABAérgica, modulación del receptor de serotonina, etc.).
- ❖ Tau (estabilización de los microtúbulos, inhibición de la fosforilación de tau, inmunoterapia, bloqueo de la oligomerización de tau, etc.).
- ❖ A β (modulación de enzimas secretasas, aumento de la remoción de A β , aumento del transporte del péptido, inmunoterapia, etc.).
- ❖ Modulación de cascadas de señalización intracelular.
- ❖ Reducción del estrés oxidante (suplementos exógenos antioxidantes, promover los antioxidantes endógenos).
- ❖ Terapia dirigida a la cascada mitocondrial (control de la producción de ROS con

- ❖ Terapia antiinflamatoria
- ❖ Modulación de la homeostasis del calcio.

1.8.1 Inmunoterapia

La inmunoterapia es una estrategia que consiste en el tratamiento de una enfermedad mediante la inducción, estimulación o supresión de la respuesta inmune. Este enfoque se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades crónicas como cáncer o padecimientos autoinmunes o infecciosos. Hay dos tipos de inmunoterapia que han sido extensamente explotados en la última década: activa y pasiva. Un tercer tipo es la inmunomodulación, una alternativa que se encuentra en etapas tempranas todavía. La primera consiste en la administración de vacunas con antígenos capaces de inducir la generación de anticuerpos en el receptor. Por su parte, la segunda se basa en administrar al paciente anticuerpos producidos en una fuente externa a su sistema inmune (anticuerpos monoclonales murinos humanizados, anticuerpos policlonales humanos derivados de donadores, anticuerpos recombinantes, entre otros). Finalmente, la inmunomodulación implica el uso de moléculas que tienen el efecto de alterar las funciones del sistema inmune como las citocinas (Lannfelt, et al., 2014).

En lo que concierne a la EA, algunos estudios iniciales demostraron que anticuerpos monoclonales dirigidos contra A β eran capaces de inhibir la agregación fibrilar, disgregar fibrillas pre-formadas y prevenir la neurotoxicidad *in vitro* (Solomon, et al., 1997). Con dichos antecedentes, en 1999 el grupo de Schenk probó un acercamiento de inmunización activa con A β de longitud completa y adyuvante Freund y obtuvo resultados extremadamente alentadores en la reducción de placas en el cerebro de ratones transgénicos (Schenk, et al., 1999). El dramático efecto observado sobre la carga de placas amiloides llevó a Elan/Wyeth en abril del 2000 a iniciar un ensayo clínico de Fase I aleatorizado, de dosis escalonadas, de dosis múltiples, doble ciego utilizando como inmunógeno al péptido de longitud completa junto con QS-21, un adyuvante que induce una fuerte respuesta proinflamatoria de tipo Th1. La fase II del ensayo comenzó en octubre 2001 pero fue abruptamente terminada en enero de 2001 cuando el 6% de los pacientes

manifestó síntomas de meningoencefalitis aséptica (confusión, letargo o dolor de cabeza). Cuando se realizaron autopsias en un número reducido de los pacientes, se encontró que efectivamente se había reducido la carga amiloide y se encontraron células de microglía activadas con inmunoreactividad a A β , evidencia de actividad fagocítica. En algunos casos también se encontraron células T alrededor de vasos sanguíneos cerebrales, lo que sugiere una respuesta tipo Th1 excesiva (Wisniewski, 2015). Tras estos inesperados resultados, la segunda generación de vacunas ha sido diseñada para evitar despertar una respuesta de células T autoreactivas durante la inmunización contra el péptido y para este fin, se han empleado diferentes acercamientos como usar epítomos N-terminales de la secuencia del péptido y adyuvantes que minimicen la participación de células T citotóxicas (Vingtdeux, et al., 2016).

1.8.1.1 Mecanismos de acción de la inmunoterapia

Hasta la fecha se han propuesto 3 posibles mecanismos de acción en que la inmunoterapia podría reducir los depósitos de A β (Morgan, 2011):

Fagocitosis por microglía: Para el primer mecanismo propuesto, se asume que una cantidad suficiente de anticuerpos (alrededor de 0.1% del total administrado) es capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica y entrar al cerebro donde se une al péptido amiloide para disparar una respuesta fagocítica, ya sea por la microglía residente o los macrófagos o monocitos infiltrados gracias al reconocimiento de los anticuerpos por el receptor FcR. Numerosos trabajos han mostrado evidencia de anticuerpos unidos a depósitos amiloides después de su administración sistémica.

Disgregación catalítica: El segundo mecanismo sugiere que los anticuerpos modifican la estructura secundaria de los monómeros de A β los cuales adquieren una conformación con menor propensión a agregarse. Además, los anticuerpos son capaces de unirse a los oligómeros con alta afinidad y alterar el equilibrio entre agregados y monómeros, sesgándolo hacia los monómeros. La propuesta del mecanismo se sustenta en el descubrimiento de que los anticuerpos anti-A β *in vitro* inhiben la formación de fibrillas de A β .

Consumo periférico: Este modelo considera que el paso de los anticuerpos al sistema nervioso central no es crítico pues la presencia de los anticuerpos en la periferia altera el equilibrio de la concentración de A β a través de la barrera hematoencefálica y favorece así su paso hacia la circulación debido a una baja concentración en la sangre. Se apoya en el hecho de que algunos autores han detectado disminución de la carga amiloide en el cerebro después de administrar anticuerpos sin encontrar la presencia de los mismos en el SNC.

Es importante recalcar que ninguno de estos mecanismos es mutuamente excluyente, diferentes anticuerpos podrían utilizar varios de estos mecanismos en diferente medida (Morgan, 2011).

1.9 Modelos no humanos de la EA

El uso de modelos animales no humanos para la EA ha provisto a esta área de herramientas para dilucidar los mecanismos moleculares de la enfermedad y evaluar potenciales alternativas terapéuticas. Los modelos animales no humanos de la EA se pueden dividir *grosso modo* en tres categorías: modelos naturales, modelos genéticos y modelos por intervención.

Dado que la gran mayoría de los casos de EA son tipo esporádico y sus causas son de naturaleza desconocida, los modelos genéticos se han basado en la introducción de mutaciones genéticas asociadas a la EA familiar en el genoma de ratones. Si bien no existe ningún modelo que represente la patología completa de manera exacta, sí permiten analizar a profundidad algunos aspectos de ella. El primer modelo fue desarrollado en 1995 y recibió el nombre de PDAPP; contiene el gen hAPP_{V717F} y estos ratones exhiben la patología de A β , microgliosis, astrogliosis, pérdida sináptica y déficit de memoria (Games, et al., 1995). Después de este han seguido otros que incorporan la pérdida neuronal o la patología de tau.

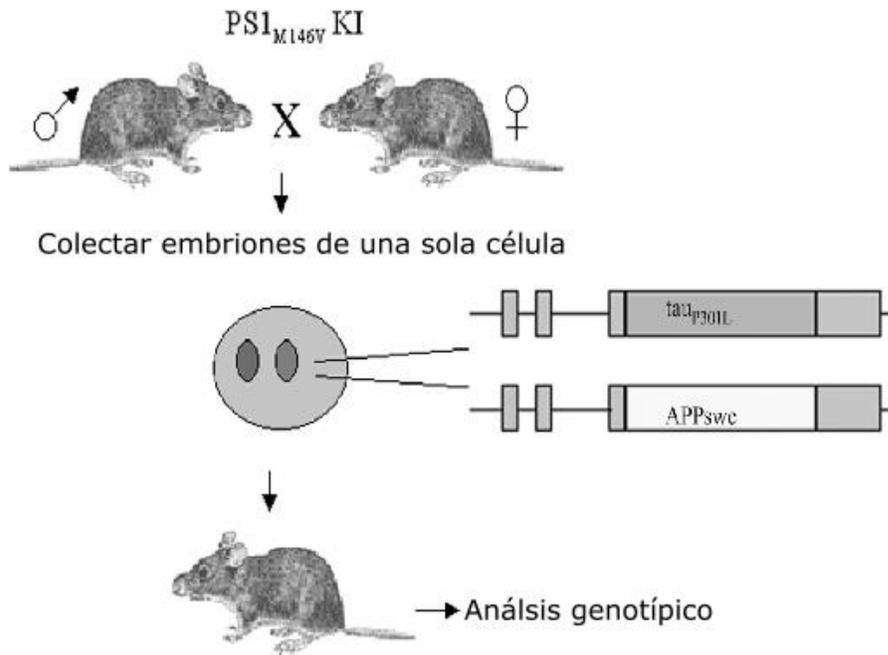


Figura 8. Proceso de generación de los ratones 3xTg-AD a partir de embriones de una sola célula proveniente de dos individuos homocigotos PS1_{M146V} knock-in a los que se inyectaron dos transgenes humanos (*tau*_{P301L} y *APP*_{K670N}). Tomado de Oddo et al., 2003.

Un modelo ampliamente utilizado es el 3xTg-AD, un modelo triple transgénico que desarrolla una patología tipo EA (Fig. 8). Fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Frank LaFerla en 2003 y contienen los genes APP humana hAPP_{Swe} (K670N, M671L);

PSEN1_{M146V} y tau_{P301L}. Para su generación se hizo una doble micro-inyección de dos transgenes humanos independientes que codificaban hAPP_{Swe} y hTau_{P301L}, en un embrión de una sola célula homocigoto mutante knock-in para PS1_{M146V}, ambos bajo el control del elemento regulador murino Thy1.2 que conduce a la expresión del transgen en el sistema nervioso central. El ratón homocigoto PS1_{M146V} KI proviene de la cruce de ratones heterocigotos PS1_{M146V} de dos cepas diferentes: 129SV y C57BL/6 por lo que los ratones 3xTg-AD tienen ambos fondos genéticos (Guo, et al., 1999). De acuerdo con los autores, en estos ratones se observan tanto las alternaciones de tau como la de placas amiloides y presentan disfunción sináptica y en el LTP, las patologías se desarrollan de manera progresiva y relacionada a la edad (Oddo, et al., 2003).

La primera manifestación neuropatológica que exhiben los ratones 3xTg-AD es la presencia de agregados intracelulares de Aβ detectado en la neocorteza desde los 4 meses y en el hipocampo a los 6 meses, aunque con poca presencia. Por su parte, los depósitos extracelulares comienzan a aparecer también a los seis meses en la corteza y a los 12 en el

hipocampo. En cuanto a las alteraciones de tau, no se hacen evidentes hasta que han cumplido 12 meses de edad (Oddo, et al., 2003). En otro estudio longitudinal para evaluar la progresión espacio-temporal de las patologías en ratones 3xTg-AD, se encontró también que la presencia de A β intracelular comienza a ser observable a los 3 meses, pero de manera muy leve y continúa así hasta los 6 meses, en donde la marca ya es evidente. Las placas amiloides en cambio, se observan por primera vez hasta los 18 meses y a los 26 meses, ya han proliferado para cubrir un área grande del cerebro. Finalmente, encontraron evidencia de la proteína tau anormalmente fosforilada en edades tan tempranas como los 6 meses (Mastrangelo & Bowers, 2008). Dado que la EA está estrechamente relacionada con la edad de los individuos en los que se presenta, es importante conocer la esperanza de vida de los diferentes modelos murinos pues, al igual que en los humanos, existen diferencias entre sexos y genotipos. Para las hembras 3xTg-AD se ha establecido una esperanza de vida promedio de 2.03 años y para los machos de 1.28 años por lo que suelen preferirse hembras en estudios longitudinales con este modelo (Rae & Brown, 2015)

El fondo genético C57BL/6 de los ratones 3xTg-AD tiene una implicación importante en sus isotipos: en 1989 se descubrió que las cepas con el alelo murino *Igh1-b* tales como C57BL/6, NOD, SJL y C57BL/10, carecen del isotipo IgG2a y en su lugar hay un nuevo isotipo llamado IgG2c que requiere de anticuerpos específicos para ser reconocido (Morgado, et al., 1989).

El modelo triple transgénico 3xTg-AD ha tenido un uso muy extendido dentro de la investigación biomédica para el tratamiento de la EA gracias a que presentan tanto las patologías ya mencionadas. Algunos ejemplos de trabajos en donde se ha usado exitosamente a estos animales son: en la administración de inmunoglobulina intravenosa (IVIg) ratones de 1-3 meses en donde se observaron efectos limitados sobre la patología de tau y una reducción del 22% de A β soluble, así como mejora cognitiva medida por pruebas conductuales (St-Amour, et al., 2014). En otro estudio realizado en ratones 3xTg-AD de 15-18 meses que recibieron una inyección de AT8 (tau fosforilada en los aminoácidos serina 202 y treonina 205) en la región CA1 del hipocampo se demostró que se reducía la carga de la proteína tau total en el soma y las dendritas de las neuronas, así como la reactividad a

tau hiperfosforilada sin tener efectos observables sobre el área cubierta por placas amiloides (Walls, et al., 2014)

A pesar de que los modelos transgénicos han sido ampliamente utilizados también se ha explorado el uso de otros animales no humanos que funcionen como modelos naturales de una patología tipo EA. La idea de usar modelos naturales surge de la preocupación de que los modelos genéticos podrían no estar representando más que a un pequeño porcentaje del total de los pacientes con EA. Existen diferentes especies que desarrollan espontáneamente características neuropatológicas parecidas a la EA como los osos polares, perros, gatos, cabras, ovejas y algunos primates no humanos. De hecho, la memantina y el dopenzil fueron probados en monos Rhesus. Incluso *Octodon degu*, un pequeño roedor sudamericano, desarrolla una neuropatología parecida a la EA en edades avanzadas, con la presencia de depósitos amiloides y NFTs, sin embargo, el modelo es nuevo y aún está siendo evaluado (Baurijssens, et al., 2013).

Los modelos de intervención están basados en la administración de sustancias químicas o lesiones específicas en el cerebro para imitar características de la EA. Se ha introducido por ejemplo A β en el cerebro de ratas y monos Rhesus, pero, aunque inducen algunas de las manifestaciones clínicas características, el modelo no es muy preciso. Otros compuestos como escopolamina o LPS se introducen con el fin de inducir amnesia o provocar inflamación, respectivamente (Baurijssens, et al., 2013).

2. Antecedentes

Después de que se detuvo abruptamente el primer ensayo clínico basado en la inmunización activa de A β (AN-1792) debido a los efectos secundarios observados en algunos pacientes, la segunda generación de inmunoterapéuticos se enfocó en medicamentos que evadieran las que se cree, fueron causas de dichos efectos secundarios (respuesta inflamatoria tipo Th1 con presencia de células T autorreactivas). Algunas de estas estrategias fueron: utilizar adyuvantes que disminuyeran la participación de células T y favorecieran la de las células B, tomar como blanco terapéutico la región N-terminal dentro de la secuencia de A β o evaluar la inmunización pasiva.

Recientemente dos ensayos clínicos de fase III reportaron resultados improductivos de la administración de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra péptidos amiloides: solanezumab y bapinezumab, que parecían muy prometedores. Otras alternativas enfocadas en los péptidos amiloides como el ensayo Gammagard, una infusión intravenosa de inmunoglobulinas sufrió el mismo destino (Karran & Hardy, 2014). Como se estableció anteriormente, ambos tipos de inmunización (pasiva y activa) tienen ventajas y desventajas y no se ha llegado a un consenso respecto a cuál de las dos es más conveniente para el tratamiento de la EA por lo que los dos continúan en constante exploración.

Además del ya demostrado “efecto semilla” de los péptidos piroglutamados A β piroGlu11-42 y A β piroGlu3-42 (Sullivan, et al., 2011) y de su toxicidad aumentada con respecto a otras especies de péptidos amiloides (Bayer & Wirths, 2014), en el laboratorio de la Dra. Gevorgyan se ha evaluado anteriormente la inmunogenicidad del péptido A β piroGlu11-42 (Perez-Garmendia, et al., 2010) y se ha demostrado su importancia dentro de la inmunoterapia, pues los anticuerpos producidos por los conejos y por los ratones inmunizados con dicho péptido no sólo reconocen a A β piroGlu11-42, también son capaces de reconocer a los oligómeros del péptido de longitud completa y al monómero y los oligómeros de A β piroGlu (Fig. 9). Adicionalmente, se han llevado a cabo varios esfuerzos de inmunización con A β piroGlu11-42 en ratones silvestres y transgénicos para estudiar la respuesta humoral y celular y los resultados de ensayos de proliferación celular sugieren

que el péptido no induce la respuesta de células T autoreactivas, convirtiéndolo en un atractivo blanco inmunoterapéutico.

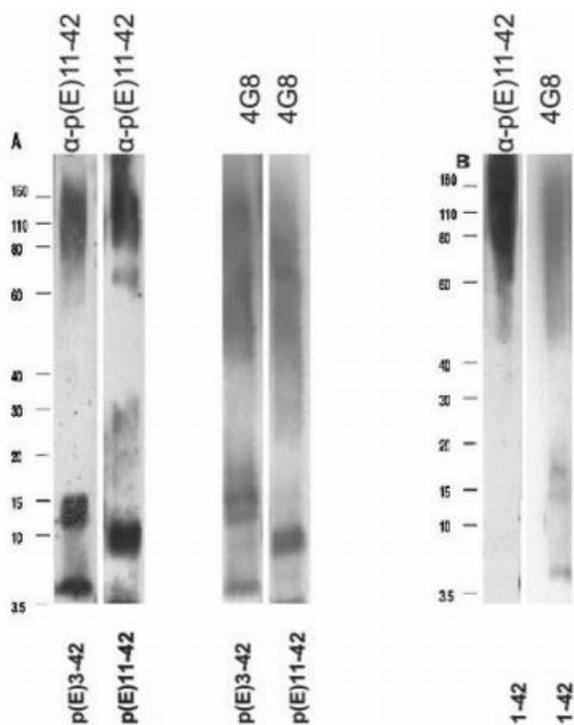


Figura 9. Reactividad cruzada entre los anticuerpos producidos en conejos inmunizados con A β p11-42 y los péptidos A β p3-42 y A β 1-42. 4G8 es un anticuerpo monoclonal que reconoce a los tres péptidos y sirve como control positivo del experimento. Tomado de Pérez-Garmendia *et al.*, 2010.

El adyuvante elegido fue la saponina por los motivos que a continuación se exponen. Las saponinas son glicósidos triterpenodes que se encuentran en plantas cultivadas o silvestres y algunas bacterias, en este caso, la saponina que usamos fue extraída de la corteza de *Quillaja saponaria*. Como adyuvantes, las saponinas son capaces de modular la respuesta inmune mediada por células, inducir una respuesta inmune de tipo pro-inflamatoria y favorecer la producción de anticuerpos aun administradas en dosis bajas (Rajput, et al., 2007). Desde su descubrimiento, se han considerado como atractivas adyuvantes y ya han sido utilizadas en ensayos clínicos para pacientes con diferentes tipos de cáncer (los cuales se han reportado fuertes respuestas contra antígenos peptídicos y carbohidratos), malaria e incluso con EA en seis ensayos clínicos de fase dos conducidos por Pfizer y uno por Wyeth con más de 800 pacientes. En pacientes con EA se demostró la seguridad y tolerabilidad del inmunoterapéutico ACC-001 usando QS-21 como adyuvante (Pasquier, et al., 2016; Ragupathi, et al., 2011). Desistimos de la idea de usar otros adyuvantes como compuestos de aluminio pues, a pesar de su extendido uso desde los años 1930s, en el último par de

décadas ha quedado evidenciado su efecto adverso sobre el cerebro: activa el sistema inmune innato de manera crónica, lleva al aumento de la apoptosis de neuronas motoras y astrocitos, aumenta la astrocitosis y la microglia, desestabiliza la homeostasis del calcio, causa daño oxidante, reduce la cantidad de antioxidantes como el glutatión y también se ha ligado a padecimientos neurodegenerativos como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Shaw & Tomljenovic, 2013; Blaylock, 2012).

3. Justificación y objetivos

3.1 Justificación

Actualmente está ampliamente demostrado que la inmunoterapia representa una firme alternativa terapéutica en el tratamiento de la EA, pues es capaz de reducir la gravedad de algunos aspectos patológicos características y mejorar el deterioro cognitivo. No obstante, este campo de investigación es relativamente reciente y hay muchos tratamientos potenciales que quedan por ser explorados.

Los péptidos amiloides aminotruncados suponen un atractivo blanco terapéutico, pues, a diferencia de los anticuerpos que se producen en la respuesta inmune contra A β 1-42 o A β piroGlu3-42 que reconocen únicamente al péptido contra el que fueron producidos, aquellos contra A β piroGlu11-42 son capaces de reconocer a otras especies amiloides lo que podría conferirles una ventaja en cuanto a la eficiencia con la que eliminan el péptido amiloide del tejido cerebral. Por lo tanto, es pertinente evaluar la respuesta inmune que provoca A β piroGlu11-42 en un modelo de la enfermedad de Alzheimer.

3.2 Objetivo general

- Evaluar la inmunogenicidad del péptido A β piroGlu11-42 diferentes cepas de ratón y su potencial protector.

3.2.1 Objetivos particulares

- Medir la cinética de producción de anticuerpos de clase IgM e IgG ante la inmunización con A β 1-42 y A β piroGlu11-42 en ratones C57BL/6J.
- Medir la cinética de producción de anticuerpos de clase IgM e IgG (y las subclases de la segunda) ante la inmunización con A β piroGlu11-42 en ratones 3xTg-AD.
- Comprobar la reactividad cruzada de los anticuerpos producidos en ratones C57BL/6 y 3xTg-AD contra A β piroGlu11-42 con otros péptidos amiloides.
- Evaluar la capacidad protectora del péptido A β piroGlu11-42 en ratones 3xTg-AD.

