



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL 4D5
ANTI- ABPE11-42”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GILBERTO ADRIAN RODRÍGUEZ LÓPEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ENRIQUE ORTEGA SOTO

VOCAL: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

SECRETARIO: GOHAR GEVORGYAN

1er. SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

2° SUPLENTE: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO A 119,
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: GOHAR GEVORGYAN

SUPERVISOR TÉCNICO: GONZALO ASARIEL ACERO GALINDO

SUSTENTANTE: GILBERTO ADRIAN RODRÍGUEZ LÓPEZ

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT #201116 y #203319.

Abreviaturas

- AAC angiopatía amiloide cerebral
- AcMo anticuerpo monoclonal
- ADDL ligandos difusibles derivados de A β
- APA aminopeptidasa
- APP proteína precursora amiloide
- A β β -amiloide
- BACE1 enzima cortadora de APP en el sitio β
- BDNF factor neurotrófico derivado del cerebro
- CREB elemento de respuesta de unión de c-AMP
- DAB diaminobencidina
- DPP dipeptidil peptidasa
- EA enfermedad de Alzheimer
- EAFIP enfermedad de Alzheimer familiar de inicio precoz
- EAIP enfermedad de Alzheimer de inicio precoz
- EAIT enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
- GFAP proteína ácida fibrilar
- NFT marañas neurofibrilares
- PBS fosfatos buffer salina
- PDGF- β factor de crecimiento β derivado de plaquetas
- PET tomografía de emisión de positrones
- PHF filamentos helicoidales pareados
- PrP proteína priónica
- PSEN1 presenilina 1
- PSEN2 presenilina 2
- PVDF fluoruro de polivinilideno
- QC glutaminil ciclasa
- TBS tris buffer salina
- TNF α factor α de necrosis tumoral

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1 Demencia y enfermedades neurodegenerativas	8
2.2 La enfermedad de Alzheimer (EA)	9
2.3 Epidemiología	9
2.4 Síntomas	10
2.5 Factores de riesgo	12
2.6 Panorama genético de la EA	13
2.7 Diagnóstico	15
2.8 Biomarcadores y evaluaciones suplementarias	16
2.9 Neuropatología	18
2.9.1 Macroscópica	18
2.9.2 Microscópica	20
2.9.3 Patología de Tau	21
2.9.4 Etapas de Braak	22
2.9.5 Placas amiloides	23
2.9.6 Angiopatía amiloide cerebral (AAC)	25
2.9.7 Péptido β -amiloide	28
2.9.8 Procesamiento de APP	31
2.9.9 Hipótesis de la cascada amiloide	34
2.9.10 Toxicidad de péptido A β	36
2.9.11 Especies A β aminotruncados y péptido A β pE11-42	37
2.10 Tratamiento de la EA	40
2.11 Inmunoterapia de la EA	41
2.11.1 Inmunoterapia activa	42
2.11.2 Inmunoterapia pasiva	43
2.12 Modelos murinos transgénicos con patología tipo EA y el modelo 3xTg-AD	44
3. Justificación	46
4. Objetivo general	46
5. Objetivos particulares	46
6. Metodología	47
6.1 Producción del AcMo 4D5	47

6.2	Ensayo de especificidad del AcMo 4D5 mediante ELISA	47
6.3	Mapeo de epítomos del AcMo 4D5 mediante ELISA	48
6.4	Determinación del reconocimiento de oligómeros mediante Western Blot	49
6.5	Reconocimiento de agregados amiloides en tejido cerebral por inmunohistoquímica amiloides	49
7.	Resultados	51
7.1	Ensayo de especificidad del AcMo 4D5	51
7.2	Mapeo de epítomos	51
7.3	Reconocimiento de oligómeros de especies patológicas de A β	52
7.4	Reconocimiento de placas amiloides en el cerebro de ratón 3xTg-AD	53
8.	Discusión	56
9.	Conclusiones	59
10.	Perspectivas	59
11.	Referencias	60

1. Resumen

Caracterización del anticuerpo monoclonal 4D5 anti-A β pE11-42

En el presente trabajo se realizó la caracterización del anticuerpo monoclonal (AcMo) 4D5 anti-A β pE11-42. Por ELISA, se confirmó la reactividad del anticuerpo contra el péptido A β pE11-42, A β pE3-42 y A β 1-42, demostrando una reactividad cruzada con otras especies patológicas del péptido A β . Posteriormente se realizó el mapeo de epítomos del AcMo 4D5 usando diferentes fragmentos del péptido A β 1-42. Los resultados sugieren que el epítomo reconocido por AcMo 4D5 se encuentra en la región central del péptido A β 1-42. El análisis por Western Blot indicó el reconocimiento de diferentes agregados de A β pE11-42, A β pE3-42 y A β 1-42 de distinto peso molecular. Por último, se comprobó la capacidad del AcMo 4D5 de reconocer agregados amiloides en cortes coronales de cerebro de ratones transgénicos 3xtg-AD, un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

2. Introducción

2.1 Demencia y Enfermedades Neurodegenerativas

Actualmente el término demencia es usado en un contexto médico para definir a una colección de enfermedades neurológicas crónicas, cuyos principales síntomas están asociados con una pérdida significativa de la capacidad mental, lo cual causa una interferencia en la habilidad ocupacional, doméstica y social del individuo. Particularmente hay déficit cognitivo, impacto en la memoria, aprendizaje, lenguaje y otras funciones superiores del cerebro (Lewis & Spillane, 2019b). Una demencia, más que una enfermedad específica, debe considerarse como un síndrome adquirido por múltiples posibles causas, es decir, el síndrome de demencia asociado a la pérdida progresiva en el lenguaje puede ser causado por varias enfermedades; por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA) o un tumor en la corteza del lenguaje (Gale et al., 2018). A nivel global se estima que la prevalencia de las demencias es de hasta el 7% en los adultos mayores de 65 años, con una ligeramente mayor prevalencia de hasta 8%-10% en países desarrollados, debido a su mayor esperanza de vida (Prince et al., 2013).

La manera clásica de estudiar a las demencias es clasificándolas en dos tipos: aquellas que son neurodegenerativas o irreversibles y las no neurodegenerativas o potencialmente reversibles. Aunque existen pacientes que pueden presentar enfermedades de ambos tipos (Gale et al., 2018).

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen un gran número de enfermedades como la EA, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Estas patologías son caracterizadas por una pérdida de la integridad funcional de las neuronas, incluyendo la muerte, acompañada del déficit de funcionalidad cerebral específica relacionada con la distribución espacial de la muerte celular y los circuitos neuronales impactados en la neurodegeneración (Lewis & Spillane, 2019b).

2.2 La enfermedad de Alzheimer

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente y la causa de demencia más común con aproximadamente 70% de los casos totales. Debido a la edad es el principal factor de riesgo, su prevalencia es mayor en adultos mayores a 65 años. Clínicamente se presenta como una demencia progresiva que predominantemente afecta la memoria episódica (Tellechea et al., 2018). Los síntomas característicos de la demencia son los problemas de memoria y el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que afectan la capacidad del paciente para desarrollar actividades cotidianas. Estos síntomas se deben a que las neuronas, localizadas en aquellas partes del cerebro relacionadas con la función cognitiva, han sido dañadas. Además, eventualmente las neuronas de otras áreas del cerebro se ven afectadas causando que la persona sea incapaz de llevar a cabo funciones básicas, como tragar o caminar, haciendo que los pacientes en esta etapa final se encuentren en cama y con la necesidad de atención permanente. La EA se torna fatal en esta última etapa (Alzheimer's Association, 2019).

La EA se clasifica en dos tipos de acuerdo a la edad en la que se presenta: esporádica o enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (EAIT) y familiar o enfermedad de Alzheimer de inicio precoz (EAFIP) cuyas características generales se mencionan a continuación (Tabla 1). El 95% de los casos de EA es esporádica y ocurre en personas mayores a 65 años, mientras que la enfermedad de Alzheimer familiar ocurre de manera temprana, estableciéndose antes de los 65 años, en alrededor de 5% de los casos y tiene una base genética (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2018).

2.3 Epidemiología

En 2015 se estimó que, a nivel mundial, alrededor de 47 millones de personas tenían demencia y aproximadamente el 70% de los casos se atribuyeron a la EA. Dentro de las diferentes regiones, Norteamérica y el occidente de Europa exhibieron la más alta prevalencia, seguidas por Latinoamérica y China. Si la prevalencia se mantiene constante, se calcula

que para el 2050 la cifra de casos ascenderá a alrededor de 130 millones de personas. (Garre Olmo, 2018; Reitz & Mayeux, 2014).

Tabla 1. Características generales de EAIT y EAFIP.

Característica	EAIT	EAFIP
Edad de establecimiento	65 años o más	Menor que 65 años
Progresión	Lenta	Rápida
Descubrimientos patológicos	Placas seniles y marañas neurofibrilares	Placas seniles y marañas neurofibrilares, con mayor presencia en el hipocampo
Genotipo APOE	Favorecida por 1 o 2 alelos de $\epsilon 4$	Principalmente ausencia de $\epsilon 4$
Estructura MRI	Atrofia hipocampal	Atrofia frontal/tempoparietal
PET-FDG	Disminución en el metabolismo en el lóbulo medial temporal	Disminución en el metabolismo en la corteza tempoparietal
PET-PIB	Incremento de marca	Incremento de marca (más en la zona parietal)

Modificada de (Tellechea et al., 2018). PET, tomografía de emisión de positrones; MRI, imagen de resonancia magnética; FDG, fluorodesoxyglucosa; PiB, compuesto B de Pittsburgh.

2.4 Síntomas

Puede haber una gran heterogeneidad en cuanto al desarrollo y progresión de los síntomas y déficit clínico en la EA, siendo en etapas tempranas muy sutil la diferencia entre cambios cognitivos relacionados con la edad y la EA. Además de la pérdida de la memoria característica de los pacientes con EA se presentan otros múltiples síntomas que cambian con el paso de los años, los cuales reflejan el nivel de daño de las neuronas en diferentes partes del cerebro. Las personas pueden presentar dificultad en el desempeño de sus actividades cotidianas, episodios de confusión y divagación, además de tener cambios de personalidad y comportamiento. En etapas severas los pacientes requieren asistencia para realizar sus actividades básicas y eventualmente pierden la habilidad para comunicarse. Es en esta etapa en donde el daño a la salud física de la persona empieza a ser evidente. Debido al daño en áreas del cerebro relacionadas con el movimiento, el paciente queda postrado en cama generando lesiones en la piel que llegan a terminar

en infecciones o hasta sepsis. Cuando el daño es en áreas relacionadas con la función de deglución se dificulta el proceso de comer y beber del individuo, terminando con partículas de comida en los pulmones lo que genera la posibilidad de una infección.

El criterio clínico reconoce casos atípicos con síntomas no amnésicos, los cuales incluyen problemas de lenguaje, visuoespacial y disfunción ejecutiva (Atri, 2019).

Actualmente se identifican tres etapas de la EA: EA preclínica, deterioro cognitivo leve debido a la EA y demencia debido a la EA (Figura 1) (Alzheimer's Association, 2019).

Enfermedad de Alzheimer preclínico: Los individuos tienen cambios medibles en algunos biomarcadores en el cerebro, la sangre y líquido cefalorraquídeo, pero aún no se han desarrollado síntomas como la pérdida de la memoria.

Deterioro cognitivo leve debido a la EA: Se presentan cambios en el cerebro evidenciados por marcadores y muestran un deterioro cognitivo mayor al esperado para su edad.

Demencia debida a la EA: Se caracteriza por síntomas notables de alteraciones en la memoria, el pensamiento y el comportamiento que discapacitan a la persona en su funcionamiento cotidiano. Además existe evidencia clara de cambios en el cerebro relacionados con la enfermedad de Alzheimer.

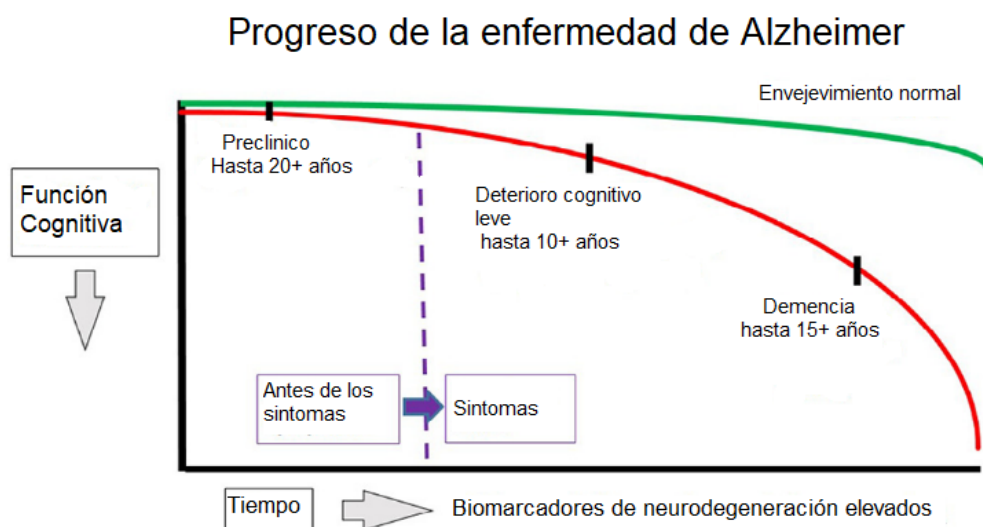


Figura 1 Progreso de la EA. Consenso actual del progreso de la EA. La etapa preclínica, antes de presentarse los síntomas, tiene una duración de hasta 20 años. Modificada de (Gale et al., 2018).

2.5 Factores de riesgo

El concepto actual de la EA la define como una enfermedad multifactorial. Al igual que otras enfermedades crónicas, se desarrolla como resultado de la interacción de múltiples factores, a excepción de los casos de EA ligadas a mutaciones genéticas autosómicas dominantes y trisomía 21.

A pesar de ser una enfermedad multifactorial, la edad es, sin duda, uno de los mayores factores de riesgo (Tabla 2). Como se hace notar en la prevalencia, el porcentaje de individuos con demencia debido a la EA se incrementa dramáticamente con la edad, siendo el 3% en personas de 65-74 años, 17% en personas de 75-84 años y 32% en personas mayores a 85 años. Es importante resaltar que la demencia asociada con la EA no es parte normal del envejecimiento (Alzheimer's Association, 2019; Waldemar & Burns, 2017) .

Tomando en cuenta que la edad es el mayor factor de riesgo y no puede ser cambiado, se han realizado estudios que evalúan la evidencia del efecto de ciertos factores de riesgo modificables en el deterioro cognitivo y la demencia. Desde una perspectiva poblacional se encontró evidencia de que la actividad física regular y el control de factores de riesgo cardiovasculares, especialmente la diabetes, la obesidad, el tabaquismo y la hipertensión, están asociados con una disminución del riesgo de demencia. También se ha observado que una dieta sana, un mayor nivel de estudios y el entrenamiento cognitivo disminuyen en el riesgo de deterioro cognitivo. Por último también se ha sugerido que el permanecer social y mentalmente activos disminuye el riesgo de EA y otras demencias (Alzheimer's Association, 2019).

Tabla 2. Factores de riesgo en la EA y la demencia.

Modificables	No modificables
<ul style="list-style-type: none"> • Riesgos vasculares • Diabetes • Hipertensión • Dislipidemia • Síndrome metabólico y obesidad • Tabaquismo • Baja actividad física • Hipoperfusión cerebral, daño cerebrovascular o derrame • Depresión • Traumatismo cerebral severo • Pérdida de la audición • Reserva cognitiva baja (capacidad de mantener función cognitiva a pesar de tener daño neurológico. Baja reserva relacionada con poca preparación educativa y profesional o baja inteligencia) 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Género (mayor en mujeres) • Historia familiar (mutaciones) • Raza (africanos, americanos e hispanos 1.5-2 veces) • Síndrome de Down • Apolipoproteína APOE-ε4 (un alelo 3 veces, homocigoto 8-10 veces) • Amiloidosis cerebral

Modificada de (Atri, 2019)

2.6 Panorama genético de la EA

La forma menos prevalente de la EA es la Familiar de Inicio Precoz (EAFIP), la cual corresponde a menos del 5% de los casos diagnosticados, con una edad de comienzo que va desde los 30 hasta los 60 años. Este subgrupo abarca mayormente casos debidos a mutaciones autosómicas dominantes (Carmona et al., 2018). Se han identificado mutaciones que provocan la EAFIP, dichas mutaciones son albergadas principalmente en tres genes: APP (proteína precursora amiloide), PSEN1 (presenilina 1) y PSEN2 (presenilina 2) (Tabla 3).

Estudios de ligamiento han identificado regiones genómicas transmitidas junto con la enfermedad en miembros afectados de la familia. La primera región se encontró en el brazo largo del cromosoma 21, posteriormente se encontró que dichas mutaciones se encontraban en el gen APP. Esta proteína es rápidamente procesada sufriendo dos cortes realizadas por la α-

o β - y la γ -secretasa. El proceso puede realizarse por dos vías, la amiloidogénica y la no amiloidogénica, siendo la amiloidogénica la que es capaz de generar el péptido beta amiloide ($A\beta$). Actualmente se han identificado 30 diferentes mutaciones, 25 de las cuales son patogénicas y en la mayoría de los casos en la EAFIP de herencia autosómico dominante.

Además de las mutaciones encontradas en el cromosoma 21, se ha encontrado evidencia de ligamiento genético para la EAFIP en el cromosoma 14. El gen que se encuentra mutado en este locus es PSEN1 el cual es el principal componente de la γ -secretasa. Las mutaciones en PSEN1 son la causa más común de EAFIP, causando el 18-50% de los casos autosómicos dominantes de la EAFIP. El fenotipo de estas mutaciones es el más severo de EA, estableciéndose a los 58 años y con una penetrancia completa.

PSEN2 fue encontrada debido a su homología con PSEN1, y su localización en el cromosoma 1 fue definido por ensayos de ligamiento genético. Mutaciones causantes de la EAFIP en este gen son raras, muestran una mayor edad de establecimiento y una menor penetrancia que las mutaciones en PSEN1 (Kim et al., 2014).

Las personas con síndrome de Down tienen un mayor riesgo de desarrollar EA relacionado a la trisomía 21, el cual codifica para la APP, incrementando la producción de $A\beta$ en el cerebro. En promedio la EA se presenta a una edad temprana, alrededor de los 40 años. Además, se estima que el 30% de los individuos de 50 años con síndrome de Down padecen EA (Alzheimer's Association, 2019).

Tabla 3 Principales genes asociados con la Enfermedad de Alzheimer.

