



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL: 4G11, ANTI BETA AMILOIDE
PYROGLUTAMATO 11-42**

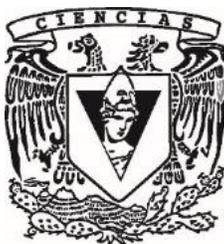
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NADIA XIMENA CORDERO ESPINO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GOAR GEVORGYAN M**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

Mis padres Irma y Jose Luis, por su apoyo incondicional. Por su amor y confianza. Son el pilar de mis proyectos, la fuerza extra. Les agradezco infinitamente todo. Por la vida maravillosa que me han dado, por dejarme ser y hacer lo que me apasiona.

A mi hermano Luis, por su cariño y su compañía. Por sus enseñanzas. Seguimos aprendiendo ambos.

A Dany por ser mi alegría.

A mi abuelita Carmen, por todo su cariño y cuidados. Por sus apoyo incondicional y sus buenos consejos. Te quiero.

A mi Solin. Por su compañía en todo momento.

A mis tios y familia por su apoyo en todo momento. Estando en las buenas y en las difíciles. Gracias de corazón. A mis tías Bertha y Esperanza, porque siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A los colegas. Karla, quien fue una amiga desde el primer día hasta el último de la carrera y lo seguirá siendo. A Jenny, mi amiga y confidente. Las quiero demasiado.

A PARADOX, porque nunca faltaron las risas y las pláticas de madrugada. Amigas de toda la vida, familia. Kary, Chely, Ana, Liz, Mary, muchas gracias.

A mis profesores, por sus enseñanzas.

A la Dra. Gohar por su confianza y guía en este proyecto.

Al Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo, por su asesoramiento técnico durante la realización del proyecto.

Al programa UNAM-PAPIIT por el financiamiento (proyectos #203319 y #201116).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Enfermedad de Alzheimer	4
1.1.1 Diagnóstico	4
1.1.2 Enfermedad de Alzheimer Familiar y Esporádica	5
1.1.2.1 Enfermedad de Alzheimer Familiar	6
1.1.2.2 Enfermedad de Alzheimer Esporádica	6
1.1.3 Factores de riesgo	6
1.1.3.1 Enfermedades cardiovasculares	7
1.1.3.2 Alteración de la presión arterial	7
1.1.3.3 Diabetes tipo 2	7
1.2 Patología de la Enfermedad de Alzheimer	8
1.2.1 Marañas neurofibrilares	8
1.2.2 Placas amiloides	9
1.3 Neuroinflamación	10
1.4 Hipótesis de la cascada amiloide	11
1.5 APP: Procesamiento proteolítico y generación de A β	13
1.6 Péptido β -aMILOIDE (A β)	14
1.6.1 Agregación y toxicidad de A β	15
1.7 Especies de A β truncadas	16
1.8 A β pyroGlu 11-42	18
1.9 Tratamientos contra la Enfermedad de Alzheimer	20
1.9.1 Tratamientos sintomáticos	20
1.9.2 Fármacos anti-inflamatorios	20
1.9.3 Inhibición de la glutaminil ciclasa (QC)	21
1.9.4 Reducción de producción de A β	22
1.9.5 Terapias dirigidas a tau	22
1.10 Inmunoterapia	23
1.10.1 Inmunoterapia activa	23
1.10.2 Inmunoterapia activa como estrategia contra la Enfermedad de Alzheimer	23
1.10.3 AN-1792	24
1.10.4 CAD106	24
1.10.5 AFFITOPE AD02	24
1.10.6 Inmunoterapia pasiva	25
1.10.7 Inmunoterapia pasiva como estrategia contra la Enfermedad de Alzheimer	25

1.10.8	Bapineuzumab	26
1.10.9	BAN2401	26
1.10.10	IGIV	26
1.10.11	Solanezumab	27
1.10.12	Gantenerumab	27
1.10.13	Crenezumab	27
1.10.14	Aducanumab	28
1.11	Mecanismos de acción de inmunoterapia anti-A β	31
2.	JUSTIFICACIÓN	33
3.	OBJETIVO GENERAL	35
3.1	Objetivos particulares	35
4.	MATERIALES Y METODOS	36
4.1	Identificación del isotipo del AcM 4G11 (anti-A β pyroGlu 11-42)	36
4.2	Evaluación de la reactividad cruzada del AcM 4G11 con distintas especies del péptido A β	37
4.3	Identificación de la región del péptido A β pyroGlu 11-42 a la cual se une el AcM 4G11	37
4.4	Determinación del tipo de agregados a los que se une el AcM 4G11	38
4.5	Purificación del anticuerpo 4G11	38
4.6	Titulación del anticuerpo monoclonal 4G11 purificado	39
4.7	Tinción de cortes de tejido de cerebro humano con 4G11	39
4.8	Análisis estadístico	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	Identificación de la Subclase del AcM 4G11	42
5.2	Evaluación de la especificidad del AcM 4G11	43
5.3	Identificación del epítipo reconocido por 4G11 a partir de un mapeo de epítipos	44
5.4	Análisis por Western blot para evaluar la especificidad y los agregados del péptido A β pyroGlu 11-42 que reconoce el anticuerpo 4G11	45
5.5	Purificación el anticuerpo 4G11	47
5.6	Titulación del anticuerpo monoclonal 4G11 purificado	48
5.7	Evaluación de la capacidad de 4G11 para reconocer a A β pyroGlu 11-42 en cortes de tejido de cerebro humano de pacientes con EA	49
6.	DISCUSIÓN	51
7.	CONCLUSIONES	56
8.	REFERENCIAS	57

GLOSARIO

Abreviatura	Significado
AAC	Angiopatía amiloide cerebral
APOE4	Apolipoproteína 4
APP	Proteína precursora amiloide
ARIA	Anormalidades de imagen relacionadas con el amiloide (Amyloid-related imaging abnormalities)
A β	Péptido beta amiloide
A β 1-42	Péptido beta amiloide 1-42
A β pE 3-42	Péptido beta amiloide piruglutamado en la posición 3
A β pE 11-42	Péptido beta amiloide piruglutamado en la posición 11
BACE	Enzima que corta en el sitio beta de APP o beta secretasa
BHE	Barrera hematoencefálica
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
ELISA	Ensayo de inmuno adsorción ligado a enzimas
FCT	Fragmentos de carboxilo terminal
IgG	Inmunoglobulina G
IGIV	Inmunoglobulina intravenosa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
N-truncadas	Especies de A β truncadas en el extremo N-terminal
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
QC	Glutaminil ciclasa
RAGE	Receptor para productos finales de gliación avanzada
RTG	Retículo trans-Golgi
SNC	Sistema nerviosos central

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo el cual afecta aproximadamente al 6% de las personas mayores a 60 años de edad (Mroczko et al, 2018). Sus principales síntomas clínicos incluyen deterioro en la cognición y la memoria acompañado de diversos síntomas psicológicos, los cuales limitan severamente las actividades sociales de los pacientes.

La enfermedad tiene una progresión promedio de alrededor de 7 a 10 años, y se hipotetiza que las alteraciones en el cerebro comienzan de 10 a 20 años antes de que aparezca cualquier manifestación clínica. La muerte neuronal en la EA comienza en la corteza entorrinal, una región que está conectada con el hipocampo, que desempeña un papel importante en el aprendizaje y participa en procesos de memoria a corto y largo plazo. La progresión de la demencia dura de dos a cinco años y se evidencia por pérdida de memoria, disfunción del lenguaje, cambios en la personalidad, entre otros. En la etapa moderada, el daño se ha extendido a las regiones de la corteza cerebral que controlan el lenguaje, el razonamiento, el procesamiento sensorial y el conocimiento consciente (Serrano-Pozo et al, 2011; Barrera-Ocampo, et al, 2016).

La característica post-mortem de la EA es la presencia de dos marcadores patológicos: i) placas amiloides extracelulares compuestas por un centro del péptido β - amiloide 1-42 ($A\beta$ 1-42) y variantes del mismo, rodeadas de neuritas distróficas y ii) marañas neurofibrilares intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada en amplias regiones cerebrales (Barrera-Ocampo et al, 2016).

1.1.1 Diagnóstico

La demencia se diagnostica por un inicio gradual de síntomas cognitivos o conductuales que interfieren con la capacidad de funcionar en el trabajo o durante las actividades diarias y que no son explicadas por el delirio o el trastorno psiquiátrico. Esto puede hacerse con ayuda de exámenes como la evaluación cognitiva de Montreal (MoCA) o el mini examen del estado mental (MMSE). Un diagnóstico de demencia debe incluir un deterioro de al menos dos de los siguientes factores: capacidad alterada para recordar información nueva, razonamiento alterado, capacidades visuoespaciales alteradas, función del lenguaje alterada o cambios en la personalidad o en el comportamiento (Mc Khann et al, 2011).

Los criterios para un diagnóstico de EA han demostrado una sensibilidad del 81% y una especificidad del 70% (Knopman et al, 2005) cuando se confirman con estudios neuropatológicos postmortem. Desafortunadamente, el punto en el que la EA puede diferenciarse exitosamente de otras enfermedades que causan demencia a menudo ocurre al final del proceso de la enfermedad (Hane et al, 2017). De acuerdo con los

criterios diagnósticos, la EA se divide en tres periodos: demencia preclínica, EA leve y EA.

La fase preclínica comienza con una amiloidosis cerebral asintomática. Inicialmente, el A β monomérico comienza a agregarse y comienza a acumularse en las neuronas, sin embargo, estos cambios aún no son detectables con las técnicas actuales. Durante la segunda etapa de la fase preclínica, ciertos biomarcadores del líquido cefalorraquídeo (LCR), como el aumento de tau fosforilada en el LCR, el hipometabolismo de glucosa y el adelgazamiento cortical se vuelven detectables (Sperling et al, 2011). El paciente, sin embargo, todavía no muestra ningún tipo de síntomas de demencia. En la tercera etapa de la fase preclínica, el paciente comienza a detectar síntomas sutiles, el paciente aún puede realizar dentro del rango normal las pruebas de función cognitiva como la MoCA y el MMSE. Se cree que una vez que una persona alcanza la etapa I de la fase preclínica de la EA, finalmente desarrollará la EA si vive lo suficiente (Sperling et al, 2011; Hane et al, 2017).

La EA leve se caracteriza por una reducción de la función cognitiva a un nivel que todavía permite al paciente seguir siendo una persona autónoma y funcional. Se diagnostica a través de pruebas cognitivas y funcionales, complementados con imágenes de PET y análisis de LCR. El paciente con EA leve presenta una reducción en la capacidad de memorizar, prestar atención y de lenguaje (Douaud et al, 2011). Esto puede manifestarse cuando el paciente es menos eficiente en la realización de tareas comunes, como transitar por una ruta común o ir de compras.

La diferenciación de la EA de otras causas de demencia a menudo puede ser difícil, especialmente en las etapas iniciales de la progresión de la enfermedad. La EA se diagnostica cuando el paciente cumple con los criterios de demencia. Por lo general, los síntomas amnésicos se presentan antes de los no amnésicos, como el lenguaje y EL déficit visuoespacial. Tanto el MMSE como el MoCA proporcionan una sensibilidad y una especificidad suficientemente altas para el diagnóstico de demencia. Además, la detección de los niveles de A β en LCR y los PET, pueden proporcionar información para el diagnóstico correcto (Nasreddine et al, 2005; Kahle-Wroblewski et al, 2007).

1.1.2 *Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica*

En función de su edad de inicio, la EA se clasifica en EA de inicio temprano o Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF). La patología de la EAF puede iniciar en personas menores de 65 años de edad. Estos pacientes representan del 1 al 5% de todos los casos.

La EA de inicio tardío o enfermedad de Alzheimer esporádica (EAE) afecta a personas de 65 años o más. Los pacientes con EAE representan más del 95% de los casos totales de EA. Aunque clínicamente no se pueden distinguir ambos tipos, la EAF se asocia generalmente con una tasa de progresión más rápida y un patrón de herencia mendeliano (Reitz et al, 2014).

1.1.2.1 Enfermedad de Alzheimer familiar

La EA familiar (EAF) se hereda de forma autosómica dominante con casi el 100% de penetrancia. Los pacientes con EAF presentan mutaciones autosómicas dominantes en APP, PS1 y PS2. Estas mutaciones generalmente resultan en un aumento en la carga total de A β o aumentan selectivamente A β -42, lo que conduce a una patología de EA de inicio temprano (Barage et al, 2015).