4. Material y métodos

4.1 Material biológico

30 ratones C57BL/6J machos de 8 a 10 semanas, 12 ratones 3xTg-AD hembras de 12 meses y 12 ratones 3xTg-AD hembras de 6 meses.

Todos los ratones usados en este trabajo fueron tratados de acuerdo a los lineamientos de manejo animal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, mismo lugar en donde permanecieron alojados a lo largo de este estudio con comida y agua *ad libitum* y ciclo luz/oscuridad de 12 horas.

4.2 Administración del inmunógeno

Protocolo 1:

Se utilizaron 30 ratones C57BL/6J machos de 8-10 semanas, los cuales se dividieron en cuatro grupos:

Grupo	Péptido	Adyuvante	Vehículo	No. De ratones
1	A β piroGlu11-42	Saponina	PBS	9
2	A β 1-42	Saponina	PBS	9
3	-	Saponina	PBS	6
4	-	-	PBS	6

Cada ratón recibió 20 μ g del péptido correspondiente y una cantidad igual del adyuvante usando PBS como vehículo. El adyuvante elegido fue saponina de *Quillaja bark* (SIGMA-ALDRICH). Se administraron en total 100 μ L a cada ratón de manera intraperitoneal cada quince días durante tres meses y el día previo a cada inmunización, se realizó sangrado de la vena sub-mandibular para evaluar la presencia de anticuerpos.

Protocolo 2:

Se utilizaron 8 ratones hembras 3xTg-AD de 12 meses divididas en dos grupos:

Grupo	Péptido	Adyuvante	Vehículo	No. De ratones
1	AβpiroGlu11-42	Saponina	PBS	4
2	-	Saponina	PBS	4

Cada ratón recibió 20µg del péptido correspondiente y una cantidad igual del adyuvante usando PBS como vehículo. Se administraron en total 100µL a cada ratón de manera intraperitoneal cada semana durante cinco meses al día siguiente de haber sangrado de la vena sub-mandibular para evaluar la presencia de anticuerpos. Las inmunizaciones se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

Dosis	Fecha de sangrado	Fecha de inmunización
1ª dosis		29-octubre-2015
2ª dosis	4-noviembre-2015	5-noviembre-2015
3ª dosis	11-noviembre-2015	12-noviembre-2015
4ª dosis	18-noviembre-2015	19-noviembre-2015
5ª dosis	2-diciembre-2015	3-diciembre-2015
6ª dosis	25-enero-2016	26-enero-2016
7ª dosis	8-febrero-2016	9-febrero-2016
8ª dosis	22-febrero-2016	23-febrero-2016
9ª dosis	15-marzo-2016	16-marzo-2016

Protocolo 3:

Se utilizaron 12 ratones hembras 3xTg-AD de 6 meses divididas en dos grupos:

Grupo	Péptido	Adyuvante	Vehículo	No. De ratones
1	A β piroGlu11-42	Saponina	PBS	6
2	-	Saponina	PBS	6

Cada ratón recibió 20 μ g del péptido correspondiente y una cantidad igual del adyuvante usando PBS como vehículo. Se administraron en total 100 μ L a cada ratón de manera intraperitoneal cada semana al día siguiente de haber sangrado para obtener anticuerpos. Las inmunizaciones se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

Dosis	Fecha de sangrado	Fecha de inmunización
1 ^a dosis		20-junio-2016
2 ^a dosis		6-julio-2016
3 ^a dosis	25-julio-2016	26-julio-2016
4 ^a dosis	23-agosto-2016	24-agoto-2016
5 ^a dosis	13-septiembre-2016	14-septiembre-2016
6 ^a dosis	3-octubre-2016	5-octubre-2016
7 ^a dosis	7-noviembre-2016	8-noviembre-2016
8 ^a dosis	17-enero-2017	19-enero-2017
9 ^a dosis	14-febrero-2017	15-febrero-2017
10 ^a dosis	16-marzo-2017	17-marzo-2017
11 ^a dosis	20-abril-2017	21-abril-2017

4.3. Obtención de sueros

Se obtuvieron entre 200 y 250 μ L de sangre de cada ratón por la vena sub-mandibular en tubos Eppendorf de 1.5mL y se centrifugaron a 7500 rpm por 10 minutos en una

microcentrífuga (*Minispin, Eppendorf, Alemania*). Se obtuvieron los sueros y se transfirieron a tubos iguales nuevos, en donde se centrifugaron otra vez de la misma forma que antes. Se recuperaron los sueros y se almacenaron a 4°C.

4.4 Preparación del tejido cerebral

Al finalizar las inmunizaciones, se obtuvieron entre 500 y 750 µL de sangre de cada ratón y fueron anestesiados con una sobredosis de sevoflurano para perfundirlos con 50 mL PBS frío pH 7.4 por vía ventricular. Se extrajo el cerebro y se separaron los dos hemisferios, uno de ellos se fijó en paraformaldehído (J. T. Baker) al 4% en PBS pH 7.4 a 4°C durante 24 h. El otro hemisferio se congeló a -80°C para análisis bioquímico de proteínas. Los cerebros fijados se deshidrataron mediante un gradiente de sacarosa de 10% 20% y 30%, incubándolos 24 horas en cada una de las concentraciones. Una vez deshidratados, los tejidos se incluyeron en TissueTek (Sakura) y se realizaron cortes de 30µm de grosor en criostato (LEICA). Los cortes se mantuvieron en una solución de almacenamiento (glicerol 30%, etilen glicol 30% en buffer de fosfatos pH 7.5) a -20°C.

4.5 Preparación de los péptidos

Se pesó un 1mg de cada péptido y se diluyó en 450µL de H₂OmQ estéril. Luego fue agitado en un vórtex un par de minutos antes de congelarlo en nitrógeno líquido y descongelarlo tres veces para lograr resuspenderlo. Después se sometieron a sonicación durante veinte minutos más y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se agregaron 50µL de PBS10x estéril para obtener una concentración de 2mg/mL, y se almacenaron a 4°C.

Los péptidos usados fueron:

- i) Aβ₁₋₄₂ [Pyr3] – beta – Amyloid (3-42) (ANASPEC Inc.)
- ii) Aβ₁₋₄₂ [pGlu] – β – Amyloid (11-42) (ANASPEC Inc.)
- iii) Aβ 1-42 Beta- Amylod (1-42) (ANASPEC Inc.)

4.6 Inmunofluorescencia

Se lavaron los tejidos de cerebro 4 veces con TBS 1x, después se realizó la exposición de epítomos en ácido fórmico al 70% (J. T. Baker) por 3 minutos. Se repitió el procedimiento de

lavado para remover el ácido y se permeabilizaron los tejidos utilizando TBS 1X/tritón X-100 0.1% (TBS A) durante 15 minutos. Posteriormente se bloquearon con TBS 1X/tritón X-100 0.1% / albúmina sérica bovina 2% (TBS B), durante 30 minutos y después se incubaron con el anticuerpo primario en TBS B a 4°C toda la noche en agitación.

Los tejidos se lavaron con las 3 soluciones a base de TBS antes mencionadas durante cinco min en cada solución y se incubaron después 1.5 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario TBS - tritón X-100 0.1% - albúmina sérica bovina 2% (TBS B). Los tejidos se volvieron a lavar de la misma manera para finalmente ser adheridos a un portaobjetos y montados con Medio VECTASHIELD/ DAPI (Vector Laboratories Inc.) y un cubreobjetos, antes de ser observados en microscopio de epifluorescencia Nikon

4.7 Conteo del área cubierta por placas amiloides

Las secciones de tejido cerebral fueron teñidas con BAM10 y DAPI y la carga relativa de A β fue evaluada usando un microscopio de fluorescencia Olympus IX51 equipado con una cámara Olympus DP71. Se tomaron fotos representativas a una magnificación 20x y se analizaron usando ImageJ. Las fotografías se convirtieron a blanco y negro de 8-bits y se fijó el umbral de intensidad; establecimos las dimensiones de área usando la marca de escala en cada imagen capturada y analizamos el área de partículas en el rango de 20 μ m a infinito de tamaño y 0 a 1 de circularidad (Image J, NHI)

4.8 Preparación de homogenizados de cerebros

El hemisferio que se destinó para análisis bioquímicos se sonicó en 1mL de buffer de triple detergente con una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas (ROCHE) (HEPES 50Mm, NaCl 150Mm, SDS 0.1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, Nonidet P40 1%, PMSF 1mM,) a 4°C tres veces durante 10 segundos cada una, con intervalos de 15 segundos entre ellas. Finalmente, se centrifugó a 16 000g por 15 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante en alícuotas a -80°C.

Para extraer la fracción de A β insoluble se lavó el pellet dos veces con PBS y se solubilizó en ácido fórmico por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se centrifugó a 16000g

por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se permitió que se evaporara el ácido fórmico antes de guardarlo a -80°C.

4.9 Cuantificación de proteínas

Se siguieron las instrucciones del kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). En breve, se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina con concentraciones de 0 a 2000µg/mL. Después se prepararon 100µL de cada muestra en una dilución 1:50 en PBS y se agregaron 25µL de ellas por duplicado en una placa de microtitulación junto con 200µL del reactivo de trabajo del kit. La placa se incubó por 2 horas a 37°C en oscuridad y al final se dejó 15 min a temperatura ambiente para finalmente ser leída a 562nm en un espectrofotómetro (Opsys MR, DIMEX technologies).

4.10 Evaluación de la presencia de anticuerpos en suero anti-Aβ mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Primero se sensibilizó una placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (Thermo Scientific) con 100µL/pozo de una solución a 5µg/mL del péptido correspondiente (Aβ1-42/ AβpiroGlu11-42) en buffer de carbonatos (pH 9.6) y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó cuatro veces la placa con 300µL/pozo PBS - tween 0.2% antes de bloquear los pozos con 200µL de leche descremada al 2% en PBS por una hora a 37°C. Se lavó la microplaca de la misma forma que en el paso anterior y se agregaron los sueros anti Aβ1-42/ AβpiroGlu11-42 diluidos 1:100 en PBS/leche 2%/ tritón X-100 0.02% y se incubaron una hora a 37°C. El procedimiento de lavado fue repetido y luego se procedió a incubar la placa con anticuerpos secundarios (cabra anti-IgG de ratón, HRP y anti-IgM de ratón, HRP) diluidos 1:2500 en PBS/leche 2% /tritón X-100 0.02% bajo las mismas condiciones que anteriormente. Se lavó la placa de nuevo, se agregaron 100µL de ABTS Single Solution, el sustrato de la peroxidasa y se incubó otra media hora a 37°C. Para concluir, se leyó la densidad óptica a 405nm en un lector de placas (Opsys MR, DIMEX technologies).

4.11 Determinación de isotipos de IgG mediante ELISA

Primero se sensibilizó una placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (Thermo Scientific) con 100µL/pozo de una solución a 5µg/mL del péptido AβpiroGlu11-42 en buffer de carbonatos (pH 9.6) y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó cuatro veces la placa con 300µL/pozo PBS - tween 0.2% antes de bloquear los pozos con 200µL de leche al 2% en PBS por una hora a 37°C. Se lavó la microplaca de la misma forma que en el paso anterior y se agregaron los sueros anti AβE11-42 diluidos 1:100 en PBS/leche 2% /tritón X-100 0.02% y se incubaron una hora a 37°C. El procedimiento de lavado fue repetido y luego se procedió a incubar la placa con anticuerpos secundarios (cabra anti-IgG (H+L) de ratón HRP (Invitrogen)/ rata anti-IgG1 de ratón HRP (Invitrogen)/ ratón anti- IgG2a(b) de ratón biotina (Life Technologies) / conejo anti-IgG2b de ratón HRP (Invitrogen) /cabra anti-IgG3 de ratón HRP (Invitrogen)) disueltos a una concentración de 1:2500 para los dos primeros y 1:1000, para los tres últimos en PBS – leche 2% - tritón X-100 0.02% bajo las mismas condiciones que anteriormente. Se lavó la placa de nuevo y se agregó PBS a todos aquellos pozos que no evaluarían la presencia de IgG2a(b). A los dirigidos contra IgG2a(b) se adicionaron 100µL de avidina-HRP (BD Pharmingen) diluida 1:250 en PBS/leche 2%/tritón X-100 0.02% por una hora a 37°C. Se lavaron únicamente esos pozos nuevamente y se succionó el líquido de los demás. Finalmente se pusieron en cada pozo 100µL de ABTS Single Solution, el sustrato de la peroxidasa con que el que se incubó otra media hora a 37°C. Para concluir, se leyó la densidad óptica a 405nm en un lector de placas (Opsys MR, DIMEX technologies).

4.12 Determinación de reactividad cruzada mediante ELISA

Primero se sensibilizó una placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (Thermo Scientific) con 100µL/pozo del péptido correspondiente (Aβ1-42/ AβpiroGlu11-42/ AβpiroGlu3-42) en una concentración de 5µg/mL en buffer de carbonatos (pH 9.6) y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó cuatro veces la placa con 300µL/pozo PBS/tween 0.2% antes de bloquear los pozos con 200µL de leche al 2% en PBS por una hora a 37°C. Se lavó la microplaca de la misma forma que en el paso anterior y se agregaron los sueros anti AβE11-42 en pozos con los tres péptidos diluidos 1:100 en PBS/leche 2%/tritón X-100 0.02% y se incubaron otra hora a 37°C. El procedimiento de lavado fue repetido y luego se procedió a incubar la placa con anticuerpo secundario cabra anti-IgG de ratón HRP diluido

1:2500 en PBS – leche 2% - tritón X-100 0.02% bajo las mismas condiciones que anteriormente. Finalmente se pusieron en cada pozo 100µL de ABTS Single Solution, el sustrato de la peroxidasa con que el que se incubó otra media hora a 37°C. Para concluir, se leyó la densidad óptica a 405nm en un lector de placas (*Opsys MR, DIMEX technologies*).

4.13 Evaluación de reactividad cruzada mediante western blot

Se colocaron 0.5µg/carril de cada uno de los tres péptidos (Aβ1-42, AβpiroGlu11-42 y AβpiroGlu3-42) en geles de gradiente *NuPAGE Bis-Tris 4-12% 1.0mm* (ThermoFisher Scientific) en una cámara de electroforesis *X-Cell Sure Lock Mini-Cell* (ThermoFisher Scientific) a 150V durante 45 minutos para separarlos. Después se transfirieron en una cámara de transferencia *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BIO-RAD) las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno *Immun-Blot PVDF Membrane* (BIO-RAD) durante 45 minutos a 25V, misma que posteriormente fue teñida con rojo de Ponceau y después se lavó y bloqueó con PBS/leche 2% toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana 4 veces con PBS/Tween-20 0.2% y se incubó con el suero anti- Aβ1-42 o AβpiroGlu11-42 y control (suero de ratón tratado con adyuvante) a una dilución 1:500 en PBS/leche 2%/Tritón X-100 0.02% durante toda la noche a 4°C. Se lavó de la misma forma y se incubó 2h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG y anti-IgM de ratón acoplados a HRP a una dilución 1:2500 y 1:3000, respectivamente en PBS/leche 2%/Tritón X-100 0.02%. Ya transcurrido el tiempo, se repitió el proceso de lavado y se realizó la inmunodetección con el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Dura* (ThermoFisher Scientific) y se imprimió en película sensible a quimioluminiscencia *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare).

4. 14 Dot blot para evaluar la carga amiloide

Se activó una membrana de nitrocelulosa incubándola en TBS 10 minutos y después se montó el equipo *Bio-Dot* de 96 pozas (BIO-RAD) con cuya ayuda se adsorbieron 10µg de proteína de los extractos de los cerebros de ratones 3xTg-AD inmunizados con AβpE11-42 y saponina. Una vez adsorbidas las muestras a la membrana, ésta se retiró del equipo y enjuagó en PBS para después ser teñida con rojo de Ponceau y documentada. A continuación, se lavó para desteñirla y se dejó bloqueando con PBS-leche 2% toda la noche

a 4°C. A la mañana siguiente, se lavó 3 veces con PBS – Tween-20 0.2% y se adicionó el anticuerpo primario, BAM10 (anti Abeta 1-12) disuelto 1:3500 en PBS/leche 2%/Tritón X-100 0.02% toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se repitió el proceso de lavado y luego se agregó anti IgG1 de ratón 1:5000 en PBS/leche 2%/Tritón X-100 0.02%, se incubó una hora y media y se reveló con el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Dura* (ThermoFisher Scientific) y la señal se imprimió en película sensible a quimioluminiscencia Amersham Hyperfil ECL (GE Healthcare).

4.15 Prueba del nido

Se transfirió a los ratones a cajas individuales y una hora antes de que empezara su ciclo de oscuridad, colocamos un cuadro de algodón de 5cm x 5cm en una esquina de cada caja y se tomaron fotografías del estado inicial del material para construir el nido. A la mañana siguiente, se calificó el nido construido por cada ratón de acuerdo con la escala establecida por Deacon, 2006. Según el criterio sugerido, el nido se puede calificar de 1 a 5 de acuerdo con el porcentaje del material que el individuo haya utilizado y el área que el nido ocupe: cuando el puntaje es 1, el material prácticamente se encuentra íntegro (más del 90% intacto); el número 2 denota que el individuo utilizó solamente parte del material (entre 50 y 90% intacto); en el 3, la mayoría del material fue usado, sin embargo no es posible identificar el sitio del nido pues ha sido desperdigado por la caja; el número 4 se refiere a un nido con forma bien definida que se encuentra confinado a un cuarto de la caja pero con paredes bajas; finalmente, el último número se refiere a un nido “perfecto” en donde más del 50% de sus paredes son más altas que el cuerpo del ratón y está restringido a un cuarto de la caja (Deacon, 2006).

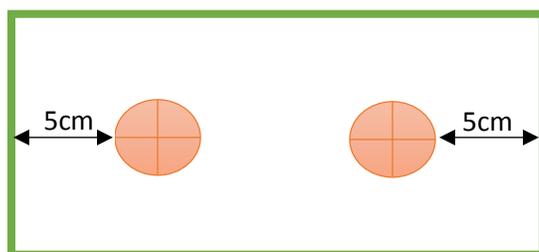
4.16 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo

Primero se preparó y etiquetó una caja con aserrín limpio para cada ratón. Después se instaló el equipo de grabación en posición vertical de tal manera que tuviera una vista amplia del interior de la caja en turno. La prueba se dividió en tres sesiones:

Sesión de aclimatación: Se colocó al ratón en la caja con aserrín, sin tapa y ningún otro objeto bajo el equipo de grabación durante 5 minutos después de los cuales, se regresó al ratón a su caja.

Al día siguiente, se prepararon nuevas cajas con aserrín y dos tubos Falcon de 50mL por ratón fueron rellenos con aserrín y limpiados con etanol al 70% para minimizar las señales olfativas.

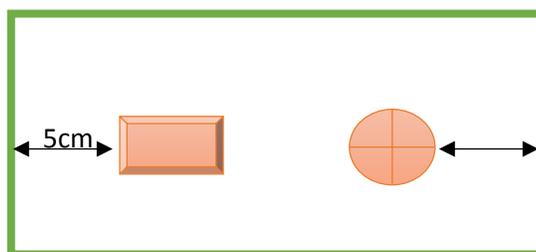
Sesión de familiarización: La caja en turno volvió a ser colocada bajo el equipo de grabación. Los dos tubos Falcon de cada ratón se colocaron dentro de la caja designada a 5cm de distancia de las paredes y se permitió al ratón explorar libremente durante 5 minutos para después regresarlo a su caja. El acomodo final se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. El interior de las cajas para la sesión de familiarización. El rectángulo verde representa los bordes de la caja y los círculos anaranjados, los tubos Falcon y su ubicación dentro de ella.

4 horas después de esta sesión se reemplazó en cada caja uno de los tubos Falcon con una caja para cultivo celular también rellena de aserrín. Ambos se limpiaron de nuevo con etanol al 70% antes de colocarlos bajo la cámara de video.

Sesión de prueba: se transfirieron los ratones a cajas individuales con un objeto nuevo (caja para cultivo celular) y uno ya conocido (tubo Falcon) y se grabó su actividad durante 10 minutos (Esquema 2).



Esquema 2. El interior de las cajas para la sesión de prueba. El rectángulo verde representa los bordes de la caja, el círculo anaranjado, el tubo Falcon y el rectángulo, la caja para cultivo celular.

Para el análisis, se tomaron en cuenta tres tiempos: Primero, el tiempo en que el ratón tardaba en alcanzar 20 segundos de exploración teniendo en cuenta ambos objetos, segundo, el tiempo que pasaba el individuo explorando el objeto ya conocido y, finalmente, el tiempo que invertía explorando el objeto nuevo.

4.17 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando SAS University Edition (SAS Institute, USA) y las gráficas fueron producidas en Excel (Microsoft Office). Se presenta en cada barra el promedio \pm la desviación estándar.