Gen	Locus	Proteína	Herencia	Edad de inicio (años)
<i>APP</i>	21q21.2	Proteína precursora amiloide	Autosómica dominante	40-60
<i>PSEN1</i>	14q24.3	Presenilina 1	Autosómica dominante	30-58
<i>PSEN2</i>	1q31-q42	Presenilina 2	Autosómica dominante	45-88

Modificada de (Kim et al., 2014)

2.7 Diagnóstico

Realizar el diagnóstico de la EA es un proceso complejo y no existe una prueba única que permita realizar la evaluación, por lo que es requerido realizar el diagnóstico por un equipo multidisciplinario.

Uno de los primeros pasos es realizar el historial clínico del paciente. El cuestionamiento se realiza al paciente y a otro informante independiente, debido a que el deterioro cognitivo evitaría que el paciente se percate de sus propios síntomas. Además, se debe realizar una evaluación física y neurológica, a pesar de que una examinación neurológica es irrelevante en la EA en etapas tempranas, en otras demencias es necesaria ya que brinda información clave de componentes de otras patologías, agregando que permite el tratamiento de comorbilidades.

Una evaluación cognitiva es clave para el diagnóstico y manejo de las demencias por lo cual es un paso fundamental para los pacientes con posible demencia en cualquiera de las etapas. El especialista realiza una medida de la cognición global, además de otras evaluaciones más detalladas de los principales dominios cognitivos, en especial el de la memoria episódica, para el caso de la EA, el cual muestra un característico deterioro. Complementario a las examinaciones previas, se realiza la evaluación de las actividades de la vida diaria, el comportamiento y síntomas psiquiátricos (Waldemar & Burns, 2017).

Para un diagnóstico definitivo de la EA se debe de realizarse un examen microscópico histopatológico post-mortem del cerebro (Figura 2), el cual revela depósitos de dos tipos de agregados protéicos: depósitos extracelulares de A β en el parénquima y depósitos intraneuronales de la proteína tau hiperfosforilada en forma de marañas neurofibrilares (Waldemar & Burns, 2017).

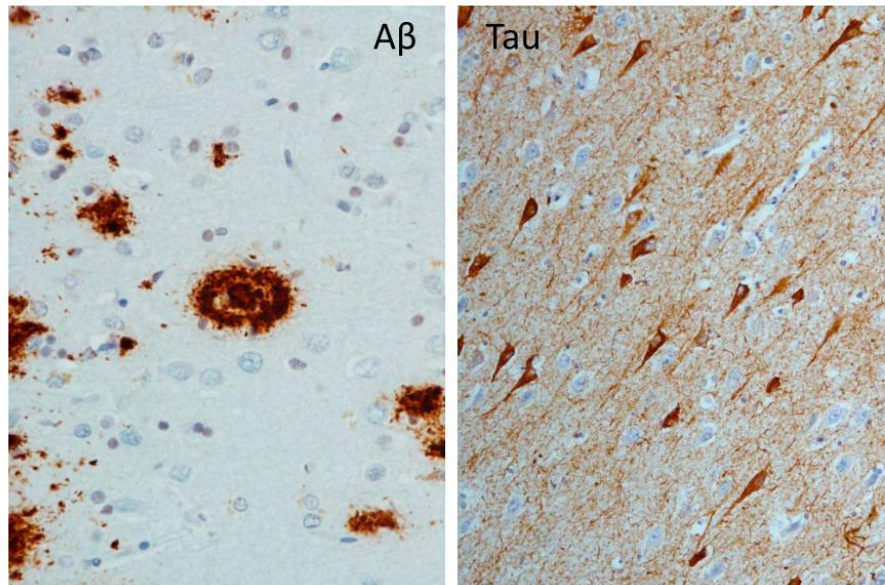


Figura 2. Muestras de tejido postmortem de tejido cerebral de pacientes con EA. En la imagen se revela la patología de la EA incluyendo placas de A β (A β) y marañas de tau (Tau). Tomada de (Fish et al., 2019).

2.8 Biomarcadores y evaluaciones suplementarias

Debido a lo difícil, complejo y tardío que llega a ser el diagnóstico de la EA, se ha realizado la búsqueda de biomarcadores que indiquen la presencia o ausencia de la enfermedad, el riesgo de desarrollarla y su progresión. Entre los factores que están siendo estudiados como biomarcadores se encuentran la medición de productos clave de la EA como el péptido A β y la proteína tau fosforilada (Tabla 4).

Mediante una punción lumbar es posible la extracción de líquido cefalorraquídeo en el cual se mide la cantidad de A β 1-42 y la relación de tau total y tau fosforilada. En el caso de pacientes con EA, A β 1-42 se ve reducida y la relación de tau fosforilada y tau total se ve incrementada.

Es posible incrementar la especificidad del diagnóstico utilizando imagen por resonancia magnética (IMR), la cual permite realizar una evaluación estructural del cerebro en busca de daño neuronal (Figura 3). En el caso de la EA se identifica una atrofia en el lóbulo temporal, así como una reducción en el volumen del hipocampo. Otra técnica de imagenología que ayudaría al diagnóstico, es la tomografía de emisión de positrones (PET) la cual, junto con radiofármacos como la fluorodesoxiglucosa, que evalúa la actividad metabólica de las diferentes regiones del cerebro, permite el diagnóstico de

la EA si hay una disminución en el consumo de glucosa en la región temporoparietal. Así mismo, el compuesto B de Pittsburgh (PiB), que visualiza la presencia de compuestos amiloides permitiendo el seguimiento *in vivo* de la patología de A β .

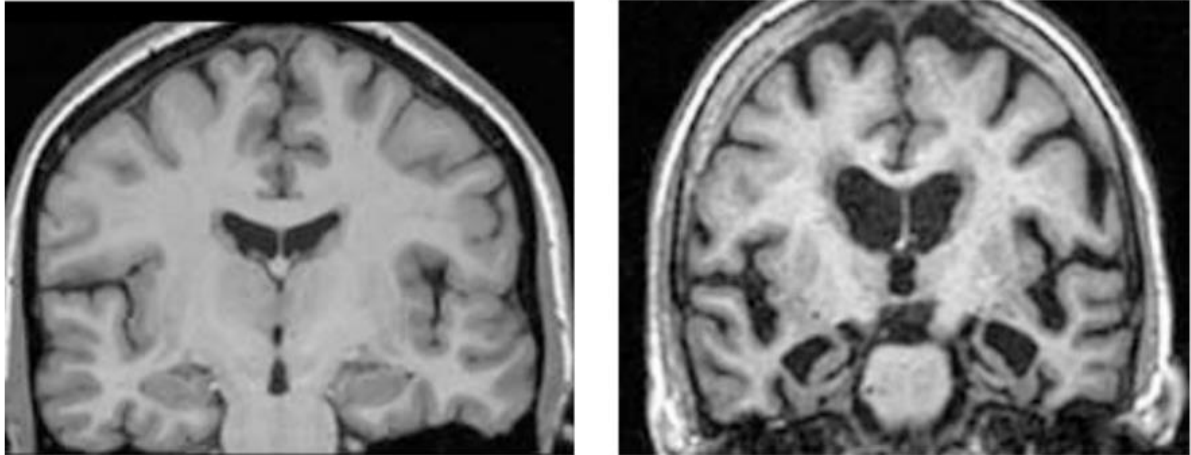


Figura 3 Comparación de imagen de resonancia magnética de un voluntario sano (izquierda, control) y un paciente con EA (derecha). El cerebro del paciente con EA muestra atrofia significativa y dilatación de los ventrículos laterales y un hipocampo más pequeño. Tomada de (Fish et al., 2019).

Por último, se realiza la evaluación genética en búsqueda de mutaciones patogénicas (APP, PSEN1, PSEN2) causantes de la EA familiar en aquellos pacientes que presenten el fenotipo apropiado o el historial familiar de una herencia autosómica dominante de demencia (Alzheimer's Association, 2019; Pitt, 2019).

Tabla 4. Selección de biomarcadores de la EA con gran evidencia en su valor de pronóstico y diagnóstico

Categoría	Patología de la EA	Biomarcador	Cambio en la EA
Biomarcadores para pronóstico	Incrementa la carga amiloide	Aβ42 en líquido cefalorraquídeo	Disminución
		PiB-PET	Incremento
	Incremento de tau (tau total y tau fosforilada)	Tau en líquido cefalorraquídeo	Incremento
		Tau fosforilada en líquido cefalorraquídeo (T181, S199, T231)	Incremento
		Relación en líquido cefalorraquídeo fosfo-tau: tau	Incremento
Biomarcadores de diagnóstico	Atrofia regional en cerebro	CT y MRI	Atrofia regional, particularmente en el hipocampo
	Hipo metabolismo	FDG-PET (consumo de glucosa)	Hipo metabolismo regional
	Flujo sanguíneo cerebral alterado	SPECT imagenología de perfusión	Alteraciones en perfusión cerebral
	Daño oxidante	Isoprostanos	Incremento

Modificada de (Pitt, 2019). CT, tomografía computarizada; MRI, imagen por resonancia magnética; PiB, compuesto B de Pittsburgh; SPECT, tomografía computarizada de emisión monofotónica; FDG, fluorodesoxiglucosa.

2.9 Neuropatología

2.9.1 Macroscópica

A pesar de que una examinación visual del cerebro no es un diagnóstico de EA, es posible observar que hay una atrofia principalmente en zonas relacionadas con la patología amiloide y de tau como: la corteza entorrinal, el hipocampo y la amígdala. Existe una fuerte correlación entre la pérdida neuronal y la atrofia en el hipocampo, y una disminución en el grosor y el largo del moño cortical, cuya medición puede ser realizada mediante IMR. La atrofia cortical que afecta principalmente a los lóbulos temporales y que se esparce hacia la corteza del motor primario, sensorial y visual, tiene

como resultado una dilatación de los ventrículos laterales (Figura 3) y sugiere fuertemente la presencia de la EA. Estudios de IMR indican que el fórnix, vía eferente del hipocampo, está involucrada en etapas tempranas. En EAFIP, la atrofia del giro cingulado es también uno de los signos más tempranos.

La severa angiopatía amiloide puede estar asociada con una severa leucoencefalopatía, que resulta en pequeños microinfartos corticales, desmielinización de la materia blanca periventricular y pequeñas microhemorragias lobulares (Calderon & Duyckaerts, 2018; Serrano, 2011).

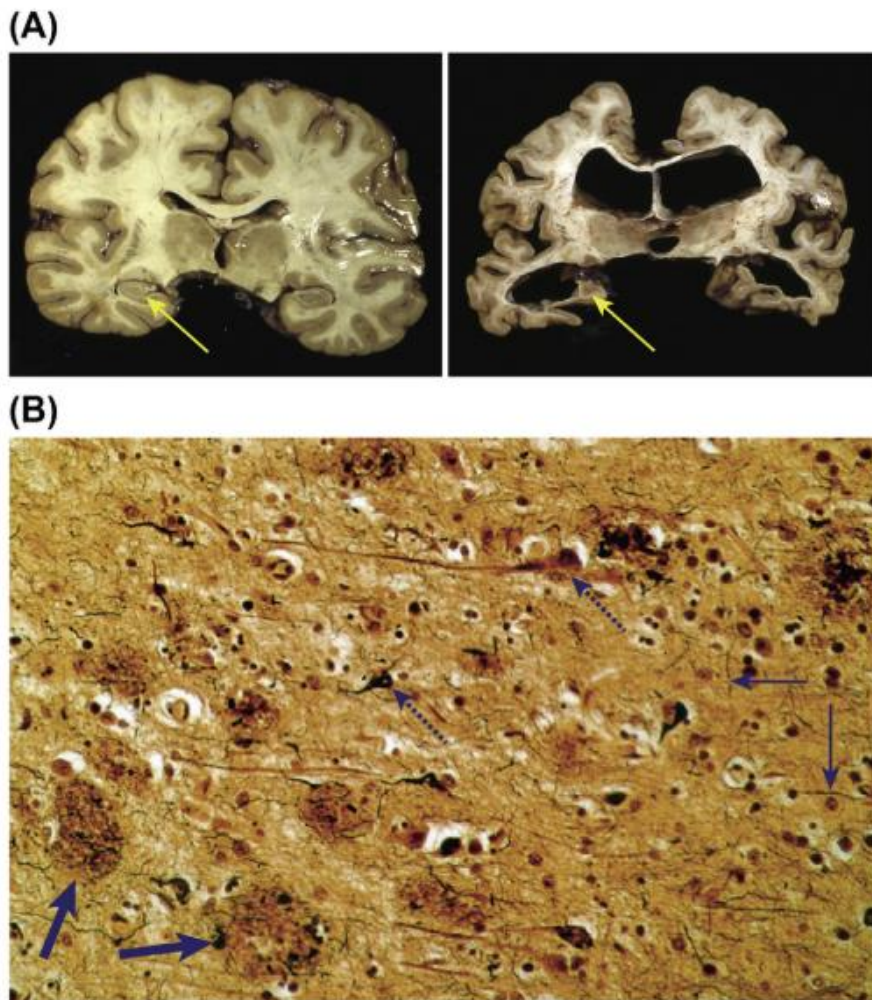


Figura 4. Neuropatología de la EA. Tomada de (Fish et al., 2019). (A) Secciones coronales de cerebro humano mostrando pérdida macroscópica de masa cerebral debido a neurodegeneración (derecha) en contraste con un cerebro sano (izquierda). El hipocampo es resaltado con flechas amarillas. (B) Patología microscópica de la EA en el cerebro humano, mostrando placas amiloides (flechas) y marañas neurofibrilares (flechas punteadas).

2.9.2 Microscópica

Otro rasgo característico de la EA es la presencia anormal de agregados proteícos en el cerebro, estas manifestaciones generan dos lesiones patognómicas de la EA. La primera lesión se presenta como acumulaciones densas extracelulares del péptido A β el cual forma placas que son denominadas placas amiloides. La segunda son agregados intracelulares de la proteína tau fosforilada, dicha lesión es conocida como marañas neurofibrilares. La presencia de ambas patologías es requerida para un diagnóstico categórico de la EA.

Además de lo anterior, también puede observarse la presencia de una gliosis, incluyendo la hipertrofia de astrocitos que han incrementado su expresión de la proteína ácida fibrilar (GFAP). Además, hay un incremento de células de la microglía en la materia gris cercana a las lesiones patognómicas de la EA (Lewis & Spillane, 2019a).

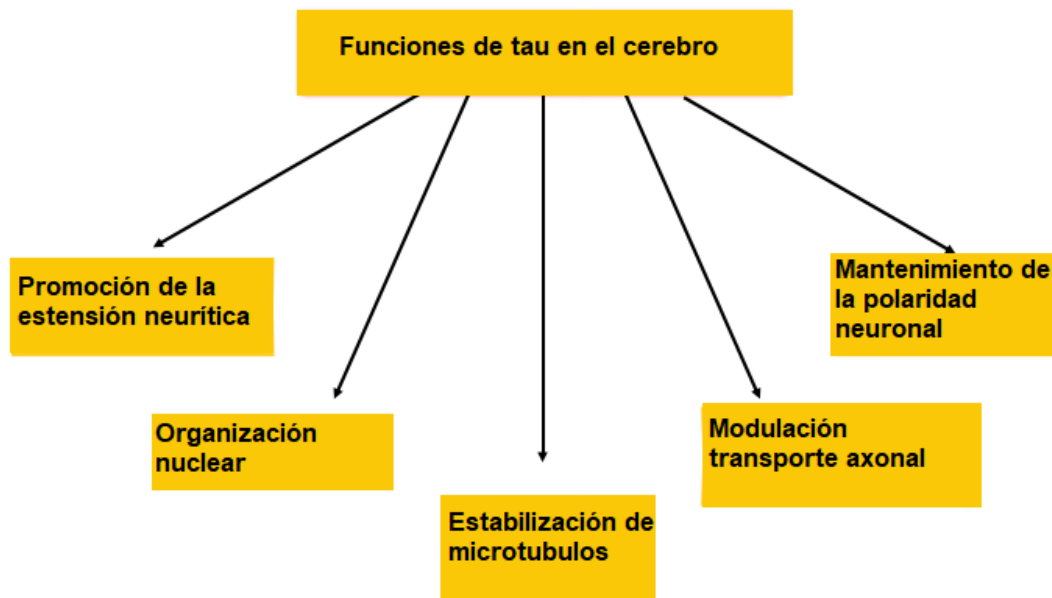


Figura 5. Funciones de la proteína tau en el cerebro. Modificada de (Farooqui, 2017b).

2.9.3 Patología de tau

La proteína tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos. Esta proteína es sometida a fosforilaciones o acetilaciones para desempeñar sus funciones (Figura 5). Cuando es fosforilada, la proteína tau se desensambla de los neurotúbulos, provocando su desestabilización y posterior despolimerización. Tau esta principalmente localizada en los axones, pero también se encuentra en las sinapsis y transporta un regulador del receptor de glutamato. La acumulación de tau fosforilada en dendritas genera una disminución de la plasticidad sináptica. Dendritas tau- positivas se despegan del cuerpo de la célula volviéndose torcidas formando hilos del neuropilo. El termino marañas neurofibrilares (Figura 6) se aplica a las inclusiones globulares formadas por dos filamentos helicoidales pareados (PHF), que se desarrollan en el cuerpo, las dendritas y los axones de las neuronas. Las neuronas más propensas en desarrollar marañas neurofibrilares (NFT) son las neuronas piramidales del hipocampo, la corteza entorrinal y la corteza cerebral, al igual que las neuronas multipolares de la región subcortical que se proyectan directamente a la corteza. La acumulación de tau hiperfosforilada, que no tiene la estructura fibrilar, se denomina pre-maraña. Cuando ocurre la muerte neuronal los agregados de tau se vuelven fibrilares y permanecen en el neurópilo formando marañas fantasmas que constituyen los núcleos de un grupo de agregados neuríticos. El componente neurítico de una placa focal constituye su corona centrada alrededor de un núcleo de $A\beta$, la razón de este fenómeno permanece desconocida (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2018; Serrano-Pozo et al., 2011).