En promedio, los pacientes con EAF suelen presentar síntomas a partir de los 40 años de edad. Aunque la presencia de síntomas clínicos es temprana en la EAF, la memoria general y los cambios cognitivos, así como la patología de la enfermedad, son similares en el tipo Familiar y Esporádico. No obstante, en la EAF, la progresión de la enfermedad es más predecible, lo que permite a los investigadores identificar biomarcadores potenciales y describir cómo cambian con el tiempo, tanto antes como después de la aparición de los síntomas de la enfermedad (Lista et al, 2015).

1.1.2.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica

La EAE es la forma más común y representa el 90% de todos los casos de EA. La edad de inicio es frecuentemente después de los 65 años en pacientes con EAE (Barage et al, 2015). A diferencia de la EAF, la EAE es causada por una combinación de factores genéticos y ambientales. Como se mencionó anteriormente, existen factores de riesgo genéticos en la EA, uno de ellos es la presencia del alelo ϵ 4 de la apolipoproteína E (APOE), que está asociado con la EAE (Mahley et al, 2006). APOE es una lipoproteína polimórfica con tres alelos principales: APOE- ϵ 2, APOE- ϵ 3 y APOE- ϵ 4; estas tres isoformas de APOE se unen a A β de forma diferencial y modulan su fibrogénesis (Mroczko et al, 2018).

La APOE modula el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas en la sangre y funciona como ligando de las partículas de lipoproteínas; en el sistema nervioso central (SNC) participa en el transporte de colesterol y en procesos inflamatorios (Kim et al, 2009).

1.1.3 Factores de riesgo

Debido a que es una enfermedad multifactorial, no se puede hablar de un factor concreto que provoque el desarrollo de esta patología. Sin embargo, se ha reportado que existen factores de riesgo como la obesidad, la diabetes, altos niveles de colesterol, así como las mutaciones genéticas ya mencionadas, que dan lugar a la EAF y a la EAE (Reitz et al, 2014). No obstante, se sabe que el mayor factor de riesgo en la EA es el envejecimiento.

Algunos de los factores de riesgo que no implican alteraciones genéticas, son:

1.1.3.1 Enfermedades cerebrovasculares

Los infartos en el SNC pueden conducir directamente al daño de las regiones del cerebro que son importantes en la función de la memoria, como el tálamo y las proyecciones tálamo-corticales. También pueden aumentar la deposición de A β , que a su vez puede conducir a un deterioro cognitivo o podría inducir respuestas inflamatorias que deterioran la función cognitiva. La hipoperfusión puede conducir a la sobreexpresión de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), esta es una quinasa importante para la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica (Cheung et al, 2008; Reitz et al, 2014).

1.1.3.2 Presión arterial

Se ha comprobado que las personas que tienen niveles elevados de presión arterial en la mediana edad, de 40 a 60 años, tienen mayor riesgo de presentar deterioro cognitivo grave en edades más avanzadas, e incluso demencia y EA (Laurer et al, 2000).

La hipertensión puede aumentar el riesgo de padecer EA a través de un efecto sobre la integridad vascular de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que produce una extravasación de proteínas en el tejido cerebral. A su vez, la extravasación de proteínas puede provocar daño celular, una reducción en la función neuronal o sináptica, la apoptosis y un aumento en la acumulación de A β que resulta en un deterioro cognitivo. (Deane et al, 2004; Kalaria et al, 2010).

1.1.3.3 Diabetes tipo 2

La diabetes de tipo 2 es un factor de riesgo de accidente cerebrovascular y se acompaña de otros factores de riesgo vascular, como hipertensión y dislipidemia (Arvanitakis et al, 2006). Los mecanismos no cerebrovasculares que potencialmente unen a la diabetes tipo 2 y a la EA incluyen hiperinsulinemia y productos avanzados de glicosilación. La insulina puede cruzar la BHE, y la infusión de insulina periférica en los ancianos aumenta los niveles de A β 42 en el LCR, (Watson et al, 2003; Festa et al, 2006). La enzima que degrada la insulina (IDE) se ha relacionado con la eliminación de A β en el cerebro, y tanto la insulina como A β son sustratos competitivos para IDE. La insulina en el cerebro puede aumentar la deposición de A β y la fosforilación de la proteína tau, que son fundamentales para la patogénesis de la EA (Park 2001). La hiperinsulinemia periférica puede regular la absorción de insulina en la BHE debido a la saturación en niveles fisiológicos. Esto puede resultar en una reducción de los niveles de insulina en el cerebro y en la disminución de la expresión de IDE lo que llevaría a la reducción de amiloide mediada por IDE (Reitz et al, 2014).

1.2 Patología de la enfermedad de Alzheimer.

La fisiopatología de la EA es muy compleja, es una enfermedad multifactorial. Desde la primera descripción de la patología realizada por Alois Alzheimer en 1906 se identificaron dos marcadores patológicos de la enfermedad: 1) la acumulación de placas seniles en el cerebro como consecuencia de la agregación y deposición extracelular de $A\beta$, un péptido derivado de la proteína precursora de amiloide (APP) y; 2) la formación de marañas neurofibrilares compuestos de proteína tau fosforilada (Limbocker et al, 2019; Takatori et al, 2019).

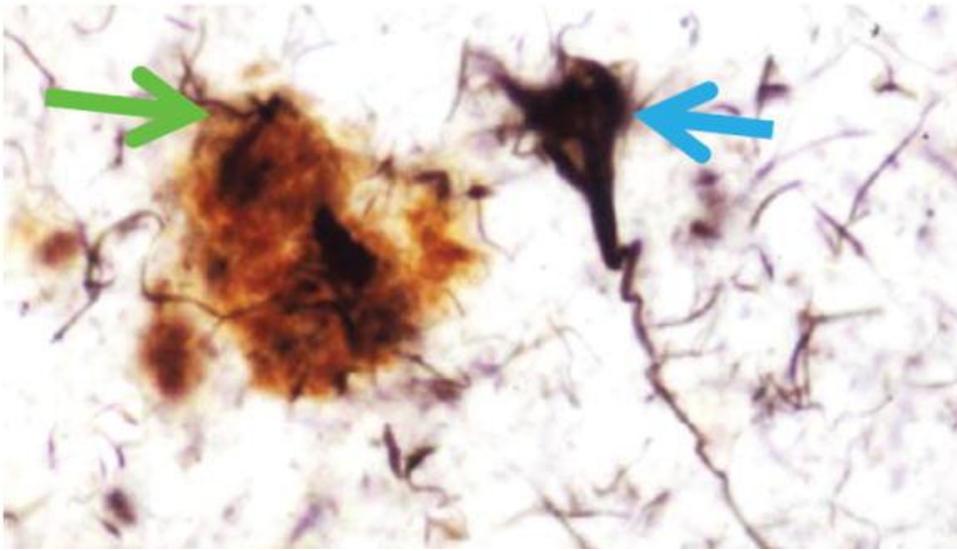


Figura 1. Fotomicrografía de una sección del neocórtex cerebral de un tejido cerebral de un paciente con EA. Las placas de $A\beta$ se señalan con la flecha azul, mientras que las neuronas con marañas neurofibrilares se señalan con una flecha verde (Tomada de Nelson et al, 2012).

1.2.1 *Marañas neurofibrilares*

El componente principal de la maraña es la proteína tau asociada a microtúbulos. Las marañas neurofibrilares están compuestas por fibrillas que miden 10 nm de diámetro, producidas en pares y se enrollan de forma helicoidal con una periodicidad regular de 80 nm. La proteína tau dentro de las marañas está anormalmente fosforilada con grupos de fosfato unidos a sitios muy específicos en la molécula (Wisniewski et al, 1976; Lee et al, 1991).

En condiciones normales, tau es una proteína soluble que es responsable de la asociación y estabilización de los microtúbulos. En las neuronas, tau se encuentra típicamente en los axones, pero en patologías como la EA, esta proteína está distribuida en el cuerpo celular y las neuritas (Goedert et al, 1989).

La función de la proteína tau en los axones neuronales es unirse a los microtúbulos, promoviendo su estabilidad y el transporte vesicular. Cuando es fosforilada anormalmente en su sitio de unión a los microtúbulos, pierde afinidad por estos, se vuelve insoluble y se asocia con otras tau fosforiladas para formar filamentos helicoidales, que posteriormente forman las marañas neurofibrilares. Esto provoca la desintegración de los microtúbulos y detiene el transporte vesicular en las neuronas, lo que provoca una comunicación deficiente entre las neuronas y finalmente su muerte (Chun et al, 2007).

En el cerebro de los pacientes con EA se ha visto que la distribución de las marañas neurofibrilares cumple un patrón, se observa una afección grave de las neuronas de la corteza entorrinal, las regiones subiculares del hipocampo, la amígdala y las capas más profundas del neocortex (Morrison & Hof, 1997). Se sabe que la extensión y distribución de las marañas neurofibrilares en los pacientes con EA se correlacionan con el grado de demencia y la progresión de la enfermedad (Arriagada et al, 1992; Hof et al, 1995).

1.2.2 Placas amiloides

Los amiloides se definen como depósitos microscópicos de tejido filamentosos extracelular, y en casos graves estos depósitos son macroscópicos. Las fibrillas amiloides son de origen proteico y son ricas en estructura de lámina β -plegada altamente ordenada (Haass & Selkoe, 2007).

Las placas amiloides son estructuras compuestas de péptido $A\beta$. Este péptido tiene un peso de 4kD y se compone de 40 a 43 aminoácidos derivado del corte proteolítico de la APP. (Masters et al, 1985; Perl 2010). Estas placas aparecen en el sistema límbico, especialmente en el hipocampo, en los cerebros de todos los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Hay dos tipos de depósito de amiloide extracelular: placas amiloides neuríticas y placas amiloides difusas. Aunque ambos tipos de placa se producen en los cerebros de ancianos sin demencia, solo se encuentran grandes cantidades de placas amiloides neuríticas en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 1994; Hardy & Selkoe 2002).

El péptido $A\beta_{1-42}$ se deposita principalmente en el parénquima cerebral en pacientes con enfermedad de Alzheimer, mientras que el $A\beta_{1-40}$ está asociado con la angiopatía amiloide cerebral (AAC). Se ha planteado que la acumulación de $A\beta$ es el primer evento en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y esto ha conducido a la Hipótesis de la cascada amiloide. La probabilidad de que el amiloide β tenga un papel clave en la EA llevó al desarrollo de modelos de ratones transgénicos que expresen la patología de la EA y también al desarrollo de fármacos o estrategias inmunoterapéuticas para disminuir los niveles de amiloide β en el cerebro (Weiner & Frenkel, 2006).

A medida que la enfermedad progresa, las regiones cerebrales donde se localizan depósitos de $A\beta$ aumentan. Las placas difusas son los primeros depósitos de $A\beta$. Los depósitos focales de amiloide constituyen el núcleo de la placa amiloide que también

comprende una corona de neuritas tau-positivas. Los depósitos de A β se encuentran sucesivamente en el neocórtex, el hipocampo, el estriado, el mesencéfalo y, finalmente, el cerebelo junto con los núcleos pontinos. La patología tau afecta en un orden estereotipado a algunos núcleos específicos del tronco encefálico, el área entorrinal, el hipocampo y el neocórtex, primero las áreas asociativas y, en segundo lugar, las cortezas primarias (estadios de Braak). La pérdida de sinapsis se observa en asociación con la patología tau y A β . La degeneración granulovacuolar y los gránulos perisomáticos también están relacionados con la patología de la enfermedad de Alzheimer (Calderon-Garcidueñas et al, 2018).

1.3 Neuroinflamación

La reacción inflamatoria y el estrés oxidante también juegan un papel importante en la patogénesis de la EA. Los depósitos de A β insoluble se reconocen como material extraño y activan la cascada de respuesta inflamatoria (Johnson et al, 2002; Kastenholtz et al, 2009). Las placas amiloides se asocian con células microgliales activadas y están rodeadas por astrocitos activados que tienen abundantes filamentos gliales conocidos como procesos ramificados. Se sabe que la función de los macrófagos y la microglia está regulada por la APOE y puede variar según la isoforma de esta lipoproteína. Especialmente, la APOE ϵ 4 se asocia con una respuesta inflamatoria mejorada en comparación con los macrófagos que no expresan este alelo (Rebeck 2017).