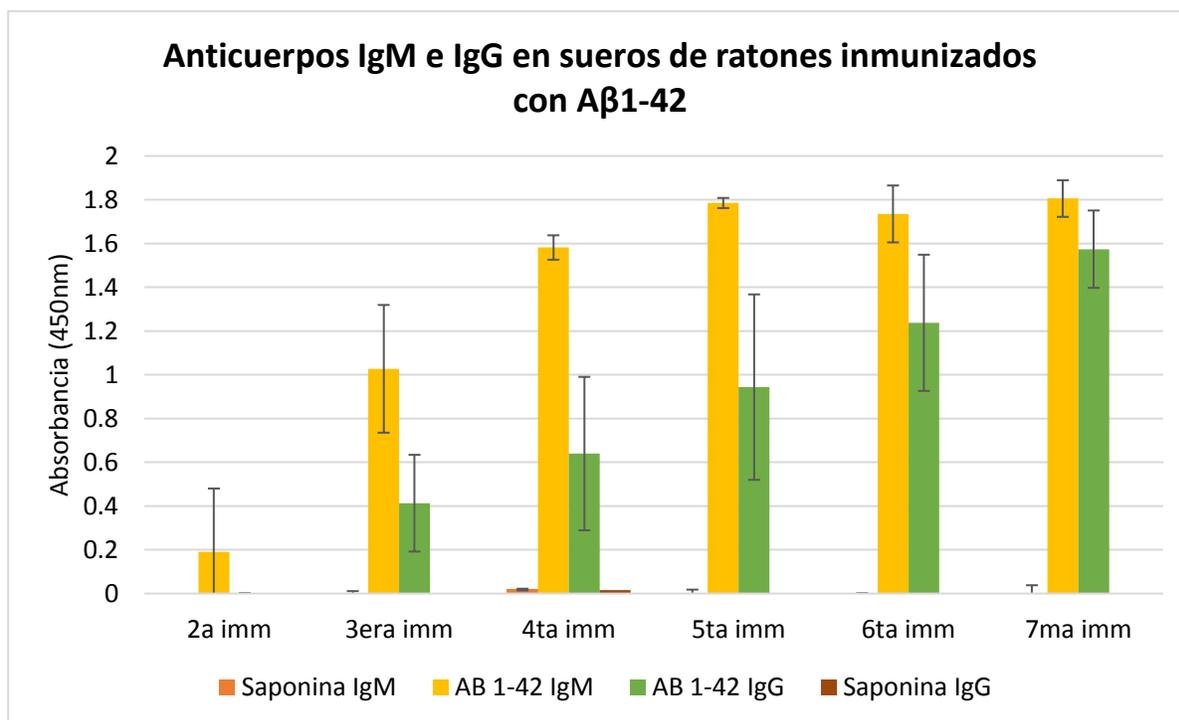
5. Resultados

5.1 Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-A β 1-42 y anti-A β piroGlu11-42 en el suero de ratones C57BL/6J inmunizados con los péptidos en presencia de saponina.

Ratones machos C57BL/6J de 8 semanas de edad fueron inmunizados de manera intraperitoneal con 20 μ g de A β 1-42 por ratón 6 veces, con intervalos de 15 días entre ellas.

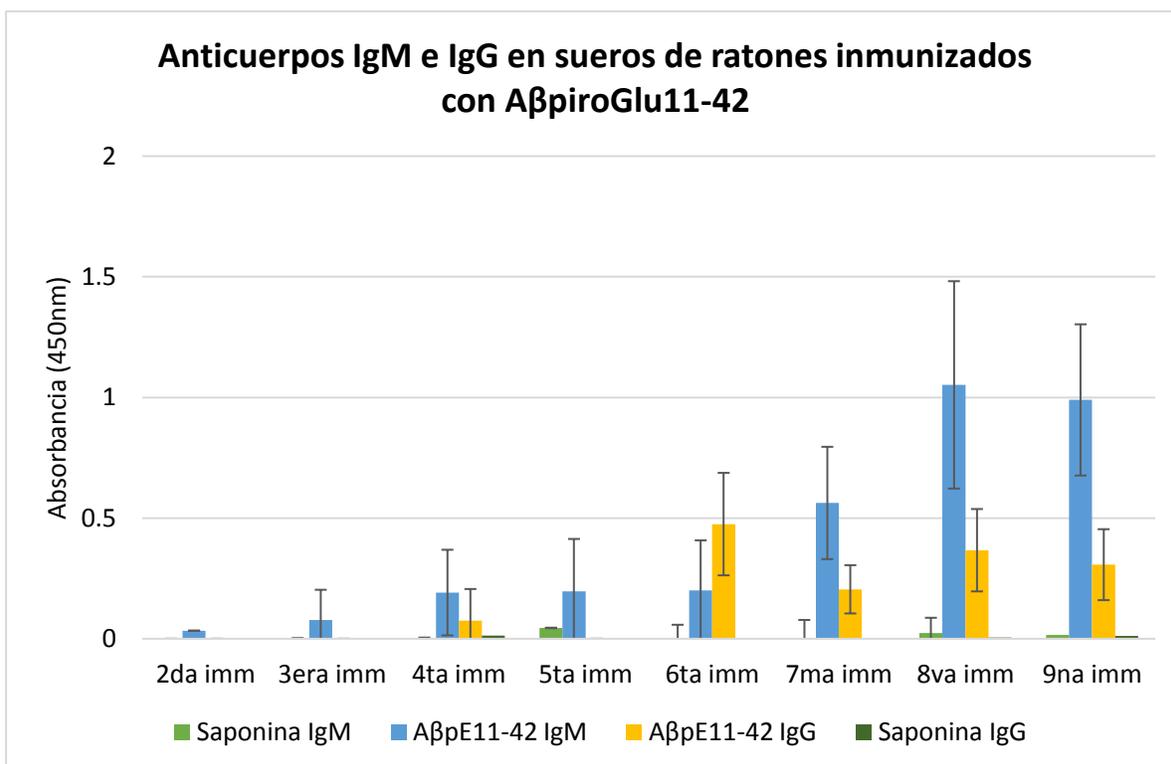
Para comprobar que el péptido A β 1-42 era capaz de causar la producción de anticuerpos en ratones, realizamos un ELISA de sus sueros con el péptido sensibilizado en la placa y revelamos con anti-IgG o anti-IgM de ratón, según fuera el caso.

El adyuvante utilizado fue saponina en la misma concentración que el péptido (Gráfica 1). Se eligió usar A β 1-42 como control positivo pues está bien documentado que desencadena una fuerte y rápida respuesta inmune en ratones, mismo efecto que se observó en estos experimentos. La presencia de anticuerpos de clase IgM se observó a partir de la segunda inmunización en algunos individuos y en todos a partir de la tercera. Los anticuerpos de clase IgG aparecieron hasta la tercera inmunización. No se observaron anticuerpos en el grupo que fue inyectado solamente con adyuvante, confirmando la especificidad de la respuesta.



Gráfica 1: Anticuerpos de clase IgM e IgG en sueros de ratones C57Bl/6 de 6 a 8 semanas inmunizados con A β 1-42 (n=9) y controles de adyuvante (n=6) detectados mediante la técnica de ELISA.

Un segundo grupo de ratones con las mismas características, pero al que se administró A β A β piroGlu11-42, fue evaluado de la misma manera y se encontró que la respuesta inmune humoral fue menos intensa y más lenta, como se puede apreciar en la gráfica 2. En este grupo, la presencia de anticuerpos de clase IgM anti-A β piroGlu11-42 no apareció en todos sus miembros hasta la sexta inmunización. Por otro lado, aquellos anticuerpos de clase IgG aparecieron desde la cuarta inmunización en algunos individuos, pero la respuesta se uniformó en el quinto refuerzo o sexta inmunización. Lo anterior apunta a que el péptido A β piroGlu11-42 es menos inmunogénico que A β 1-42. Al igual que para el péptido de longitud completa, la respuesta fue específica pues no se observaron anticuerpos en el grupo control de ninguna de las dos clases.



Gráfica 2: Anticuerpos de clase IgM e IgG en sueros de ratones C57Bl/6 de 6-8 semanas inmunizados con A β piroGlu11-42 (n=9) y controles de adyuvante (n=6) detectados mediante la técnica de ELISA.

5.2 Reconocimiento de tres péptidos amiloides por sueros anti-A β 1-42 y anti-A β piroGlu11-42

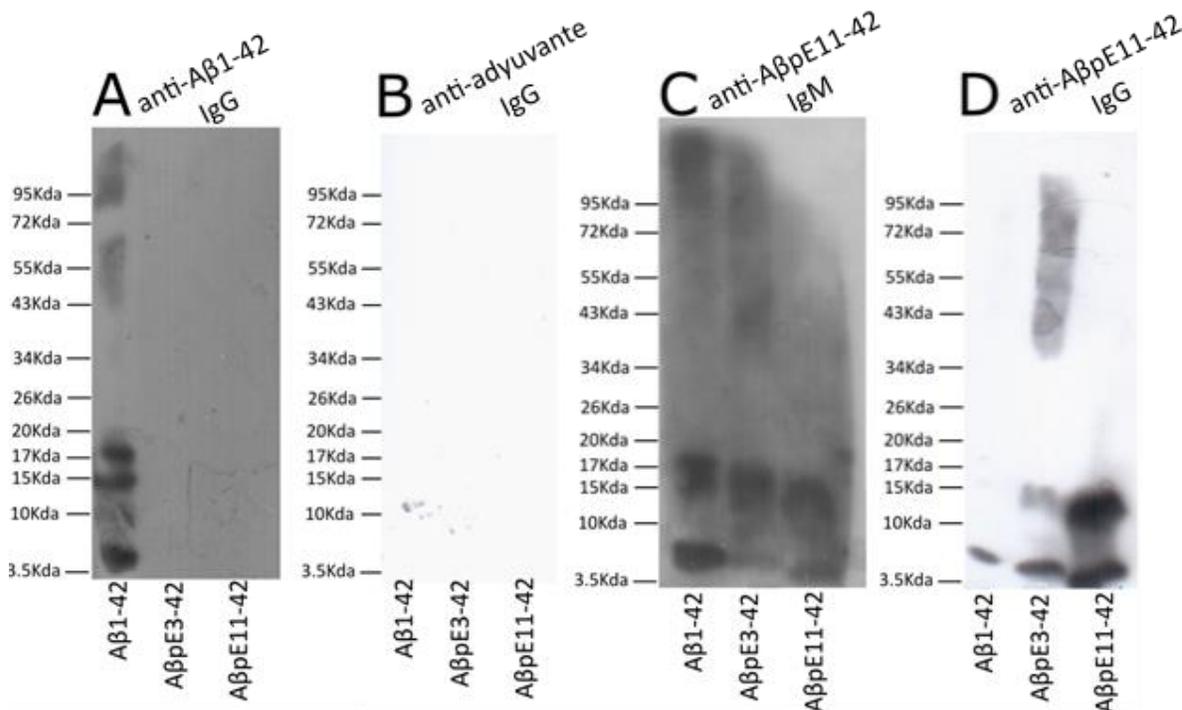


Figura 10. Western blot del reconocimiento de A β 1-42, A β piroGlu3-42 y A β piroGlu11-42 por los sueros anti A β piroGlu11-42 y A β 1-42. (A) Membrana revelada con suero anti-A β 1-42 (IgG), (B) membrana revelada con suero control (adyuvante) (IgG), (C) membrana revelada con anti-A β piroGlu11-42 (IgM) y (D) membrana revelada con anti-A β piroGlu11-42 (IgG)

Después de confirmar que los ratones C57BL/6J eran capaces de montar una respuesta inmune humoral específica contra el péptido A β piroGlu11-42, procedimos a comprobar a qué péptidos amiloides reconocían los anticuerpos que se habían producido. La comprobación se realizó mediante un western blot en el que corrimos 3 péptidos amiloides diferentes en geles de gradiente: A β 1-42, A β piroGlu3-42 y A β piroGlu11-42. Se transfirieron a membranas de PVC, mismas a las que se agregaron los sueros (anti A β 1-42, anti-A β piroGlu11-42 o anti-adyuvante) y después anticuerpos secundarios (IgM o IgG). Los resultados, como se puede observar en la figura 10, fueron los siguientes:

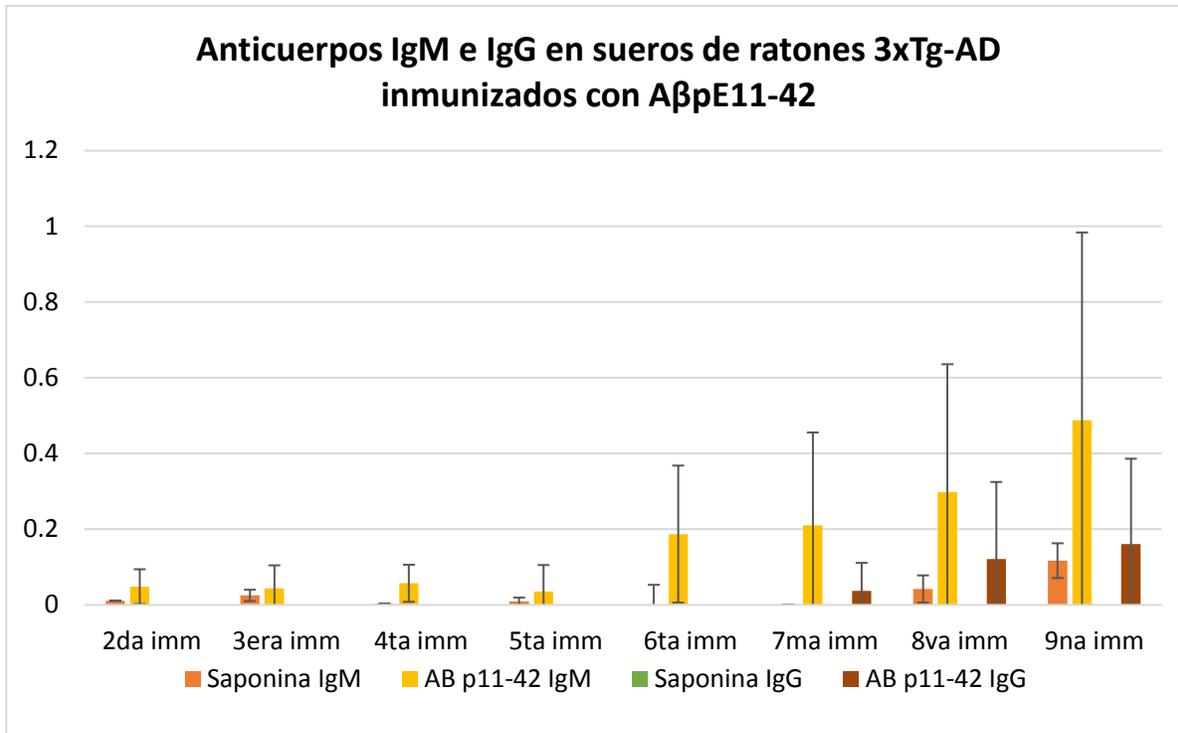
- i. El suero control (ratón administrado solo adyuvante) revelado con anti-IgG de ratón no reconoció a ningún péptido (Fig. 10B).

- ii. Los anticuerpos en el suero anti-A β 1-42 revelado con anti-IgG de ratón reconocieron solamente a A β 1-42 en sus formas monomérica y oligoméricas (Fig. 10A).
- iii. Los anticuerpos en el suero anti- A β piroGlu11-42revelado con anti-IgM de ratón reconocieron al monómero de A β 1-42 y a sus oligómeros. También se unieron al monómero y a los oligómeros de A β piroGlu3-42al igual que a A β pE11-42 (Fig. 10C).
- iv. Los anticuerpos en el suero anti- A β piroGlu11-42revelado con anti-IgG de ratón reconocieron al monómero de A β 1-42, al monómero y a los oligómeros de A β piroGlu3-42 al igual que a A β piroGlu11-42 (Fig. 10D).

5.3 Evaluación de la producción de anticuerpos anti- A β piroGlu11-42en ratones 3xTg-AD viejos inmunizados con el péptido en presencia de saponina.

Una vez comprobado que los ratones C57BL/6 eran capaces de producir anticuerpos anti-A β piroGlu11-42 específicos que reconocían a los péptidos A β piroGlu3-42y A β 1-42, proseguimos a indagar si individuos transgénicos tendrían la misma respuesta.

Se utilizó a un grupo de hembras 3xTg-AD de 12 meses de edad, las cuales recibieron 20 μ g de A β piroGlu11-42 (con una cantidad igual de saponina) o adyuvante en 9 ocasiones referidas en la tabla de la página 35. Como se muestra en la gráfica 3, los anticuerpos anti-A β pE11-42 aparecen de manera lenta, primero los de clase IgM y después los de clase IgG. También es notoria la gran desviación estándar que presentan los datos debido a que solo la mitad de los individuos produjo anticuerpos contra el péptido. No se encontraron anticuerpos anti-A β pE11-42 en el suero de los ratones que recibieron solamente el adyuvante.



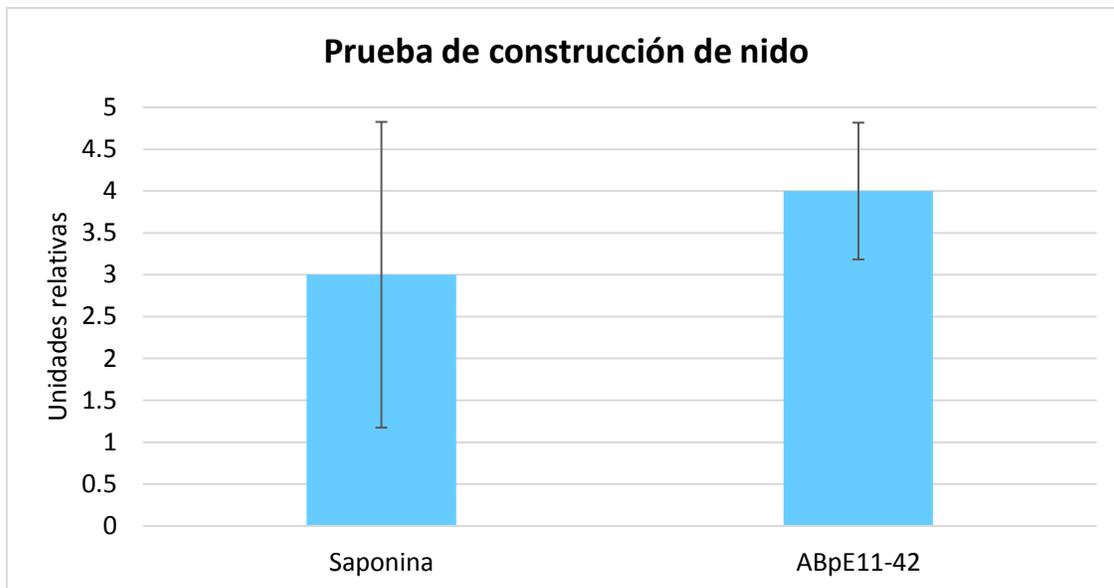
Gráfica 3: Producción de anticuerpos de clase IgM e IgG en sueros de ratones 3xTg-AD de 12 meses inmunizados con AβpE11-42 (n=4) y controles (n=4) detectados mediante ELISA.

5.4 Pruebas de conducta en ratones 3xTg-AD viejos:

5.4.1 Prueba de construcción de nido

Se ha descrito que cuando la conducta de anidamiento en roedores se encuentra dañada, esto puede ser un indicador de que el hipocampo también lo está por lo que se llevó a cabo una prueba de anidamiento para evaluar la función del hipocampo (Deacon, 2006). A los 17 meses, a todos los ratones se les puso en cajas individuales y después fueron provistos con un cuadrado de algodón de 5x5 cm para que construyeran su nido una hora antes de que comenzara su ciclo de oscuridad y la mañana siguiente se evaluaron los nidos.

Siguiendo los criterios anteriormente descritos, se obtuvieron mediciones que se resumen en la gráfica 4. Se analizaron tres ratones del grupo experimental y cuatro del grupo que recibió solamente adyuvante. Se observó una tendencia del grupo de ratones tratados con AβpE11-42 a construir nidos que recibirían puntajes más altos, aunque las diferencias no fueron significativas (P 0.373).

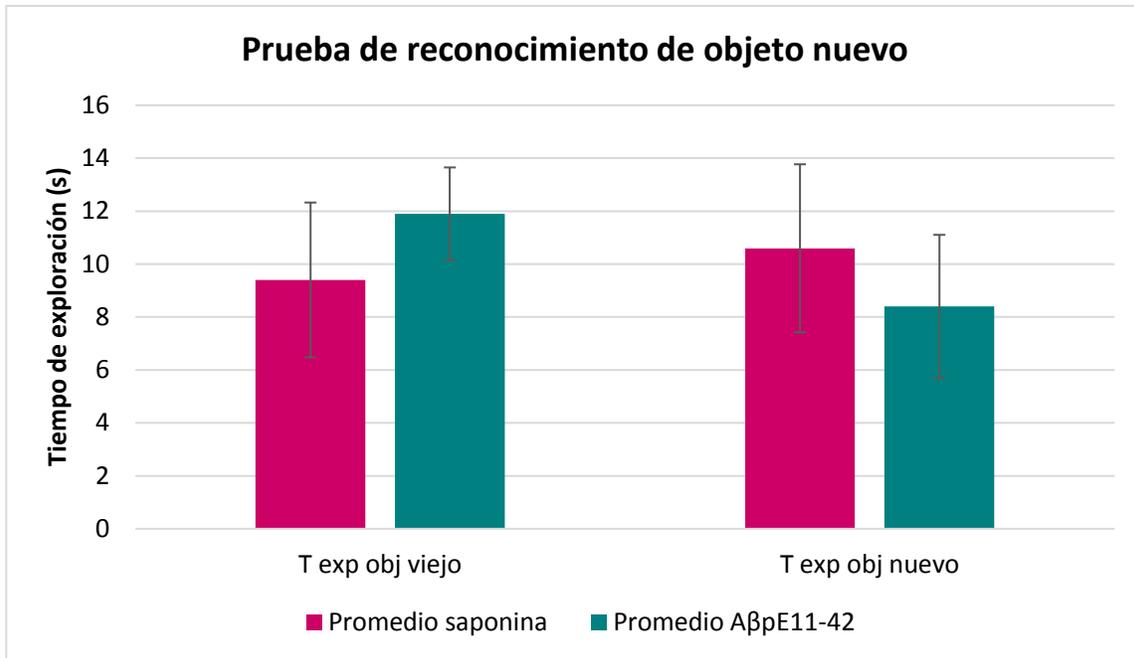


Gráfica 4: Resultados de la prueba de construcción del nido en ratones 3xTg-AD hembras de 17 meses tratadas con AβpE11-42 (n=4) y adyuvante sólo (n=4) basados en los criterios de Deacon, 2006. Se realizó una prueba de t de Student y no se encontraron diferencias significativas.