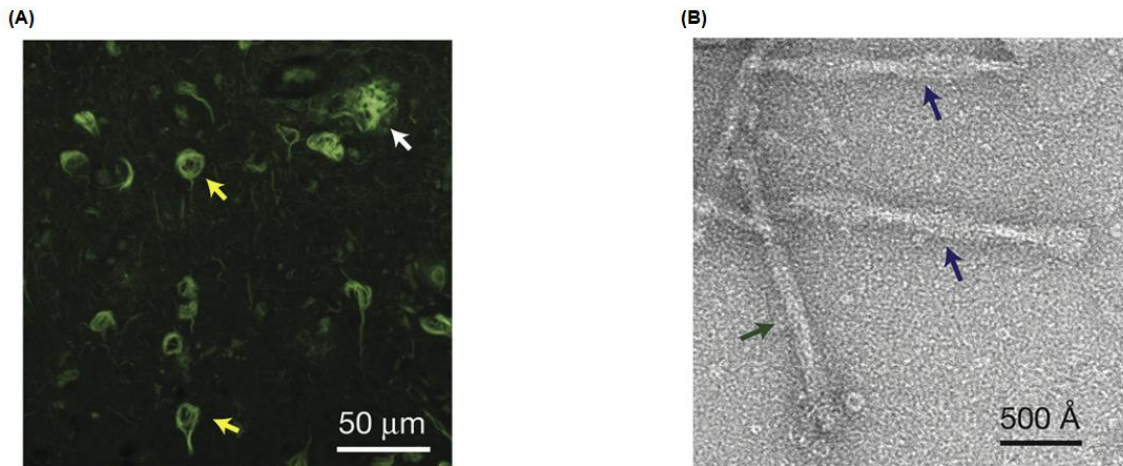


Figura 6. Marañas neurofibrilares y Microscopía electrónica de filamentos. (A) Marañas neurofibrilares (flechas amarillas) y placas amiloides (flecha blanca) en el cerebro humano. (B) Microscopía electrónica de filamentos helicoidales pareados de tau (flechas azules) y filamentos rectos (flecha verde). Tomado de (Lewis & Spillane, 2019a).

2.9.4 Etapas de Braak

El patrón de distribución espaciotemporal de la progresión de NFTs se manifiesta en un orden jerárquico y es bastante predecible. Braak sugirió que la jerarquía está relacionada con una progresión hecha en etapas. La división de las etapas se realizó con base en la inmunotinción realizada con el anticuerpo AT8. Brevemente, la degeneración neurofibrilar comienza en la allocorteza del lóbulo temporal medio (corteza entorrinal e hipocampo) y se esparce a la isocorteza, invadiendo las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales. Braak distinguió 6 etapas que pueden ser resumidas en: entorrinal, límbicas e isocorticales.

Las primeras NFTs aparecen en la región transentorrinal (etapa I) a lo largo de la corteza entorrinal, seguido por la región de CA1 del hipocampo (etapa II). El siguiente desarrollo y acumulación de NFTs ocurre en estructuras límbicas como el subículo del hipocampo (etapa III) y la amígdala, tálamo y claustró (etapa IV). Finalmente, las marañas se distribuyen hacia el área isocortical (etapa V) y por último en las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales (etapa VI) (Figura 7) (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2018; Serrano-Pozo et al., 2011).

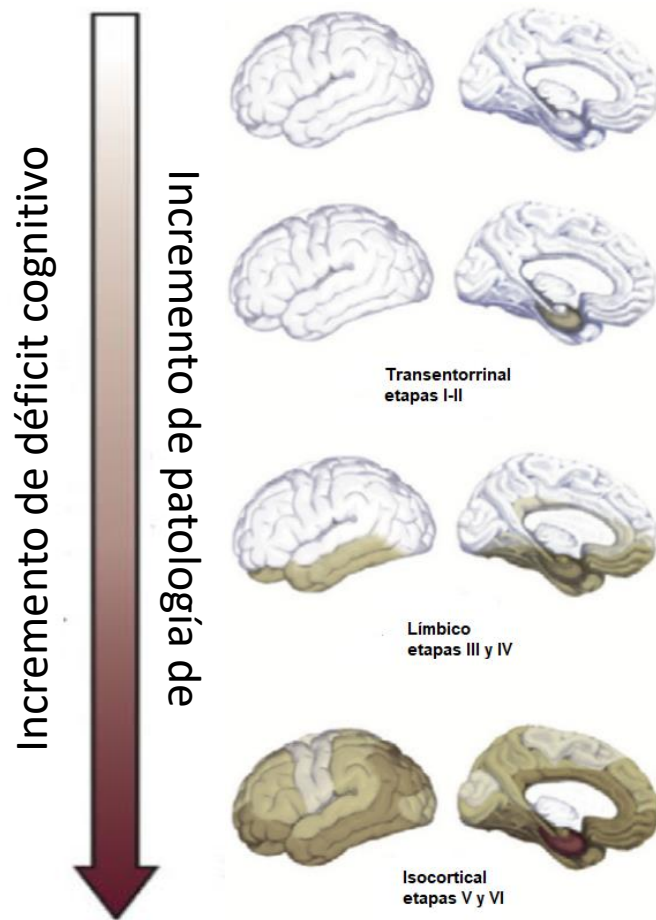


Figura 7. Pérdida neuronal y marcadores patológicos a través del tiempo.. Modelo de Braak para indicar los cambios patológicos de la EA tiempo dependientes. Modificada de (Lewis & Spillane, 2019a)

2.9.5 Placas amiloides

Las placas amiloides, también conocidas como placas seniles, son acumulaciones o depósitos extracelulares protéicos del péptido A β , cuyos principales componentes son péptidos hidrofóbicos de A β de una gran heterogeneidad, de entre 39 y 43 aminoácidos de largo derivados de un proceso proteolítico (Farooqui, 2017c). Estos depósitos son detectados por inmunohistoquímica usando anticuerpos como 4G8 o 6F/3D. Dentro de las especies de A β la isoforma A β 1-40 es la más abundante en circulación, pero la especie A β 1-42 es la que se encuentra en mayor proporción en las placas seniles, esto debido a que es menos soluble y más propenso a fibrilizarse (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2018).

Con un criterio morfológico es posible clasificar a las placas amiloides en dos tipos: placas difusas y placas compactas basado en su tinción con

colorantes específicos para la conformación de β -plegada como por ejemplo, Rojo Congo y Tioflavina-S. Las placas compactas están compuestas por una masa central de fibrillas extracelulares que se van extendiendo radialmente hacia la periferia donde se van mezclando con procesos neuronales, astrocíticos y microgliales. Estos procesos, conocidos como neuritas distróficas, contienen paquetes de PHFs, al igual que una abundancia de mitocondrias anormales y cuerpos densos de probable origen lisosomal (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2018).

Las placas amiloides se acumulan principalmente en la isocorteza. Aunque el patrón de progresión espaciotemporal es medianamente predecible, en general la allocorteza (corteza entorrinal y la formación hipocampal), los ganglios basales, núcleos relevantes del cerebro y el cerebelo están afectados en una menor extensión.

Además del modelo de Braak para definir el progreso de los depósitos amiloides, Thal et al. han propuesto otro modelo que consta de 5 etapas: isocortical (etapa 1), depósitos adicionales en allocorteza (etapa 2), núcleo subcortical, incluyendo el tálamo e hipotálamo y materia blanca (etapa 3), núcleos rojos, sustancia nigra y formación reticular de la médula oblongada (etapa 4) y cerebelo (etapa 5)(Serrano et al., 2011).

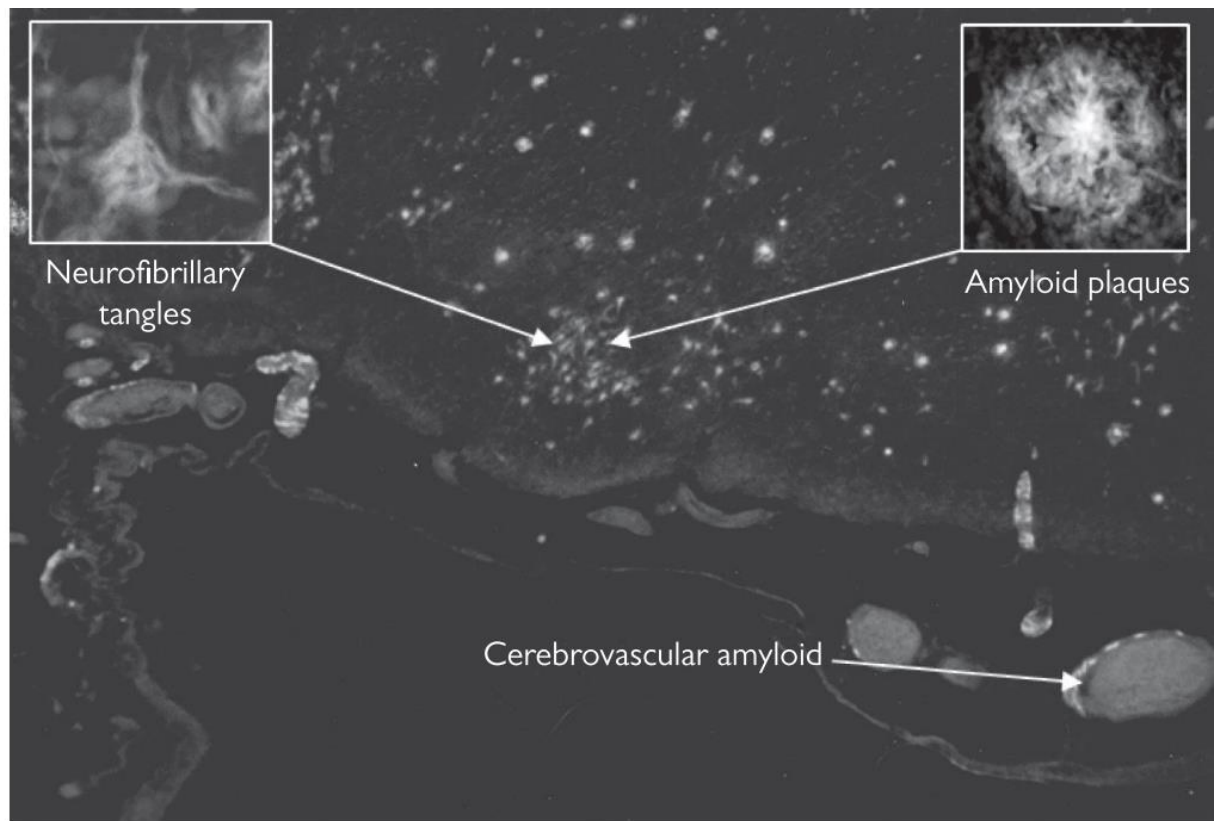


Figura 8. Examinación microscópica de la neuropatología de la EA en la corteza temporal. Una sección de la corteza temporal de cerebro humano teñida con tioflavina S, mostrando grupos de placas amiloides, marañas neurofibrilares y angiopatía amiloide cerebral. Neurofibrillary tangles, marañas neurofibrilares; Amyloid plaques, placas amiloides; Cerebrovascular amyloid, amiloide cerebrovascular. Tomada de (Waldemar & Burns, 2017).

2.9.6 Angiopatía amiloide cerebral (AAC)

Desde un punto de vista clínico, la angiopatía amiloide cerebral puede ser definida como la deposición amiloidea en los vasos cerebrales que causa disfunción vascular. Se caracteriza por una ruptura de los vasos y hemorragias intracerebrales espontáneas, las cuales representan una notable forma de ataque fulminante severa e intratable en la vejez.

La dificultad de diagnosticar la AAC en sujetos vivos hace poco certeras las cifras en la incidencia de la enfermedad y la prevalencia. La AAC sin hemorragias intracerebrales es claramente un fenómeno común en cerebros viejos donde solo la minoría de los casos de AAC patológicamente avanzada resultan en un accidente cerebrovascular hemorrágico. La edad avanzada es el factor de riesgo más fuerte para la AAC relacionado a las hemorragias intracerebrales, por lo que es común su establecimiento en el contexto de la

EA con un 80% de los pacientes que presentan algún grado de la patología (Greenberg, 2004; Serrano-Pozo et al., 2011).

La AAC se muestra, en análisis patológicos, como una combinación variable de depósitos amiloides vasculares y ruptura de la pared de los vasos. Los vasos afectados son capilares, arteriolas, arterias de pequeño y mediano tamaño principalmente de la corteza cerebral, sobrepuestos en las leptomeninges, en la materia blanca y en estructuras profundas de materia gris. Por otro lado, se encuentra con menos frecuencia en el hipocampo, cerebelo y ganglios basales. Su distribución es irregular y segmentada, teniendo vasos que están fuertemente afectados con regiones libres de amiloide.

El principal constituyente de la AAC es el péptido A β . A diferencia de la EA, donde el mayor componente que conforma las placas es A β 1-42, en los agregados presentes en AAC la especie A β 1-40 es la predominante, especialmente en estadios avanzados de la patología (Figura 9). Se ha asociado una serie de mutaciones con la AAC entre las cuales se encuentran un subgrupo de mutaciones en APP asociados a la EAFIP como, por ejemplo, la Iowa, la Swedish, Arctic e Italian, y mutaciones en PS1 Y PS2 (Greenberg, 2004).

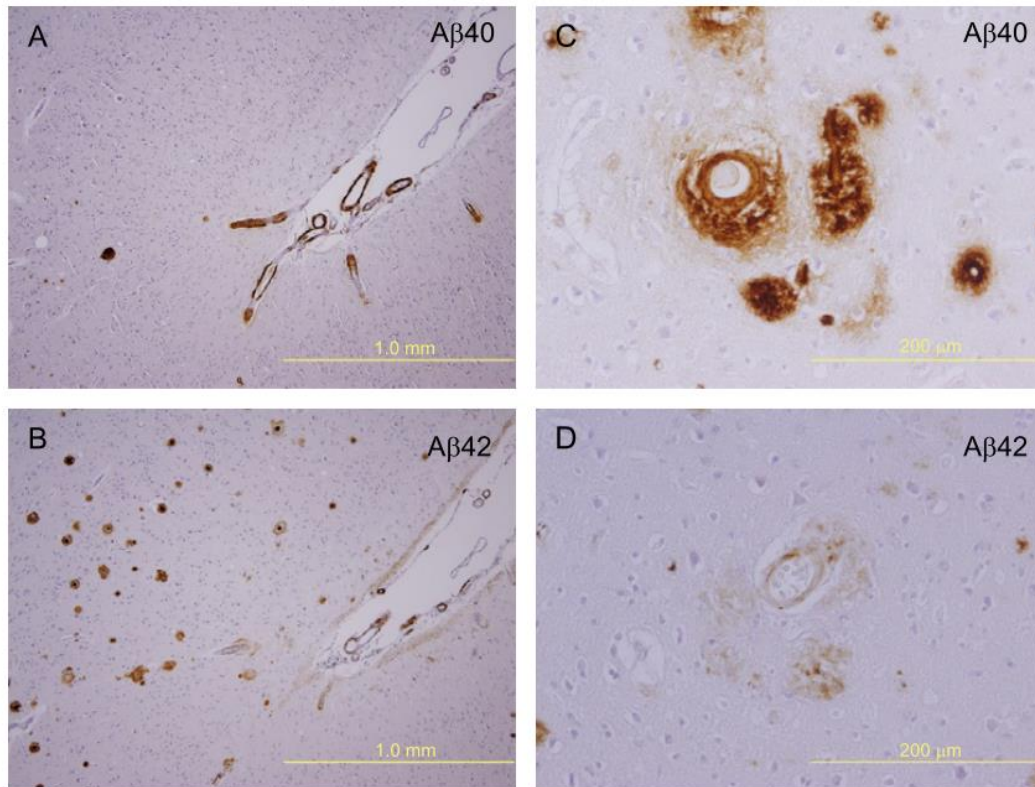


Figura 9. Inmunohistoquímica de la AAC. Se realizó con anticuerpos específicos para A β 1-40 (A,C) y A β 1-42 (B,D). Las placas seniles se encuentran conformadas por A β 1-42 (B). En cambio, A β 1-40 es el componente principal de la AAC (C). Tomada de (Yamada & Naiki, 2012).

La fuente principal de A β es probablemente neuronal, aunque no debe excluirse que A β sea producido localmente. El A β producido por la neurona es arrastrado a la vasculatura vía drenaje de líquido intersticial y, subsecuentemente, internalizado o acumulado en pequeños depósitos focales, causando degeneración del endotelio y células de músculo liso, la cual interfiere con la función de la barrera hematoencefálica comprometida. La ruptura de la barrera hematoencefálica puede llevar a la acumulación adicional de A β periférico, causando futuros depósitos de A β y degeneración vascular. Así, pequeñas cantidades de A β extra o intracelular pueden iniciar o continuar el proceso de agregación de A β en los vasos.

Antes de que sucedan los cambios cognitivos y neurodegenerativos, se han observado anomalías microvasculares, los cuales incluyen: engrosamiento de la membrana, degeneración de pericitos, cambio en la forma de las células endoteliales y colapso de los capilares cerebrales (Rensink et al., 2003).

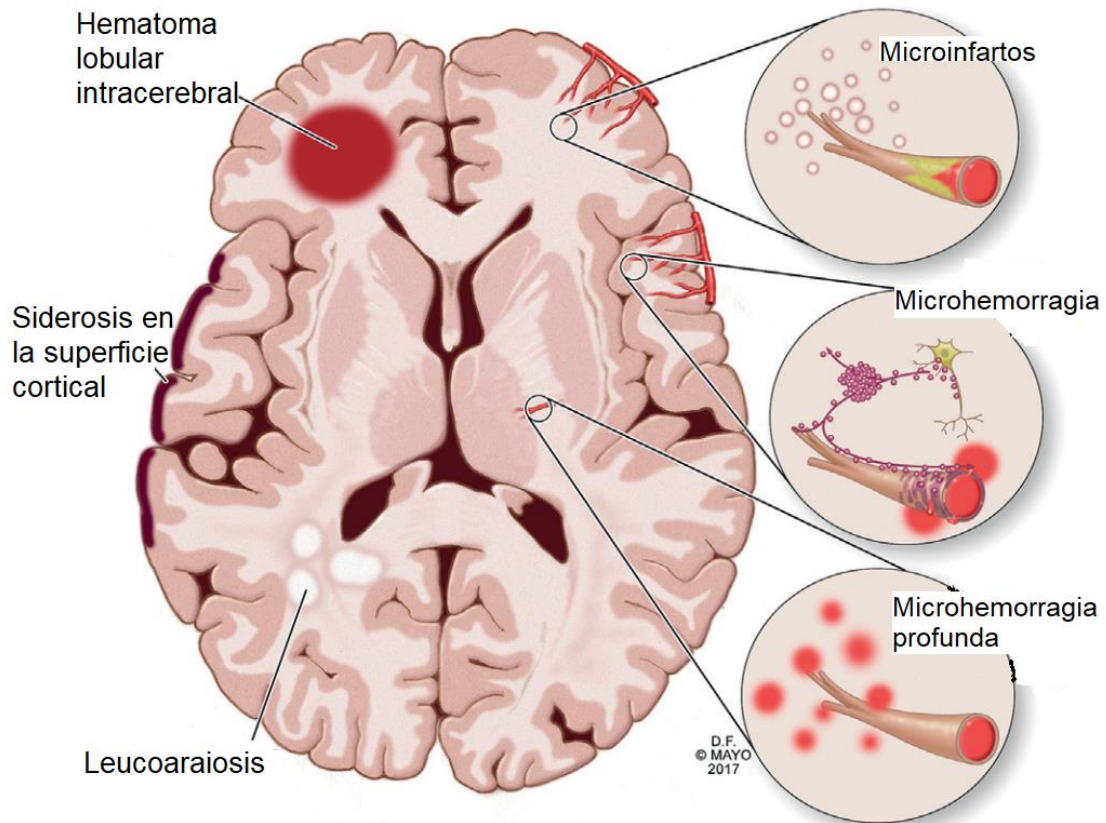


Figura 10. Varias formas de patología vascular asociadas a la angiopatía amiloide cerebral que pueden estar presentes en cerebro envejecido. Estas incluyen leucoaraiosis, siderosis en la superficie cortical, hemorragia lobular intracerebral, microinfartos y microhemorragias lobulares. Microhemorragias profundas también pueden estar presentes y reflejan hipertensión arteriopática. Modificado de (DeSimone et al., 2017).