Las placas amiloides también inducen la activación de la vía clásica de la cascada del complemento (McGeer & McGeer, 2001). In vitro, tanto el A β fibrilar como las marañas neurofibrilares activan directamente tanto la vía clásica del complemento como, en ausencia de anticuerpos, la vía alternativa del complemento. Esto podría proporcionar un mecanismo para reclutar células gliales activadas en placas que contienen fibrillas de amiloide- β y conducir a una inflamación local, disfunción de las células neuronales y, en última instancia, a la degeneración (Weiner & Frenkel, 2006).

El componente 1q (C1q) del complemento se co-localiza con los depósitos de amiloide en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. C1q es un hexámero de subunidades idénticas, de manera que el sitio de unión a la cadena A C1q se replica a intervalos seis veces en cada complejo. Por lo tanto, al unir múltiples moléculas de β -amiloide en posiciones que se aproximan a las de la lámina plegada de amiloide- β o al estabilizar oligómeros ya formados de β -amiloide, C1q podría facilitar la formación de las fibrillas de amiloide- β que forman la placa amiloide (McGreal & Gasque, 2002). Se ha demostrado que C1q se une a amiloide- β y desencadena la cascada del complemento, incluida la formación del complejo de ataque a la membrana, C5b-C9. No obstante, la activación del complemento también podría tener un efecto beneficioso al conducir a la captación de amiloide β por las células microgliales.

1.4 Hipótesis de la Cascada amiloide.

Los intentos de aclarar la etiología de la enfermedad han dado lugar a distintas hipótesis. La acumulación de A β como la base patogénica de la EA se propuso a principios de la década de 1990, por Selkoe y Hardy. La hipótesis de la cascada amiloide indica que el A β del cerebro impulsa la fosforilación de tau, la formación de marañas neurofibrilares, la pérdida de sinapsis, la muerte neuronal y el deterioro cognitivo (Panza et al, 2019). Por lo que la deposición de A β conlleva a una citopatología neurítica y glial en regiones del cerebro importantes en la cognición y la memoria (Mroczko, 2017).

La hipótesis de la cascada amiloide se apoya principalmente en estas evidencias: 1) Las mutaciones autosómicas dominantes en los genes de Presenilina-1 (PS1), la presenilina-2 (PS2) y APP están relacionados con la EAF de inicio temprano. Estas mutaciones alteran la producción de A β , aumentando los niveles de A β 1-42, A β 1-40 y favoreciendo la agregación y deposición de A β . Además, se ha visto que los pacientes con Síndrome de Down presentan signos de la EA en edades tempranas. 2) La hipótesis asume que el desequilibrio entre la producción y la degradación de A β en etapas tempranas de la enfermedad es un factor causante de la EA. 3) Se observó que la agregación de A β precede a la hiperfosforilación y agregación de tau, en modelos de animales transgénicos para EA. 4) Las terapias enfocadas a la degradación de A β obtuvieron como resultado una mejora cognitiva (Salomon, 2009; Mroczko et al, 2017; Panza et al, 2019).

Las revisiones más actuales de la Hipótesis de la cascada amiloide sugieren que la presencia de oligómeros de A β en el cerebro puede ser un factor importante en la patología de la enfermedad.

El reconocimiento de oligómeros bioactivos solubles en medios de cultivo celular, en cerebros de ratones transgénicos de APP y en tejido cerebral de pacientes con EA, originó el concepto de que las fibrillas inactivas de las placas amiloides sirven como reservorio de oligómeros de A β , los cuales son potencialmente neurotóxicos (Mucke & Selkoe, 2012).

Este nuevo enfoque hacia los oligómeros de A β no descarta el papel neurotóxico de las placas amiloides. De hecho, la alteración neurítica en la proximidad inmediata de las placas amiloides, como la distorsión local y la curvatura de las dendritas corticales alrededor de las placas, afecta la calidad de la neurotransmisión (Hyman et al, 1995). Las placas amiloides pueden conferir neurotoxicidad local porque están en equilibrio con los oligómeros y protofibrillas circundantes (Mucke & Selkoe, 2012).

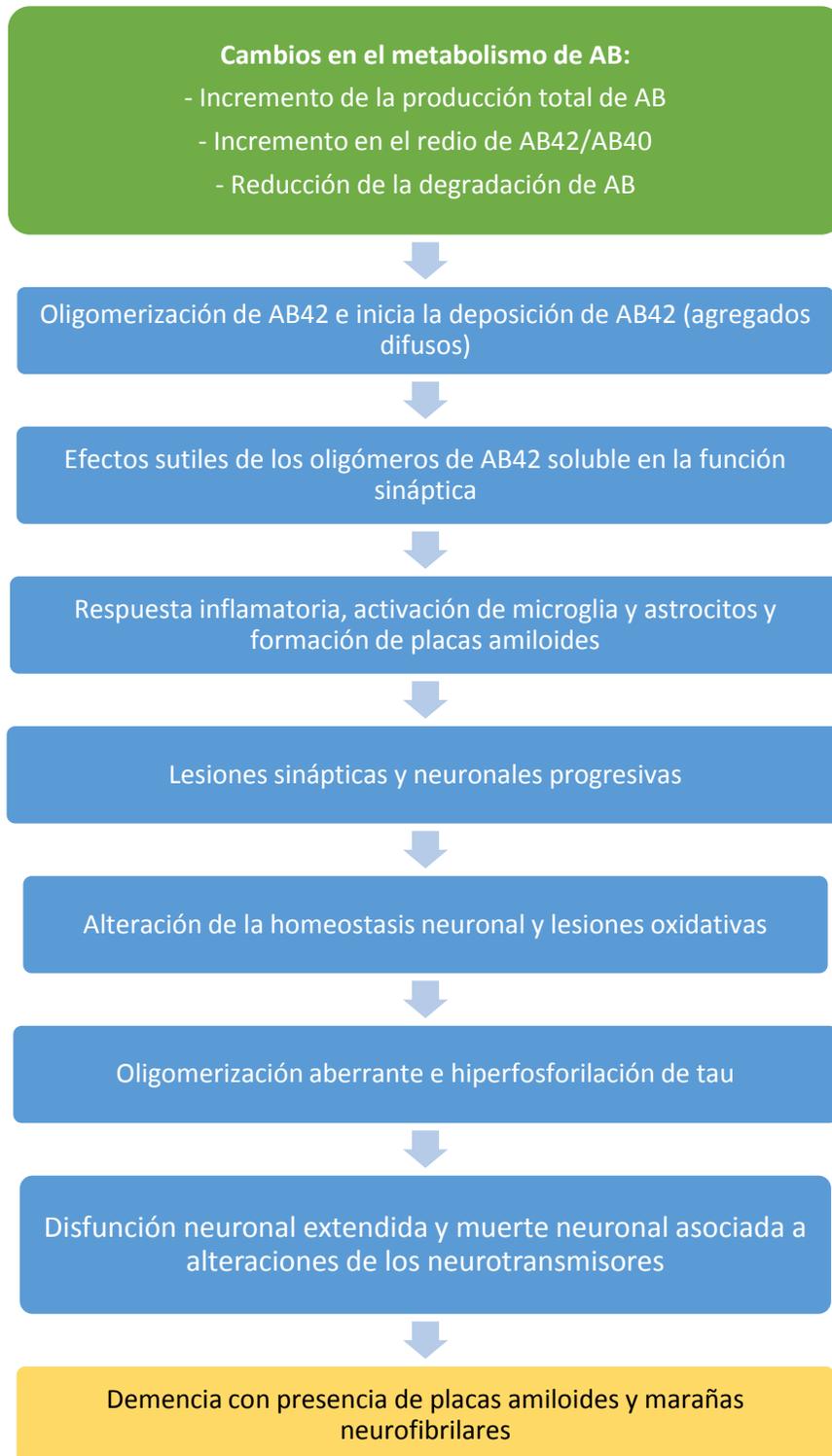


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide (Haass & Selkoe, 2007).

1.5 APP: procesamiento proteolítico y generación de A β .

La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína transmembranal de tipo I con grandes dominios extracelulares. El dominio de A β es exclusivo de la proteína APP (O'Brien & Wong, 2011).

El gen APP se encuentra en el cromosoma 21 en humanos, el empalme alternativo de la transcripción de APP genera 8 isoformas, de las cuales 3 son las más comunes: la forma de APP695, que se expresa predominantemente en el sistema nervioso central (SNC), en neuronas y carece del dominio KPI, y las formas APP751 y APP770, que se expresan en la mayoría de los tejidos y contienen un dominio de Inhibidor de Proteasa (KPI) de 56 aminoácidos dentro de sus regiones extracelulares (Bayer et al, 1999). Las isoformas que contienen el dominio KPI están relacionadas con niveles elevados de APP y, por ende, relacionadas con un aumento de la deposición de A β en pacientes con EA (Zhang et al, 2011).

La función fisiológica precisa de la APP no se conoce con exactitud. La APP se ha visto relacionada con la modulación del crecimiento celular, la supervivencia celular, el transporte de proteínas neuronales a lo largo del axón, la transducción de señales transmembranal, la adhesión celular y el metabolismo del calcio (O'Brien & Wong, 2011). En ratones transgénicos que sobreexpresan APP muestra un efecto positivo en la salud y el crecimiento de las células (Oh et al, 2009).

La proteína APP se sintetiza en el retículo endoplásmico y luego se transporta a través del aparato de Golgi a la red trans-Golgi (RTG). Desde la RTG, la APP se puede transportar en vesículas a la superficie celular donde se comienza la proteólisis. La proteólisis de APP puede ser por la vía amiloidogénica o por la vía no amiloidogénica (Figura 3).

La vía no amiloidogénica no genera A β . El corte de APP por α -secretasa excluye la generación de A β ya que el sitio de escisión está dentro del dominio A β , como resultado se libera un gran ectodominio soluble de APP llamado sAPP α (Zhang et al, 2011), así como un fragmento transmembranal, α -FCT. El fragmento α -CTF después es cortado por γ -secretasa, generando un residuo extracelular, p3, y uno intracelular, AICD (O'Brien & Wong, 2011).

La vía amiloidogénica sí genera A β . El primer paso en la generación de A β es el corte de APP por la β -secretasa. Se conocen dos formas de β -secretasa, BACE1 y BACE2. BACE1 es una aspartil proteasa unida a membrana con un dominio transmembrana de tipo I cerca del extremo C-terminal y se considera la principal BACE en la generación de A β ya que se expresa mayormente en neuronas. El corte por la β -secretasa genera el ectodominio de APP soluble (sAPP β). También se generan los fragmentos del carboxilo terminal (FCT) de APP, β -FCT. Los fragmentos β -FCT se cortan por γ -secretasa para generar fragmentos AICD y A β . Los fragmentos de AICD se quedan en el espacio intracelular, mientras que A β es el fragmento extracelular (Sinha et al, 1999; Vassar et al, 1999; Zhang et al, 2011).

La γ -secretasa es un complejo de alto peso molecular que consta de al menos cuatro componentes: presenilina (PS, PS1 o PS2), nicastrina, APH-1 y potenciador PS2. El corte mediado por γ -secretasa tiene lugar dentro del dominio transmembranal. La escisión puede producir tanto A β 40, como A β 42, las cuales son las especies más abundantes en la patología de la EA (Kimberly et al, 2003).

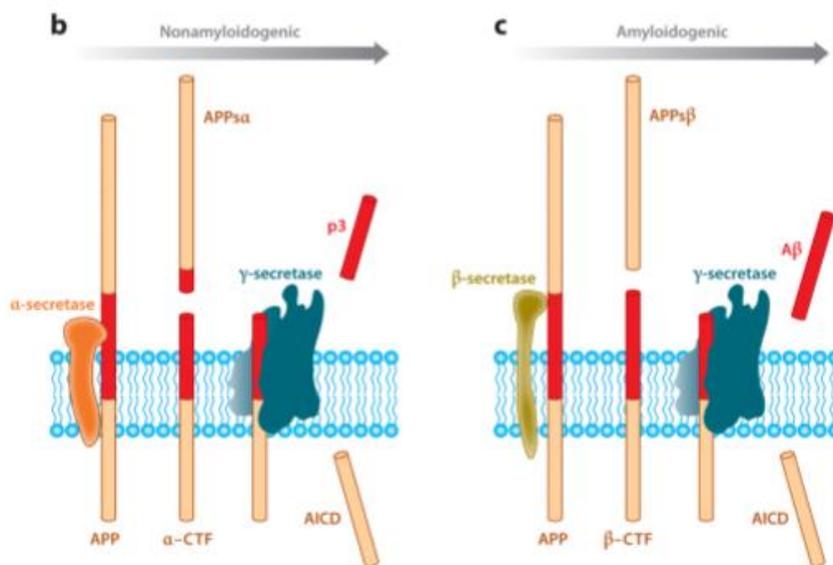


Figura 3. Procesamiento de APP. La proteólisis de APP puede ser por la vía amiloidogénica, donde se genera A β , mientras la vía no amiloidogénica no genera A β (Tomada de O'Brien y Wong, 2011).