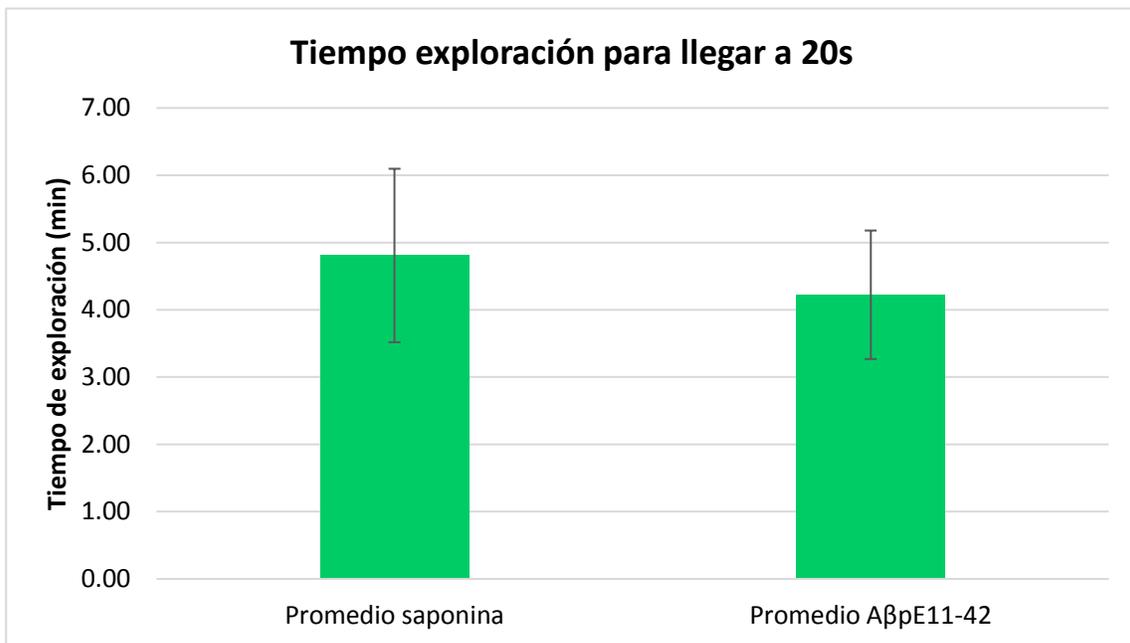
5.4.2 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo

Este ensayo se basa en la predilección innata de los roedores por explorar un objeto nuevo que uno que ya les es familiar por lo que es de esperarse que los individuos pasen más tiempo explorando el objeto más novedoso. Para este fin, a los ratones les fueron presentados dos objetos iguales y se les dio tiempo para que pudieran familiarizarse con ellos para que cuatro horas después, se cambiara uno de los objetos por otro diferente.

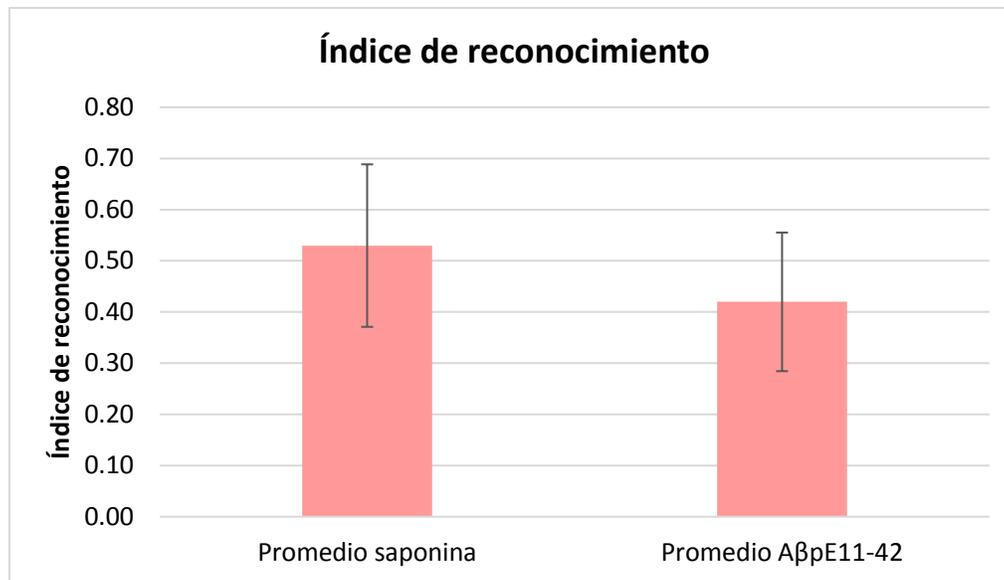
La prueba se realizó a ratones 3xTg-AD de 17 meses y se analizaron tres ratones del grupo experimental y cuatro del grupo que recibió solamente adyuvante. Se comparó el tiempo que los individuos invertían explorando el objeto viejo, el objeto nuevo (Gráfica 5), el tiempo que les tomó llegar a 20 segundos totales de exploración (Gráfica 6) y el índice de reconocimiento, dado por la relación entre el tiempo que el ratón exploró el objeto nuevo y los 20 segundos de totales de explotación (Gráfica 7) entre el grupo experimental (ratones inmunizados con AβpiroGlu11-42) y el grupo control. El análisis estadístico no arrojó evidencia de la presencia de diferencias significativas en ninguno de los rubros mencionados entre los grupos.



Gráfica 5. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Histograma del análisis del tiempo promedio de exploración de cada objeto por el grupo de ratones experimentales (n=3) y controles de adyuvante (n=4). No se encontraron diferencias significativas.



Gráfica 6. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Análisis del tiempo promedio de que le tomó a cada grupo de ratones (experimentales (n=3) y controles de adyuvante (n=4)) alcanzar 20 segundos de exploración. No se hallaron diferencias significativas.



Gráfica 7. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Histograma del índice de reconocimiento (tiempo de exploración del objeto nuevo/20s) del grupo de ratones experimentales (n=3) y controles de adyuvante (n=4). No se encontraron diferencias significativas.

5.5 Análisis de la carga amiloide en cerebros de ratones 3xTg-AD viejos inmunizados con el péptido en presencia de saponina

Diez días después de la última inmunización, los ratones 3xTg-Ad de 18 meses fueron anestesiados, sacrificados y sus cerebros se disectaron.

Para evaluar si los anticuerpos producidos contra el péptido Aβ₁₋₄₂ eran capaces de reducir la carga amiloide en el cerebro de ratones 3xTg-AD de 18 meses, realizamos dos ensayos de dot-blot: uno con la fracción soluble de Aβ y un segundo con la insoluble. Para ambos, se adsorbieron los sueros de los ratones a una membrana de PVC que después se tiñó con Ponceau (para la cuantificación de proteínas totales) y escaneó para finalmente ser revelada con BAM10, un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de Aβ, y anti-IgG1 de ratón.

En la figura 11 se observa el revelado del dot-blot de la fracción soluble con BAM10 + anticuerpo secundario (anti-ratón IgG1) (Fig. 11A), con anticuerpo secundario (Fig. 11B) y con Ponceau (Fig. 11C) y en la gráfica 8 el análisis por densitometría de esos resultados. No

se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.052$), aunque sí se observó una tendencia a la reducción de la carga amiloide en aquellos individuos del grupo que recibió inmunizaciones de A β piroGlu11-42.

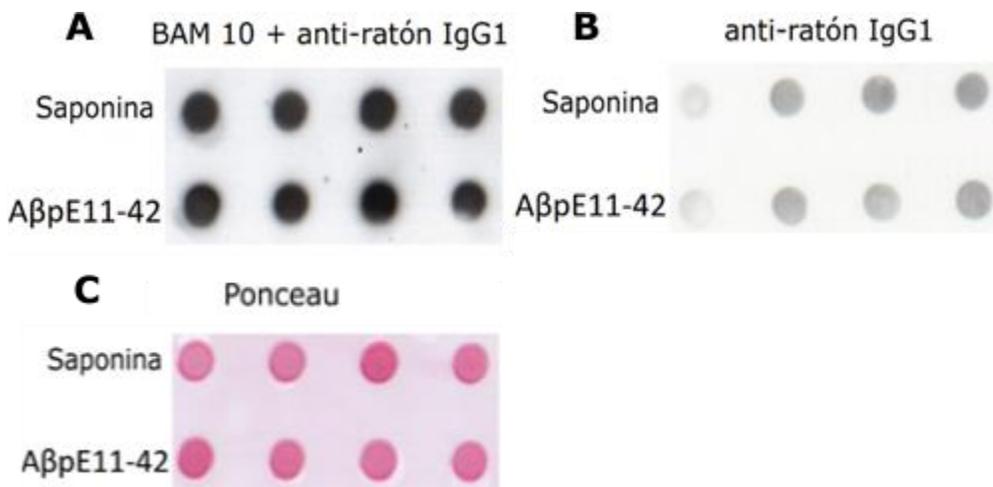
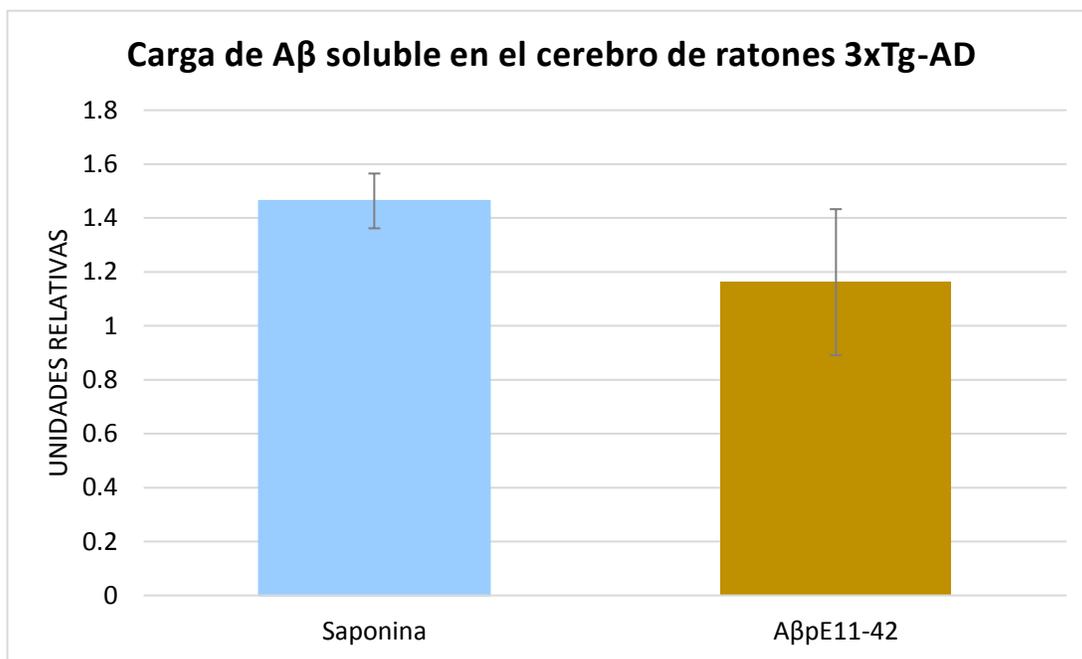


Figura 11. Dot blot para analizar la carga de A β en tejido cerebral de ratones 3xTg-AD hembras de 18 meses. Dot blot revelado con BAM10 + anti-ratón IgG1 (A), control que se reveló sólo con anticuerpo secundario (B) y la membrana teñida con Ponceau (C).



Gráfica 8. Histograma de la cuantificación de A β por análisis de densitometría del dot blot del grupo de ratones experimentales ($n=4$) y controles de adyuvante ($n=4$). Las densidades medias de los puntos fueron normalizadas con Ponceau para cada punto. No se encontraron diferencias significativas.

En la figura 12 se observa el revelado del dot-blot de la fracción insoluble con BAM10 + anticuerpo secundario (anti-ratón IgG1) (Fig. 12A), con anticuerpo secundario (Fig. 12B) y con Ponceau (Fig. 12C) y en la gráfica 9, el análisis por densitometría de esos resultados. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.31$)

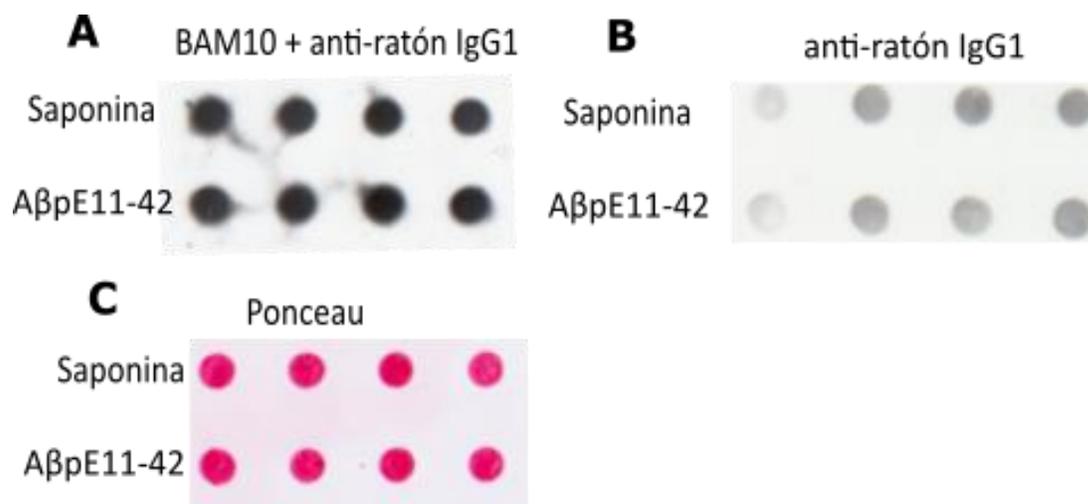
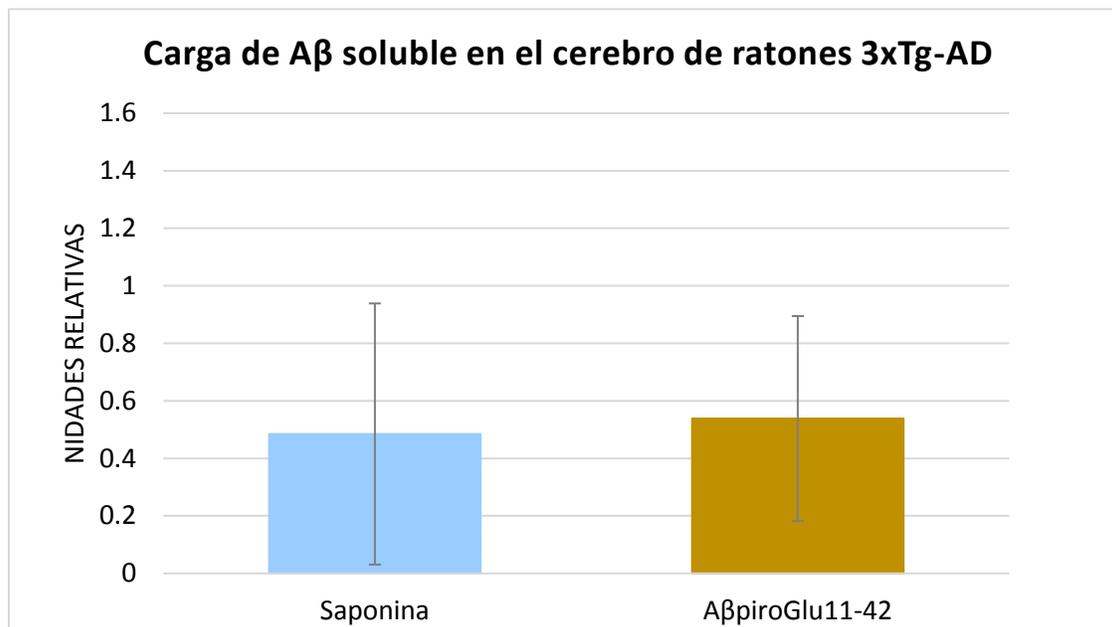


Figura 12. Dot blot para analizar la carga de Aβ insoluble en el tejido cerebral de ratones 3xTg-AD hembras de 18 meses. Dot blot revelado con BAM10 + anti-ratón IgG1 (A), control que se reveló sólo con anticuerpo secundario (B) y la membrana teñida con Ponceau (C).



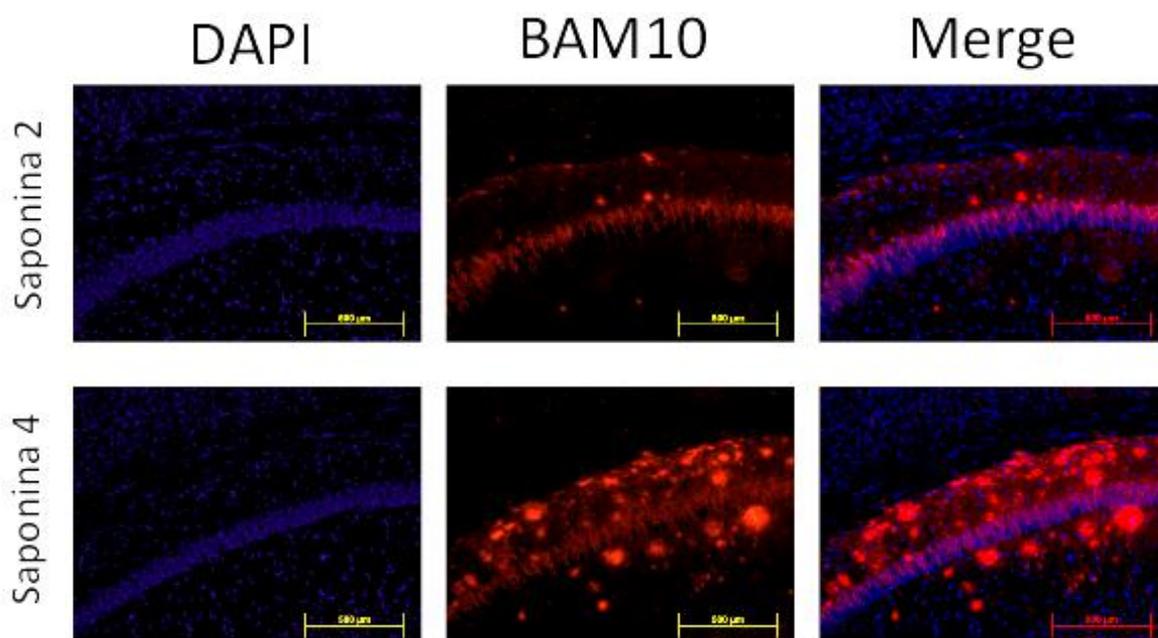
Gráfica 9. Histograma de la cuantificación de Aβ por análisis de densitometría del dot blot del grupo de ratones experimentales ($n=4$) y controles de adyuvante ($n=4$). Las densidades medias de los puntos fueron normalizadas con Ponceau para cada punto. No se encontraron diferencias significativas.

5.6 Evaluación del área cubierta por placas amiloides en el cerebro de los ratones 3xTg-AD de 18 meses inmunizados con el péptido en presencia de saponina.

Para comprobar la presencia de placas amiloides en el cerebro de los ratones 3xTg-AD se realizaron tinciones con BAM10 y DAPI (para evidenciar A β y Núcleos Celulares respectivamente) y se observaron al microscopio de fluorescencia (figura 9). Se tomaron fotos de la región CA1 del hipocampo y de la corteza a 10x y se cuantificó el área cubierta por placas de A β usando el programa ImageJ.

Se confirmó la presencia de péptidos amiloides en los tejidos de todos los ratones transgénicos, tanto de forma intracelular como extracelular; como se esperaba, no se observó marca de BAM10 en el tejido del ratón C57BL/6 silvestre, solo de DAPI.