2.9.7 Péptido β -amiloide

$A\beta$ es un péptido corto cuya longitud varía de entre 39 y 43 aminoácidos, dependiendo de las enzimas que intervinieron en su producción. Tiene un carácter anfipático ya que posee regiones hidrofílicas e hidrofóbicas dadas por el tipo de aminoácidos que conforman cada región. Es posible identificarlo en fluidos como el líquido cefalorraquídeo y en plasma, sin embargo, se encuentra en bajas concentraciones, las cuales se ven disminuidas cuando se presenta la EA. A pesar de la gran heterogeneidad de las especies $A\beta$, existen dos isoformas ($A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$) que predominan y las que son clave para la patogenia de la EA. La estructura primaria del péptido $A\beta$ puede dividirse en cuatro regiones basándonos en su hidrofobicidad. La primera región corresponde a los residuos 1-16 del extremo N-terminal, cuyos aminoácidos determinan el carácter hidrofílico de esta región y su asociación con su capacidad de interactuar con iones metálicos (residuos D1, H6, H13 y H14). La segunda región (central) es una

región hidrofílica de muy pequeño tamaño que corresponde a los residuos E22-G29, la cual rodea la región central hidrofóbica (L17-A21). La última región que corresponde al extremo C-terminal y que constituye a los residuos (A30-V40/A42) es una región hidrofóbica (Aleksis, et al., 2017). La especie A β 1-42 es la más abundante en las placas amiloides por su carácter más insoluble debido a que contiene dos residuos más en la región hidrofóbica del extremo C-terminal.

El péptido A β intrínsecamente, cuando se encuentra en solución, no adquiere un plegamiento terciario, sino más bien existe como una serie de estructuras. Mediante microscopía electrónica se ha revelado que fibrillas amiloides son típicamente largas, rectas y no ramificadas, con un rango de 0.1 a 10 μ m de largo. Utilizando estudios de difracción de rayos X se encontró que todas las fibrillas comparten una estructura cross- β , compuesta por laminas β que están perpendicular al eje de la fibrilla. Se ha observado que una vez realizada la síntesis de A β la forma nativa y soluble de este péptido es aleatoria. La diferencia entre estas dos estructuras nos indica que es necesario un cambio conformacional para su agregación. Mediante estudios mutagénicos se ha encontrado que cambios de aminoácidos de los residuos 15-21, 24-28 y 31-36 pueden comprometer la estructura β -laminar de las fibrillas.

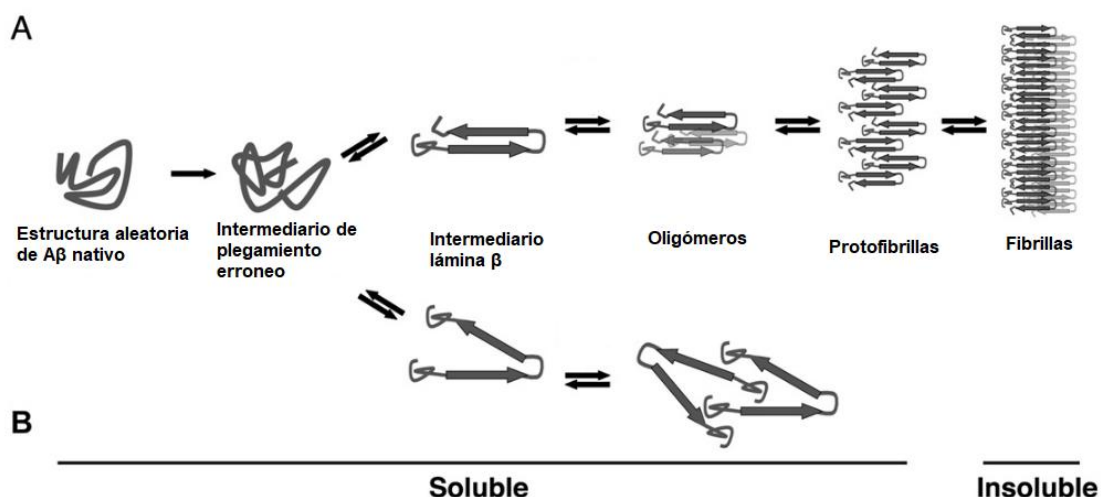


Figura 11. Agregación de A β . A β nativo adopta una estructura enrollada aleatoria. La formación de fibrillas es iniciada cuando A β lleva a cabo un cambio conformacional a un intermediario mal plegado, el cual se transforma a un intermediario rico en láminas β (A). Este intermediario es inestable y se agrega en oligómeros compuestos de múltiples unidades monoméricas. El reclutamiento de monómeros adicionales resulta en la formación de protofibrillas, las cuales se ensamblan para dar origen a fibrillas insolubles. (B) Una vía alternativa de agregación incluye una vía en la que no se forman oligómeros, cuyo ensamblaje no da origen a fibrillas. Modificada de (DaSilva et al., 2010).

A pesar de las diferentes isoformas de A β que difieren en sus propiedades de agregación, existen tres grupos principales de ensamblajes de A β . Estos están compuestos por monómeros, oligómeros solubles y fibrillas insolubles, "A β pools". Los oligómeros en EA, están organizados en diferentes estructuras que van desde dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros y decámeros, ligandos difusibles derivados de A β (ADDL), dodecámeros o A β *56 (Sengupta et al., 2016).

La formación de oligómeros de A β (Figura 11), así como su depósito en agregados amiloides son fenómenos dependientes de la concentración. Brevemente, el mecanismo de agregación que se ha descrito propone que comienza con el plegamiento erróneo de A β en β -plegada, seguido de un ensamblaje de monómeros con una organización de núcleo, el cual contiene múltiples sitios de unión a otros monómeros que dan lugar a oligómeros de mayor tamaño, posteriormente estos se ensamblan formando protofibrillas. Finalmente ocurre un cambio conformacional que rompe las estructuras β plegadas intramoleculares para formar puentes de hidrogeno intermoleculares reorganizando las protofibrillas en una estructura tipo fibrilla insoluble (Aleksis et al., 2017). Debido a que en el cerebro A β es producido y degradado constantemente, la alteración en los procesos de producción o eliminación dará lugar a un exceso y acumulación en su forma soluble o insoluble.

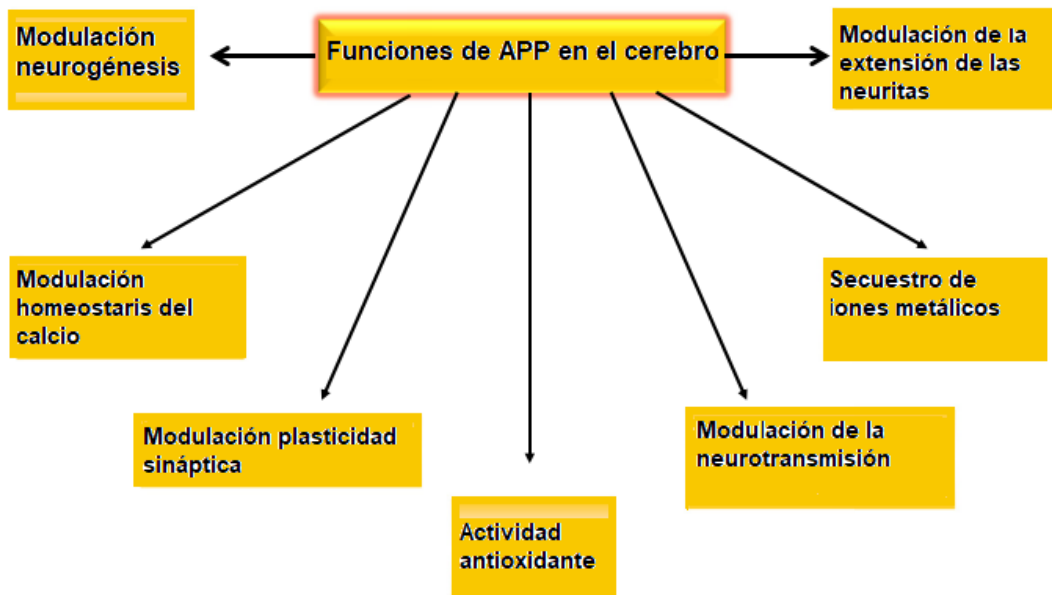


Figura 12. Funciones de la proteína precursora amiloide en el cerebro. Modificada de (Farooqui, 2017b).

2.9.8 Procesamiento de la APP

A β es el producto proteolítico del procesamiento de la APP, la cual es una glicoproteína membranal integral, cuya función no es totalmente clara pero se le ha atribuido un papel en la modulación de la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión (Figura 12). Su proteólisis puede ocurrir por dos vías (Figura 13), la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. La mayoría de las veces es procesada por la vía no amiloidogénica la cual no lleva a la producción de A β . El procesamiento es iniciado por dos endopeptidasas llamadas α y β secretasa. El corte por la α secretasa o la β secretasa (BACE-1) resulta en la liberación de casi el ectodominio completo, generando largos derivados de APP solubles (llamados APP α y APP β) junto con la producción de un fragmento C-terminal embebido en la membrana llamado α o β CTF (C83 y C99 respectivamente). El procesamiento de CTF por γ secretasa genera el péptido inofensivo P3 (por la vía no amiloidogénica) o péptidos A β (vía amiloidogénica) de un rango de 38 a 43 aminoácidos, junto con el dominio intracelular de la proteína precursora amiloide (AICD). Varias metaloproteasas como, TACE/ADAM17, ADAM9 y BACE2, también pueden hidrolizar APP en el sitio de la α secretasa dentro del dominio de A β evitando la formación del péptido A β completo.

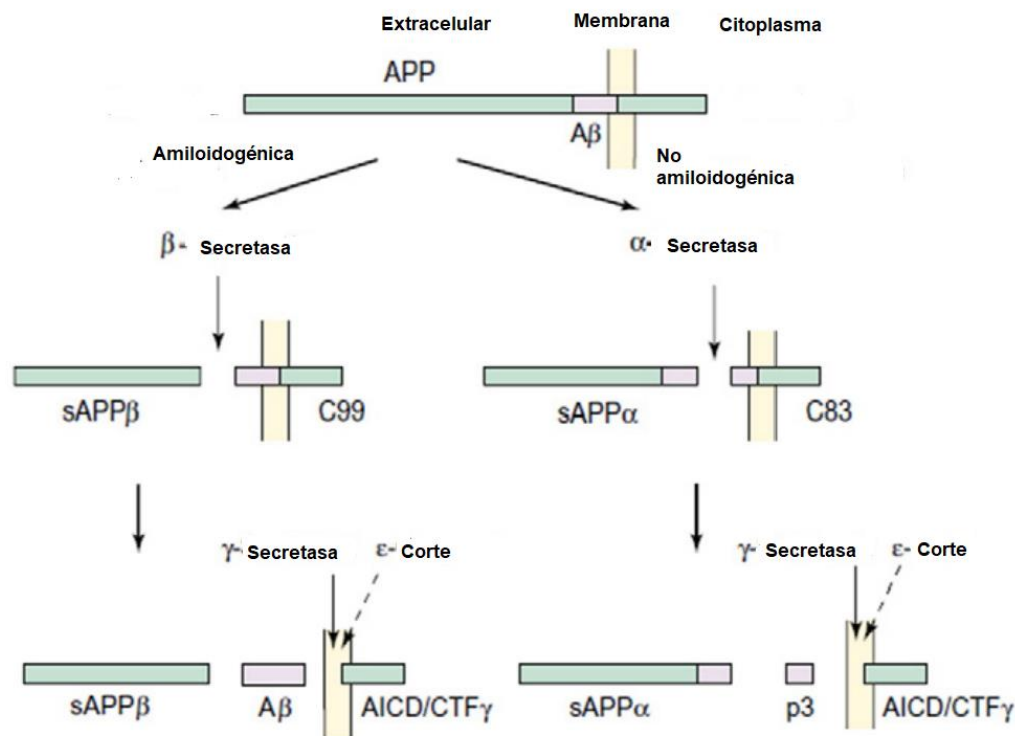


Figura 13 La estructura del procesamiento de APP mostrando la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. Modificada de (Barage & Sonawane, 2015).

La proteína y secretasa es un complejo proteico que consiste en presenilina 1/presenilina 2, nicastrina, APH-1 y el enhancer 2 de presenilina. En la membrana, la α secretasa se encuentra localizada en los dominios ricos en fosfolípidos, mientras que β y γ secretasa residen en las balsas lipídicas ricas en colesterol de la membrana plasmática. Investigaciones sugieren que alteraciones en los niveles de colesterol en la membrana celular modulan la vía de procesamiento de APP a través de las secretasas (Farooqui, 2017c).

El incremento en los niveles de Aβ puede ser causado por: (1) un incremento en la producción de Aβ debido a mutaciones en APP o mutaciones en genes que tengan que ver con su procesamiento (PSEN1, PSEN2) en el caso de la EA familiar; o (2) debido a una disminución en la eliminación de Aβ en el caso de la EA esporádica (Tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones relacionadas con la EA y su fenotipo resultante.

Gen	Mutaciones	Resultado
Proteína precursora amiloide (APP; Gene ID 351)	K670N/M671L (Swedish)	Incrementa la producción de A β a través de la actividad potenciada de BACE1; riesgo de EA aumentado
	A673T	Disminuye la producción de A β a través de la actividad atenuada de BACE1; reduce el riesgo de EA
	A692G (Flemish)	Incrementa la producción de A β a través de la atenuada actividad de α -secretasa; riesgo de EA aumentado
	E693G (Arctic)	Incrementa la polimerización de A β ; elevado riesgo de EA
	V717I (London)	Incrementa la relación A β 42: A β 40; riesgo de EA elevado
Presenilina 1 (PSEN1; Gene ID 5663)	Más de 150 mutaciones, principalmente sentido erróneo.	Incrementa la relación A β 42: A β 40; incrementa el riesgo de EA
Presenilina 2 (PSEN2; Gene ID 5664)	Más de 10 mutaciones	Incrementa la relación A β 42: A β 40; incrementa el riesgo de EA

Modificado de (Pitt, 2019).

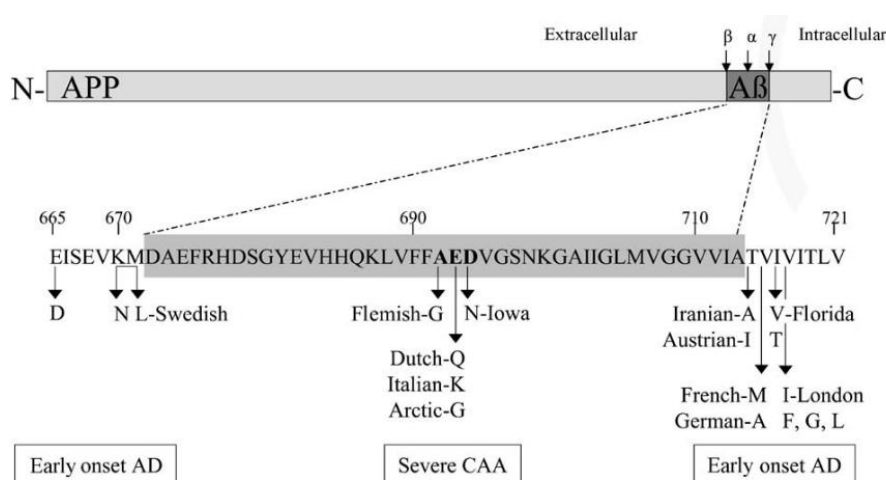


Figura 14 Representación esquemática de las mutaciones en APP. (Rensink et al., 2003) Early onset AD, enfermedad de Alzheimer familiar de inicio precoz; severe CAA, AAC severa; Early onset AD, inicio temprano de la EA Tomada de (Rensink et al., 2003).

2.9.9 Hipótesis de la cascada amiloide.

La hipótesis de la cascada amiloide postula que la neurodegeneración en la EA es causada por acumulación anormal de placas de A β en diferentes regiones del cerebro. De acuerdo a esta hipótesis la acumulación de A β actúa como un gatillo patológico para una cascada que incluye daño neurítico, formación de NFTs que llevan a la disfunción neuronal y a la muerte celular (Figura 15).

Evidencias genéticas, bioquímicas y patológicas apoyan esta hipótesis que afirma que la acumulación de placas amiloides es la causa primaria de la patología. Las alteraciones en la producción y eliminación de A β resultan en la acumulación de A β 1-40 y A β 1-42, o una inversión en la proporción de producción de especies de A β favoreciendo a la especie de mayor tamaño. Estos se acumulan formando oligómeros que pueden tener un impacto tóxico directo, pero también pueden llevar a una disfunción de tau que da como resultado su hiperfosforilación y desensamble de los microtúbulos. Eso lleva a la formación de marañas neurofibrilares, generando especies tóxicas de agregados de tau que culminan en citotoxicidad (Lewis & Spillane, 2019a). La formación de depósitos de A β y difusión de las placas llevan a una activación local de la microglía, liberación de citocinas, astrogliosis y a una respuesta proinflamatoria multiprotéica. Los procesos inflamatorios pueden magnificar y exacerbar la muerte celular iniciada por la exposición a agregados proteicos. Además, estos depósitos de A β llevan a diferentes cambios estructurales y bioquímicos en axones, dendritas y cuerpos neuronales vecinos, que generan la pérdida sináptica, neuronal y atrofia cerebral característica de la EA (Barage & Sonawane, 2015). Es importante notar que a pesar de las evidencias que se tienen, aún existen vacíos en nuestro entendimiento sobre cómo se unen los eventos que forman la hipótesis de la cascada amiloide.