1.6 Péptido β -Amiloide (A β)

A β es un péptido que en condiciones normales se encuentra a bajas concentraciones en el cerebro así como en fluidos biológicos, líquido cefalorraquídeo y plasma. En su forma monomérica, participa en funciones antioxidantes, en la estimulación de la proliferación celular, promueve la adhesión celular y regula la transmisión sináptica excitadora y quelante de iones metálicos tóxicos (Giuffrida, 2010). A β es un péptido anfifílico, sus primeros 28 residuos son polares y los 12 siguientes no lo son, esto le confiere una gran capacidad para agregarse, así como estabilidad y facilita la formación de fibrillas (Nagy, 2005).

Aunque la mayor parte de A β se secreta fuera de la célula, se sabe que puede generarse en el interior de la célula en el retículo endoplásmico, Aparato de Golgi, en la RTG y el endosoma. Además, el A β extracelular puede ser internalizado por la célula para su degradación. La existencia intracelular de A β implica que este péptido puede acumularse dentro de las neuronas y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Se ha

sugerido que el A β internalizado puede agregarse dentro de la célula y romper la membrana vesicular, contribuyendo así a su efecto patológico (Friedrich et al, 2010).

1.6.1 *Agregación y toxicidad de A β*

Los monómeros de A β en condiciones normales cumplen con funciones fisiológicas importantes en el SNC, sin embargo estos monómeros se vuelven neurotóxicos después de su autoasociación (Lambert et al, 1998). Bajo ciertas condiciones, el A β puede asociarse con otros péptidos de A β y formar agregados con estructuras β -plegadas. Los péptidos A β 42 tienen una mayor propensión a formar agregados oligoméricos solubles, lo que conduce a la formación de placas insolubles. Estos monómeros de A β 42 pueden formar agregados que van desde los trímeros hasta los dodecámeros, estos pueden oligomerizarse aún más para formar agregados de orden superior (Sharma et al, 2017).

La formación de oligómeros de A β comienza a partir de alteraciones en la conformación de A β monomérico, dando como resultado dímeros y trímeros de bajo peso molecular, seguidos de la formación de agregados de oligómeros esféricos solubles que constan de 12 a 24 monómeros, seguidos de la formación de protofibrillas alargadas que finalmente se convierten en fibrillas insolubles (Glabe, 2008).

En etapas tempranas de la patología de la EA, antes de la aparición de las placas amiloides, los oligómeros se ensamblan perisomáticamente, y no intracelularmente, rodeando a las neuronas (Mroczko, 2017).

Los oligómeros de A β soluble pueden causar una muerte neuronal altamente selectiva y acelerada al aumentar la exposición a los oligómeros de A β (Lambert et al, 1998). Estos oligómeros pueden desencadenar directamente la disfunción de la señalización neural, lo que conduce a una pérdida de memoria temprana y la progresión de la demencia en la EA, además, inhiben la potenciación a largo plazo de la sinapsis. La actividad nociva de los oligómeros de A β puede inducir ciertas aberraciones en la composición, forma y densidad de las sinapsis (Klein et al, 2001; Lacor et al, 2007).

En el cerebro de pacientes con EA, la deposición de A β sigue un patrón de distribución según el avance de la enfermedad. Inicialmente, los depósitos de A β se encuentran exclusivamente en el neocortex, después, aparecen los depósitos en las regiones cerebrales distributivas, luego los núcleos diencefálicos, el cuerpo estriado y los núcleos colinérgicos del cerebro anterior basal. Más tarde, se observan depósitos de A β en el tronco encefálico. Finalmente, la deposición en cerebelo aparece. Este patrón de deposición progresivo se confirmó por imágenes generadas por tomografía de emisión de positrones (PET).

Los mecanismos de toxicidad de los oligómeros de A β incluyen la pérdida de sinapsis y la interrupción de la transmisión sináptica, lo que sugiere que estas formas oligoméricas podrían ser las especies que desencadenan la pérdida de sinapsis y el deterioro de la memoria en la EA (Mroczko, 2017). La evidencia reciente sugiere que las especies oligoméricas de A β formadas como intermediarios durante el proceso de

agregación son sustancialmente más tóxicas para las células neuronales que las placas maduras y, por lo tanto, es probable que contribuyan de manera muy significativa al inicio y propagación de la enfermedad (Limbocker et al, 2019).

En general, los oligómeros solubles se definen como ensamblajes de A β que no se acumulan a partir de fluidos fisiológicos mediante centrifugación de alta velocidad. Además, los oligómeros solubles pueden unirse a otras macromoléculas o a membranas celulares y, por lo tanto, pueden volverse insolubles (Hass & Selkoe, 2007).

1.7 Especies de A β truncadas

El A β de longitud completa (A β -40 y A β -42) ha sido el foco dominante de la investigación sobre la etiología de la EA, sin embargo recientemente se ha dado mucha atención a las especies A β truncadas en el extremo N terminal (N-truncadas), ya que una porción significativa de A β en el cerebro de pacientes con EA consiste en especies N-truncadas (Sullivan et al, 2011). Además, el extremo amino puede ser modificado y esta modificación les confiere más resistencia a la degradación, se agregan más rápidamente y muestran mayor toxicidad en neuronas, comparado con péptidos de longitud completa (Russo 2002; Acero et al, 2009).

Se sabe que los péptidos A β N-truncados/modificados se acumulan en etapas tempranas de la enfermedad en el cerebro de pacientes con EA y en personas con síndrome de Down, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos. Además, se consideran un componente importante en las placas seniles. En cuanto a la progresión de la enfermedad, se ha visto que el aumento de las especies N-truncadas/modificadas es proporcional a la gravedad de la enfermedad (Youssef et al, 2009).

Los agregados pre-amiloides no fibrilares difusos contienen especies N-truncadas que podrían desempeñar un papel importante en la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo en pacientes con EA (Acero et al, 2009).

Como ya se mencionó, las especies N-truncadas pueden tener modificaciones postraduccionales, la más importante es la formación de un residuo de piroglutamato en el extremo amino terminal (Mori et al, 1992). Cuando el truncamiento N terminal expone un residuo de ácido glutámico, el extremo amino de A β puede pirolizarse formando un anillo estable. Como resultado de esta modificación postraducciona podemos encontrar principalmente dos especies modificadas de A β : A β pyroGlu 3-42 y A β pyroGlu 11-42.

Estas formas piroglutamadas adoptan rápidamente una conformación de β -plegada, son significativamente más tóxicas y estables que las especies de A β de longitud completa sin modificaciones, además tienen un aumento de oligomerización y fibrilación, generan también un aumento en la peroxidación lipídica y una pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Sullivan et al, 2011; Scheidt et al, 2016).

El proceso para generar A β pyroGlu 3-42 inicia con el corte secuencial de los dos primeros aminoácidos N terminales de A β 1-42, por acción de la aminopeptidasa A (Sevalle et al, 2009). Este corte es seguido por la pirólisis del ácido glutámico N terminal resultante, produciendo A β pyroGlu 3-42, esta modificación hace a este péptido más resistente a la degradación. La pirolisis es catalizada por la enzima glutaminil ciclasa (QC).

A β pyroGlu 11-42, se genera a partir del corte directo de APP por BACE1 en el sitio β' , el cual se localiza entre el aminoácido 10 y el 11 de A β 1-42. El residuo de ácido glutámico generado por el corte de BACE1 se piroliza por la enzima QC.

Se ha demostrado que los péptidos A β modificados con piroglutamato son los componentes predominantes entre todas las especies de A β N-truncadas en el cerebro con EA. Las especies N-truncadas piroglutamadas se acumulan progresivamente en el cerebro en las etapas más tempranas de la EA, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos, lo que sugiere que estos péptidos son especies semilla potenciales y pueden desempeñar un papel importante en la formación de placas seniles (Sergeant et al, 2003). Se ha demostrado que las especies de A β modificadas son significativamente más resistentes a la degradación, se agregan más rápido y muestran una toxicidad mayor en comparación con especies de longitud completa (Schilling et al, 2006; Nussbaum et al, 2012).

Tanto A β pyroGlu 3 como A β pyroGlu 11 forman el núcleo central de los agregados amiloides, lo que apunta a la hipótesis de que su deposición en el cerebro de EA podría haber precedido a la del péptido A β de longitud completa. A β pyroGlu 3 y A β pyroGlu 11 son más hidrofóbicos debido a la pérdida de tres cargas, en el caso de A β pyroGlu 3 y 6 cargas en A β pyroGlu 11, tienen una vida más larga que la de A β de longitud completa, pues no pueden ser degradados por aminopeptidasas comunes y requieren aminopeptidasas específicas de piroglutamato (Naslund et al, 1996; Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013).

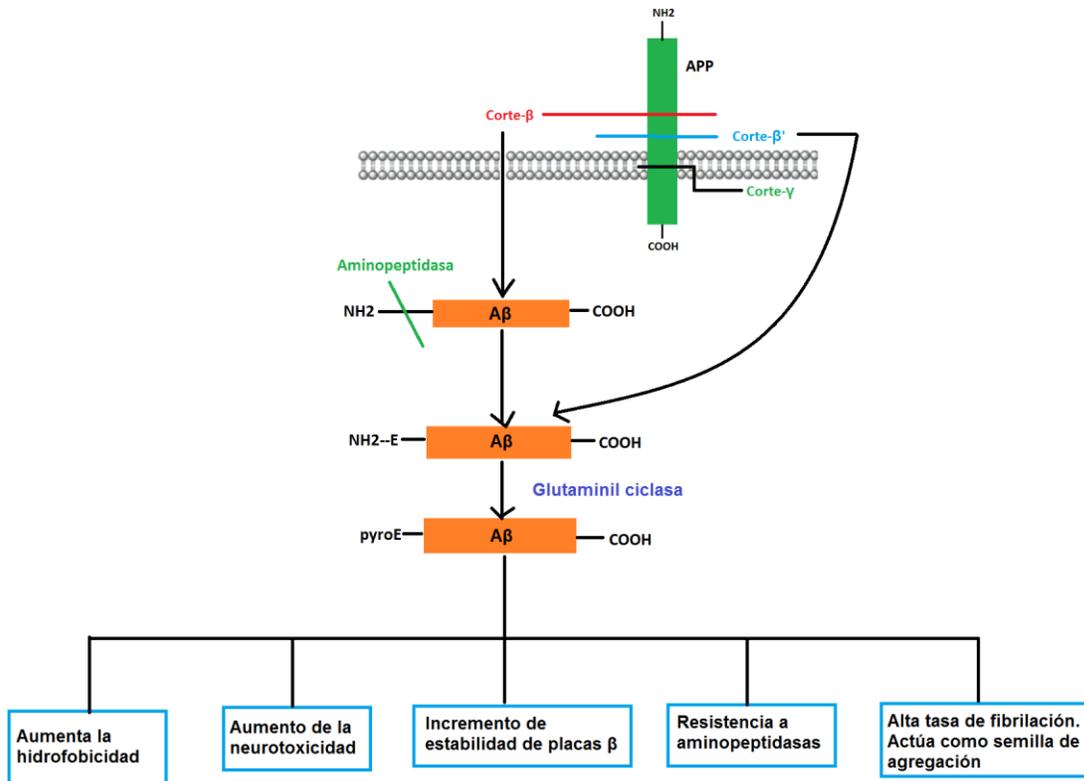


Figura 4. Generación de péptidos $A\beta$ modificados piroglutamados. A partir de la proteólisis de la APP se generan los péptidos modificados. La adición de piroglutamato en el extremo N-terminal le confiere a los péptidos características físico-químicas importantes en la patología de la EA.

1.8 $A\beta$ pyroGlu 11-42

$A\beta$ pyroGlu 11-42 es un péptido modificado y truncado. Se caracteriza por tener un piroglutamato en la posición 11. $A\beta$ pyroGlu 11-42 proviene directamente del procesamiento de APP por una β -secretasa (BACE1) en el sitio β' que se encuentra entre los aminoácidos Tirosina 10 y Glutamato 11. Este corte se realiza preferentemente en la RTG, seguido del corte de γ -secretasa. El péptido resultante es modificado por la QC para formar un anillo piroglutamado estable en la posición 11 (Liu et al, 2002; Cynis et al, 2008).