En la figura 13 se muestran algunas fotografías representativas, pero se analizaron todas las que obtuvimos para cuantificar el área cubierta por las placas. Los resultados se muestran a continuación:



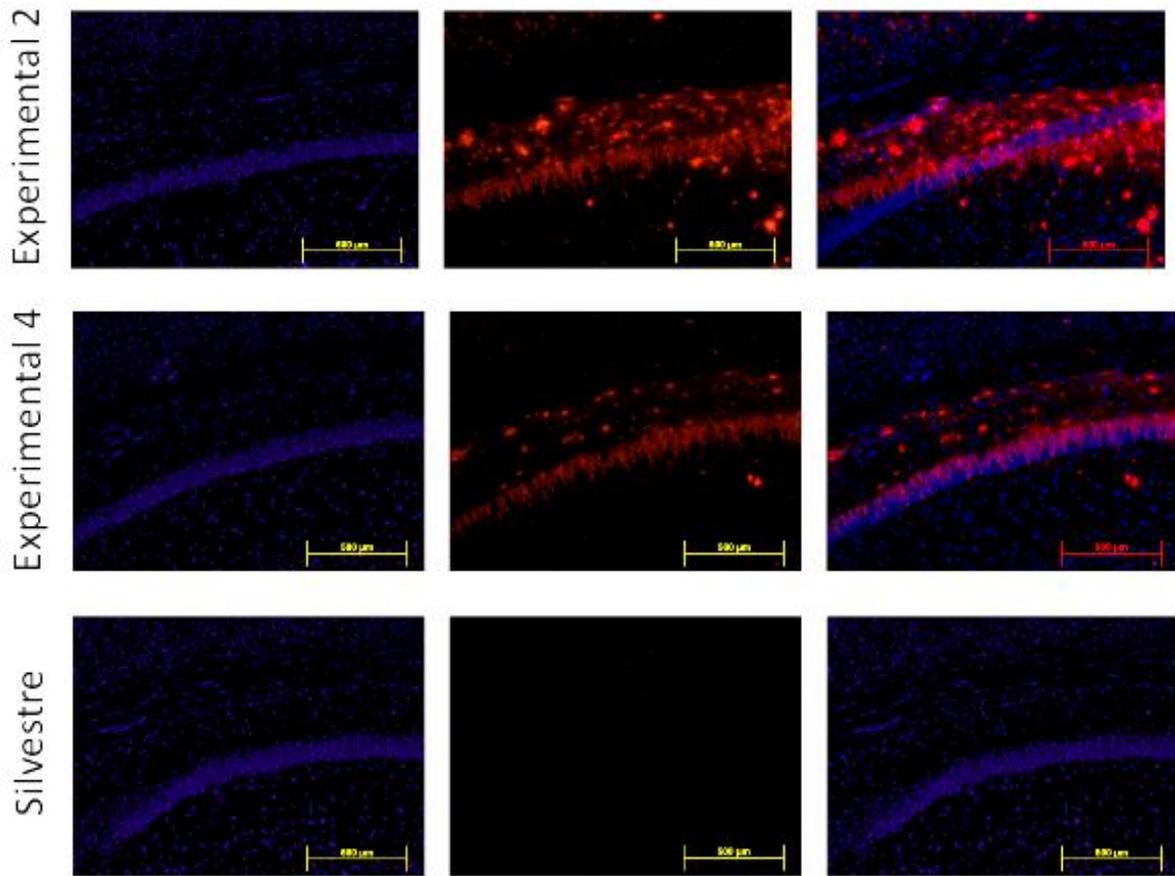
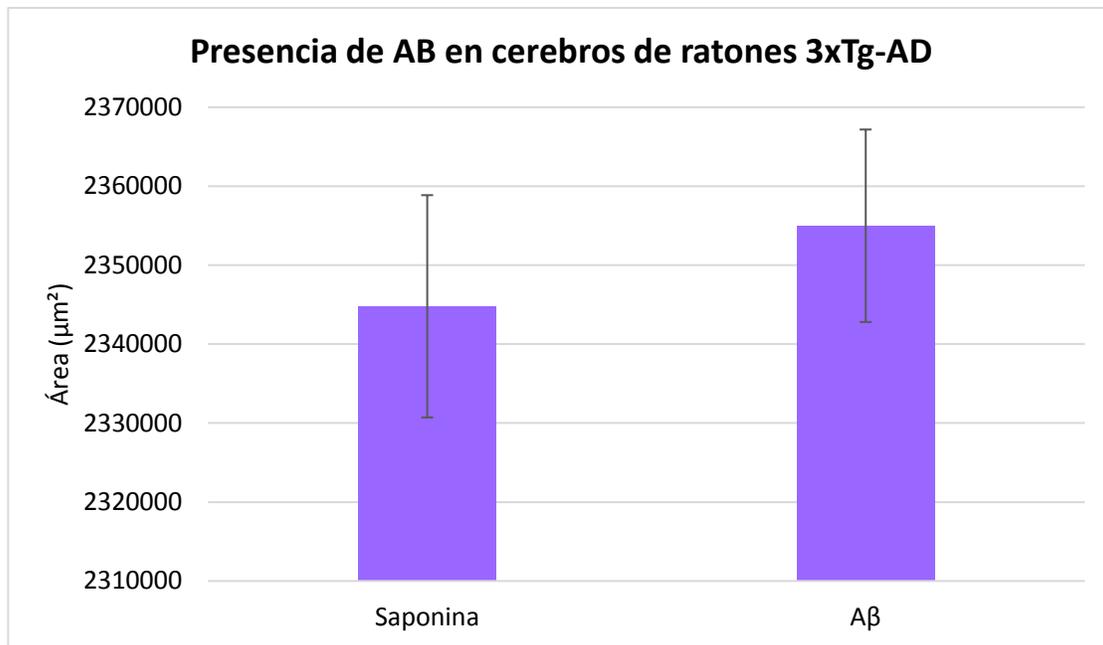


Figura 13. Detección de placas amiloides en cerebros de ratones 3xTg-AD de 18 meses. En las dos filas superiores se observan tejidos de controles de adyuvante, las siguientes dos comprenden tejidos de ratones que recibieron A β pE11-42. La última muestra es de un ratón no transgénico C57BL/6 de la misma edad. En la primera columna se muestra la tinción con DAPI que evidencia el núcleo de las células, en la segunda, el marcaje de los péptidos amiloides por BAM10 y en la última, la combinación de las dos anteriores. Barra de escala: 500 μ m

Como se puede apreciar en la gráfica 10, hay gran variabilidad en los resultados dentro del área que cubren los péptidos amiloides en cada grupo y no se encontraron diferencias significativas entre ellos.



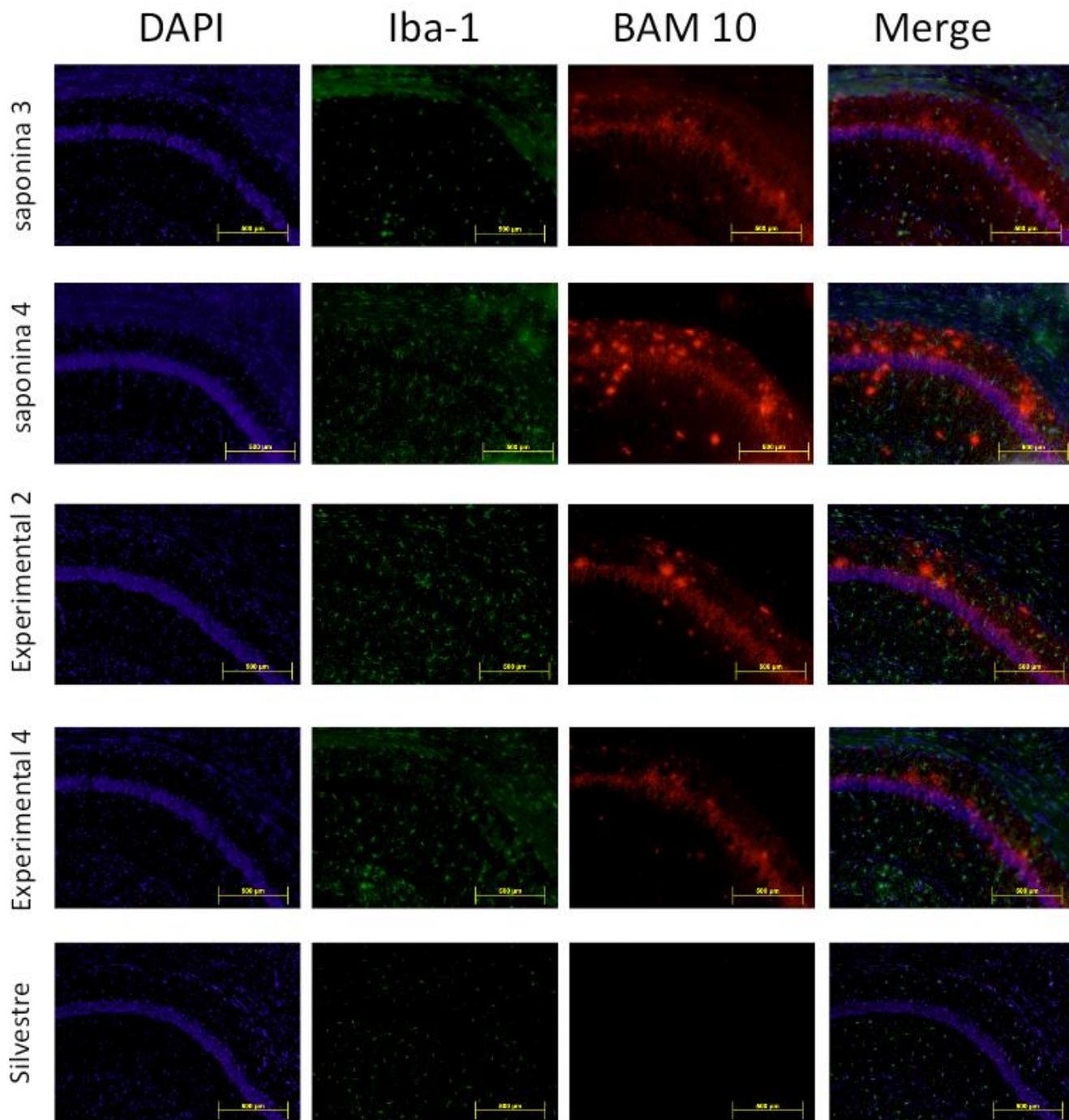
Gráfica 10. Cuantificación del área cubierta por agregados amiloides en cerebros de ratones 3xTg-AD de 18 meses. Se tiñeron los tejidos con BAM10 y DAPI, se tomaron fotografías de la región CA1 de la corteza a 10x del grupo experimental (n=4) y del control de adyuvante (n=3) y se analizaron mediante ImageJ. No se encontraron diferencias significativas entre grupos (p= 0.18)

5.7 Análisis de la ubicación de las placas amiloides con respecto a la microglía en el cerebro de los ratones 3xTg-AD de 18 meses inmunizados con el péptido en presencia de saponina.

Una vez que demostramos que en todos los cortes histológicos obtenidos había placas amiloides, nos preguntamos si había células de microglía en su proximidad, como se ha reportado ya antes. Para tal propósito se realizaron dobles tinciones con anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes.

Se usó un anticuerpo específico para detectar la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1), una proteína específica de microglía y macrófagos y BAM10, un anticuerpo monoclonal que reconoce los aminoácidos 1-12 de Aβ. En la figura 14 se muestran algunas fotografías obtenidas con esta doble tinción en donde observamos la presencia de placas amiloides por BAM10 en todos los ratones transgénicos, pero no así en el tejido de ratón silvestre ni aquel que solo estuvo en contacto con anticuerpos secundarios. La marca de Iba-1 se puede ver en todos los tejidos, con excepción del que

solo recibió anticuerpos secundarios. En la figura 15 se observan acercamientos a microglías que se encuentran en la proximidad de los agregados de A β en el cerebro de uno de los controles y uno de aquellos inmunizados con A β piroGlu11-42. No se observaron diferencias significativas en la morfología de las células entre ambos grupos.



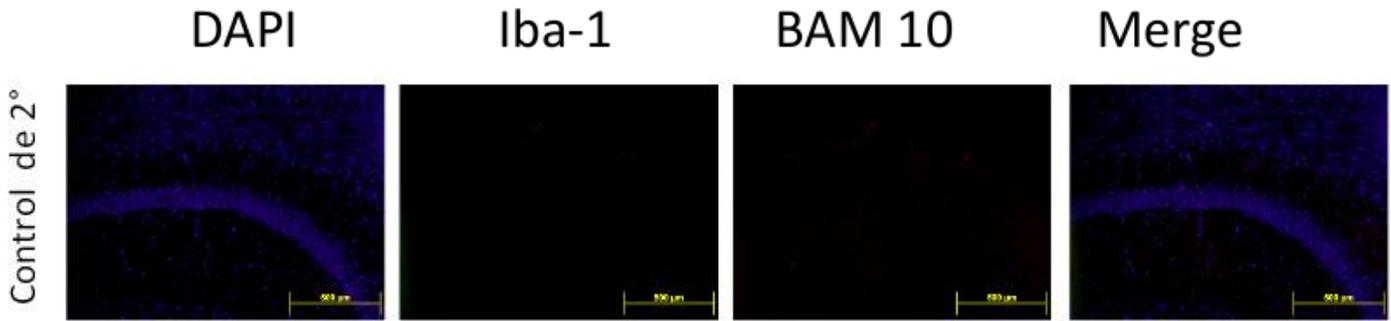


Figura 14. Inmunodetección de células de microglía y péptidos beta-amiloides en cerebros de ratones 3xTg-AD de 18 meses. En las dos filas superiores se observan tejidos de controles de adyuvante, las siguientes dos comprenden tejidos de ratones que recibieron A β pE11-42. La quinta muestra la tinción del cerebro de un ratón no transgénico C57BL/6 de la misma edad y en la última fila se observa el cerebro de uno de los controles de saponina pero que no se tiñó con anticuerpo primario. En la primera columna se muestra la tinción con DAPI que evidencia el núcleo de las células, en la segunda se ven las células de microglía marcadas por un anticuerpo anti-Iba-1, en la tercera el marcaje de los péptidos amiloides por BAM10 y en la última, la combinación de las tres anteriores. Barra de escala: 500 μ m

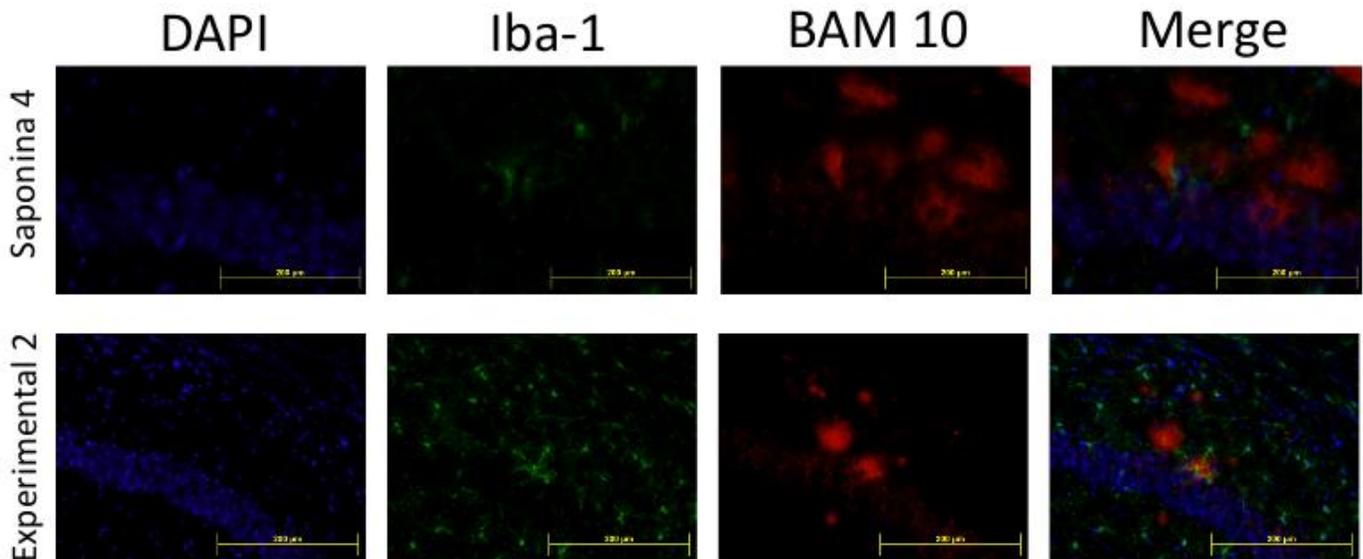
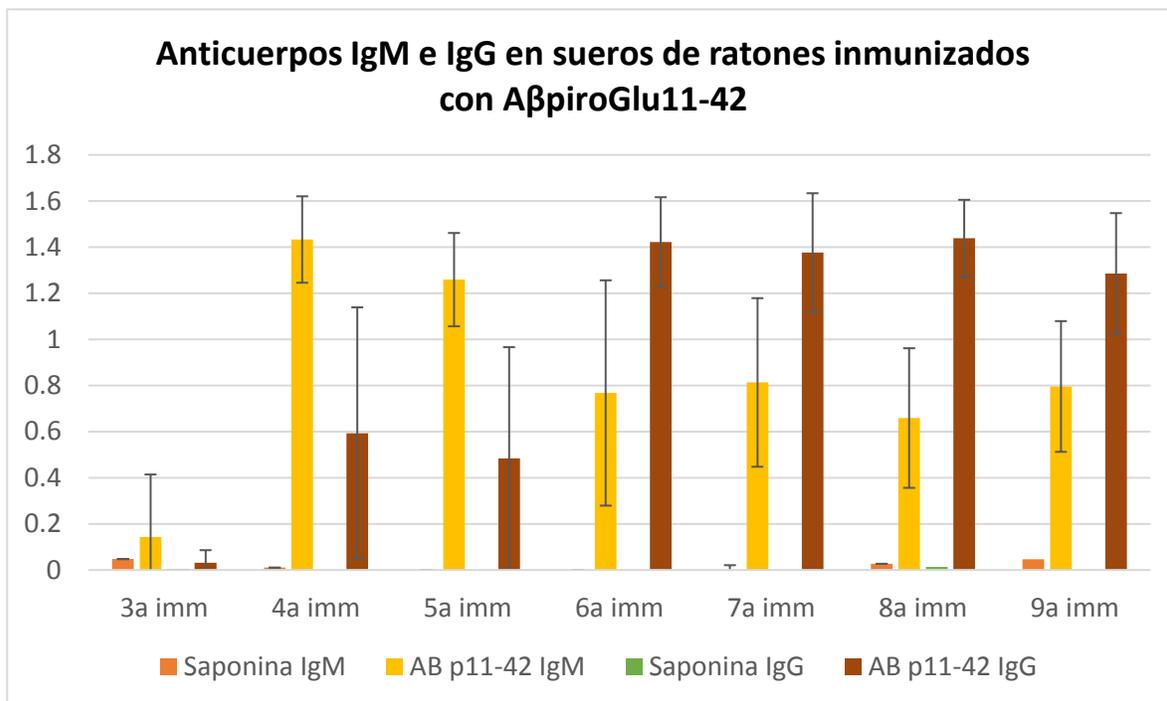


Figura 15. Inmunodetección de células de microglía y péptidos beta-amiloides en cerebros de ratones 3xTg-AD de 18 meses. En la fila superior se observan tejidos de un control de adyuvante y la inferior el tejido de un ratón que recibieron A β pE11-42. En la primera columna se muestra la tinción con DAPI que evidencia el núcleo de las células, en la segunda se ven las células de microglía marcadas por un anticuerpo anti-Iba-1, en la tercera el marcaje de los péptidos amiloides por BAM10 y en la última, la combinación de las tres anteriores. Barra de escala: 200 μ m

5.8 Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-A β piroGlu11-42 en el suero de ratones 3xTg-AD jóvenes inmunizados con el péptido en presencia de saponina.

Dado que no observamos diferencias significativas en la carga amiloide ni en las pruebas de memoria, nos preguntamos si la falta del efecto protector podría tener que ver con la edad de los ratones que elegimos; la patología ya estaba desarrollada al momento del inicio de la terapia. Por eso comenzamos a repetir el experimento en ratones hembras 3xTg de 6 meses siguiendo el mismo protocolo, esta vez usamos seis individuos en cada grupo.

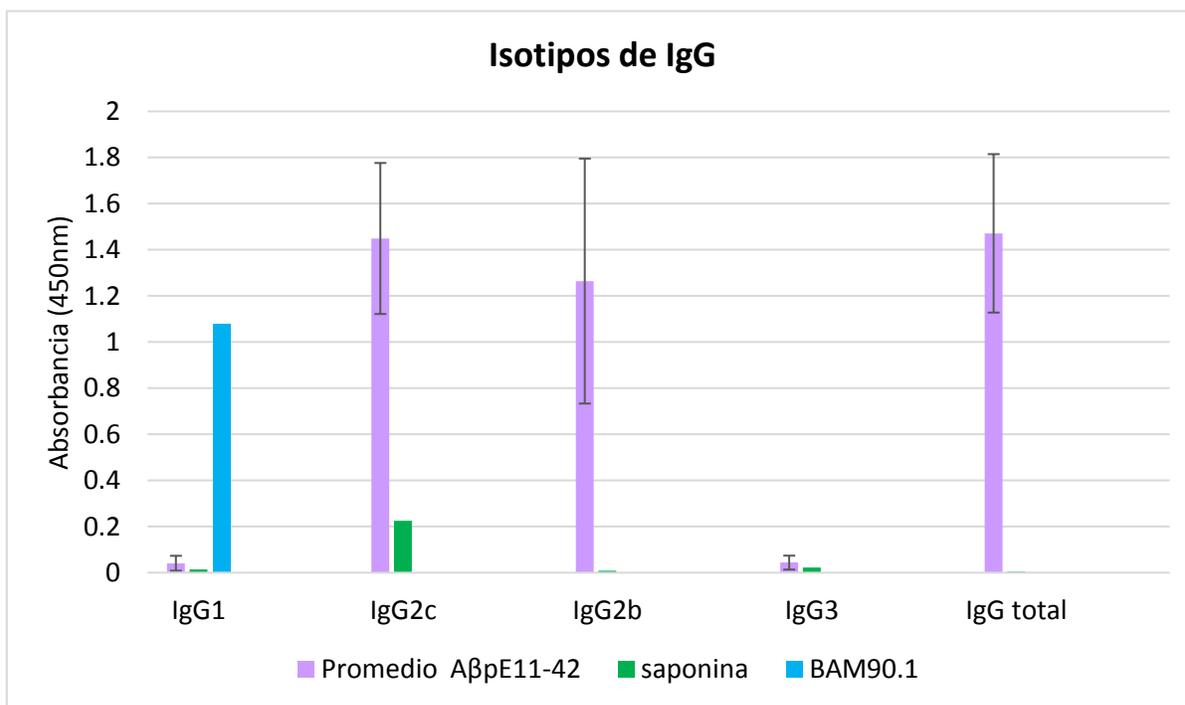
La gráfica 11 muestra los resultados de la producción de anticuerpos en las 11 dosis que recibieron del péptido. Al igual que con los ratones transgénicos de edad más avanzada y los C57BL/6J silvestres, se montó una respuesta inmune humoral específica contra el péptido. La aparición de anticuerpos de clases IgM e IgG se dio en todos los ratones en la cuarta inmunización, aunque los de esta última se estabilizaron hasta la sexta. También es de notarse cómo disminuye la densidad óptica detectada para la clase IgM cuando aumenta aquella para IgG.