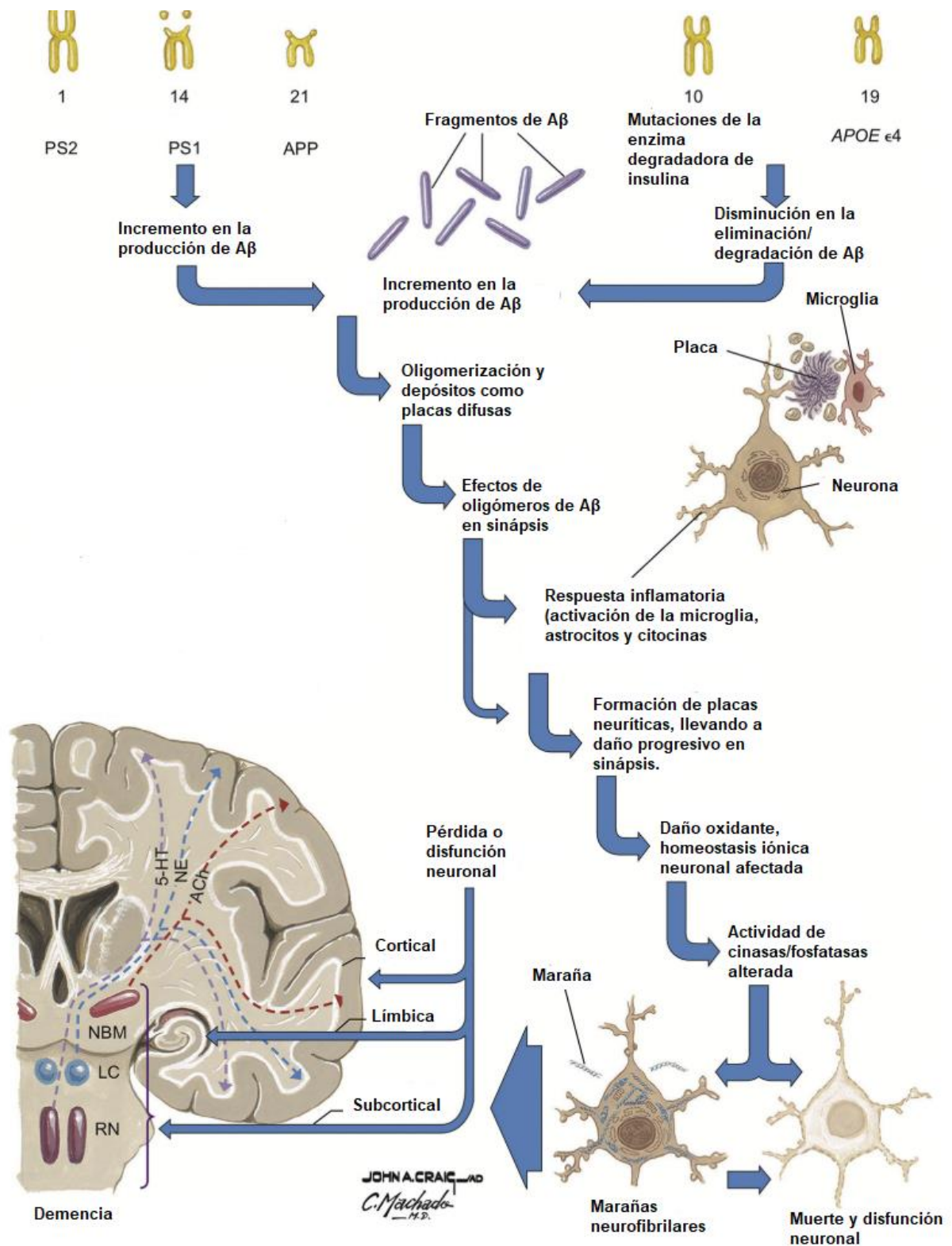


Figura 15. Esquema de la hipótesis de la cascada amiloide. La hipótesis establece que la acumulación de Aβ en el cerebro resulta en la construcción de agregados oligoméricos de este péptido, estimulando la agregación de tau, llevando a citotoxicidad y neurodegeneración. 5HT, serotonina; NE, norepinefrina; Ach, acetilcolina; NBM, Núcleo basales de Meynert; LC, locus caeruleus; RN, núcleo de Raphe. Modificada de (Lewis & Spillane, 2019a).

2.9.10 Toxicidad del péptido A β

En la vía amiloidogénica el procesamiento de la APP genera A β 1-40/42 como la especie predominante, ya que la proporción de A β 1-40:A β 1-42 producidos es 9:1. Por razones aún desconocidas, en condiciones patológicas que llevan a la EA, se acumula A β 1-42, llevando a efectos adversos en las neuronas y el ambiente celular del cerebro. Intraneuronalmente, el A β se acumula en endosomas y lisosomas e interrumpe la función de degradación proteolítica. Su secreción forma dímeros y trímeros los que son resistentes a la degradación proteolítica. Para permitir la formación de oligómeros a partir de monómeros debe realizarse un cambio conformacional del monómero, que se encuentra en α hélice y adoptar una estructura β plegada (Sengupta et al., 2016; Waldemar & Burns, 2017).

El cerebro tiene una alta tasa de consumo de oxígeno y bajos niveles de enzimas antioxidantes haciendolo vulnerable al daño producido por las especies reactivas de oxígeno. Los oligómeros de A β median su neurotoxicidad al incrementar la generación de especies reactivas de oxígeno por mecanismos directos e indirectos. Directamente producen H₂O₂ no solo por la activación de la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre, sino también por la activación de la NADPH oxidasa en astrocitos. Indirectamente genera especies reactivas de oxígeno al disminuir la actividad de enzimas mitocondriales como la enzima alcohol deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual culmina en la disfunción mitocondrial (Waldemar & Burns, 2017).

Un aspecto importante es el control de la homeostasis del Ca⁺², debido a que ocurre un incremento intraneuronal de Ca⁺². Los oligómeros de A β extracelulares se unen a proteínas priónicas celulares en la membrana plasmática generando un incremento en la entrada de Ca²⁺ a la neurona. Estos oligómeros forman estructuras de anillo, las cuales permiten a los residuos hidrofóbicos interactuar con proteínas de la membrana plasmática formando canales solvatados. Además, los altos niveles de Ca⁺² pueden ser causados por la liberación del citocromo C de la mitocondria, subsecuente al inicio de la apoptosis (Waldemar & Burns, 2017).

También se ha mostrado que los oligómeros solubles de A β , incluso a bajas concentraciones, son capaces de incrementar la respuesta de receptores como el NMDA, causando una despolarización de las neuronas, liberación de glutamato y excitotoxicidad debida a la entrada de Ca⁺².

Otro de los mecanismos tóxicos de A β es su capacidad de unirse a proteínas e interferir con su expresión y función, por ejemplo, la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual es importante en ambientes dependientes de glucosa, incrementando la capacidad del cerebro de usar cetonas. En presencia de A β esta enzima es capaz de facilitar la apoptosis. Además, el A β es capaz de unirse al factor de transcripción elemento de respuesta a unión de c-AMP (CREB) que controla la expresión de proteínas involucradas en la memoria y la plasticidad sináptica como por ejemplo, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) entre otros (Farooqui, 2017c).

Los agregados del péptido A β 1-42 provocan una respuesta inflamatoria y activación de la microglía. El incremento de Ca⁺² por la estimulación de los receptores postsinápticos, como el NMDA y el mGluR, lleva a un proceso inflamatorio y muerte celular. Los oligómeros de A β inducen inflamación a través de la activación de diferentes receptores como RAGE, TLRs, NLRs y receptores de formil péptido, por lo tanto, llevan a la activación de células gliales, la producción de mediadores de la inflamación como citocinas, interleucinas y factor α de necrosis tumoral (TNF α), que a su vez incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Farooqui, 2017c; Sengupta et al., 2016).

2.9.11 Especies A β aminotruncados y péptido A β pE11-42

La hipótesis de la cascada amiloide propone como piezas clave a las especies de tamaño completo de A β 1-42 y la relación de A β 1-40/A β 1-42 en la etiología de la EA, cuyos oligómeros solubles llevan a la neurotoxicidad, hiperfosforilación de tau, neurodegeneración y eventualmente al déficit cognitivo. Sin embargo, el A β "peptidoma" consiste realmente de varias especies relacionadas al A β , las cuales colectivamente representan a una familia de péptidos hidrofóbicos de 30-43 aminoácidos, que poseen una gran heterogeneidad en los extremos amino y carboxilo terminal. Estos catabolitos pueden ser obtenidos mediante el procesamiento primario por

enzimas en β APP o debido al procesamiento secundario del A β por exopeptidasas. Existe evidencia que implica a varias isoformas del A β como agentes neurotóxicos subyacentes a la degeneración celular, inflamación y deterioro cognitivo (Gunn, Masters, & Cherny, 2010).

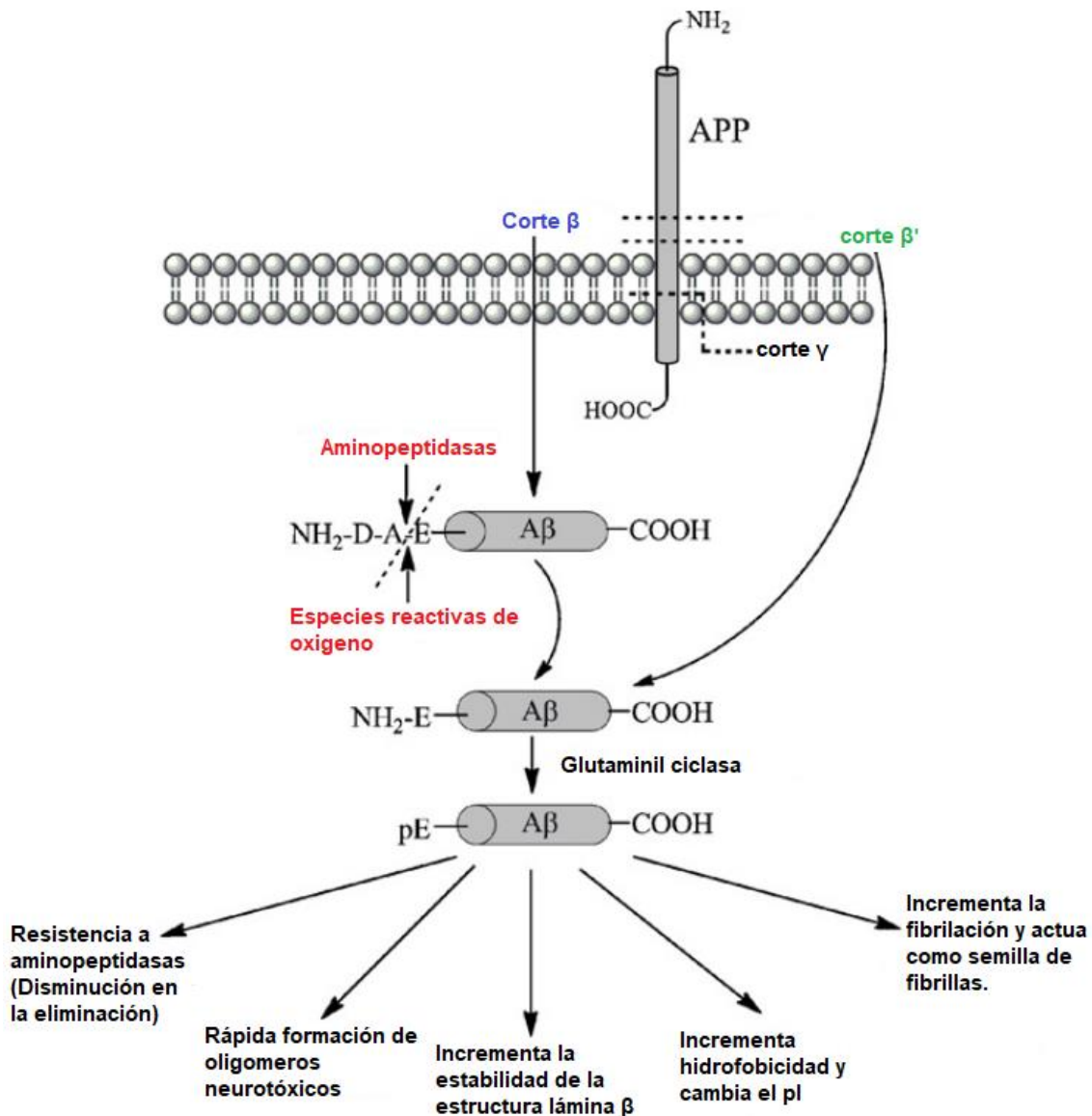


Figura 16. Representación esquemática de la formación de pE-A β , los resultados fisiológicos y efectos bioquímicos. Múltiples potenciales mecanismos para las especies aminotruncadas han sido propuestas. En el mecanismo exacto pueden estar implicados una o más de las vías o un proceso de corte que aún no ha sido identificado. Modificada de (Gunn et al., 2010).

Además de las ya conocidas especies de tamaño completo, algunas especies más cortas son generadas por cortes primarios que tienen lugar en β APP como por ejemplo, las especies N-truncadas (Figura 16). Así, el corte

mediado por la enzima cortadora de la APP en el sitio β (BACE1) realiza un corte en el sitio β' , y combinado con la acción de γ secretasa genera el péptido A β 11-40/42. Por otro lado, también se pueden generar especies truncadas a partir del péptido A β de tamaño completo mediante la contribución de exopeptidasas como la aminopeptidasa A (APA), que genera la especie truncada A β 3-X, o la intervención de la familia dipeptidil peptidasa (DPP) que genera diferentes especies N-truncadas. Posterior a la generación de la especie aminotruncada A β 3-X o A β 11-X, el residuo expuesto, que en ambas especies corresponde a un glutamato, es convertido a piroglutamato por la enzima glutaminil ciclasa (QC) (Figura 17). Dicha reacción es favorecida en condiciones ácidas, como las que se encuentran en los compartimientos de secreción donde la APP y la QC son colocalizados (Dunys, Valverde, & Checler, 2018).

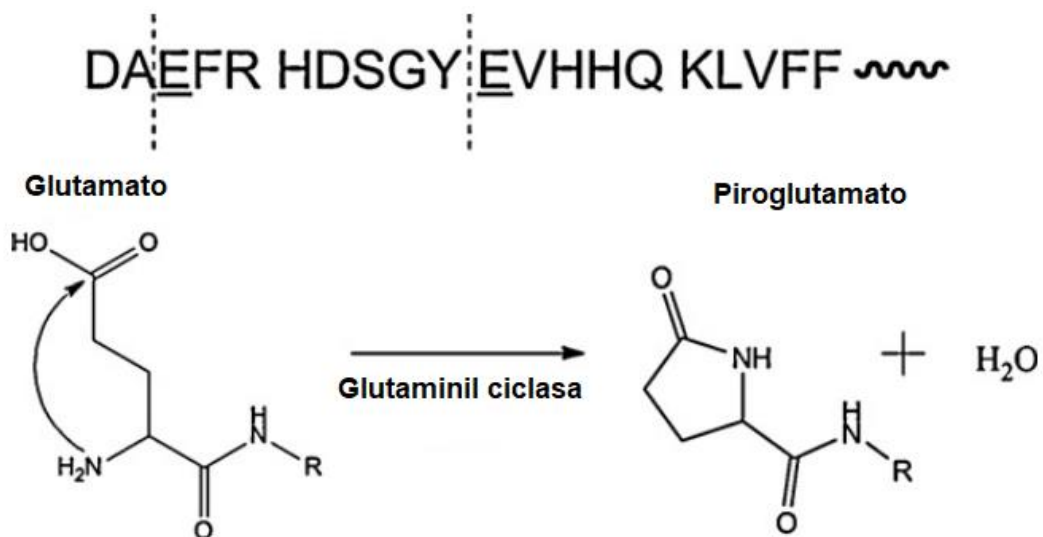


Figura 17 Reacción de generación de piroglutamato. El procesamiento de A β en el extremo N-terminal en las posiciones 3 y 11 (parte superior; se muestra la secuencia de los primeros 20 residuos de A β) deja expuesto el residuo de glutamato en el cual puede actuar la enzima glutaminil ciclasa que genera un residuo más hidrofóbico y resistente a las aminopeptidasas, el piroglutamato. Modificado de (Gunn et al., 2010).

La formación de especies A β piroglutamadas resulta en la pérdida de dos cargas para A β 3pE y diez para A β 11pE, consecuentemente incrementando su hidrofobicidad, promoviendo una rápida adopción de la estructura β plegada y la formación de agregados tóxicos. Estas especies son abundantes en el cerebro de personas con EA y síndrome de Down, diferenciando aquellos cerebros de personas sanas de la misma edad, en los

cuales la mayoría tiene especies A β N-intactas. Además, estas especies N-truncadas representan hasta el 25% de total de A β en cada cerebro con EA. Por último, evidencia sugiere que especies aminotruncadas y piroglutamadas son las primeras que comienzan a depositarse en placas amiloides y que actúan como semillas de fibrilación, acelerando la oligomerización y fibrilación de otras especies de A β (Gunn et al., 2010).

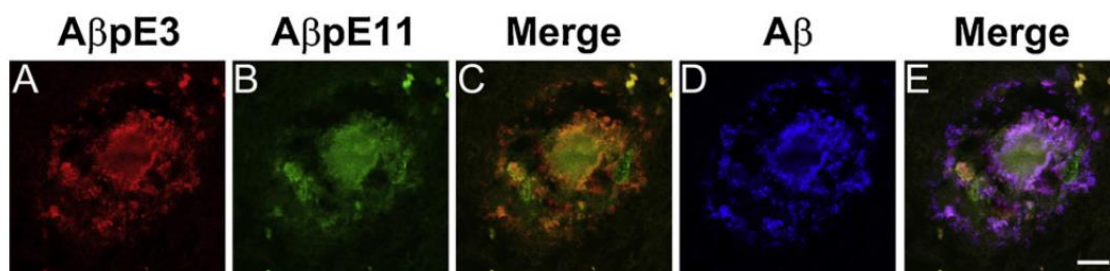


Figura 18. A β pE11-42 colocaliza con A β pE3-42 en placas amiloides. Triple inmunotinción realizada con anticuerpo contra A β pE3-42 (A), A β pE11-42 (B), y A β total (D). Las muestras fueron examinadas en microscopía confocal para la colocalización de A β pE11-42 y A β pE3-42 (C) y para colocalización de A β pE11-42 y A β total. La barra de escala blanca corresponde a 50 μ m. Tomado de (Sullivan et al., 2011).