Figura 5. Generación del péptido AβpyroGlu 11-42 a partir de Aβ. El corte de β-secretasa entre los aminoácidos Tirocina 10 y Glutamato 11, además del corte de γ-secretasa en la posición del aminoácido 40 o 42.

Las especies de Aβ modificadas con piroglutamato en la posición N-terminal muestran una tasa más acelerada de agregación, comparado con las especies no modificadas de Aβ, sugiriendo que estas especies son especies que sirven como semilla para la formación de agregados neurotóxicos, también son más estables en la forma de β-plegada y su tasa de fibrilación aumenta (Russo, 1997). Además son más hidrofóbicas, y tienen una vida más larga en comparación con las especies no modificadas (Perez-Garmendia & Gevorkian; 2013). La modificación le otorga a la proteína resistencia a la degradación por aminopeptidasas extracelulares (Russo, 2002). Solo la piroglutaminil aminopeptidasa es capaz de liberar el piroglutamato de las especies modificadas, pero se encuentra en citoplasma y necesita un medio reductor para su actividad (Liu, 2002).

Las placas neuríticas en el cerebro de pacientes con EA están compuestas hasta en un 50% de los péptidos de Aβ piroglutamados en algunos pacientes (He & Barrow, 1999). Se ha observado AβpyroGlu 3 y AβpyroGlu 11 abundantes en placas amiloides maduras en el cerebro de pacientes con EA, donde se colocaron con Aβ de longitud completa, así como entre sí. También se encontraron placas con núcleos ricos en AβpyroGlu 11. Se ha propuesto que AβpyroGlu 11 es generado intracelularmente y se agrega dentro de las neuronas en forma de oligómeros, posteriormente AβpyroGlu 11 ingresa al espacio extracelular después de la muerte celular o por algún otro mecanismo (Christopher Sullivan et al, 2011).

En el tejido cerebral de personas con Síndrome de Down se ha identificado AβpyroGlu 11 incluso antes del nacimiento. Además, se han observado niveles más altos de AβpyroGlu 11 en los núcleos de placas en comparación con las especies AβpyroGlu 3 y Aβ de longitud completa. Esta observación apoya a la hipótesis de que AβpyroGlu 11 puede ser una especie que se agrega en etapas tempranas, y por lo tanto, actúa como semilla de agregación para la formación de placas seniles (Sullivan et al, 2011).

En individuos con EA familiar de inicio temprano, se observó que AβpyroGlu 11 es el principal péptido detectado en las placas de algodón, una lesión que carece de un núcleo de amiloide central (Perez-G & Gevorkian, 2013).

1.9 Tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer

1.9.1 *Tratamientos sintomáticos*

Las terapias sintomáticas se han centrado en la modulación de la función colinérgica y glutamatérgica: los inhibidores de la colinesterasa y un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), la memantina. Los inhibidores de la colinesterasa disminuyen la degradación de la acetilcolina liberada por las neuronas colinérgicas, lo que aumenta la transmisión sináptica y mejora el estado funcional cognitivo y global de los pacientes con EA leve a moderada (Kumar et al, 2016). La memantina bloquea los receptores de NMDA y exceso de excitación para prevenir la liberación de glutamato, inhibiendo así la neurotoxicidad (Readhead et al, 2018). Sin embargo, la eficacia disminuye con el tiempo y estos tratamientos no detienen la progresión de la enfermedad (Buckley et al, 2015).

1.9.2 *Fármacos anti-inflamatorios*

El objetivo principal de los AINE son las enzimas ciclooxigenasa (COX). La expresión de COX2, que es la isoforma inducible que se encuentra en las neuronas y otras células, se aumenta en los cerebros de los pacientes con EA, lo que indica que los AINE podrían ser beneficiosos para reducir la inflamación neurotóxica que se produce por la deposición de A β . Se cree que la inhibición de la COX2 es neuroprotectora en lesiones isquémicas y excitotóxicas (Nogawa et al, 1997).

Los AINE clásicos, como el ibuprofeno y la indometacina, a través de su inhibición no selectiva de las enzimas COX, pueden suprimir la producción de prostaglandinas por parte de las células microgliales que se produce en las reacciones inflamatorias (Hoozemans et al, 2003). Sin embargo, un subconjunto de AINE reduce los niveles de A β 1-42 independientemente de la actividad de la enzima COX, aparentemente modulando la actividad de la γ -secretasa. Se informó también de que los AINE pueden disminuir la actividad de la β y γ -secretasa que cortan la APP, y por ende, reducir los niveles de A β (Takahashi et al, 2003).

Los primeros ensayos clínicos de inhibidores de la COX2 no lograron reducir los déficits cognitivos o de comportamiento en pacientes con EA (Aisen et al, 2003). Varios estudios han demostrado que los AINE pueden reducir los niveles de β -amiloide en modelos de ratones, pero los efectos beneficiosos de los AINE pueden no ser suficientes en una enfermedad multifactorial como la EA.

1.9.3 *Inhibición de la glutaminil ciclasa (QC)*

La glutaminil ciclasa (QC) es una enzima que convierte la glutamina amino terminal en pyroGlu, es abundante en el cerebro de mamíferos y tiene una función clave en el procesamiento postraduccional de varias hormonas (Schilling et al, 2004). Se ha propuesto que al inhibir la actividad de la QC se evitaría la formación de especies de A β modificadas con piroglutamato, las cuales son especies con una alta neurotoxicidad en cerebros de pacientes que presentan la patología de la EA.

Se han descrito pocos inhibidores de la QC. Estos inhibidores son eficaces para reducir la generación de especies de A β piroglutamadas *in vitro* e *in vivo*, también pueden reducir la infiltración de monocitos, macrófagos, tienen actividad antiinflamatorias en muchos modelos de inflamación y reducen la patología de la EA en varios modelos de ratones transgénicos.

Uno de los inhibidores de QC es PQ912. PQ912, inhibe la actividad de la QC en el LCR en un 92%. Este inhibidor se mostró cómo seguro y bien tolerado en un estudio de fase 1. PQ912 reduce la actividad de QC tanto del suero como del LCR de manera dosis-dependiente (Lues et al, 2015).

P150/03, es un inhibidor específico de QC, el cual disminuye la ciclación del glutamato en el extremo N y la formación de A β pyroGlu 3 en células de mamíferos cultivadas (Cynis et al, 2006).

En ratones, la inhibición farmacológica crónica o la ablación genética de la Q-C dan como resultado una reducción de los niveles cerebrales de especies de A β piroglutamadas y una mejora de las tareas cognitivas en los modelos de EA (Schilling et al, 2008). En otro estudio, se aplicó un inhibidor de QC por vía oral a los ratones transgénicos con mutación de APP para estudiar los efectos de la conversión de glutamato a piroglutamato en las concentraciones de especies A β pyroGlu 3, así como en otras especies de A β . Se observó una disminución dependiente de la dosis de la formación de placa cortical y las concentraciones totales de A β y A β pyroGlu 3 insoluble, así como la mejora de la memoria (Schilling et al, 2008).

La reducción de los niveles de especies de A β piroglutamadas a través de la inhibición farmacológica de QC ha surgido como una estrategia terapéutica prometedora para la EA (Bridel et al, 2017). Sin embargo, el bloqueo de la formación de especies de A β piroglutamadas mediante la inhibición de la QC puede tener efectos secundarios impredecibles porque el piroglutamato también es el residuo N terminal de muchas otras proteínas, hormonas y péptidos con funciones no patológicas (Wu, 2017), con lo cual se puede ver afectada la actividad fisiológica de estas otras moléculas.

1.9.4 Reducción de la producción de A β

Sabemos que A β se deriva del corte secuencial de APP por β -secretasa y el complejo γ -secretasa. Es por esto que se ha planteado la modulación de estas enzimas como un enfoque terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

Se han desarrollado inhibidores de BACE1 que penetran en el cerebro y han logrado reducir los niveles de A β en modelos de animales (Kennedy et al, 2016). Sin embargo, la mayoría de los inhibidores de BACE1 probados no sobrevivieron más allá de los ensayos clínicos de fase II/III debido a la falta de eficacia o los efectos secundarios indeseables a largo plazo (May et al, 2015). Se ha logrado demostrar que la desactivación de BACE1 es capaz de revertir completamente la deposición de amiloide preformada y mejorar la función cognitiva en un modelo de ratón transgénico 5XAD para EA familiar (Cao et al, 2018).

Por otro lado, para el complejo γ -secretasa se han producido inhibidores tanto no selectivos como selectivos. En estudios realizados, los inhibidores no selectivos provocaron una disminución de A β cerebral y redujeron la señalización de Notch al mismo tiempo, causando síntomas gastrointestinales desfavorables y un sistema inmunitario comprometido (Dovey et al, 2001; Searfoss et al, 2003). Entre los inhibidores selectivos se encontró que el inhibidor de quinasa abl, Gleevec, reduce la producción de A β pero evita el corte de Notch por la γ -secretasa en las células neurales (Netzer et al, 2003). Otro inhibidor selectivo es Avagacestat, el cual llegó a ensayos clínicos. Avagacestat inhibe el procesamiento de APP (Gillman et al, 2010). Sin embargo, el ensayo clínico de fase II de Avagacestat se suspendió debido a los efectos secundarios adversos, que sugieren una posible inhibición de Notch.

1.9.5 *Terapias dirigidas a Tau*

Las estrategias terapéuticas actuales dirigidas a tau se enfocan en la inhibición de la agregación de tau, en la reducción de la hiperfosforilación u otras modificaciones tóxicas postraduccionales de tau, además de promover su eliminación y prevenir la progresión de su agregación (Panza et al, 2016).

Aunque se ha visto una mejora en la cognición y un mejor rendimiento neuronal en los pacientes con enfermedades neurodegenerativas con terapias enfocadas a tau, la mayoría de los agentes utilizados en terapias dirigidas a tau de tau provocaron efectos secundarios tóxicos indeseables (Hung & Fu, 2017). Así mismo, varios inhibidores de la agregación de tau probados han fallado en los ensayos clínicos debido a efectos secundarios no deseados o falta de eficacia (Baddeley et al, 2015; Wischik et al, 2015; Cao et al, 2018).

1.10 Inmunoterapia

La inmunoterapia es el tratamiento de distintas enfermedades mediante la inducción, estimulación o supresión de la respuesta inmune.

Una de las características atractivas de la inmunoterapia anti-A β es la multiplicidad de moléculas y la variedad de mecanismos que pueden ser dirigidos con fines terapéuticos. Los anticuerpos pueden dirigirse contra β -APP, la molécula de A β monomérica y muchos intermediarios de agregación de A β solubles e insolubles. Incluso las especies que no son A β , como las proteínas transportadoras de A β y los canales de transporte, son objetivos potenciales. Esta versatilidad es importante a la luz de la incertidumbre acerca de qué formas de A β son patógenas en la EA y sobre el posible papel que pueden desempeñar los monómeros de A β en general.

1.10.1 *Inmunización activa*

La inmunización activa implica la administración de una vacuna que contiene antígenos u otros estímulos diseñados para inducir una respuesta inmune que genere anticuerpos en el receptor (Lannfelt et al., 2014). Una ventaja de la inmunización activa es la capacidad de un pequeño número de vacunaciones para generar una respuesta de anticuerpos prolongada. Los anticuerpos generados en respuesta a la vacunación son generalmente policlonales, por lo que se pueden producir anticuerpos con múltiples epítomos contra A β .

Una desventaja potencial es la variabilidad en la respuesta de anticuerpos entre los pacientes. Esto puede ser especialmente problemático en pacientes con EA de inicio tardío debido a la reducción de la capacidad inmunológica causada por la edad de los pacientes. El sistema inmunológico senescente es menos probable que genere títulos terapéuticos adecuados de anticuerpos en respuesta a la vacunación y es más probable que desarrolle efectos secundarios autoinmunes. También se ha visto que la inmunización activa genera una respuesta inmunológica sostenida. Las células T producen una respuesta inflamatoria dañina que no se logra suprimir fácilmente (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

1.10.2 *Inmunoterapia activa como estrategia contra la Enfermedad de Alzheimer*

En 1999, Schenk et al, informaron la primera evidencia de que la inmunoterapia activa con A β podría reducir la patología de A β *in vivo*. A finales de la década de 1990 Elan y Wyeth desarrollaron una vacuna contra A β para su uso en humanos.