Gráfica 11. Se muestra el histograma de la progresión de anticuerpos de clase IgM e IgG en sueros de ratones 3xTg-AD de 6 meses inmunizados con A β pE11-42 (n=5) y controles (n=6) detectados mediante ELISA.

5.9 Análisis de los isotipos de anticuerpos IgG anti-A β piroGlu11-42 en el suero de ratones 3xTg-AD jóvenes inmunizados con el péptido en presencia de saponina.

Una vez que los ratones 3xTg-AD de 13 meses inmunizados con A β piroGlu11-42 y sus respectivos controles estaban produciendo anticuerpos de una manera uniforme, procedimos a analizar los isotipos de IgG presentes en los sueros. Los isotipos se estudiaron mediante la prueba de ELISA en donde se examinó la presencia de IgG total, IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3. Como control positivo se usó BAM 90.1, un anticuerpo monoclonal contra A β de subclase IgG1. En la gráfica 12 se comprueba que la respuesta humoral desencadenada por A β pE11-42 es específica por la ausencia de anticuerpos en los sueros de los controles de adyuvante. También se demuestra que se generaron los anticuerpos específicos IgG2c e IgG2b en ratones inmunizados con el péptido en presencia de saponina, lo que indica a una respuesta mixta Th1/Th2. No se detectaron anticuerpos IgG1 o IgG3.

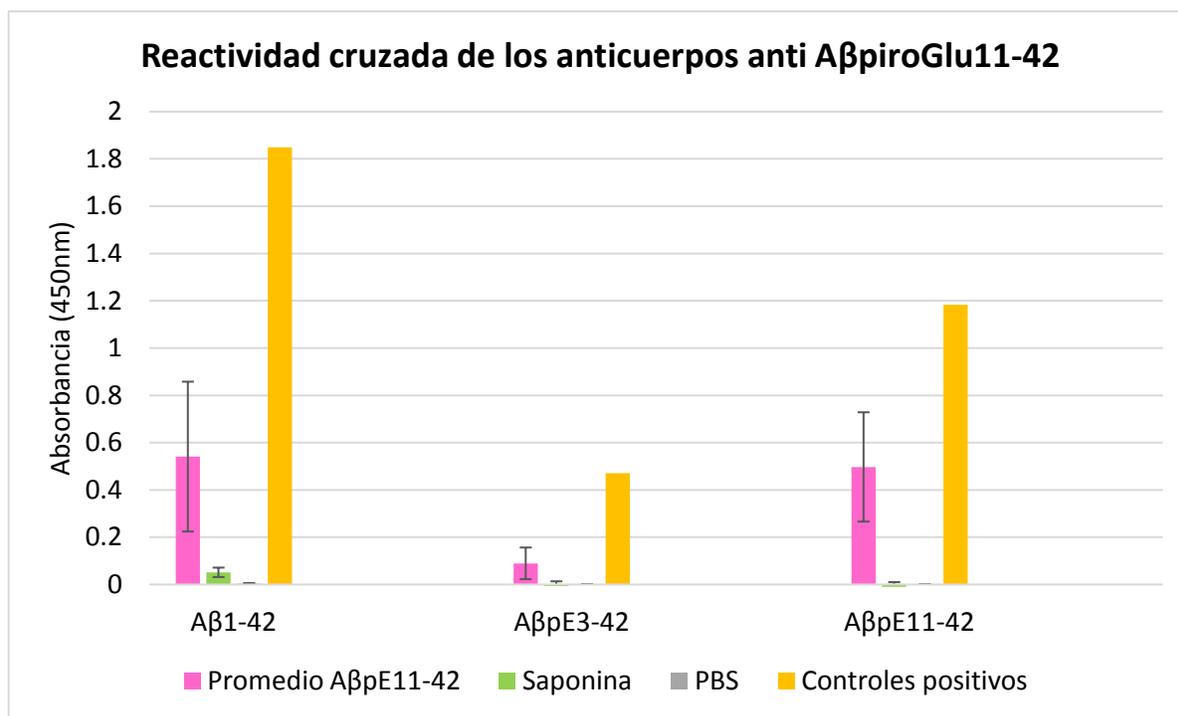


Gráfica 12. Histograma en donde se muestran los isotipos de IgG en sueros de ratones 3xTg-AD de 13 meses de los grupos control (n=6) y experimental (n=5). BAM90.1 fue utilizado como control positivo de IgG1. Con los sueros de los miembros del grupo control se hizo un pool para la medición.

5.10 Reactividad cruzada de los sueros anti- A β piroGlu11-42 producidos en ratones 3xTg-AD jóvenes.

Una vez confirmando que los ratones 3xTg-AD habían producido anticuerpos específicos, decidimos comprobar la reactividad de los sueros anti- A β piroGlu11-42 de reconocer a otras especies del péptido amiloide. La comprobación se realizó mediante la prueba de ELISA. Como control positivo, se utilizaron sueros previamente caracterizados que reconocían a cada uno de los péptidos adsorbidos a la placa.

En la gráfica 13 se observa que los anticuerpos presentes en los sueros anti-A β piroGlu11-42 se unieron a los tres péptidos: A β 1-42, A β piroGlu11-42 y A β piroGlu3-42. Los sueros de los ratones control no reconocieron a ninguno de los tres péptidos amiloides. Es importante recalcar que también se demostró por este método que, al igual que en el Western blot de la sección 5.3, los anticuerpos producidos contra el péptido A β piroGlu11-42 tienen reacción cruzada contra A β 1-42, A β piroGlu3-42.



Gráfica 13. Se muestra un histograma de la prueba de reactividad cruzada mediante ELISA de los sueros anti-A β piroGlu11-42 de los ratones experimentales (n=5) y controles (n=6) contra los péptidos A β 1-42, A β piroGlu3-42 y A β piroGlu11-42, cada uno con su respectivo control.

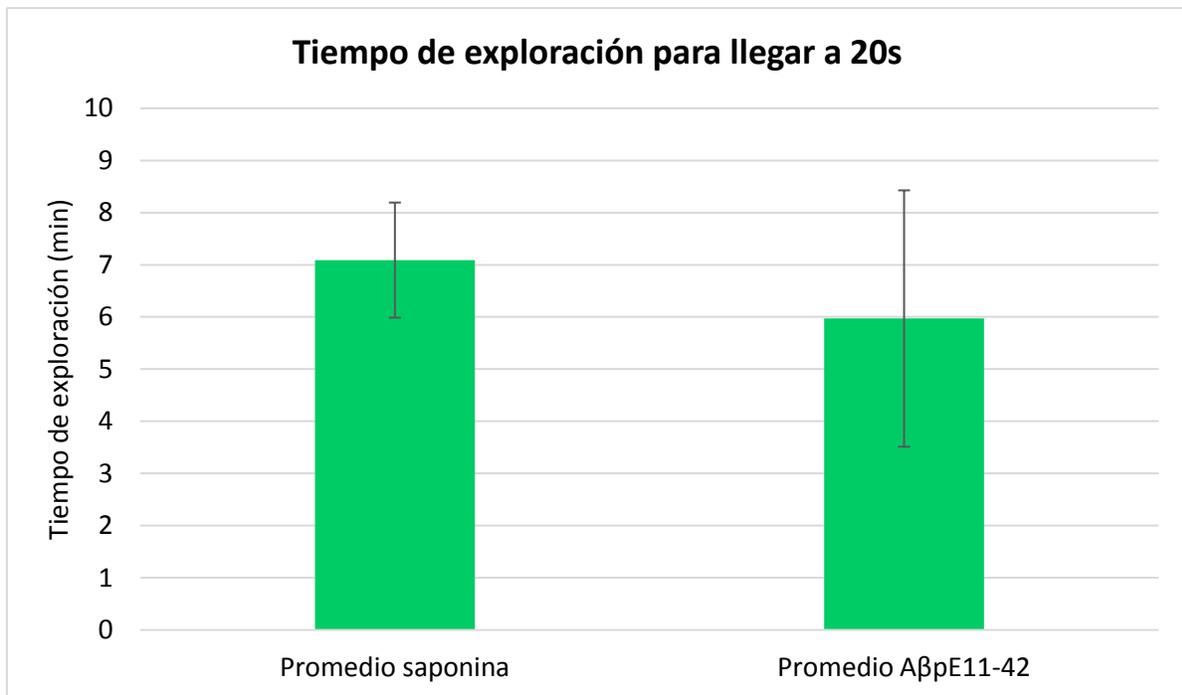
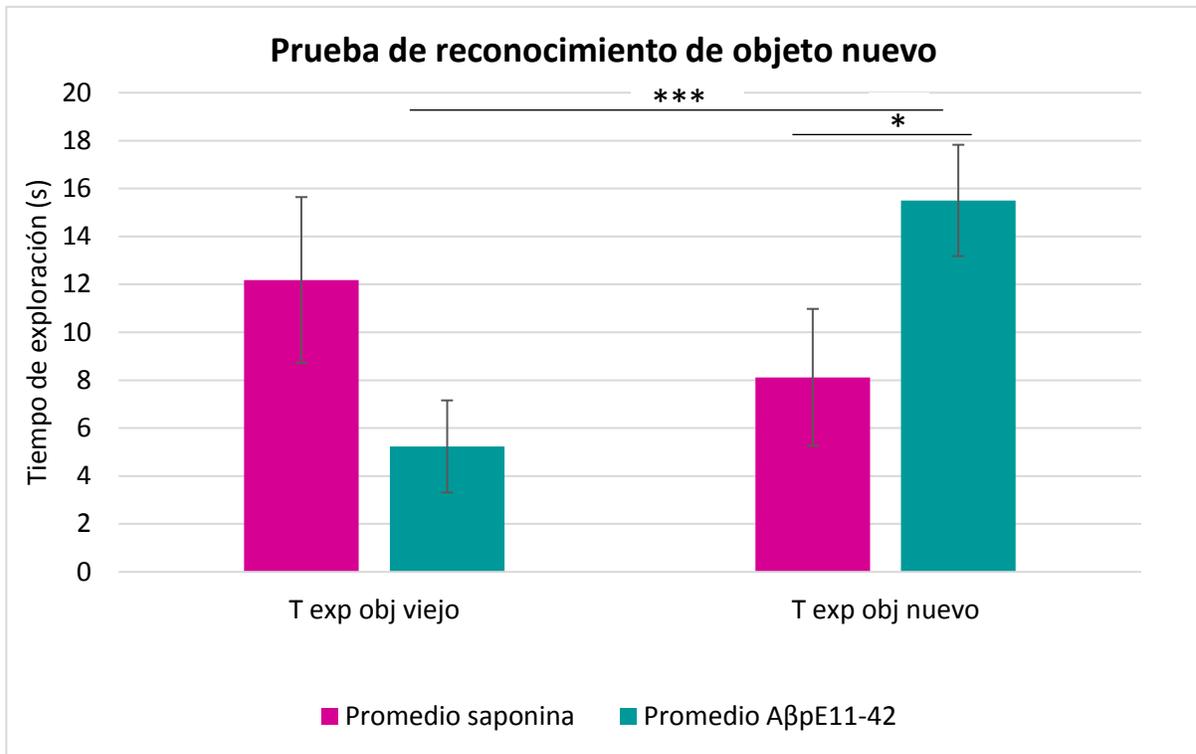
5.11 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo en ratones 3xTg-AD jóvenes.

Seguimos la misma dinámica que en la prueba descrita anteriormente, pero esta prueba se realizó a los 11 meses de edad de los ratones 3xTg-AD inmunizados con A β piroGlu11-42 y sus respectivos controles.

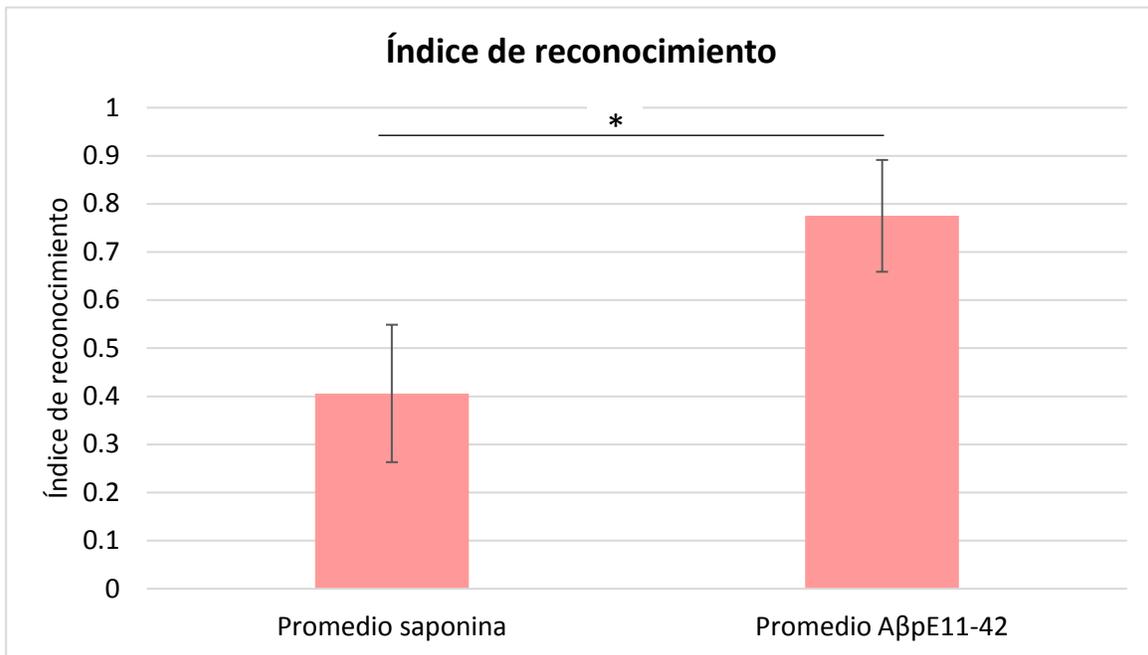
De acuerdo con Deacon, 2006, para obtener resultados confiables, solo los ratones que hayan alcanzado los 20 segundos de exploración totales pueden ser analizados. Resulta notorio que del grupo control, solo dos de seis individuos alcanzaron este criterio y del experimental, cuatro de cinco individuos cumplieron con él. Por lo tanto, el análisis de la prueba se realizó únicamente con los ratones que cumplieron dicho criterio que fueron: dos ratones del grupo control y cuatro del grupo experimental (ratones inmunizados con A β piroGlu11-42).

Se comparó el tiempo que los individuos invertían explorando el objeto viejo, el objeto nuevo (Gráfica 14), el tiempo que les tomó llegar a 20 segundos de exploración (Gráfica 15) y el índice de reconocimiento dado por la relación entre el tiempo que el ratón exploró el objeto nuevo y los 20 segundos de totales de exploración (Gráfica 16) entre el grupo experimental y el grupo control. En la primera comparación se encontraron diferencias significativas entre el tiempo que los ratones de cada grupo pasaron explorando el objeto nuevo ($P=0.04$), entre el tiempo que los ratones del grupo experimental pasaron explorando cada uno de los objetos ($P=0.0002$) y también en el índice de reconocimiento ($P=0.04$). No hubo diferencias significativas entre el tiempo invertido en explorar el objeto viejo ni tampoco en el tiempo de exploración requerido para llegar a 20 segundos totales.

Gráfica 14. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 11 meses. Análisis del tiempo promedio de exploración de cada objeto por el grupo de ratones experimentales (n=5) y controles de adyuvante (n=6). Se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de exploración del objeto nuevo ($P=0.0002$) pero no en el del objeto viejo.



Gráfica 15. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 11 meses. Análisis del tiempo promedio de que le tomó a cada grupo de ratones (experimentales y controles de adyuvante) alcanzar 20 segundos de exploración. No se hallaron diferencias significativas.



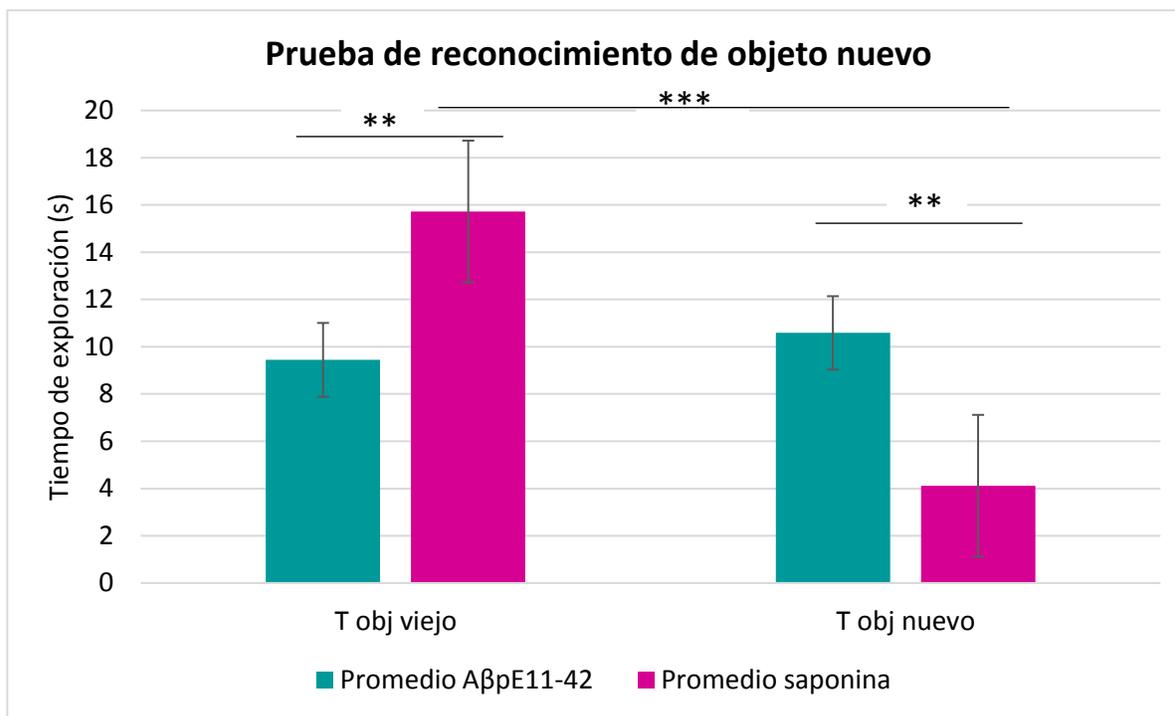
Gráfica 16. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Histograma del índice de reconocimiento (tiempo de exploración del objeto nuevo/20s) del grupo de ratones experimentales (n=3) y controles de adyuvante (n=4). Se observó una diferencia significativa en el índice de reconocimiento de cada grupo (P=0.04)

5.12 Segunda prueba de reconocimiento de objeto nuevo en ratones 3xTg-AD jóvenes.

Cuando los ratones 3xTg-AD que se empezaron a inmunizar a los 6 meses llegaron a los 17 meses de edad, se repitió la prueba de reconocimiento de objeto nuevo con el fin de evaluar si permanecían las diferencias entre el grupo experimental y el control, de acuerdo a lo observado seis meses atrás.