2.10 Tratamiento de EA

Los acercamientos terapéuticos para la EA, como para la mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas, pueden clasificarse en tres categorías: sintomática, modificadora de la enfermedad y regenerativa. Actualmente las terapias aprobadas actúan en la categoría sintomática, solo con efecto en la función cognitiva y mostrando así que aún permanece una necesidad médica no alcanzada para que el tratamiento efectivo de la EA sea capaz de eliminar la progresión de la patología. La mayoría de los esfuerzos se encuentran en la búsqueda de nuevas terapias orientadas hacia la modificación de la enfermedad y de su progresión, enfocándose principalmente en interferir en la cascada amiloidea y en la biología de tau. La regeneración del cerebro dañado es básicamente hipotética, ya que busca reemplazar las neuronas perdidas, la cual es una meta muy lejana en este momento.

De las terapias actuales aprobadas por la FDA, ninguna tiene como blanco directamente la patología de la EA. Los tratamientos existentes son sintomáticos y apuntan a la disminución en la disfunción cognitiva a través

de dos diferentes modos de acción: agonistas del sistema colinérgico y antagonistas del receptor NMDA.

El sistema colinérgico tiene un papel importante en la cognición por lo que su modulación es un blanco terapéutico. La principal estrategia para el tratamiento de la EA es incrementar los niveles de acetilcolina mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa, enzima que cataliza la degradación de la acetilcolina del espacio sináptico. Estos medicamentos son: la rivastigmina, donepezil y galantamina. Esta estrategia ha mostrado efectos significativos en pacientes con EA leve o moderada. Por otro lado, para el tratamiento de casos moderados a severos de la EA, se utiliza una estrategia diferente: antagonistas de los receptores de NMDA que tienen como blanco la disfunción glutamatérgica. La memantina es un antagonista no competitivo que es capaz de unirse al estado abierto del receptor de NMDA, normalizando el incremento de su actividad que se ha reportado en la patología, sin afectar la función del receptor en condiciones no patológicas (Fish et al., 2019).

2.11 Inmunoterapia de la EA

La inmunoterapia consiste en el uso de agentes inmunitarios que modulan, activan, intensifican o inhiben, la respuesta del sistema inmune con el fin de tratar una enfermedad. Debido a los diferentes beneficios que aporta, recientemente se ha postulado como un acercamiento prometedor para el tratamiento de la EA. La inmunoterapia de la EA se fundamenta en la hipótesis de la cascada amiloide, la cual tiene como blanco el péptido A β , permitiendo su eliminación y reducción de la acumulación de agregados protéicos. La investigación actual en la inmunoterapia de la EA se enfoca en dos estrategias: inmunización activa e inmunización pasiva. La última usa como agentes anticuerpos, o fragmentos de ellos, contra el péptido A β , con el fin de reducir los agregados y depósitos en el cerebro (Farooqui, 2017a). Se han postulado diversos mecanismos por los cuales estos anticuerpos pueden actuar, pero estos pueden variar dependiendo de la estrategia utilizada y la etapa de la EA en el que sean administrados. Estos mecanismos (Figura 19) pueden actuar individualmente o en combinación e incluyen: (1) prevenir la agregación del péptido A β secuestrando

monómeros, (2) promover su eliminación por fagocitosis mediada por el receptor de Fc de la microglía, (3) cambiar el gradiente de transporte del A β a través de la barrera hematoencefálica que resulta en un incremento en el flujo del cerebro a la sangre y (4) neutralizar el efecto sinaptotóxico al unirse a oligómeros de A β (Crehan & Lemere, 2016).

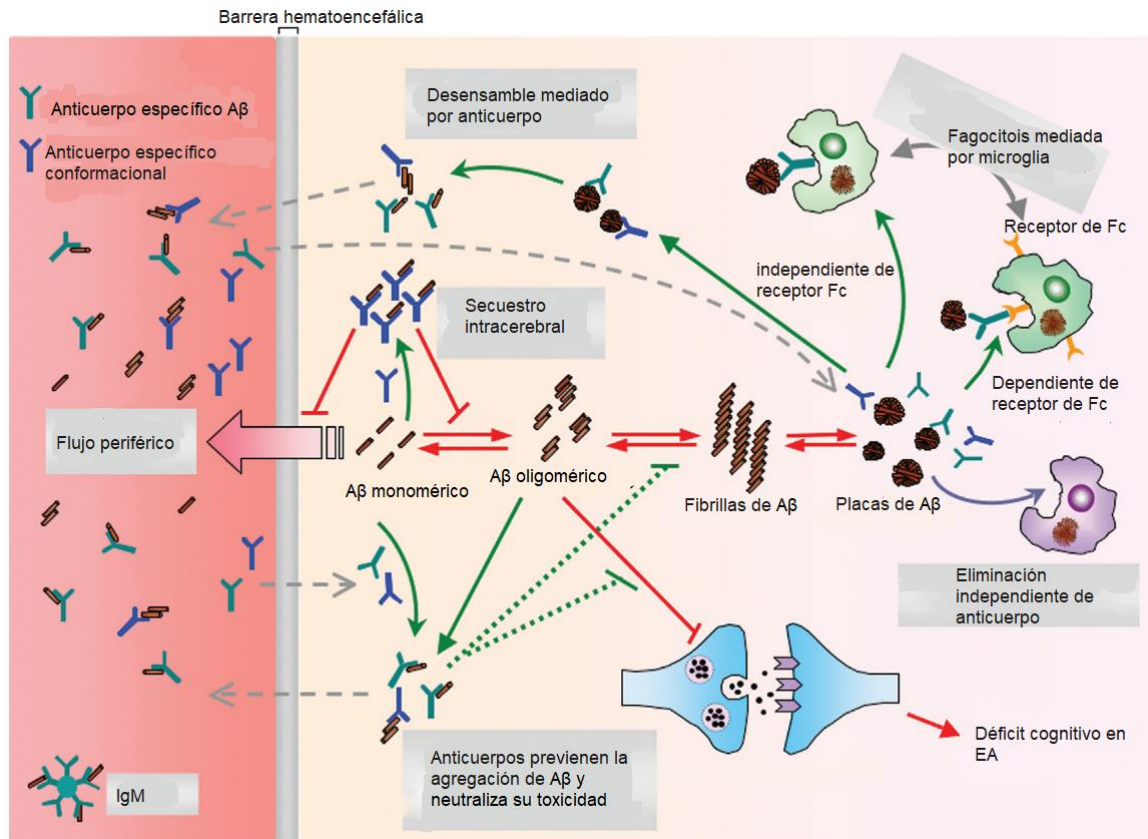


Figura 19. Esquema de posibles mecanismos de acción de la inmunoterapia anti-A β en modelos de la EA. Mecanismos que pueden eliminar placas de A β independientes o en conjunto incluyen: fagocitosis mediada por anticuerpo, fagocitosis independiente de anticuerpo, secuestro de A β en su estado monomérico, desensamble de A β para prevenir su agregación en placas, hidrólisis de A β mediada por IgM, flujo periférico, neutralización de la toxicidad de A β y prevención de su agregación. Modificado de (Crehan & Lemere, 2016).

2.11.1 Inmunoterapia Activa

La inmunización activa estimula al sistema inmune celular y humoral para producir anticuerpos y/o células protectoras y consiste en la administración de un antígeno en diferentes formatos con o sin un adyuvante. La inmunoterapia activa es un proceso atractivo porque resulta en la producción de anticuerpos de larga duración en una gran población, siendo rentable. Sin embargo, la producción de anticuerpos puede ser acompañada de una respuesta de células T que puede incrementar el riesgo de una

respuesta inmune perjudicial, especialmente si las células T reconocen a un antígeno propio (Farooqui, 2017a).

En el caso de la inmunoterapia en la EA, se ha desarrollado inmunización con el A β 1-42. Las pruebas realizadas en modelos murinos de la EA han demostrado una reducción de A β en el cerebro, además de la mejora en el deterioro cognitivo. Sin embargo, la inmunización con A β 1-42 puede causar respuestas autoinmunes adversas o respuestas perjudiciales mediadas por las células T autoinmunes. Un ejemplo es el de la vacuna AN1792, que usa al A β 1-42 como antígeno, junto con el adyuvante QS-21, cuyas pruebas clínicas de fase 2 fueron detenidas prematuramente debido a que el 8% de los pacientes desarrollaron meningoencefalitis y neuroinflamación (Crehan & Lemere, 2016).

2.11.2 Inmunoterapia Pasiva

La transferencia pasiva de anticuerpos anti-A β es una estrategia alternativa que puede ser tan efectiva como la inmunización activa. En esta terapia el riesgo de meningoencefalitis puede ser minimizado debido a que los anticuerpos son administrados sin adyuvante. Además, la inmunización pasiva puede ser detenida inmediatamente si se presentan efectos adversos y se pueden elegir como blancos epítomos específicos o agregados patogénicos sin perturbar las otras formas de la proteína de interés. Sin embargo, se requiere la producción de anticuerpos monoclonales humanizados caros y una administración repetida de estos. Con el paso del tiempo se pueden llegar a producir anti-anticuerpos. La inmunoterapia pasiva en la EA consiste en la administración de anticuerpos anti-A β . La especificidad de los anticuerpos que se han producido es variada, teniendo anticuerpos que pueden reconocer específicamente diferentes especies de A β , completa o truncada, o sus especies monoméricas, oligoméricas o placas. Una de las ventajas de esta estrategia es que no hay una respuesta adversa mediada por células T. En modelos murinos se ha demostrado que hay una reducción de las placas amiloides y una mejora en la cognición. Sin embargo, en pruebas clínicas se han observado efectos adversos en los pacientes o poca mejora en el deterioro cognitivo. Un ejemplo es el bapineuzumab (Tabla 6), que en pruebas clínicas de fase 3 en pacientes con

EA leve a moderada no lograron diferencias significativas en las evaluaciones cognitivas (Crehan & Lemere, 2016).

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales que alcanzaron la Fase III en pruebas clínicas

Nombre	Tipo de anticuerpo	Compañía	Epítipo de A β	Etapa clínica
Bapineuzumab	Monoclonal humanizado IgG1	Pfizer/Janssen	N-terminal	Descontinuado
Solanezumab	Monoclonal humanizado IgG1	Eli Lilly	Dominio central (monómeros)	Fase III
Ganterezumab	Monoclonal humanizado IgG1	Hoffman-La Roche	N-terminal y dominio central (agregados)	Fase III
Crenezumab	Monoclonal humanizado IgG4	Genentech	Dominio central (oligómeros y fibrillas)	Fase III
Ponezumab	Monoclonal humanizado IgG2	Pfizer	C-terminal (monómeros plasmáticos)	Descontinuado
BAN2401	Monoclonal humanizado IgG1	BioArtic/Eisai	E22G mutación ártica (protofibrillas)	Descontinuado
Aducanumab	Monoclonal humano IgG1	Biogen Idec	N-terminal y dominio central (agregados)	Fase III

Modificado de (Montoliu-Gaya & Villegas, 2018).

2.12 Modelos murinos transgénicos con patología tipo EA y el modelo 3xTg-AD

La producción de diferentes modelos murinos para el estudio de la EA se encuentra fundamentada en el trasfondo genético de la EAFIP, cuyas mutaciones autosómicas en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, dan origen a una sobreproducción de A β . Estos modelos son mejor vistos como una herramienta minimalista para entender los efectos o funciones de los genes/proteínas que pueden estar implicados en la EA, y para identificar estrategias que puedan bloquear los efectos patológicos; sin embargo, ningún modelo es considerado el mejor, ya que ninguno demuestra todas

las manifestaciones clínicas y patológicas de la EA en conjunto. El modelo ideal de EA debe incluir déficit cognitivo y conductual, placas amiloides y NFTs, gliosis, pérdida sináptica, axonopatía, pérdida neuronal y neurodegeneración. Los diferentes modelos desarrollan estos fenotipos a diferentes niveles y combinaciones (Crehan & Lemere, 2016; Hall & Roberson, 2012).

Varios grupos han generado ratones transgénicos que sobre-expresan APP con mutaciones de EA familiar usando varios promotores, como factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF- β), proteína priónica (PrP) y Thy1. La construcción de APP difiere entre las líneas, incluyendo APP695 y APP770; algunos tienen más de una mutación en el transgén, y la más usada es la mutación Swedish. Estos ratones exhiben depósitos extracelulares de A β en el cerebro junto con déficit cognitivo. Sin embargo, no son capaces de reproducir las NFT ni la pérdida neuronal.

Se han realizado otros esfuerzos en los que se combinan estos transgénicos con otros que tienen mutaciones en el gen de PS1. Los transgénicos que sobre-expresan PS1 o expresan el gen mutado PSEN1, no desarrollan la patología de A β , pero la cruce de estos ratones con ratones transgénicos APP-Tg da como resultado cepas con mayor producción de A β patogénico en el cerebro y resulta en una aceleración de la patología y deterioro cognitivo. Para poder replicar la patología de tau, se realizaron cruces del ratón transgénico de tau con el ratón transgénico de APP, incrementando la patología de tau en el sistema límbico y la corteza olfatoria sin afectar la patología de A β . El modelo murino generado fue un triple transgénico, 3xTg-AD, el cual sobre-expresa APP Swedish y Tau_{P301L} en un knock-in PS1_{M146V}. Este ratón exhibe neuropatología similar al de los pacientes con EA, incluyendo la formación de placas A β y neurofibrillas, junto con gliosis, daño sináptico y déficit de memoria (Hall & Roberson, 2012; Hiroki et al., 2017).

3. Justificación

Debido a que la EA es una patología común que afecta a un sector considerable de la población mayor a 60 años, se requiere que continúen los esfuerzos en generar potenciales agentes terapéuticos con el fin de prevenir o detener el desarrollo de la enfermedad. Un acercamiento para lograr tal objetivo es mediante la inmunoterapia pasiva, generando anticuerpos capaces de reconocer especies patológicas del A β , incluyendo las especies piroglutamadas (A β pE3-42 y A β pE11-42) que forman oligómeros altamente tóxicos. Estos anticuerpos pueden ayudar a eliminar y neutralizar los efectos neurotóxicos de los agregados amiloides

Previamente en nuestro grupo de investigación se generó un AcMo 4D5 anti-A β pE11-42. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de AcMo 4D5 para su potencial uso en la inmunoterapia y/o inmunodiagnóstico de la EA.

4. Objetivo General

Caracterizar el anticuerpo monoclonal 4D5 anti-A β pE11-42

5. Objetivos particulares

- Determinar la especificidad del AcMo 4D5
- Realizar el mapeo de epítomos del AcMo 4D5
- Determinar los oligómeros reconocidos por el AcMo 4D5
- Determinar la capacidad de reconocimiento del AcMo 4D5 a agregados amiloides en el cerebro de ratón transgénico 3xTg-AD

6. Metodología

6.1 Producción del AcMo 4D5

El AcMo 4D5 fue producido previamente en el laboratorio al inmunizar, vía subcutánea, a tres ratones BALB/c con 20 µg de péptido AβpE11-42 emulsionado con Adyuvante Completo de Freund. Se repitió la inmunización a las 2, 4 y 6 semanas en Adyuvante Incompleto de Freund. Al ratón que presentó el título más alto de anticuerpos, determinado por ELISA, se le dieron refuerzos en los días 4 y 3 antes de la fusión vía intraperitoneal e intravenosa respectivamente, con 20 µg del péptido en solución salina isotónica. El día de la fusión, este ratón fue sacrificado, el bazo fue disgregado y los esplenocitos obtenidos se fusionaron con las células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC, Manassas, VA, USA) en presencia de PEG350. Esta suspensión se diluyó en medio selectivo (RPMI 1640 con Hipoxantina, Aminopterina, Timidina (HAT)) y se sembraron en 6 cajas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo. Después de dos semanas de cultivo, los sobrenadantes se probaron para la presencia de anticuerpos anti-AβpE11-42 por ELISA. Se seleccionaron las clonas positivas y se subclonaron por dilución limitante aquellas con las lecturas más altas. Se seleccionó la clona 4D5 y se caracterizó el isotipo del anticuerpo utilizando anticuerpos contra igGs de ratón (igG1, igG2a, igG2b, igG2c e igG3) obteniendo reactividad con anticuerpos anti-igG2c. Por último, se realizó la purificación del anticuerpo del sobrenadante con una columna de sefarosa A 4B (invitrogen) y se determinó la concentración de 0.4 mg/mL.

6.2 Ensayo de especificidad del AcMo 4D5 mediante ELISA

Se llevo a cabo realizando la sensibilización de una placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (Thermo Scientific) con 100 µL de una solución del péptido correspondiente (AβpE11-42, AβpE3-42 y Aβ1-42) a 5 µg/mL en amortiguador de carbonato pH 9.5, incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con 300 µL de PBS-Tween 0.2%. En seguida se bloqueó la placa con 200 µL de PBS/Tween 0.2%/Leche 2%

durante 1 h a 37°C. Se volvió a lavar la placa y se agregaron 100 µL del AcMo 4D5 diluido 1:500 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% dejando incubar durante 1 h a 37°C. Después del lavado, se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG2c acoplado a HRP (Invitrogen Rockford IL, USA), durante 1h a 37°C diluido 1:2500 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2%. Finalmente, después del lavado, se realizó el revelado del ensayo agregando 100 µL/pozo del sustrato ABTS (Life Tech, Friederick MD, USA) y se incubó durante 30 m a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm (Dynex Opsys MR™ Microplate Reader). Como control positivo se realizó el ensayo utilizando como anticuerpos primarios dos anticuerpos comerciales anti-Aβ Bam 90.1 y Bam 10 (ambos 1:1000) (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, USA).

6.3 Mapeo de epítomos del AcMo 4D5 mediante ELISA

Para el mapeo de epítomos, la sensibilización de la placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (Thermo Scientific) se realizó con 100 µL de solución de los fragmentos de Aβ1-42: Aβ1-16, Aβ11-25, Aβ11-42 y Aβ12-28 a 10 µg/mL en amortiguador de carbonato pH 9.5 y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con 300 µL de PBS-Tween 0.2% seguidos por el bloqueo de la placa con 200 µL de PBS/Tween 0.2%/Leche 2% durante 1 h a 37°C. La placa se lavó nuevamente y concluidos los lavados, se agregaron 100 µL del AcMo 4D5 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% a una dilución 1:500 diluido 1:500 y se incubó por a 37°C. Una vez terminada la incubación, se lavó la placa y se agregó el anticuerpo secundario, anti-igG2c acoplado a HRP, diluido 1:2500 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2%, y se incubó durante 1 h a 37°C. Concluida la incubación, se realizó el último ciclo de lavados y se agregó 100 µL/pozo de sustrato ABTS, se incubó durante 30 min a 37°C y se midió la absorbancia a 405 nm. Como control positivo se realizó el ensayo utilizando como anticuerpo primario Bam 90.1 y Bam 10 (ambos 1:1000).