Una gran parte de los ensayos clínicos de inmunoterapia activa dirigidos a A β se han detenido hasta ahora debido a las respuestas autoinmunes. Actualmente las vacunas de inmunoterapia activa de segunda generación han progresado a ensayos clínicos y siguen en investigación.

A continuación se mencionan algunos ejemplos:

1.10.3 *AN-1792*

Elan y colaboradores demostraron que la vacunación activa con A β fibrilar generaba anticuerpos anti-A β , los cuales podían ayudar a alterar los componentes patológicos de la EA. La vacuna AN-1792 consta de A β fibrilar acompañado de un adyuvante. Esta vacunación condujo a la prevención de la formación de nuevos depósitos amiloides y a la depuración de los existentes en cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan APP. Estos resultados llevaron a la vacuna AN-1792 a ensayos clínicos. En la fase II, se observó en un examen postmortem a los pacientes participantes en el ensayo una reducción en la carga de placas amiloides y angiopatía amiloide en el cerebro (Nicoll et al, 2003), además las concentraciones de proteína tau total se redujeron en el LCR (Gilman et al, 2005). Sin embargo, se detuvo ensayo debido a que el 6% de los pacientes tratados con la vacuna desarrolló meningoencefalitis mediada por células T autorreactivas, además, solo el 20% de los pacientes vacunados tuvieron títulos de anticuerpos detectables, y esto se atribuyó a la senescencia inmunológica de los pacientes. Los efectos secundarios, la falta de eficacia clínica y la respuesta débil del sistema inmunológico llevaron a muchos investigadores a centrarse en la inmunoterapia pasiva.

1.10.4 *CAD106*

CAD106 es una vacuna contra A β que alcanzó los ensayos clínicos de fase II en pacientes con EA leve. Consta de dos componentes, el portador del fármaco Immunodrug Qb junto con un fragmento del péptido A β . En modelos animales, se ha demostrado que el tratamiento con CAD106 puede bloquear la formación de placas de A β en el cerebro. El primer ensayo de fase II fue para evaluar la seguridad de CAD106 cuando se administra de forma subcutánea (Winblad et al, 2012). Resultó en un perfil de seguridad favorable. El segundo ensayo de fase II se diseñó para determinar la seguridad y la tolerabilidad de CAD106 en pacientes con EA. Actualmente sigue en estudios.

1.10.5 *AFFITOPE AD02*

AFFITOPE AD02 es péptido sintético de seis aminoácidos que imita el extremo N-terminal de A β . Este péptido fue diseñado para evitar los problemas de activación de las células T que llevaron a la meningoencefalitis con la vacuna AN1792 (Lannfelt et al, 2014).

Tabla 1. Fármacos desarrollados para terapias contra A β por inmunización activa. Estos fármacos llegaron a ensayos clínicos.

COMPAÑÍA	FÁRMACO	EPÍTOPO DE A β
Alzheimer Immunotherapy	ACC-001	Región N-terminal, A β 1-6
Novartis/Cytos	CAD106	Región N-terminal, A β 1-6
GSK/Affiris	AFFITOPE AD02	Región N-terminal, A β 1-6

1.10.6 Inmunización pasiva

En la inmunización pasiva, los anticuerpos se producen en una fuente distinta al propio paciente que recibirá el tratamiento. Se administran directamente los anticuerpos dirigidos a una molécula específica, generados en otro organismo.

Una ventaja de la inmunoterapia pasiva es que el suministro de anticuerpos terapéuticos al paciente nos permite direccionar de forma específica la terapia hacia moléculas blanco de la enfermedad, sin necesidad de desencadenar una respuesta humoral inespecífica (Lannfelt et al, 2014). Si la respuesta a la vacuna es dañina para el paciente, se puede suspender inmediatamente la administración. Además, la inmunización pasiva no genera una respuesta celular potencialmente dañina para el paciente. Una desventaja es el requisito de infusiones repetidas de anticuerpos a lo largo del tiempo.

Un enfoque para el tratamiento de la EA es reducir la acumulación de placas amiloides utilizando anticuerpos monoclonales.

1.10.7 Inmunoterapia pasiva como estrategia contra la enfermedad de Alzheimer

La transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales anti-A β exógenos parece ser la forma más fácil de proporcionar anticuerpos anti-A β sin riesgo de autoinmunidad mediada por una respuesta de células T no controlada. Los problemas potenciales con la inmunización pasiva incluyen la necesidad de inyecciones repetidas en un enfermo crónico, un alto costo, la selección adecuada de los antígenos blanco, la penetración de la barrera BHE, el riesgo de hemorragias y el desarrollo de una respuesta inmunológica contra los anticuerpos inyectados (Wisniewski & Goni, 2014).

Varios anticuerpos se han desarrollado como herramientas para la inmunoterapia pasiva en la EA. Una gran parte de estos anticuerpos han llegado a ensayos clínicos, sin embargo, no han generado una mejora contundente en los pacientes.

1.10.8 *Bapineuzumab*

Bapineuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido al extremo amino del péptido A β , se une a los depósitos de péptidos A β que se acumulan en el cerebro. Este anticuerpo reconoce una región que normalmente permanece expuesta cuando se forman las fibrillas de A β , y se une al A β fibrilado en las placas más fuertemente que al A β soluble.

Este anticuerpo llegó a ensayos clínicos de fase III, sin embargo, no se encontró ningún efecto beneficioso en los estudios clínicos con este anticuerpo en pacientes con EA moderada (Bachurin et al, 2017). Bapineuzumab se administró por vía intravenosa a pacientes con EA de leve a moderada en dos estudios de fase III. En el primer ensayo, los portadores de APOE ϵ 4 se incluyeron y se empleó un régimen de dosificación reducido con el objetivo de mitigar los efectos secundarios. En el segundo ensayo de fase III, solo se reclutaron personas que no fueran portadoras de APOE ϵ 4. Después de 18 meses, los resultados no fueron diferentes en los pacientes tratados con Bapineuzumab que en los que recibieron placebo. El tratamiento con Bapineuzumab se asoció con un número significativo de anomalías de imagen relacionadas con amiloide con edema parenquimatoso (ARIA-E), así como microhemorragias intracelulares (ARIA-H). A raíz de los resultados clínicos negativos y el perfil de eventos adversos, el desarrollo de Bapineuzumab se ha detenido (Abushouk et al, 2017; Cao et al, 2018).

1.10.9 *BAN2401*

BAN2401 es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a las protofibrillas de A β . Este anticuerpo completó recientemente el ensayo de fase II con 856 sujetos con EA leve con patología confirmada de amiloide cerebral, con resultados positivos del grupo de tratamiento con dosis más alta (10 mg/kg, dos veces por semana). Se ha reportado que BAN2401 es capaz de impedir la agregación de protofibrillas de A β , reduce los niveles de protofibrillas de A β en el cerebro y en LCR en ratones transgénicos (Tucker et al, 2015).

1.10.10 *Inmunoglobulina intravenosa (IGIV)*

La IGIV es un anticuerpo derivado del plasma sanguíneo de donantes sanos que se utiliza para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. El fundamento de la IGIV en el tratamiento de la EA es que en la IGIV pueden estar anticuerpos dirigidos contra A β (Kaveri, 2012). Aunque la IGIV muestra propiedades seguras, bien toleradas, anti-amiloides y moduladoras inmunes en pacientes con EA, los ensayos

clínicos posteriores de la Fase III indican que la IGIV no ejerce efectos sobre la cognición o la función en pacientes con EA leve a moderada (Relkin et al, 2017) (Identificador de ensayo clínico: NCT00818662).

1.10.11 *Solanezumab*

Solanezumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a las formas monoméricas del péptido A β . Reconoce la región de 16-24 de A β (Cao et al, 2018). Lilly ha completado dos ensayos clínicos en fase III: EXPEDITION y EXPEDITION-2. Cada uno incluyó un periodo de tratamiento doble ciego aleatorizado de 18 meses durante el cual los pacientes recibieron Solanezumab (400 mg) o placebo cada 4 semanas. En los pacientes con EA leve se demostró una reducción en la tasa de deterioro cognitivo en el ensayo EXPEDITION, más no en EXPEDITION-2. Los datos combinados de los dos ensayos mostraron una reducción del 34% en el deterioro cognitivo de pacientes con EA leve (Lannfelt et al, 2014).

1.10.12 *Gantenerumab*

Gantenerumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-A β , desarrollado por Roche, tiene una alta capacidad para unirse específicamente a las placas amiloides y promueve su eliminación por fagocitosis mediada por el receptor Fc. El anticuerpo tiene dos sitios de unión en A β , uno N-terminal y la porción media del péptido (Bohrmann et al, 2012; Ostrowitzki et al, 2017).

En un estudio de fase I de 16 pacientes con EA leve a moderada, el tratamiento con Gantenerumab dio lugar a una rápida reducción de la carga de amiloide en el cerebro en el transcurso de 6 meses (Ostrowitzki et al, 2012), sin embargo a una dosis de 200 mg administrados por vía intravenosa, se detectó ARIA-E y ARIA-H en portadores de APOE ϵ 4. Es por eso que para el estudio de fase III (SCarlet RoAD) se evaluó el efecto del Gantenerumab en comparación con un placebo, el tratamiento duró 2 años. No obstante, en este estudio no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados con Gantenerumab y los pacientes a los que se les administró el placebo. La incidencia de ARIA aumentó de una manera dependiente del genotipo. El estudio se detuvo temprano por inutilidad, pero los efectos dependientes de la dosis observados en análisis exploratorios en determinados criterios de valoración clínicos y biomarcadores sugieren que una dosis más alta de Gantenerumab puede ser necesaria para lograr la eficacia clínica (Ostrowitzki et al, 2017).

1.10.13 *Crenezumab*

Crenezumab es un anticuerpo monoclonal de subclase IgG4 completamente humanizado contra A β que se une a formas monoméricas y oligoméricas, inhibe la agregación y promueve la degradación. La subclase IgG4 conduce a un funcionamiento efector reducido, es decir, una reducción en la fagocitosis mediada por Fc, y posiblemente reduce las reacciones inflamatorias. Se ha visto que en pacientes con EA

leve, Crenezumab a dosis altas es bien tolerado. Crenezumab se está evaluando en estudios de fase 3 contra un placebo para evaluar la eficacia y también para evaluar la seguridad en personas con EA prodromal a leve ([CREAD, NCT02670083; CREAD2, NCT03114657]). Se ha visto que el tratamiento con Crenezumab genera un aumento significativo de niveles de A β 1-42 en LCR en personas con EA leve (Cummings et al, 2018).

1.10.14 *Aducanumab*

Aducanumab se une selectivamente a los agregados de A β con una afinidad muy baja por los monómeros de A β , lo que promueve la eliminación específica de las especies de A β más tóxicas, sin interferencia de A β monomérico o fragmentos de β APP. Aducanumab se dirige a un epítipo que normalmente no está accesible en el monómero A β . (Sylvänen et al, 2018).

Este anticuerpo se sometió a estudios clínicos donde se evaluó la seguridad y farmacocinética de Aducanumab. Se administró de manera creciente de la dosis, empezando con una concentración desde 0,3 mg/kg, hasta llegar a 30 mg/kg en pacientes con EA leve a moderada. Se reportaron pacientes participantes con ARIA relacionado con el fármaco. Se determinó que Aducanumab era seguro a una dosis de 30 mg/kg (Dubois et al, 2010).

En 2012, Biogen anunció el inicio de un estudio con dosis múltiples de Aducanumab, en pacientes con EA prodromal o leve. Participaron 166 personas. En este estudio se evaluó el rendimiento de los criterios diagnósticos de investigación propuestos anteriormente por Dubois, et al., 2010 y Albert, et al., 2011. En 2014, Biogen anunció que pasaría a la Fase 3 basándose en datos provisionales que sugieren un compromiso objetivo y un beneficio cognitivo. Los resultados sugirieron que Aducanumab reducía la deposición de amiloide en el cerebro, se presentó ARIA-E en pacientes con genotipo ApoE4 (Dubois et al, 2010; Sevigny, et al., 2016).