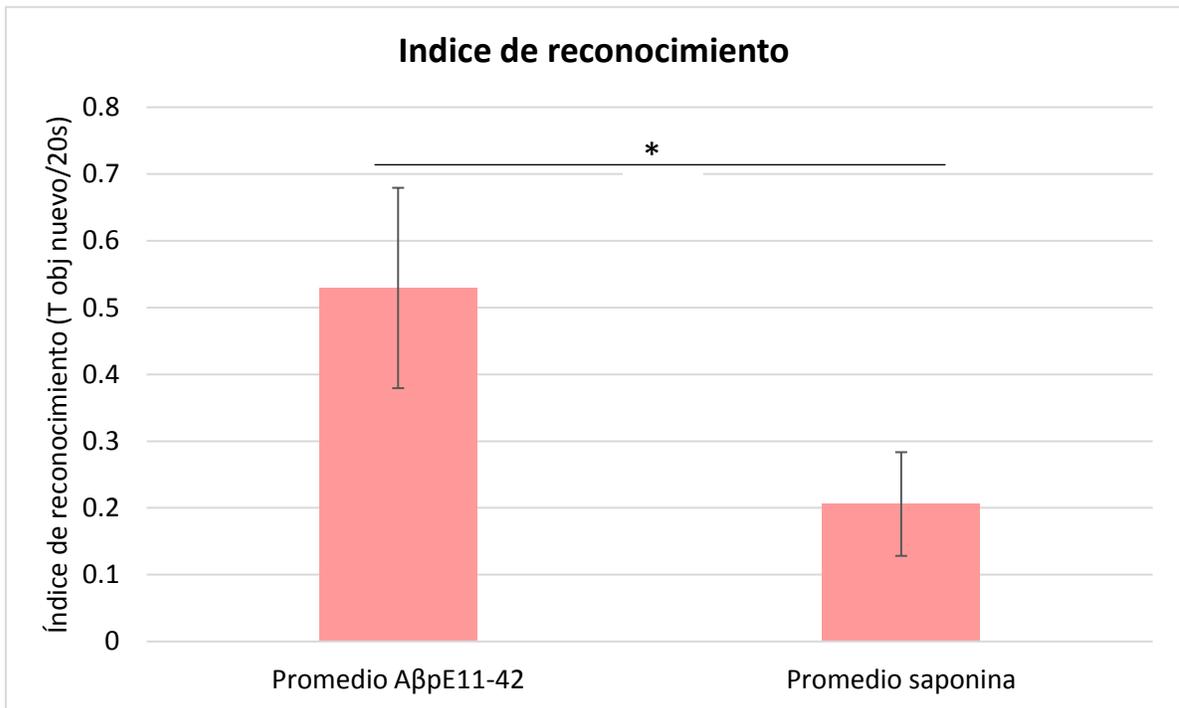
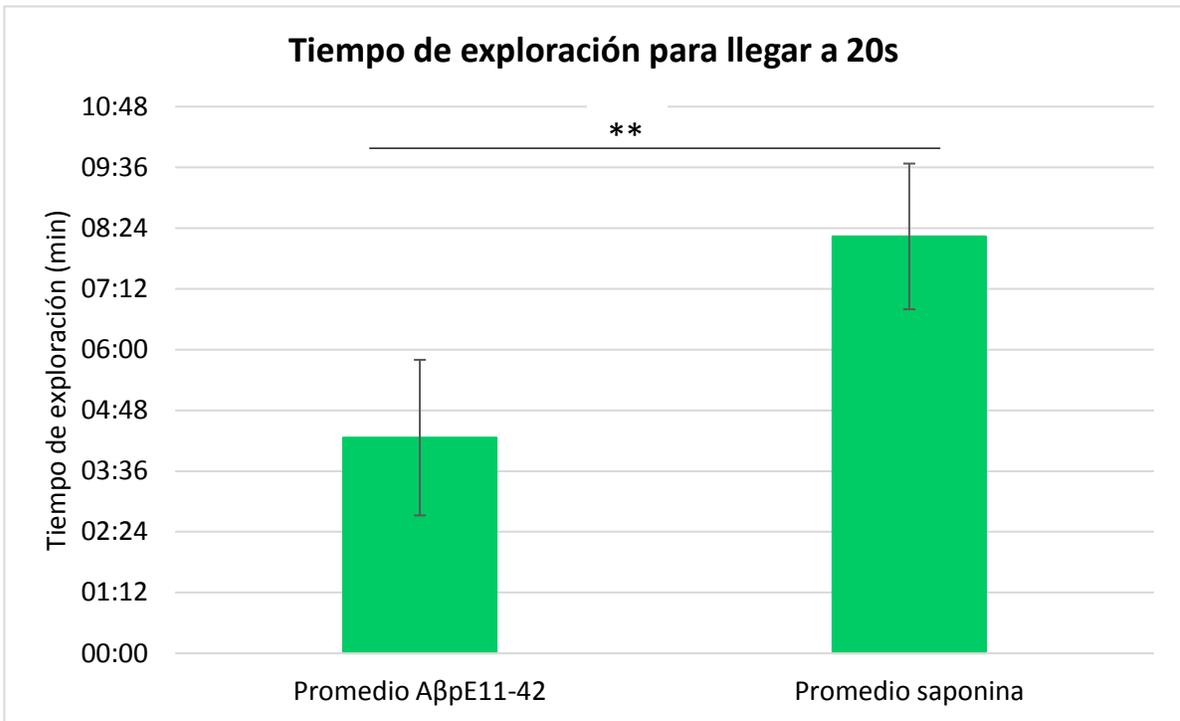
De nuevo, de acuerdo con el criterio de inclusión de Deacon, solo los ratones que alcanzaron el criterio de los 20 segundos de exploración totales fueron analizados, lo que excluyó a dos individuos del grupo experimental del análisis. Se encontraron diferencias significativas entre el tiempo que pasaron los ratones de cada grupo explorando el objeto viejo (P=0.01) y el objeto nuevo (P=0.01). También hubo diferencias significativas entre el tiempo que los individuos del grupo control pasaron explorando cada objeto (P<0.001) pero no así en el grupo experimental (Gráfica 17). Además, se observaron diferencias en el tiempo que les tomó a los individuos de cada grupo alcanzar los 20 segundos de exploración totales (Gráfica

18), el promedio para el grupo experimental fue significativamente menor que aquel del grupo control ($P=0.01$). Asimismo, se detectaron diferencias significativas en el índice de reconocimiento de ambos grupos (Gráfica 19), favoreciendo al inmunizado con A β piroGlu11-42 ($P=0.019$).



Gráfica 17. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Análisis del tiempo promedio de exploración de cada objeto por el grupo de ratones experimentales ($n=3$) y controles de adyuvante ($n=6$). Se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de exploración del objeto nuevo ($P=0.01$) y del objeto viejo ($P=0.01$) entre grupos y en el grupo de saponina entre los dos objetos ($P<0.001$).

Gráfica 18. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Análisis del tiempo promedio de que le tomó a cada grupo de ratones (experimentales y controles de adyuvante) alcanzar 20 segundos de exploración. Sí se encontraron diferencias significativas ($P=0.01$)



Gráfica 16. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo a ratones hembras 3xTg-AD de 17 meses. Histograma del índice de reconocimiento del grupo de ratones experimentales (n=3) y controles de adyuvante (n=4). Se observó una diferencia significativa en el índice de reconocimiento de cada grupo (P=0.019)

6. Discusión

Hasta la fecha no existen tratamientos capaces de desacelerar o detener la progresión de la enfermedad de Alzheimer, una enfermedad devastadora que cobra más vidas cada año con un estimado de 131.5 millones de enfermos para el año 2050 (Alzheimer's Disease International, 2016).

El presente estudio consistió en una estrategia de inmunización activa basado en la hipótesis de que si los ratones inmunizados con A β pE11-42+saponina eran capaces de producir anticuerpos contra el mismo péptido en diferentes estados de agregación, entonces la carga amiloide en su cerebro disminuiría y esto se vería reflejado en menor deterioro de sus capacidades cognitivas comparados con controles de la misma edad sin tratamiento. Demostramos, en primer lugar, que los ratones inmunizados (tanto C57BL/6J como 3xTg-AD) sí produjeron anticuerpos contra el monómero y algunos oligómeros del péptido y que también reconocieron al monómero y oligómeros de A β pE3-42 y a A β 1-42.

Para el primer experimento se utilizaron ratones C57BL/6J, dado el fondo genético de los ratones 3xTg-AD C57BL/6 x 129SV (Guo, et al., 1999), para comprobar su capacidad de reconocer a A β piroGlu11-42, utilizando a A β 1-42 como control positivo debido a la bien conocida capacidad de este último de inducir una rápida respuesta de anticuerpos. Se observó que, de manera consistente con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, al inmunizar con péptidos piroglutamados, la inducción de anticuerpos generada por A β piroGlu11-42 tomó más tiempo y fue más débil (Gráfica 2), es decir, que el péptido A β piroGlu11-42 es menos inmunogénico que A β 1-42. Posteriormente, se evaluó la propiedad de reactividad cruzada de los anticuerpos obtenidos en el suero anti-A β piroGlu11-42 y anti-A β 1-42 contra A β 1-42, A β piroGlu11-42 y A β piroGlu3-42 (Fig. 10). De acuerdo con la literatura, el monómero de A β 1-42 aparece alrededor de los 4.5kDa, el de A β p3-42 cerca de los 4.3kDa y el de A β piroGlu11-42a los 3.3kDa aproximadamente. En el inmunoblot confirmamos que los anticuerpos anti-A β 1-42 reconocen únicamente a ese péptido. En cambio, los anticuerpos en el suero anti-A β piroGlu11-42 reconocieron a los monómero y a oligómeros de diferente peso molecular de los tres péptidos amiloides

evaluados. Este resultado es importante para el desarrollo de vacunas anti-amiloides pues se ha propuesto que algunos anticuerpos monoclonales que han sido evaluados, pueden haber tenido poco éxito debido a su incapacidad de reconocer a las especies amiloides piroglutamadas (Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013).

Una vez encontrados los resultados ya descritos, se prosiguió a evaluar la inmunogenicidad del péptido A β piroGlu11-42 en ratones hembras 3xTg-AD de 12 meses, edad que fue elegida porque en ella, la acumulación de péptidos amiloides de manera extracelular en el cerebro ya es robusta. La inmunización activa con el péptido A β piroGlu11-42 en estos individuos indujo una débil respuesta de producción de anticuerpos de clase IgM en la mitad de los individuos, pero en la otra mitad, no se pudieron detectar anticuerpos específicos a lo largo de todas las inmunizaciones. La respuesta débil puede deberse al proceso de inmunosenescencia por el que atraviesan los ratones a esa edad, y su gran heterogeneidad entre los miembros del grupo y a condiciones de estrés externas. A los 17 meses de edad, se realizó la prueba de reconocimiento de objeto nuevo en este grupo para comprobar el estado de su memoria a corto plazo (Gráficas 5, 6 y 7). No se encontró ningún dato que pudiera sugerir mejoría debida al tratamiento.

Para evaluar si la inmunización con A β piroGlu11-42 había tenido algún efecto sobre la carga amiloide en el cerebro de ratones 3xTg-AD, cuando tenían 18 meses, realizamos dos ensayos de dot-blot: uno con la fracción soluble de A β y un segundo con la insoluble (Fig. 11, Gráfica 8 y Fig. 12, Gráfica 9, respectivamente). Esta medida resulta importante porque se ha sugerido antes que mayores concentraciones de A β soluble pueden favorecer la formación de oligómeros tóxicos (Nicoll, et al., 2006). No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos fracciones atribuibles al tratamiento, pero sí se observó una tendencia a la disminución de A β soluble. A continuación, se cuantificó el área cubierta por placas amiloides en el cerebro de los ratones transgénicos para ver si había cambios debido a la inmunización, pero tampoco se observaron diferencias significativas (Fig. 13 y Gráfica 10). Finalmente, se realizaron tinciones con DAPI (marcador de núcleos celulares), Iba-1 (marcador de células de microglía) y BAM10 (marcador de A β) con el fin de evaluar el

estado de la microglía por su morfología (activada o en reposo) y su localización con respecto a placas amiloides, pues se ha sabido durante ya algunas décadas lo importante que es el papel de la microglía en respuesta a diferentes lesiones cerebrales. Por ejemplo, hay evidencia de que pueden fagocitar las placas amiloides *in vitro* y su participación se ha ligado al éxito de algunas terapias dirigidas contra péptidos amiloides en modelos murinos (Bolmont, et al., 2008). En el presente trabajo se comprobó la colocalización de células de microglía con placas amiloides presentes en el cerebro de los ratones 3xTg-AD del grupo experimental, lo cual es consistente con la literatura. Se observaron algunas células de microglía activadas, pero no se cuantificaron.

A los doce meses de edad, en el cerebro de un ratón 3xTg-AD ya es posible observar la aparición de agregados amiloides extracelulares y los intracelulares llevan ya más de seis meses presentes (Oddo, et al., 2003; Mastrangelo & Bowers, 2008), lo que quiere decir que los mecanismos de toxicidad han tenido efecto. Creemos que la ausencia de cambios observables por la inmunización con A β piroGlu11-42 se puede explicar por la intervención terapéutica tardía, es decir, que se empezó en animales que ya tenían la patología tipo enfermedad de Alzheimer establecida.

Para evaluar dicha hipótesis, comenzamos un nuevo experimento con individuos más jóvenes: se seleccionaron ratones de 6 meses, en cuyos cerebros se esperaría observar ya indicios de agregados amiloides intracelulares, para repetir el protocolo. Como era de esperarse por ser más jóvenes, la respuesta inmune humoral que montaron contra A β piroGlu11-42 fue más rápida y más robusta (Gráfica 11). Una vez comprobada la aparición de anticuerpos, se evaluaron los isotipos de IgG presentes en el suero con la finalidad de determinar si la respuesta inmune era de tipo pro-inflamatoria o anti-inflamatoria. Los isotipos de IgG encontrados principalmente fueron IgG2c e IgG2b (Gráfica 12). Típicamente, se utiliza la relación IgG1/IgG2c para determinar si la respuesta inmune es de tipo T_H1 o T_H2, es decir pro-inflamatoria o anti-inflamatoria debido a que los isotipos de IgG que se producen, son una medida indirecta del tipo de citocinas que se liberaron (Petrushina, et al., 2003). La producción del isotipo IgG1 se ve favorecida por la presencia

de citocinas anti-inflamatorias, no obstante, hay pocas evidencias del papel que juega IgG2c en este equilibrio, y aunque se han encontrado evidencias de que en ratones silvestres C57BL/6 resulta de la actividad de una respuesta tipo Th-1, hacen falta más estudios para saber si la relación IgG1/IgG2c puede servir para indicar si la respuesta es Th1 o Th2 (Petrushina, et al., 2003; Davtyan, et al., 2010). Por su parte, los anticuerpos IgG2b indican una respuesta anti-inflamatoria. De ser cierto que la presencia de IgG2c es indicativa de una respuesta inflamatoria, en nuestro trabajo hemos demostramos que el péptido A β piroGlu11-42 administrado con saponina a ratones 3xTg-AD induce una respuesta mixta Th1/Th2. En otra serie de experimentos reportados previamente por nuestro grupo, cuando se inmunizaron ratones con las mismas características, pero usando adyuvante completo de Freund combinado con A β piroGlu11-42, se observaron las mismas subclases más IgG1, lo que indicaba una respuesta mixta (Rodríguez-Rosales, 2015 [Tesis de maestría]). En otro trabajo en donde se utilizaron ratones de la cepa BALB/c y adyuvante completo de Freund, se observó la presencia de inmunoglobulinas de subtipo IgG2b e IgG1 indicando una respuesta Th2 en esta cepa (Nava-Catorce, 2012 [Tesis de licenciatura]). Los ratones de la cepa 3xTg-AD que usamos fueron creados a partir de híbridos C57BL/6 y 129 (Oddo, et al., 2003). Ahora bien, la predominancia de uno u otro tipo de respuesta inmune está influenciada por la carga genética de los individuos: los linfocitos T de los ratones C57BL/6 tienden a producir citocinas de tipo Th1 acompañadas de altas concentraciones de IFN- γ y bajas concentraciones de IL-4 mientras que las células T de los BALB/c preferencialmente producen citocinas de tipo Th2. (Watanabe, et al., 2004).

La capacidad de A β piroGlu11-42 de inducir anticuerpos capaces de reconocer también a A β 1-42 y a A β piro3-42 previamente reportada en nuestro laboratorio en conejos (Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013) se confirmó en este grupo más joven de ratones 3xTg-AD (Gráfica 13).

En este grupo, se realizaron dos pruebas de reconocimiento de objeto nuevo, una a los 11 meses de edad (cuando habían estado en tratamiento durante 5 meses) y la segunda a los 17 meses de edad. En ambas pruebas se observaron diferencias significativas entre en

grupo inmunizado con A β piroGlu11-42 y el grupo control, en donde los resultados favorecieron al primero. Los datos obtenidos sugieren que, incluso en una edad ya muy avanzada, como 17 meses, en donde ya se esperaba encontrar abundantes placas amiloides en el cerebro y un importante deterioro cognitivo, el tratamiento puede tener un efecto protector sobre la patología.

7. Conclusiones

- ✓ El péptido A β piroGlu11-42 es menos inmunogénico que A β 1-42.
- ✓ El péptido A β piroGlu11-42 administrado con saponina es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG.
- ✓ Los isotipos de la clase IgG encontrados fueron IgG2c e IgG2b.
- ✓ El péptido A β piroGlu11-42 administrado con saponina induce una respuesta mixta Th1/Th2.
- ✓ Los anticuerpos contra A β piroGlu11-42 reconocen también a otras especies del péptido como A β 1-42 y A β pE3-42.
- ✓ En la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, se observaron diferencias significativas que favorecieron al grupo experimental y que sugieren que el cerebro puede estar menos dañado.
- ✓ La inmunización temprana con A β piroGlu11-42 puede tener capacidad protectora contra una patología tipo EA en modelos murinos.

8. Perspectivas

- ✓ En el laboratorio se comprobó que los anticuerpos en el suero anti- A β piroGlu11-42 son capaces de reconocer las placas amiloides en cortes histológicos de cerebros humanos con EA.
- ✓ El tercer experimento continúa en curso, los ratones serán sacrificados para realizar las mismas pruebas que con el grupo anterior (análisis de la carga amiloide en cerebro, del área cubierta por placas y del estado de la microglía).

Referencias

- Alonso-Vilatela, M. E., López-López, M., & Yescas-Gómez, P. (2012). Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Med Res*, *43*(8), 622-631.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex]. *Allg Z Psychiatr*, *64*, 146-148.
- Alzheimer's Association. (2016). 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alz & Dementia*, *12*(4).
- Alzheimer's Disease International. (2016). World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: an analysis of prevalence, incidence, costs and trends. *Alzheimer's Disease International*.
- Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharma*, *76*(PART A), 27-50.
- Bard, F.; Barbour, R.; Cannon, C.; Carretto, R.; Fox, M.; Games, D.; Guido, T.; Hoenow, K.; Hu, K.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, C.; Lee, M.; Motter, R.; Nguyen, M.; Reed, A.; Schenk, D.; Tang, P.; Vasquez, N.; Seubert, P.; Yednock, T. (2003). Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *PNAS*, *100*(4), 2023-2028.
- Baurijssens, B., Aujard, F., & Rahman, A. (2013). Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Transl pharmac*, *10*(3), e319-e327.
- Bayer, T. A., & Wirths, O. (2014). Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Aβ peptides as drugs and targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *127*, 787-801.
- Bekris, L., Yu, C., Bird, T., & Tsuang, D. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, *23*(4), 213-227.
- Bird, T. D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genetics in Med*, *10*(4), 231-239.
- Blaylock, R. L. (2012). Immunoexcitotoxicity in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Current Inorganic Chem*, *2*(1), 46-53.
- Bolmont, T.; Haiss, F.; Eicke, D.; Radde, R.; Mathis, C. A.; Klunk, W. E.; Kohsaka, S.; Jucker, M.; Calhoun, M. E. (2008). Dynamics of the Microglial/Amyloid Interaction Indicate a Role in Plaque Maintenance. *J Neurosci*, *28*(16), 4283-4292.
- Broersen, K., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2010). The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimers Res Ther*, *2*(12).
- Cacace, R., Slegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alz & Dementia*, *12*(6), 733-748.

- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*, 2(22).
- Contestabile, A. (2010). The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural Brain Res.*
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Risch, N. J.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell Jr., P. C.; Rimmler, J. B.; Locke, P. A.; Conneally, P. M.; Schmechel, K. E.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Gen*, 7, 180-184.
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123).
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*, 36(3), 175-184.
- Cruts, M., Hendriks, L., & Van Broeckhoven, C. (1996). The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Human Mol Gen*, 5, 1449-1455.
- Cruts, M., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human Mut*, 33(9), 1340-1344.
- Cynis, H., Scheel, E., Saido, T. C., Schilling, S., & Demuth, H. (2008). Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochem*, 47(28), 7405-7413.
- da Silveira, S. A.; Kikuchi, S.; Fossati-Jimack, L.; Moll, T.; Saito, T.; Verbeek, J. S.; Botto, A.; Walport, M. J.; M., Carroll; S., Izui (2002). Complement Activation Selectively Potentiates the Pathogenicity of the IgG2b and IgG3 Isotypes of a High Affinity Anti-Erythrocyte Autoantibody. *J Exp Med* (195), 665-672.
- De Strooper, B., Craessaerts, K., Dewachter, I., Moechars, D., Greenberg, B., Van Leuven, F., & Van den Berghe, H. (1995). Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 270, 4058-4065.
- Deacon, R. M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nat Protocols*, 1(3), 1117-9.
- Deng, Y.; Wang, Z.; Wang, R.; Zhang, X.; Zhang, S.; Wu, Y.; Staufenbiel, M.; Cai, F.; Song, W. (2013). Amyloid- β protein (A β) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to A β Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis. *Eur J Neurosci*, 37(12), 1962-1969.
- Di Carlo, M. (2010). Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J*, 39, 877-888.
- Di Fede, G.; Catania, M.; Morbin, M.; Rossi, G.; Suardi, S.; Mazzoleni, G.; Merlin, M.; Giovagnoli, A. R.; Prioni, S.; Erbetta, A.; Falcone, C.; Gobbi, M.; Colombo, L.; Bastone, A.; Beeg, M.;

- Manzoni, C.; Francescucci, B.; Spagnoli, A.; Cantù, L.; Del Favero, E.; Levy, E.; Salmona, M.; Tagliavini, F. (2009). A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*, 323(5920), 1473-1477.
- Dong-Hee, K.; Y., Seung Hyeon; P., Jeong-Min; C., Ji Ye; L., Tae-Hee; P., Soon Yong; O., Mee Sun; E., Jungwoo; K., Heui-Soo; Hee-Jae, C. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene*, 545(2), 185-193.
- Dubois, B., Padovanib, A., Scheltensc, P., Rossi, A., & Dell'Agnello, G. (2016). Timely Diagnosis for Alzheimer's. *J of Alzheimer's Disease*, 49, 617-631.
- Farrer, L. A.; Cupples, L. A.; Haines, J. L.; Hyman, B.; Kukull, W. A.; Mayeux, R.; Myers, R. H.; Pericak-Vance, M. A.; Risch, N.; van Duijn, C. M. (1997). Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease A Meta-analysis. *JAMA*, 278(16), 1349-1356.
- Games, D.; Adams, D.; Alessandrini, R. M.; Barbour, R.; Berthelette, P.; Blackwell, C.; Carr, T.; Clemens, J.; Donaldson, T.; Gillespie, F.; Guido, T.; Hagopian, S.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Lee, M.; Liebowitz, P.; Lieberburg, I.; Little, S.; Masliah, E.; Mcconlogue, L.; Montoya-Zavala, M.; Mucke, L.; Paganini, L.; Penniman, E.; Power, M.; Schenk, D.; Seubert, P.; Snyder, B.; Soriano, F.; Tan, H.; Vitale, J.; Wadsworth, S.; Wolozin, B.; Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nat*, 373(6514), 523-527.
- Ghiso, J., Tomidokoro, Y., Revesz, T., Frangione, B., & Rostagno, A. (2010). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's Disease. *Hirotsuki Igaku*, 61, S111-S124.
- Giaccone, G.; Morbin, M.; Moda, F.; Botta, M.; Mazzoleni, G.; Uggetti, A.; Catania, M.; Moro, M. L.; Redaelli, V.; Spagnoli, A.; Rossi, R. S.; Salmona, M.; Di Fede, G.; Tagliavini, F. (2010). Neuropathology of the recessive A673V APP mutation: Alzheimer disease with distinctive features. *Acta Neuropathol.*, 120(6), 803-812.
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., De Bona, P., Pappalardo, G., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., & Copani, A. (2010). The Monomer State of Beta-Amyloid: Where the Alzheimer's Disease Protein Meets Physiology. *Rev in the Neurosci*, 21(2), 83-94.
- Glenner, G., & Wong, C. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biocheml and Biophys Res Communications*, 120(3), 885-890.
- González-González, G. & López-Esqueda, F. (2014) Factores de riesgo para demencia tipo Alzheimer, 33-44, en Reyna-Carrizales, M.; González-Rubio, M.; López-Esqueda, F.; González-González, G., editores. Demencias: Una visión panorámica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. A. (2010). Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *The Int J of Biochem & Cell Biol*, 42(12), 1915-1918.