6.4 Determinación del reconocimiento de oligómeros mediante Western Blot

Se realizó la electroforesis de 1 µg de los péptidos AβpE11-42, AβpE3-42 y Aβ1-42 en un gel de acrilamida al 15%. El gel fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y posteriormente se dejó incubando toda la noche a 4°C en agitación con 20 mL de la solución de bloqueo PBS/Tween 0.2%/Leche 2%. Terminada la incubación, se lavó la membrana y se agregaron 5 mL del AcMo 4D5 diluido 1:1000 dejando incubarse en agitación a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavó la membrana y se agregó una solución del anticuerpo secundario anti-IgG2c acoplado a HRP diluido 1:5000 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% y se incubó en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalizando, se lavó la membrana y se reveló mediante quimioluminiscencia SuperSignal WestDura Extended Duration Substrate (Thermo Sci, Rockford IL, USA). Como control positivo se utilizó el anticuerpo primario 4G8, un anticuerpo anti-Aβ comercial (Bio Legend, San Diego CA, USA) en una dilución 1:5000.

6.5 Reconocimiento de agregados amiloides en tejido cerebral por inmunohistoquímica

Para el ensayo de reconocimiento de placas amiloides se ocuparon cortes coronales de ratones hembras 3xTg-AD de 20 meses de edad (173 y 178) y controles C57BL/6 de 6 meses. Los cortes coronales de 30 µm (1.4 mm de bregma) se encontraban previamente fijados en paraformaldehído. La exposición de epítomos se realizó con una incubación de 3 min a temperatura ambiente con ácido fórmico 80%, seguido de una incubación con amortiguador de citrato pH 6 a 70°C durante 30 min. Los tejidos se lavaron con TBS, después se llevó a cabo la permeabilización durante 15 min con TBS/Tritón 0.1% y el bloqueo con TBS/Tritón 0.1%/BSA 2% durante 30 min. Posteriormente se agregó el AcMo 4D5 diluido 1:50, 1:100 o 1:200 en TBS/Tritón 0.1%/suero de cabra 5% y se incubó toda la noche a 4°C. Los tejidos se lavaron y se agregó el anticuerpo secundario anti-igG2c acoplado a HRP en una dilución 1:500 en TBS/Tritón 0.1%/suero de cabra 5% y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Terminando la incubación, se lavaron los tejidos y se agregó la solución reveladora de

diaminobencidina (DAB) PBS/H₂O₂ 0.15%/DAB 0.05%, dejando reaccionar durante 15 minutos, y se detuvo la reacción con TBS/Tritón 0.1%. Los tejidos se lavaron y se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Como control positivo se utilizó el anticuerpo primario 4G8 en una dilución 1:500.

7. Resultados

7.1 Ensayo de especificidad del AcMo 4D5

Para determinar si el anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer específicamente A β pE11-42, se realizó un ELISA utilizando tres especies patológicas de A β (A β pE11-42, A β pE3-42, A β 1-42). En la figura 20 se observa que el AcMo 4D5 puede reconocer no solo a A β pE11-42 si no también a las otras dos especies patológicas A β pE3-42 y A β 1-42. Estos resultados nos indican que AcMo 4D5 tiene una reactividad cruzada con otras especies patológicas de A β , similar al anticuerpo comercial Bam 10/90.

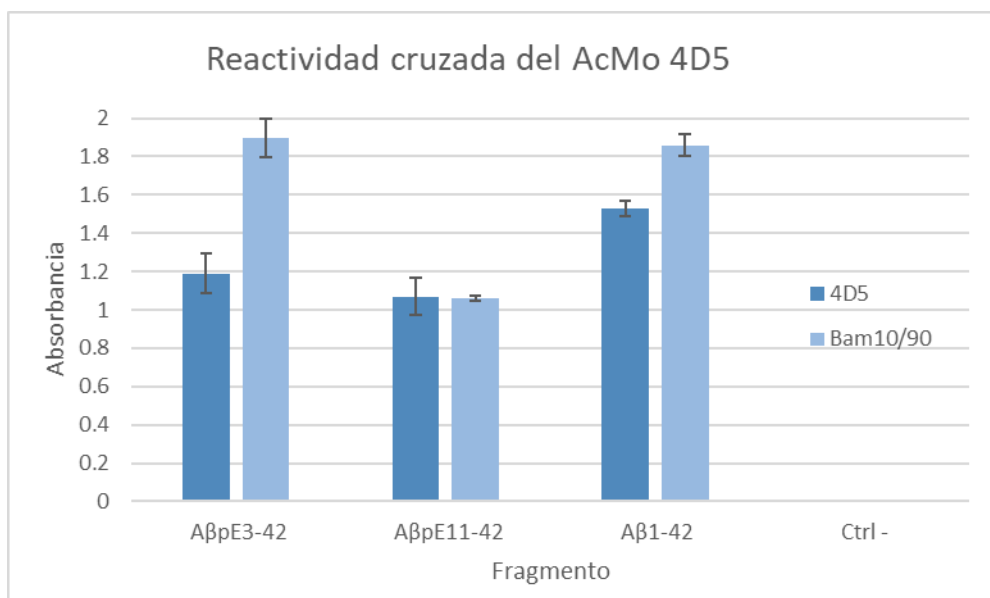


Figura 20. ELISA de especificidad del AcMo 4D5. El anticuerpo, además de reconocer a A β pE11-42, reconoce a A β pE3-42 y A β 1-42 indicando que 4D5 tiene reactividad cruzada con otras especies patológicas de A β

7.2 Mapeo de epítomos

Para identificar la región de A β 1-42 que el AcMo 4D5 es capaz de reconocer, se realizó un ELISA de fragmentos del péptido A β 1-42. Los fragmentos fueron: A β 1-16, que corresponde a la región amino terminal; A β 11-25 y A β 12-28, que corresponden a la región media y A β 11-42 que es la especie aminotruncada. En la figura 21 se observa que el AcMo 4D5 es capaz de reconocer la especie A β 11-42, además de los péptidos A β 11-25 y A β 12-28

que corresponden a la región media del péptido. Por otro lado, el AcMo 4D5 no es capaz de unirse a la especie A β 1-16, que corresponde al extremo amino terminal del péptido.

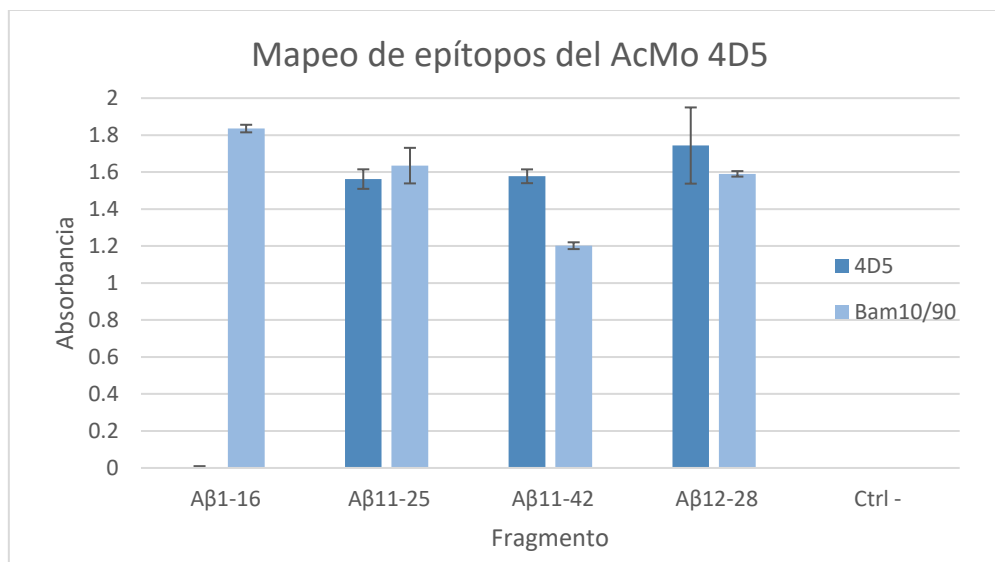


Figura 21. Mapeo de epítomos mediante ELISA. El AcMo 4D5 reconoce fragmentos correspondientes a la región central de A β 1-42 (fragmentos A β 11-25, A β 12-28) y a la especie amino truncada A β 11-42. Sin embargo, no reconoce los fragmentos correspondientes a ambos extremos, amino terminal (A β 1-16).

7.3 Reconocimiento de los oligómeros de especies patológicas de A β

Para evaluar la capacidad del AcMo 4D5 de unirse a los oligómeros que generan las diferentes especies de A β , se realizó un Western Blot de los péptidos A β pE11-42, A β pE3-42 y A β 1-42. En la figura 22 se observa que el AcMo 4D5 reconoce las especies monoméricas de los tres péptidos que se encuentran cercanos a 3.5 KDa. De la especie A β 1-42, el AcMo 4D5 reconoce diferentes oligómeros: trímeros, tetrámeros, pentámeros y oligómeros de mayor tamaño de entre 35 KDa y 100 KDa, de la especie A β pE3-42 reconoce las especies diméricas, tetraméricas y pentaméricas junto con oligómeros de entre 35 KDa y 50 KDa. Por último, del péptido A β pE11-42 reconoce los tetrámeros y pentámeros, además de oligómeros de entre 20 KDa y más de 160 KDa.

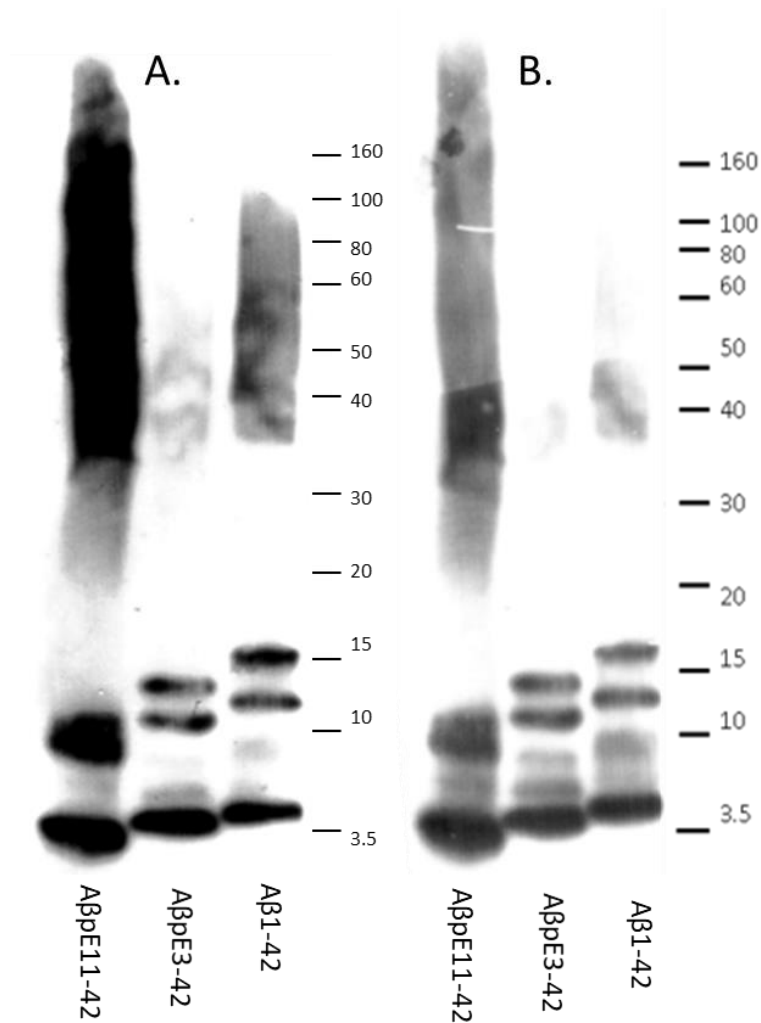


Figura 22 Western Blot de las especies patológicas del Aβ. A. El AcMo 4D5 es capaz de unirse a los monómeros y diferentes oligómeros de especies patológicas del Aβ. Los oligómeros reconocidos de la especie AβpE11-42 son de bajo peso molecular de entre 5 KDa y 12 KDa y de alto peso molecular de entre 20 KDa y más de 160 KDa. Además, reconoce oligómeros de AβpE3-42 y Aβ1-42 de entre 3.5 y 15 KDa junto con oligómeros de alto peso molecular de entre 35 KDa y 50 KDa para AβpE3-42 y de entre 35 KDa y 100 KDa para Aβ1-42. B. El anticuerpo comercial 4G8 reconoce los monómeros y oligómeros de bajo peso molecular (entre 3.5 KDa y 20 KDa) de las 3 especies patológicas y oligómeros de alto peso molecular de entre 20 KDa y más de 160 KDa para AβpE11-42 y de entre 35 KDa y 50 KDa para Aβ1-42.

7.4 Reconocimiento de placas amiloides en el cerebro de ratón 3xTg-AD

Para determinar si el AcMo 4D5 reconoce agregados amiloides en el cerebro de ratones transgénicos, se realizó una inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo en diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200. En la figura 23 se observan agregados amiloides marcados con el anticuerpo 4G8 (1:500), control positivo, encontrando placas en la región hipocámpal (subículo, CA1 y CA2), en la amígdala y en la corteza entorrinal. En cuanto al AcMo 4D5, se logra visualizar placas a lo largo del hipocampo: principalmente en el subículo y CA1 (Figura 24). Además se observan placas amiloides en CA2 y

CA3 (Figura 25). También se encontraron agregados amiloides en la región de la amígdala y en la corteza entorrinal (Figura 26).

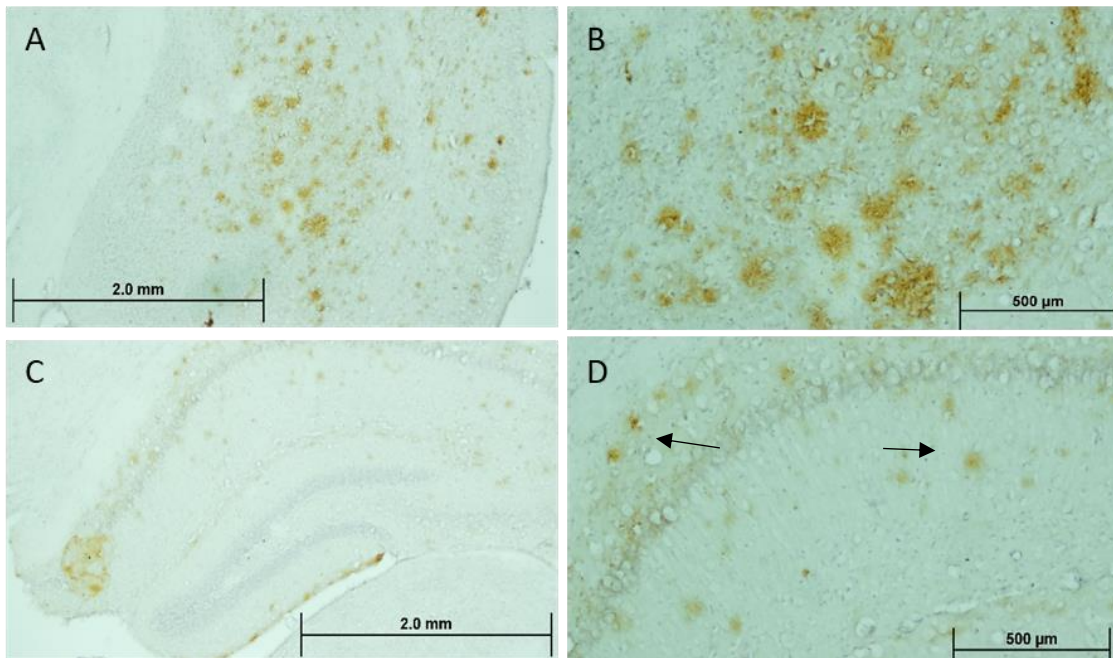


Figura 23. Inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebros de ratón 3xTg-AD hembra de 20 meses de edad (173) con anticuerpo 4G8 (1:500) usado como control positivo. (A y B) Agregados amiloides en la amígdala y corteza entorrinal. (C y D) Agregados amiloides en la región hipocampal, específicamente en el subículo, CA1 Y CA2. Flechas marcan ejemplos de marcas positivas.

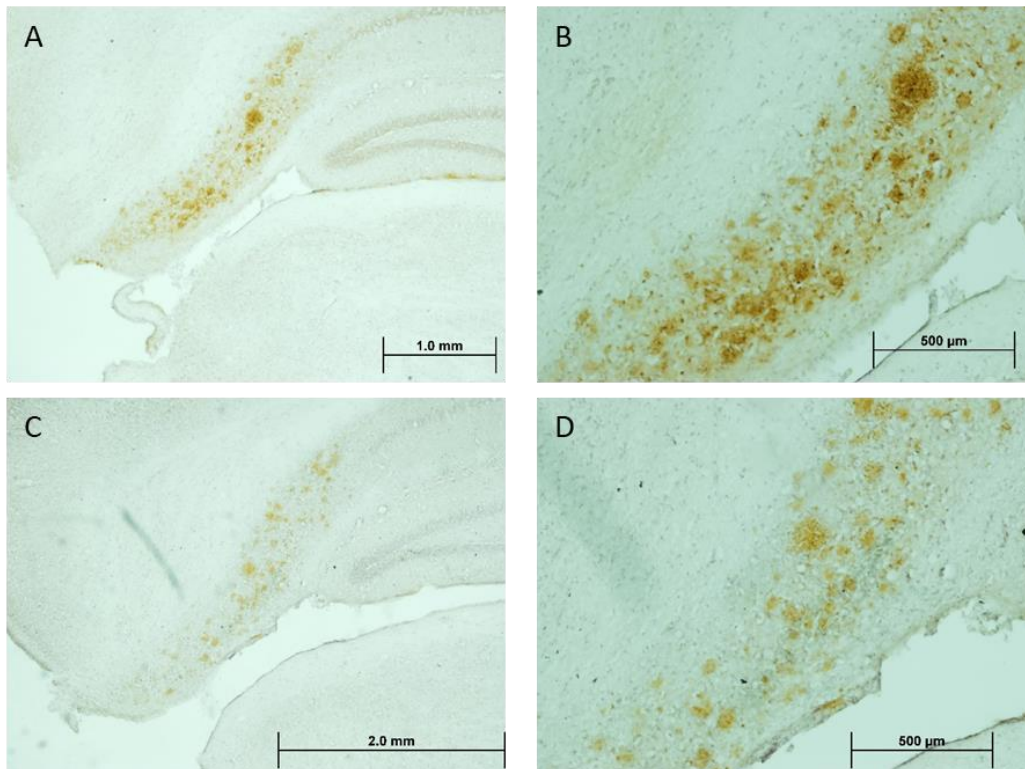


Figura 24. Inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebros de ratón 3xTg-AD hembra de 20 meses de edad (173) con AcMo 4D5 (1:100 y 1:200). (A y B) Agregados amiloides en subículo y CA1 4D5 1:100. (C y D) Agregados en subículo 4D5 1:200.