En 2015, los resultados obtenidos de un estudio donde se utilizó el Aducanumab a una dosis de 6mg/kg mostraron que el fármaco es capaz de reducir los niveles de amiloide en el cerebro, además de reducir el deterioro cognitivo generado por la demencia al evaluar a los pacientes en pruebas de MMSE. ARIA-E se mostró más persistente en pacientes tratados con dosis altas y en pacientes con genotipo ApoE4. La Fase 1 de dosis crecientes de hasta 6 mg/kg se evaluó en 25 pacientes con EA leve a moderada. Se evaluó la eficacia de Aducanumab en la Fase 3 (estudio 221AD301 ENGAGE), con pacientes con EA leve a moderada, se planeaba continuar con esta fase hasta el año 2022, evaluando su capacidad para reducir el deterioro cognitivo, donde se pretende contrastar la acción de Aducanumab contra la administración de placebo durante un tratamiento de 18 meses. Estaba programado para llevarse a cabo en 1.350 pacientes en 131 sitios en América del Norte y Europa. En 2016, Biogen realizó un ajuste en las dosis utilizadas durante la fase 3 (Albert et al, 2011; Sevigny et al, 2016).

En marzo del presente año, Biogen y Eisai anunciaron que finalizarían todos los ensayos de Aducanumab actualmente en curso, citando un análisis interino que predijo que los estudios EMERGE y ENGAGE de Fase 3 no llegarían a finalizarse. Aducanumab no resultó ser eficaz para generar mejorías funcionales ni cognitivas en los pacientes de Alzheimer (Sevigny et al, 2016).

Numerosos estudios preclínicos han demostrado efectos significativos del tratamiento con anticuerpos monoclonales contra A β en modelos de ratones transgénicos (DeMattos et al, 2001; Lord et al, 2009; Tucker et al, 2015), se ha reportado una mejora en la cognición y una reducción en la patología de A β . Algunos de estos anticuerpos han llegado a ser estudiados en ensayos clínicos, donde muchos de ellos no han logrado reducir el deterioro cognitivo y la patología A β . Los resultados poco favorables de estos estudios pueden ser atribuidos al diseño del ensayo y los criterios para la inclusión del paciente, sin embargo, los anticuerpos mencionados anteriormente se unen a A β de forma generalizada, esto puede provocar que los anticuerpos sean secuestrados por el A β monomérico, que está presente en abundancia en la sangre y en el SNC, algunos se unen también a formas solubles de β APP, lo que disminuye los niveles periféricos del anticuerpo libre disponible para la degradación de A β (Sylvänen et al, 2018).

Tabla 2. Fármacos desarrollados para terapias dirigidas contra A β por inmunización pasiva. Todos los fármacos en esta tabla son anticuerpos, en inmunoterapia pasiva se han desarrollado principalmente anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente a A β de forma agregada, fibrilar, monómeros, etc. La mayoría de estos anticuerpos han llegado a ensayos clínicos, y han podido reducir la carga de A β en cerebro de pacientes con EA, además, han reducido el deterioro cognitivo generado por la patología de la enfermedad, sin embargo los efectos secundarios han persistido en algunos ensayos o han detenido los ensayos por inutilidad del fármaco.

Fármaco	Compañía	Tipo de anticuerpo	Epítipo de A β
Bapineuzumab	Elan/Wyeth/Pfizer	Anticuerpo monoclonal humanizado	N-terminal
Solanezumab	Eli Lilly	Anticuerpo monoclonal humanizado	Región media
Gammagard IVIG	ADCS/Baxter	Anticuerpo policlonal humano	Neoepitopos conformacionales de agregados de A β
Gantenerumab	Roche/Morphosys	Anticuerpo monoclonal humanizado	N-terminal y región media
Ponezumab	Pfizer	Anticuerpo monoclonal humanizado	C-terminal
Crenezumab	Genentech/Roche	Anticuerpo monoclonal humanizado	A β soluble y placas
BAN2401	Eisai/BioArctic	Anticuerpo monoclonal humanizado	Protofibrillas de A β
Aducanumab	Biogen/Eisai	Anticuerpo monoclonal humanizado	Agregados de A β

1.11 Mecanismos de acción de inmunoterapia anti-A β

Un desafío importante asociado con la inmunoterapia para la EA es el paso limitado de anticuerpos a través de la BHE, que controla el transporte de moléculas entre la sangre y el cerebro. Se ha informado que solo el 0,1% de los anticuerpos administrados periféricamente llegan al cerebro (Bard et al, 2000). Los conductos precisos para el transporte de anticuerpos al SNC no se han identificado completamente, pero incluyen el sistema linfático, los espacios perivasculares y las áreas dentro del SNC en las que la barrera hematoencefálica (BHE) tiene fugas (Syvänen et al, 2018).

Los anticuerpos pueden alterar la degradación de A β al interactuar con el sistema de transporte que mueve a A β dentro y fuera del compartimiento del SNC (Zlokovic, 2004). El influjo en el SNC se produce a través del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE), y se cree que el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) está involucrado en su flujo de salida (Lannfelt et al, 2014). La presencia de grandes cantidades de anticuerpos anti-amiloides en la circulación periférica puede crear una fuerza impulsora para el movimiento de A β fuera del SNC. Los anticuerpos en circulación contribuyen al equilibrio entre A β en la sangre y el SNC. Si los niveles de anticuerpos aumentan, la difusión pasiva a través de un gradiente de concentración puede ayudar a eliminar el A β monomérico del cerebro (De Mattos et al, 2001).

Las cantidades relativamente pequeñas de Ig que llegan al cerebro después de la administración periférica pueden ejercer una variedad de efectos sobre A β en el SNC. Para anticuerpos que se unen a A β , es probable que el tipo de efecto esté influenciado por el epítipo de unión del anticuerpo, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a formas solubles de A β pueden aumentar el equilibrio y el desplazamiento, mientras que los anticuerpos que se unen a la placa amiloide depositada requieren de la activación microglial para lograr la reducción de la placa (Lannfelt et al, 2014).

Se propusieron varios mecanismos para explicar la reducción de la deposición de A β por acción de anticuerpos específicos contra A β administrados en inmunoterapias:

- **Los anticuerpos dentro del cerebro también pueden activar las células de la microglia para eliminar a A β y sus agregados.** Esto podría ser a través de la inducción de fagocitosis mediada por Fc o de un mecanismo independiente de Fc. Este mecanismo se basa en el papel tradicional del anticuerpo para opsonizar antígenos que conducen a la fagocitosis de macrófagos y la activación de la vía del complemento (Weiner & Frenkel, 2006).
- **Los anticuerpos también pueden bloquear la toxicidad de A β o secuestrar monómeros de A β dentro del SNC, lo que evita que se agreguen.** Este mecanismo se conoce como mecanismo de disgregación catalítica, donde el anticuerpo se encarga de impedir la fibrillogénesis y la formación de agregados citotóxicos de A β , desensamblando estos agregados directamente, con lo que resulta una mayor cantidad de monómeros que son eliminados más fácilmente. Los anticuerpos actúan catalíticamente para modificar la estructura secundaria

de los monómeros de A β en una conformación que es menos probable que forme los agregados asociados con formas oligoméricas o fibrilares. Beka Solomon y sus colegas demostraron que los anticuerpos pueden modificar la estructura de A β y bloquear la formación de fibrillas de A β in vitro (Weiner & Frenkel, 2006; Morgan, 2011).

- **Los anticuerpos anti-A β pueden prevenir la deposición de A β a partir de la creación de un efecto de “Secuestro periférico”,** donde la eliminación del exceso de A β soluble que circula en el torrente sanguíneo, conduce a la extracción de A β soluble del cerebro (Wisniewski, 2014). Este Secuestro periférico altera el equilibrio a través de la BHE para que el A β favorezca el flujo de salida debido a la reducción del flujo libre. Se ha comprobado que varios anticuerpos con alta afinidad por A β elevan dramáticamente las concentraciones circulantes (Morgan, 2011).

Ninguno de estos mecanismos es mutuamente excluyente. Además, diferentes anticuerpos pueden utilizar diferentes mecanismos. Por ejemplo, los anticuerpos que no se unen al amiloide fibrilar pueden ser menos capaces de inducir la fagocitosis, pero pueden provocar un Secuestro periférico. Algunos anticuerpos pueden unirse a A β sin lograr modificar la estructura secundaria, pero aun así activar a la microglia y el transporte mediado por FcR.

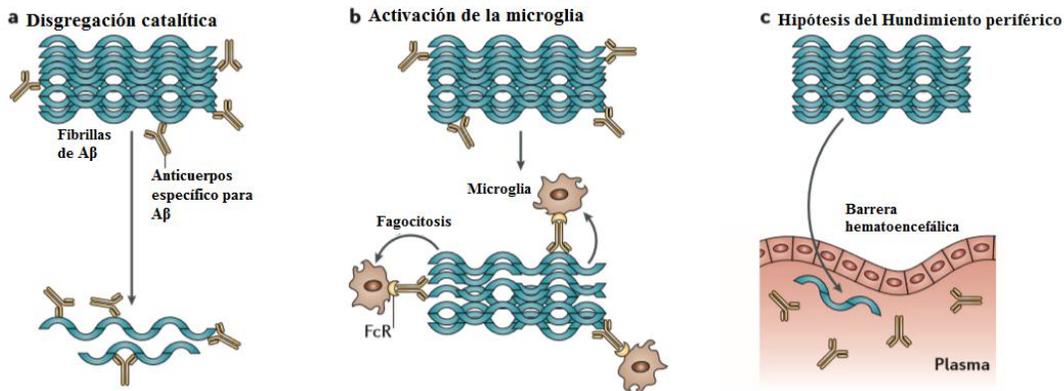


Figura 6. Mecanismos de acción de inmunoterapia anti-A β . a) La disgregación catalítica de A β se da mediante la unión al extremo N-terminal de A β . b) La activación de microglia ayuda a la degradación de A β . La microglia reconoce la región FcR del anticuerpo y comienza su activación. c) La hipótesis del Secuestro periférico menciona que el A β circulante es secuestrado, esto causa un flujo de salida de A β desde el cerebro al plasma. (Modificada de Weiner & Frenkel, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

La EA se caracteriza por dos factores fisiopatológicos: la formación de placas amiloides compuestas de péptido A β y la presencia de marañas neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada.

En la década de 1990, Selkoe y Hardy propusieron la Hipótesis de la cascada amiloide como una explicación de la generación de los agregados de A β , principalmente de A β 40 y A β 42, en el cerebro que posteriormente formaran placas amiloides, lo que conducirá al desarrollo de la EA. Con base en esta propuesta, el principal enfoque de las terapias contra esta enfermedad se dirigió contra las especies de longitud completa. Sin embargo, se ha propuesto que los oligómeros de A β juegan un papel importante en la formación de las placas amiloides cerebrales y por ende, en la patología de la EA. Estos oligómeros pueden estar agregados desde dímeros, trímeros, tetrámeros, e incluso pueden estar compuestos por péptidos con alguna modificación postraduccional o truncamiento en sus extremos N-terminal o C-terminal.

Recientemente se ha puesto en la mira el papel de los péptidos de A β truncados en el extremo N-terminal en la patología de la EA, ya que estos péptidos muestran una mayor propensión a la agregación, en comparación con los péptidos de longitud completa. Particularmente, los péptidos truncados en el extremo N-terminal y modificados con pyroGlu han llamado el interés de grupos de investigación, pues se ha comprobado que estos péptidos son abundantes en cerebros de pacientes con EA, mientras que en personas sanas se encuentran en muy poca o nula cantidad; también se han propuesto como especies semillas de agregación para las placas amiloides. Incluso se sabe que estas especies modificadas son más resistentes a la degradación por aminopeptidasas y son más tóxicas para las neuronas comparadas con las especies A β 40 y A β 42. Se observó que las especies de A β modificadas más abundantes en el cerebro de pacientes con EA son A β pyroGlu 3 y A β pyroGlu 11.

En el laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan se han desarrollado anticuerpos policlonales contra estas dos especies. A partir de la inmunización de conejos con A β pyroGlu 3-42, se generaron anticuerpos policloales anti-A β pyroGlu 3-42. Se comprobó que estos eran específicos para A β pyroGlu 3-42 (Acero et al, 2009).

También se desarrollaron anticuerpos policlonales contra A β pyroGlu 11-42, los cuales reconocían a los péptidos A β pyroGlu 11-42, A β pyroGlu 3-42 y A β 1-42. Se comprobó que estos anticuerpos reconocían agregados amiloides en tejidos cerebrales de pacientes con EA (Perez-Garmendia et al., 2010).

Varios grupos de investigación alrededor del mundo han generado terapias y anticuerpos dirigidos a A β , como los descritos anteriormente (Bapineuzumab, Crenezumab, etc.), que no están dirigidos a oligómeros de A β ni a especies modificadas que se sabe que son las especies más tóxicas de A β .