- Güntert, A., Döbeli, H., & Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neurosci*, *143*(2), 461–475.
- Gutiérrez-Robledo, L. & Arrieta-Cruz, I. (2015) Demencias en México: La necesidad de un plan de acción. *Gac Med Mex*. 151:667-73
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*, 1-26.
- Haass, C., Koo, E. H., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1994). Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells. *PNAS*, *91*, 1564–1568.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, *26*, 184-185.
- Harold, D.; Abraham, R.; Hollingworth, P.; Sims, R.; Gerrish, A.; Hamshere, M. L.; Singh Pahwa, J.; Moskвина, V.; Dowzell, K.; Williams, A.; Jones, N.; Thomas, C.; Stretton, A.; M., Angharad R.; Lovestone, S.; Powell, J.; Proitsi, P.; Lupton, M. K.; Brayne, C.; Rubinsztein, D. C.; Gill, M.; Lawlor, B; Lynch, A.; Morgan, K.; Brown, K. S.; Passmore, P. A.; Craig, D.; McGuinness, B.; Todd, S.; Holmes, C.; Mann, D.; Smith, A. D.; Love, S.; Kehoe, P. G.; Hardy, J.; Mead, S.; Fox, N.; Rossor, M; Collinge, J.; Maier, W.; Jessen, F.; Schürmann, B.; Heun, R.; van den Bussche, H.; Heuser, I.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J.; Dichgans, M.; Frölich, L.; Hampel, H.; Hüll, M.; Rujescu, D.; Goate, A. M. ; Kauwe, J. S. K.; Cruchaga, C.; Nowotny, P.; Morris, J. C.; Mayo, K.; Sleegers, K.; Bettens, K.; Engelborghs, S.; De Deyn, P. P.; Van Broeckhoven, C.; Livingston, G.; Bass, N. J.; Gurling, H.; McQuillin, A.; Gwilliam, R.; Deloukas, P.; Al-Chalabi, A.; Shaw, C. E.; Tsolaki, M.; Singleton, A. B.; Guerreiro, R.; Mühleisen, T. W.; Nöthen, M. M.; Moebus, S.; Jöckel, K.; Klopp, N.; Wichmann, H. E.; Carrasquillo, M. M.; Pankratz, V. S.; Younkin, S. G.; Holmans, P. A.; O'Donovan, M.; Owen, M. J.; Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Gen*, *41*, 1088 - 1093.
- He, W., & Barrow, C. J. (1999). The A β 3-Pyroglutamyl and 11-Pyroglutamyl Peptides Found in Senile Plaque Have Greater β -Sheet Forming and Aggregation Propensities in Vitro than Full-Length A β . *Biochem*, *38*(33), 10871–10877.
- Hermes, J.; Anliker, B.; Heber, S.; Ring, S.; Fuhrmann, M.; Kretschmar, H.; Sisodia, S.; Müller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*, *23*(20), 4106–4115.
- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., & Doms, R. W. (2002). Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J of Biol Chem*, *277*(18), 16278–16284.
- Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D. R.; Tew, D. G.; Meek, T. D.; Chapman, C.; Gloger, I. S.; Murphy, K. E.; Southan, C. D.; Ryan, D. M.; Smith, T. S.; Simmons, D. L.; Walsh, F. S.; Dingwall, C.; Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as b-Secretase. *Mol Cell Neurosci*, *14*, 419–427.

- Jawhar, S., Wirths, O., & Bayer, T. A. (2011). Pyroglutamate Amyloid- β (A β): A Hatchet Man in Alzheimer Disease. *J of Biol Chem*, 286(45), 38825-38832.
- Jonsson, T.; Stefansson, H.; Steinberg, S.; Jonsdottir, I.; Jonsson, P. V.; Snaedal, J.; Bjornsson, S.; Huttenlocher, J.; Levey, A. I.; Lah, J. J.; Rujescu, D.; Hampel, H.; Giegling, I.; Andreassen, O. A.; Engedal, K.; Ulstein, I.; Djurovic, S.; Ibrahim-Verbaas, C.; Hofman, A.; Ikram, A.; van Duijn, C. M.; Thorsteinsdottir, U.; Kong, A.; Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 368, 107-116.
- Karran, E., & J., H. (2014). A Critique of the Drug Discovery and Phase 3 Clinical Programs Targeting the Amyloid Hypothesis for Alzheimer Disease. *Annals of Neurology*, 76(2), 185-205.
- Koffie, R. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2011). Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol Neurodegen*, 6(63), 1-9.
- Korolev, I. O. (2014). Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Med Student Res J*, 4, 24-33.
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11), 1-13.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8, 499-509.
- Lambert, J. C.; Heath, S.; Even, G.; Campion, D.; Sleegers, K.; Hiltunen, M.; Combarros, O.; Zelenika, D.; Bullido, M. J.; Tavernier, B.; Letenneur, L.; Bettens, K.; Berr, C.; Pasquier, F.; Fiévet, N.; Barberger-Gateau, P.; Engelborghs, S.; De Deyn, P.; Mateo, I.; Franck, A.; Helisalmi, S.; Porcellini, E.; Hanon, O.; European Alzheimer's Disease Initiative Investigat; de Pancorbo, M. M.; Lendon, C.; Dufouil, C.; Jaillard, C.; Leveillard, T.; Alvarez, V.; Bosco, P.; Mancuso, M.; Panza, F.; Nacmias, B.; Bossù, P.; Piccardi, P.; Annoni, G.; Seripa, D.; Galimberti, D.; Hannequin, D.; Licastro, F.; Soininen, H.; Ritchie, K.; Blanché, H.; Dartigues, J.; Tzourio, C.; Gut, I.; Van Broeckhoven, C.; Alperovitch, A.; Lathrop, M.; Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Gen*, 41, 1094 - 1099.
- Lannfelt, L., Relkin, N. R., & Siemers, E. R. (2014). Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J of Internal Med*, 275, 284-295.
- Lee, E., Skovronsky, D., Abtahian, F., Doms, R., & Lee, V. (2003). Secretion and Intracellular generation of Truncated A β in β -site Amyloid- β Precursor Protein-Cleaving Enzyme Expressing Human Neurons. *J of Biol Chem*, 287(7), 4458-4466.
- Liu, C., Kanekiyo, T., Xu, H., & G., B. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurol*, 9(2), 106-118.
- Liu, K., Doms, R. W., & Lee, V. M. (2002). Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A β production upon BACE overexpression. *Biochem*, 41(9), 3128-3136.

- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2006). Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, *112*(2), 163-174.
- Llibre-Rodriguez, J. J.; Ferri, C. P.; Acosta, D.; Guerra, M.; Huang, Y.; Jacob, K. S.; Krishnamoorthy, E. S.; Salas, A.; Sosa, A. L.; Acosta, I.; Dewey, M.; Gaona, C.; Jotheeswaran, A. T.; Li, S.; Rodriguez, D.; Rodriguez, G.; Kumar, P. S.; Valhuerdi, A.; Prince, M. (2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet*, *372*, 464-474.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., P. M., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, *12*(1), 289-309.
- Martina, L., Latypovaa, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroch Int*, *58*(4), 458-471.
- Mejia-Arango, S., & Gutierrez, L. M. (2011). Prevalence and Incidence Rates of Dementia and Cognitive Impairment No Dementia in the Mexican Population: Data from the Mexican Health and Aging Study. *J Aging Health*, *23*(7), 1050-1074.
- Morgan, D. (2011). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med*, *269*(1), 54-63.
- Munson, G. W., Roher, A. E., Kuo, Y. M., Gilligan, S. M., Reardon, C. A., Getz, G. S., & LaDu, M. J. (2000). SDS-stable complex formation between native apolipoprotein E3 and beta-amyloid peptides. *Biochem*, *39*, 16119-16124.
- Nagy, Z. (2005). The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, *9*(3), 531-541.
- Nava-Catorce, M. (2012 [Tesis de licenciatura]). Evaluación de la inmunogenicidad de tres especies patogénicas del péptido beta amiloide en ratones.
- O'Brien, R. J., & Wong, C. P. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 185-204.
- Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y.; Laferla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction. *Neuron*, *39*, 409-421.
- Olsson, B.; Lautner, R.; Andreasson, U.; Öhrfelt, A.; Portelius, E.; Bjerke, M.; Hölttä, M.; Rosén, C.; Olsson, C.; Strobel, G.; Wu, E.; Dakin, K.; Petzold, M.; Blennow, K. & Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's. *The Lancet Neur*, *15*(7), 673 - 684.
- Park, M. H.; Choi, D. Y.; Jin, H. W.; Yoo, H. S.; Han, J. Y.; Oh, K. W.; Han, S. B.; Hwang, D. Y.; Hong, J. T. (2012). Mutant presenilin 2 increases beta-secretase activity through reactive oxygen species-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *J of Neuropath and Experim Neur*, *71*(2), 130-139.

- Pasquier, F.; Sadowsky, C.; Holstein, A.; Leterme, P.; Peng, Y.; Jackson, N.; Fox, N. C.; Ketter, N.; Liu, E.; Ryan, J. M.; ACC-001 (QS-21) Study Team (2016). Two Phase 2 Multiple Ascending-Dose Studies of Vanutide Cridificar (ACC-001) and QS-21 Adjuvant in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 51(4), 1131-43.
- Perez-Garmendia, R., Ibarra-Bracamontes, V., Vasilevko, V., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Govezensky, T., Acero, G.; Manoutcharian, K.; Cribbs, D. H. & Gevorkian, G. (2010). Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: relevance for immunotherapy. *J of Neuroimmunol*, 229(1-2), 248-255.
- Pericak-Vance, M. A.; Bebout, J. L.; C., Gaskell Jr. P.; Yamaoka, L. H.; Hung, W.-Y.; Alberts, M. J.; Walker, A. P.; Barttlet, R. J.; Haynes, C. A.; A., Welshm K.; Earl, N. L.; Heyman, A.; Clark, C. M. & Roses, A. D.. (1991). Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J of Human Gen*, 48(6), 1034-1050.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med* , 77(1), 32–42.
- Pettegrew, J. W., Panchalingam, K., Hamilton, R. L., & McClure, R. J. (2001). Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 26, 771-782.
- Pimplikar, S. W. (2009). Reassessing the Amyloid Cascade Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(6), 1261-1268.
- Portelius, E., Bogdanovic, N., Gustavsson, M. K., Volkman, I. B., Zetterberg, H., Winblad, B., & Blennow, K. (2010). Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 120, 185-193.
- Prince, C., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G., Wu, Y., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. . *Alzheimer's Disease Int*.
- Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O., & Gin, D. Y. (2011). Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines*, 10(4), 463-470.
- Rajput, Z. I., Hu, S., Xiao, C., & Arijo, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8(3), 153-161.
- Rodríguez-Rosales, Y. A. (2015 [Tesis de maestría]). Evaluación de la inmunogenicidad y propiedades protectoras del péptido beta-amiloide 11-42 y sus fragmentos.
- Rossor, M. N., Fox, N. C., Beck, J., Campbell, T. C., & Collinge, J. (1996). Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation. 347:1560. *Lancet*, 347(9014), 1560.
- Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; St. George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F., Crapper-Mac Lachlan, D. R.; Alberts, M. J.; Hulette, C.; Crain, B.; Goldgaber, D. & Roses, A. D. (1993). Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1467-1472.
- Schellenberg, G. D.; Bird, T. D.; Wijsman, E. M.; Orr, H. T.; Anderson, L.; Nemens, E.; White, J. A.; Bonnycastle, L.; Weber, J. L.; Alonso, M. E.; Potter, H.; Heston, L. L. & Martin, G. M. (1992).

Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, 258(5082), 668–671.

- Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D. & Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nat*, 400, 173-177.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H. U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters*, 563(1-3), 191-196.
- Schilling, S.; Zeitschel, U.; Hoffmann, T.; Heiser, U.; Francke, M.; Kehlen, A.; M., Holzer; Hutter-Paier, B.; Prokesch, M.; Windisch, M.; Jagla, W.; Schlenzig, D.; Lindner, C.; Rudolph, T.; Reuter, G.; Cynis, H.; Montag, D.; Demuth, H. & Rossner, S. (2008). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Ab and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Medicine*, 14(10), 1106-1111.
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S. A.; Schilling, S. & Demuth, H. U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochem*, 48(29), 7072–7078.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6), 595-608.
- Sergeant, N.; Bombois, S.; Ghestem, A.; Drobecq, H.; Kostanjevecki, V.; Missiaen, C.; Watzet, A.; David, J.; Vanmechelen, E.; Sergheraert, C. & Delacourte, A. (2003). Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J of Neurochem*, 85(6), 1581–1591.
- Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Esch, F.; Lee, M.; Dovey, H.; Davis, D.; Sinha, S.; Schioesmacher, M.; Whaley, J.; Swindlehurst, C.; McCormack, R.; Wolfert, R.; Selkoe, D.; Lieberburg, I. & Schenk, D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nat*, 359, 325 - 327.
- Shaw, C. A., & Tomljenovic, L. (2013). Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunologic Res*, 56(2), 304–316.
- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Südhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Pers in Biol*, 1-18.
- Sherrington, R.; Froelich, S.; Sorbi, S.; Campion, D.; Chi, H.; Rogaeva, E.; Levesque, G.; Rogaev, E.; Lin, C.; Liang, Y.; Ikeda, M.; Mar, L.; Brice, A.; Agid, Y.; Percy, M.; Clerget-Darpoux, F.; Piacentini, S.; Marcon, G.; Nacmias, L.; Nacmias, B.; Amaducci, L.; Frebourg, T.; Rommens, J. L.; Lannfelt, L.; Rommens, J. M. & St George-Hyslop, P. H. (1996). *Hum Mol Genet*. Alzheimer's Disease Associated with Mutations in Presenilin 2 is Rare and Variably Penetrant, 5(7), 985-988.

- Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K.; Tsuda, T.; Mar, L.; Foncin, J. F.; Bruni, A. C.; Montesi, M. P.; Sorbi, S.; Rainero, I.; Pinessi, L.; Nee, L.; Chumakov, I.; Pollen, D.; Brookes, A.; Sanseau, P.; Polinsky, R. J.; Da Silva, H. A.; Wasco, W.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A.; Tanzi, R.; Roses, A. D.; Fraser, P. E.; Rommens, J. M. & St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nat* 375(6534), 754-760.
- Sjögren, T., Sjögren, H., & Lindgren, A. G. (1952). Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl*, 82, 1-152.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., & Hanan-Aharon, E. (1997). Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *PNAS*, 94(8), 4109-4112.
- St-Amour, I.; Paré, I.; Tremblay, C.; Coulombe, K.; Bazin, R. & Calon, F. (2014) IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and A β pathology. *J of Neuroinflammation*, 11 (54)
- St. George-Hyslop, P. H.; Tanzi, R. E.; Polinsky, R. J.; Haines, J. L.; Nee, L.; Watkins, P. C.; Myers, R. H.; Feldman, R. G.; Pollen, D.; Drachman, D.; Growdon, J.; Bruni, A.; Foncin, J. F.; Salmon, D.; Frommelt, P.; Amaducci, L.; Sorbi, S.; Piacentini, S.; Stewart, G. D.; Hobbs, W. J.; Conneally, P. M. & Gusella, J. F. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235(4791), 885-890.
- Steinberg, S.; Stefansson, H.; Jonsson, T.; Johannsdottir, H.; Ingason, A.; Helgason, H.; Sulem, P.; Magnusson, O. T.; Gudjonsson, S. A.; Unnsteinsdottir, U.; Kong, A.; Helisalmi, S.; Soininen, H.; Lah, J. J.; DemGene; Aarsland, D.; Fladby, T.; Ulstein, I.; Djurovic, S.; Sando, S. B.; White, L. R.; Knudsen, G.; Westlye, L. T.; Selbæk, G.; Giegling, I.; Hampel, H.; Hiltunen, M.; Levey, A. I.; Andreassen, O. A.; Rujescu, D.; Jonsson, P. V.; Bjornsson, S.; Snaedal, J. & Stefansson, K. (2015). Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. *Nat gen*, 47(5), 445-447.
- Sullivan, C. P.; Bergc, E. A.; Elliott-Bryanta, R.; Fishmanc, J. B.; McKea, A. C.; Morina, P. J.; Shiac, M. A. & Fine R. (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. *Neurosci Letters*, 505(2), 109–112.
- Tharp, W. G., & Sarkar, I. N. (2013). Origins of amyloid- β . *BMC Genomics*, 14(290), 1-15.
- Theuns, J.; Del-Favero, J.; Dermaut, B.; van Duijn, C. M.; Backhovens, H.; Van den Broeck, M.; Serneels, S.; Corsmit, E.; Van Broeckhoven, C. & Cruts, M. (2000). Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Human Mol Gen*, 9(3), 325-331.
- Tschanz, J. T. (2011). Senile Plaques. In J. S. Kreutzer, J. DeLuca, & B. Caplan, *Encyclopedia of Clinical Neuropsych* (pp. 2254-2256). Springer.
- Tsuji, S. (2010). Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Human Mol Gen*, 19(R1), R65-R70.

- Tycko, R. (2003). Insights into the amyloid folding problem from solid- state NMR. *Biochem*, 42, 3151-3159.
- van Duijn, C. M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L. M., Hofman, A., & Van Broeckhoven, C. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Gen*, 7, 74-78.
- Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; P., Amarante; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.; Treanor, J.; Rogers, G. & Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440), 735-741.
- Vingtdeux, V., Zhao, H., Chandakkar, P., Acker, C. M., Davies, P., & Marambaud, P. (2016). A Modification-Specific Peptide-Based Immunization Approach Using CRM197 Carrier Protein : Development of a Selective Vaccine Against Pyroglutamate Abeta Peptides. *Mol Med*, 22, 841-849.
- Walls, K. C.; Ager, R. R.; Vasilevko, V.; Cheng, D.; Medeiros, R. & LaFerla F. M. (2014) p-Tau immunotherapy reduces soluble and insoluble tau in aged 3xTg-AD mice. *Neurosci Letter* 575; 96-100
- Wang, P.; Yang, G.; Mosier, D. R.; Chang, P.; Zaidi, T.; Gong, Y. D.; Zhao, N. M.; Dominguez, B.; Lee, K. F.; Gan, W. B. & Zheng, H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci.*, 25(5), 1219-1225.
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., & Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, 22(5), 460-466.
- Wingo, T. S., Lah, J. J., Levey, A. I., & Cutler, D. J. (2012). Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 69(1), 59-64.
- Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M., & Wen, G. Y. (1985). Occurrence of neuro- pathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol*, 17(3), 278-282.
- Wisniewski, T. &. (2015). Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron*, 85, 1162-1176.
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord*, 6(1), 19-33.
- Zekanowski, C., & Wojda, U. (2009). Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp*, 69(2), 232-253.
- Zeng, X., & Song, W. (2013). The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. *Alzheimers Res Ther*, 5(5).
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4(3), 1-13.

Zhao, Y.; Bhattacharjee, S.; Jones, B. M.; Hill, J. M.; Clement, C.; Sambamurti, K.; Dua, P. & Lukiw, W. J. (2015). Beta-Amyloid Precursor Protein (β APP) Processing in Alzheimer's Disease (AD) and Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Molecular Neurobiology*, 52, 533-544.