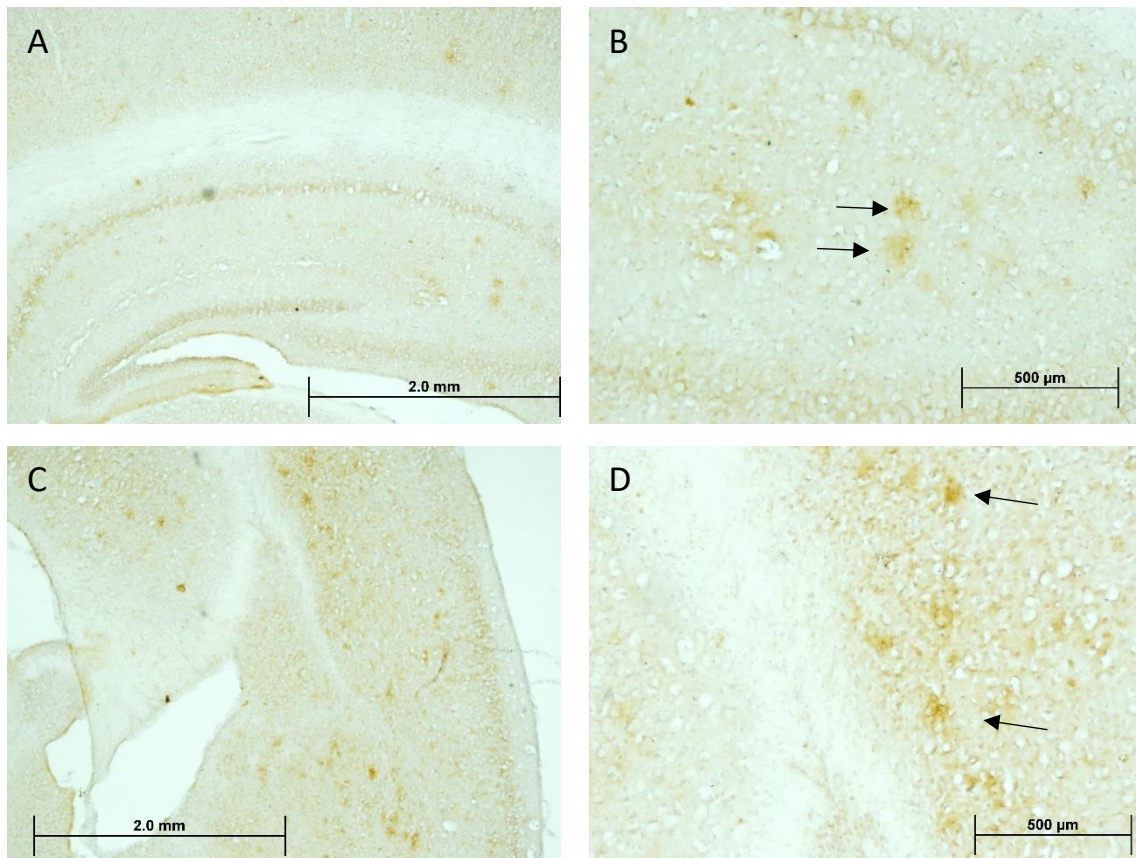


Figura 25. Inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebros ratón 3xTg-AD hembra de 20 meses de edad (173) con AcMo 4D5 (1:50). (A y B) Agregados amiloides en CA2 y CA3. (C y D) Agregados en amígdala y corteza entorrinal). Flechas marcan ejemplos de marcas positivas.

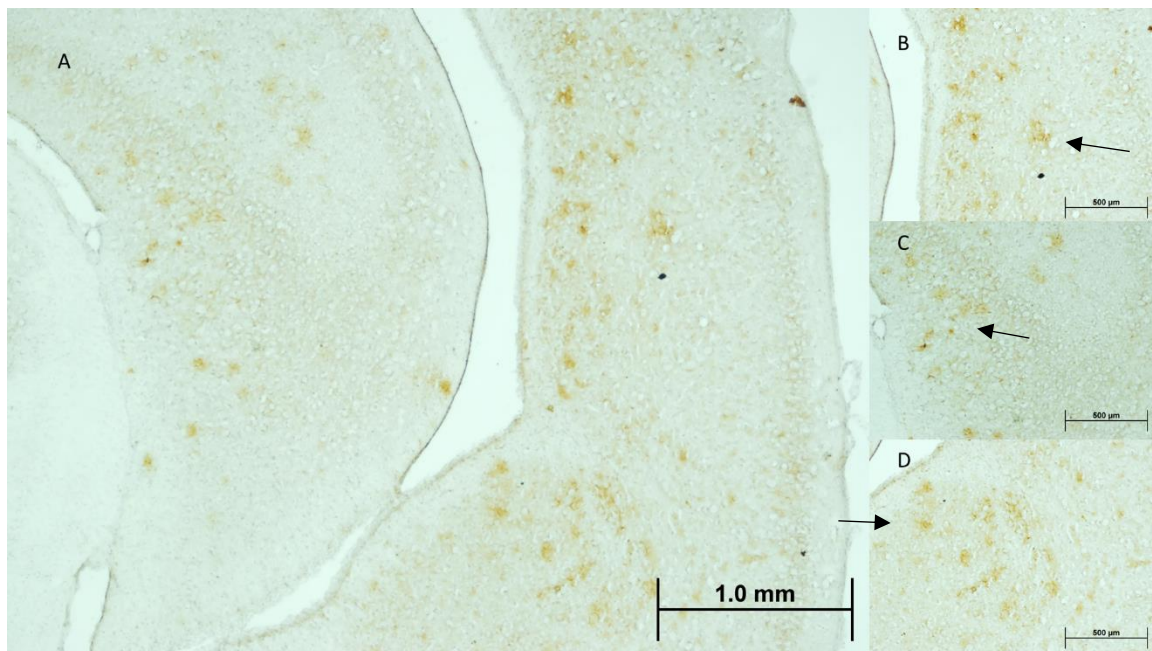


Figura 26. Inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebros de ratón 3xTg-AD hembra de 20 meses de edad (178) con AcMo 4D5 1:100. (A) Agregados amiloides en la región del hipocampo, amígdala y corteza entorrinal. Placas amiloides en la corteza entorrinal (B), Hipocampo CA3 (C) y amígdala (D). Flechas marcan ejemplos de marca positiva

8. Discusión

La EA es la enfermedad crónico-neurodegenerativa más prevalente en el mundo: de los 46.8 millones de casos de demencia estimados a nivel mundial por el Reporte Mundial de Alzheimer 2015, el 60% corresponden a la EA. Así, esta enfermedad impone una tremenda carga a la sociedad y economía a nivel mundial (Sengupta et al., 2016). De acuerdo a la Asociación de Alzheimer, la EA es la única enfermedad, de las 10 principales causas de muerte, que no tiene un tratamiento que pueda curar o incluso retrasar el progreso de la enfermedad. Por lo que se resalta la necesidad de generar tratamientos que sean lo suficientemente efectivos para controlar el progreso de la enfermedad (Brewer, 2018).

Dentro de las razones que han dificultado tener una terapia adecuada para la EA, es el hecho de que los fenómenos patológicos se desarrollan muchos años antes de la aparición de los síntomas, que indiquen que una persona padece EA, por lo que la necesidad de un diagnóstico temprano es fundamental para avanzar en la generación de un tratamiento eficiente para esta enfermedad (Fish et al., 2019).

Los esfuerzos fallidos en el tratamiento de la EA son consecuencia de la carencia de conocimiento que tenemos del papel de los fenómenos patológicos y su interrelación que originan la demencia, por lo que es necesario adaptar las estrategias a los nuevos conocimientos generados por la investigación de la EA.

La aplicación de anticuerpos anti-péptidos amiloides N-truncados/modificados es un acercamiento diseñado con base en las recientes investigaciones sobre la presencia y papel de las especies piroglutamadas en estadios tempranos de la patología, junto con su relevante mayor neurotoxicidad y propensión a agregarse.

En el presente trabajo se realizó la caracterización de la especificidad y el reconocimiento de diferentes fenómenos patológicos que se han descrito en la EA, para evaluar el desempeño del AcMo 4D5 como posible agente terapéutico y de diagnóstico.

El AcMo 4D5 no mostró especificidad en el reconocimiento de A β pE11-42, ya que es capaz de reconocer a otras especies patológicas A β pE3-42 y A β 1-42. La reactividad cruzada brinda la ventaja de reconocer las tres

principales especies de A β relevantes en la formación de las placas seniles, siendo la especie completa A β 1-42 la más abundante en las placas, además de que las especies A β pE3-42 y A β pE11-42 se han descrito como especies más tóxicas ya que forman parte del efecto semilla que incrementa la formación de agregados amiloides (Dunys et al., 2018; Sullivan et al., 2011). Así, un solo inmunoterapéutico (AcMo 4D5 humanizado, por ejemplo) puede ser dirigido a tres blancos importantes.

Para poder elucidar el epítipo que reconoce el AcMo 4D5, se realizó un mapeo con diversos fragmentos de A β 1-42. Los resultados nos dan indicios que la región reconocida es la zona central de A β 1-42, correspondiente a A β 11-28. La región media del péptido A β se caracteriza por ser de carácter hidrofóbica y se ha descrito como una región clave en la generación de la estructura cross β , la cual permite la generación de oligómeros y estructuras de mayor tamaño de carácter tóxico (Aleksis et al., 2017). Esta característica de AcMo 4D5 también es importante, sugiriendo que el anticuerpo podría intervenir con la agregación de los péptidos A β .

Mediante Western Blot, debido a que se realiza una separación con base en el tamaño de los péptidos y los agregados que forman, es posible identificar los oligómeros que el AcMo 4D5 reconoce. El AcMo 4D5 es capaz de reconocer diferentes oligómeros de bajo peso molecular, desde la especie monomérica hasta los pentámeros, dependiendo de la especie patológica. Además, reconoce oligómeros de alto peso molecular, desde especies de 20 KDa hasta más de 160KDa, para A β pE11-42, de 35 KDa hasta 50 KDa para A β pE3-42 y por último de 35 KDa hasta 100 KDa para A β 1-42. Los oligómeros solubles son las estructuras que, en investigaciones recientes, han identificado como responsables del efecto neurotóxico de los péptidos A β , por lo que es fundamental su reconocimiento por el anticuerpo para su eliminación y neutralización (Aleksis et al., 2017; Sengupta et al., 2016).

Por último, se realizó la prueba de reconocimiento de agregados amiloides en tejido cerebral del modelo murino 3xTg-AD. El modelo murino 3xTg-AD es uno de los diferentes modelos que se han desarrollado para permitir la investigación de los mecanismos patológicos de la EA, así como el desarrollo de agentes terapéuticos novedosos. Este modelo se caracteriza por ser un triple transgénico que desarrolla fenómenos patológicos característicos de la EA como: la hiperfosforilación de tau, agregados amiloides, déficit cognitivo

y neuroinflamación. El tejido con el que se trabajó fueran cortes coronales de cerebros de hembras (30 μm) de 20 meses de edad, en donde previamente se comprobó la presencia de agregados amiloides con el anticuerpo comercial 4G8. Se demostró la capacidad del AcMo 4D5 de reconocer agregados amiloides presentes en las estructuras principales en donde se han reportado estas placas. Las marcas más fuertes se encontraron en el subículo y CA1, estructuras que son partes de la región hipocampal. También se encontraron agregados en CA2, CA3, amígdala y corteza entorrinal. La distribución de las placas varía ya que los depósitos no se forman de manera homogénea en las estructuras. Además, también hay una variación de la profundidad de los cortes, ya que en este modelo se ha descrito que en cortes más rostrales hay una menor cantidad de agregados en comparación con otros más caudales (Belfiore et al., 2019). El reconocimiento de agregados nativos es importante.

En resumen, en este trabajo se comprueba que el AcMo 4D5 anti-A β pE11-42, tiene potencial para el tratamiento y/o diagnóstico de la EA, por lo que se debe continuar la investigación de este anticuerpo monoclonal.

9. Conclusiones

- El AcMo 4D5 reconoce a las tres especies patológicas principales A β 1-42, A β pE3-42 y A β pE11-42.
- El epítipo del AcMo 4D5 se encuentra en la región central del péptido A β 1-42.
- El AcMo 4D5 reconoce los oligómeros de las especies A β 1-42 y A β pE3-42.
- El AcMo 4D5 es capaz de unirse a agregados amiloides en tejido cerebral del modelo murino 3xTg-AD.

10. Perspectivas

- El AcMo 4D5 podría ser evaluado in vivo después de su modificación con un fluoróforo con el fin de determinar si es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a agregados amiloides en el cerebro de ratón 3xTg-AD. Estos resultados pueden sugerir el futuro uso del AcMo 4D5 como inmunoterapéutico y/o inmunodiagnóstico por imagenología.
- El AcMo 4D5 podría ser evaluado en ensayos de ELISA para el desarrollo de pruebas diagnósticas.

11.Referencias.

- Aleksis, R., Oleskovs, F., Jaudzems, K., Pahnke, J., & Biverstal, H. (2017). Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*, *140*, 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.011>
- Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *15*(3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Medical Clinics of North America*, *103*(2), 263–293. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Neuropeptides Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer ' s disease. *YNPEP*, *52*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/accel.12873>
- Brewer, G. J. (2018). Treatment of Alzheimer ' s Disease. In *Environmental Causes and Prevention Measures for Alzheimer's Disease* (pp. 119–126). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811162-8.00013-5>
- Calderon-Garcidueñas, A. L., & Duyckaerts, C. (2018). Alzheimer disease. In *Neuropathology* (Vol. 145, pp. 325–337). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7>
- Carmona, S., Hardy, J., & Guerreiro, R. (2018). The genetic landscape of Alzheimer disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 148, pp. 395–408). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0>
- Crehan, H., & Lemere, C. A. (2016). Anti-Amyloid- β Immunotherapy for Alzheimer's Disease. In *Developing Therapeutics for Alzheimer's Disease* (pp. 193–226). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802173-6/00007-1>
- DaSilva, K. A., Shaw, J. E., & McLaurin, J. (2010). Amyloid- β fibrillogenesis:

- Structural insight and therapeutic intervention. *Experimental Neurology*, 223(2), 311–321.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.032>
- DeSimone, C. V., Graff-Radford, J., El-Harasis, M. A., Rabinstein, A. A., Asirvatham, S. J., & Holmes, D. R. (2017). Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.724>
- Dunys, J., Valverde, A., & Checler, F. (2018). Are N- and C-terminally truncated A β species key pathological triggers in Alzheimer ' s disease ?, 293, 15419–15428.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003999>
- Farooqui, A. A. (2017a). Immunotherapy for the Treatment of Alzheimer's Disease. In *Neurochemical Aspects of Alzheimer's Disease* (pp. 331–359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809937-7.00009-4>
- Farooqui, A. A. (2017b). Neurochemical aspects of Alzheimer's disease : risk factors, pathogenesis, biomarkers, and potential treatment strategies. Elsevier Academic Press. Retrieved from
<https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128099377#book-info>
- Farooqui, A. A. (2017c). Neurochemical Aspects of β -Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease. In *Neurochemical Aspects of Alzheimer's Disease* (pp. 1–46). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809937-7.00001-X>
- Fish, P. V, Steadman, D., Bayle, E. D., & Whiting, P. (2019). New approaches for the treatment of Alzheimer ' s disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(2), 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>
- Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *The American Journal of Medicine*, 131(10), 1161–1169.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>
- Garre Olmo, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Revista de Neurología*, 66(11), 377.
<https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>
- Greenberg, S. M. (2004). Cerebral Amyloid Angiopathy. In *Stroke* (Fourth Edi, pp. 693–705). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B0-443->

06600-0/50039-0

- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. A. (2010). Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(12), 1915–1918.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.015>
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.017>
- Hiroki, S., Per, N., Shoko, H., Kenichi, N., Takashi, S., Bart De, S., ... Takaomi C, S. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *The EMBO Journal*, 36(17), 2473–2487.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201797397>
- Kim, D. H., Yeo, S. H., Park, J.-M., Choi, J. Y., Lee, T.-H., Park, S. Y., ... Cha, H.-J. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene*, 545(2), 185–193.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.031>
- Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019a). Alzheimer's Disease and Dementia. In *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* (pp. 25–82). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811069-0.00002-1>
- Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019b). An Introduction to Neurodegeneration. In *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* (pp. 1–23). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811069-0.00001-x>
- Montoliu-Gaya, L., & Villegas, S. (2018). Immunotherapy for neurodegenerative diseases: the Alzheimer's disease paradigm. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 19, 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.coche.2017.12.006>
- Pitt, J. (2019). Biomarkers of Alzheimer's Disease. In *Biomarkers in Toxicology* (pp. 885–894). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00049-9>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's and Dementia*, 9(1), 63–75.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic

- criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Rensink, A. A. M., De Waal, R. M. W., Kremer, B., & Verbeek, M. M. (2003). Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. *Brain Research Reviews*, *43*(2), 207–223. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.08.001>
- Sengupta, U., Nilson, A. N., & Kaye, R. (2016). The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*, *6*, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), a006189–a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sullivan, C. P., Berg, E. A., Elliott-Bryant, R., Fishman, J. B., McKee, A. C., Morin, P. J., ... Fine, R. E. (2011). Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neuroscience Letters*, *505*(2), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.071>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurología (English Edition)*, *33*(4), 244–253. <https://doi.org/10.1016/J.NRLENG.2015.08.009>
- Waldemar, G., & Burns, A. (2017). *Alzheimer's Disease (Oxford Neurology Library)*. (G. Waldemar & A. Burns, Eds.) (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780198779803.001.0001>
- Yamada, M., & Naiki, H. (2012). *Cerebral Amyloid Angiopathy. Molecular Biology of Neurodegenerative Diseases* (1st ed., Vol. 107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00006-0>