Sabiendo los nuevos enfoques que se han desarrollado a partir del descubrimiento del papel de los oligómeros y especies modificadas de A β en la patología y la progresión de la EA, además de las características físico-químicas que les confiere la modificación, como la resistencia a aminopeptidasas, el aumento de toxicidad y la tasa acelerada de agregación, y tomando en cuenta que las estrategias inmunoterapéuticas desarrolladas contra especies de A β de longitud completa no han sido exitosas, consideramos importante el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas para pacientes con EA, enfocadas en péptidos modificados como A β pyroGlu 3 y A β pyroGlu 11.

Por esa razón, en este trabajo se decidió evaluar un anticuerpo monoclonal anti-A β pyroGlu 11-42 obtenido en nuestro laboratorio.

3. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización del AcM anti-A β pE11-42 (4G11).

3.1 Objetivos particulares

- a) Identificar que subclase es el AcM 4G11 (anti-A β pE11-42).
- b) Evaluar la reactividad cruzada del AcM 4G11 con distintas especies del péptido A β .
- c) Identificar la región del péptido A β a la cual se une el AcM 4G11.
- d) Determinar a qué tipo de agregados se une el AcM 4G11.
- e) Purificar el anticuerpo 4G11.
- f) Evaluar la capacidad de 4G11 para reconocer A β pE11-42 en cortes de tejido de cerebro humano de pacientes con EA.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Identificación del isotipo del AcM 4G11 (anti-A β pyroGlu 11-42)

Se realizó un ensayo ELISA para la identificación del isotipo del AcM 4G11. La placa de microtitulación (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se sensibilizó con el péptido A β pyroGlu 11-42 sintético, con una concentración de 0.3 μ g/100 μ l, en buffer de carbonatos a pH 9.6. Se incubó por toda la noche a 4°C. El lavado de la placa se realizó con buffer PBS (1x) – Tween (0.2%), en cuatro ciclos, con 300 μ l utilizando un lavador automático (WellWash, Thermo Scientific, EUA). El bloqueo se realizó con PBS (1x) – Leche (2%) – Tween (0.2%) por una hora, a 37°C; después se lavó de la manera ya descrita.

El anticuerpo primario utilizado fue el AcM 4G11 del sobrenadante de cultivo a una dilución 1:10. El sobrenadante del anticuerpo monoclonal se diluyó en PBS (1x) – Leche (2%) – Tween (0.2%), se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente, se lavó igual que las veces anteriores, y se agregó el anticuerpo secundario.

Los anticuerpos secundarios se agregaron en volumen 100 μ l de PBS (1X) – Leche (2%) – Tween (0.2%) en cada pozo, se utilizaron anticuerpos contra distintos isotipos de IgG:

Anti-IgG Total	Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, USA
Anti-IgG1	Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, USA
Anti-IgG2a	Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, USA
Anti-IgG2b	Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, USA
Anti-IgG3	Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, USA

Los anticuerpos anti-IgG Total, anti-IgG1 y anti-IgG2a, se administraron en la placa a una dilución de 1:2500. Mientras que el anticuerpo anti-IgG2b se diluyó a 1:2000, y el anti-IgG3 a una dilución de 1:1000. Se incubó a 37°C por una hora.

Al terminar, se lavó la placa y se agregó el sustrato ABTS (ABTS single solution, Invitrogen, USA), incubando la placa a 37°C por 15 minutos, después se leyó con un lector de placas automático (Microplate Reader, Dynex, USA) a 405 nm, y se volvió a leer después de 25 minutos.

4.2 Evaluación de la reactividad cruzada del AcM 4G11 con distintas especies del péptido A β

Se sensibilizó una placa de microtitulación con las distintas especies de A β : A β 1-42 y A β 11-42, A β pyroGlu 3-42 y A β pyroGlu 11-42 a una concentración de 0.3 μ g/100 μ l de Buffer de carbonato/bicarbonato. La placa se incubó a 4°C toda la noche.

Después, se lavó con PBS (1x) – Tween (0.2%), en el lavador automático, a cuatro ciclos de 300 μ l. Se bloqueó con PBS (1x) – Leche (2%) – Tween (0.2%), durante una hora a 37°C.

Se lavó la placa y se agregó el anticuerpo primario. Como anticuerpos primarios se utilizaron el AcM 4G11, y también se utilizó una mezcla de los anticuerpos monoclonales comerciales BAM10 y el BAM90. El AcM 4G11 se utilizó a una dilución 1:10; la mezcla de los dos anticuerpos monoclonales BAM10 (dirigido a la parte amino-terminal de A β) y BAM90 (dirigido a la región media del péptido A β) se agregó a una dilución 1:500; todos en PBS (1x) – Leche (2%) – Tween (0.2%). Se agregó un suero positivo y un suero negativo a una dilución 1:200 como controles. Se incubó una hora a 37°C después del ciclo de lavado.

Se agregaron los anticuerpos secundarios. Se agregó anti-IgG Total para los sueros positivo y negativo a una dilución 1:5000; anti-IgG1 para los pozos con la mezcla de BAM10/BAM90 diluido a 1:5000; y anti-IgG2b para los pozos con el AcM 4G11 a una dilución de 1:5000. Se dejó incubar durante una hora a 37°C, seguido del lavado de placa. Luego se agregaron 100 μ l por pozo del sustrato ABTS (Single Solution, Invitrogen, USA), la placa se incubó a 37°C, para después leer la absorbancia con el lector de placas automático a 405 nm.

4.3 Identificación de la región del péptido A β pyroGlu 11-42 a la cual se une el AcM 4G11

El procedimiento de este ELISA es similar a los ya descritos. Se utilizaron los mismos buffers y los mismos aparatos. Se sensibilizó la placa con los distintos fragmentos del péptido A β a evaluar:

A β 12-28, A β 1-16 y A β 11-25 a una concentración de 1 μ g/100 μ l.

Como anticuerpos primarios se utilizaron el AcM 4G11 a una dilución 1:10; una mezcla de BAM10 y BAM90 a una dilución de 1:500; el suero positivo y el negativo como controles a una dilución de 1:200.

Como anticuerpo secundario se agregó anti-IgG Total para los sueros positivo y negativo a una dilución de 1:5000; el anti-IgG1 se usó para la mezcla de BAM10/BAM90 a una dilución de 1:5000; y el anti-IgG2b se usó para el AcM 4G11 a

una dilución de 1:5000. Se agregó ABTS, para después leer la reacción en la placa con el lector de placas automático a 405 nm.

4.4 Determinación del tipo de agregados a los que se une el AcM 4G11

Se realizó un ensayo de Western blot para determinar los tipos de agregados del péptido A β pyroGlu 11-42 a los cuales reconoce el AcM 4G11.

Para realizar el Western blot, se usó un gel de poliacrilamida al 15%. En este gel se separaron tres especies de péptidos de A β : A β 1-42, A β pyroGlu 3-42 y A β pyroGlu 11-42, a una concentración de 1 μ g/1 μ l cada uno. Se agregaron 2 μ g de cada péptido por carril, en 12 μ l.

La transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó a 25V por 1 hora, posteriormente se bloqueó con PBS 1x – Leche (2%) a 4°C.

Después se lavó la membrana tres veces con PBS 1x – Tween (0.2%), por 5 minutos cada uno de los lavados. La membrana se incubó con el AcM 4G11 diluido con PBS (1x) – Leche (2%) – Tween (0.2%), a una dilución de 1:1. Se lavó nuevamente la membrana, y se agregó el anticuerpo secundario, anti-IgG2b a una dilución de 1:2500, diluido en buffer de PBS 1X – Leche (2%) – Tween (0.2%). Se incubó en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó y se realizó la inmunodetección por quimioluminiscencia usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA).

La membrana se desnudó con 10 mL de Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Sci) por 15 minutos. Se lacó tres veces con 20 mL de PBS (1x). Se verificó la ausencia de luminiscencia con el mismo kit de inmunodetección.

Posteriormente se realizó un segundo Western Blot, usando el mismo kit de inmunodetección y con la misma membrana pero utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo comercial, 4G8, este anticuerpo reconoce a todas las especies de A β . Se utilizó a una dilución de 1:5000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG2b a una dilución de 1:5000.

4.5 Purificación del anticuerpo 4G11

Se realizó una cromatografía de afinidad con proteína A, con el fin de purificar el AcM 4G11 a partir del sobrenadante.

Se centrifugó el sobrenadante a 4500 RPM por 10 minutos; después se filtró con una membrana con poros de 0.45 μ m Nalgene. Ajustamos el pH \geq 8 con buffer Tris 2M con pH $>$ 8. Se montó una columna para cromatografía, la cual cuenta con una fase

estacionaria de perlas de agarosa con proteína A acoplada; se lavó con buffer Tris 0.1 M/NaCl 0.2 M a pH 8.2.

Después del lavado de la columna se pasaron 150 mL de sobrenadante a través de la columna. El eluato se guardó a 4°C y la columna se lavó cuatro veces con 3 mL de buffer Tris 0.1 M/NaCl 0.2 M a pH 8.2 y se guardó el cuarto lavado en un microtubo. Se hizo la elución con glicina a 0.2 M a pH 2.8. Se colectaron fracciones de 1.5 mL en microtubos de 2 ml con 150 µl de Tris 2M a pH 8.

Realizamos la lectura de absorbancia de las fracciones a 280 nm; y determinamos la concentración de anticuerpo (mg/ml) con el parámetro establecido para inmunoglobulinas, 1.4 O.D. = 1 mg/ml. Este procedimiento se realizó cuatro veces sobre la misma columna previamente lavada. Se seleccionaron las 4 fracciones con la concentración más alta de inmunoglobulinas. A las fracciones obtenidas de la elución las unimos en un pool, se determinó la concentración final. Se prepararon alícuotas de 50 µl y se guardaron a -80°C.

4.6 Titulación del anticuerpo monoclonal 4G11 purificado

Con el fin de titular al anticuerpo monoclonal 4G11 purificado, se realizó un ensayo ELISA.

La placa (Nunc Maxi Sorp, Denmark) se sensibilizó con el péptido AβpyroGlu 11-42 a 0.3µg/100µl. Se realizaron diluciones seriales del anticuerpo 4G11 purificado:

1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400.

El AcM 4G11 se diluyó en buffer PBS - Leche 2% -Tween 0.2%. Como anticuerpo secundario utilizamos un anticuerpo anti-IgG2b de ratón (Goat Anti-Mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate, Invitrogen, USA) a una dilución de 1:2500. Se leyó la absorbancia de la placa a 405 nm en el lector de placas automático.

4.7 Tinción de cortes de tejido de cerebro humano con 4G11

Se evaluó la capacidad del AcM 4G11 para reconocer a AβpyroGlu 11-42 en cortes de tejido de cerebro humano de pacientes con EA. Para ello se realizaron tinciones en muestras de tejido cerebral humano.

Los cortes de tejido de cerebro humano de pacientes diagnosticados con EA se obtuvieron del Banco Nacional de Cerebros, CINVESTAV-IPN, CDMX. Se seleccionaron tres tejidos. Dos de ellos eran de pacientes diagnosticados con EA, uno era de una persona sana.

Los tejidos se lavaron 2 veces con TBS (1x). La exposición de epítomos se realizó mediante la incubación en ácido fórmico (JT. Baker) al 70% durante 3 minutos, seguido de la incubación en Buffer de Citratos (0.1M ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6.0) durante 30 min a 60°C. Posteriormente, los tejidos se lavaron 2 veces con TBS (1x), después 15 minutos con TBS (1x) -Tritón X100 (0.1%) y 20 minutos con TBS (1x) – Tritón x – 100 (0.1%) - BSA (2%).

Los tejidos se incubaron con el AcM 4G11 a una dilución 1:100 y BAM 10 a una dilución 1:2000 en TBS (1x) – Tritón X100 – Suero normal de cabra (5%) a 4°C toda la noche.

Posteriormente, los tejidos se lavaron por cinco minutos secuencialmente con TBS (1x) / TBS (1x) – Tritón X100 (0.1%) / TBS (1x) – Tritón X100 (0.1%) – BSA (2%), y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-IgG2 de ratón ALEXA488, diluido 1:1000 y con el anticuerpo anti-IgG1 de conejo ALEXA594 a una dilución 1:2000 en TBS 1x – Tritón X100 (0.1%) – Suero normal de cabra (5%).

Se lavaron los tejidos por cinco minutos secuencialmente con TBS 1x / TBS 1x – Tritón X100 (0.1%) / TBS (1x) – Tritón X100 (0.1%) – BSA (2%), y se montaron sobre un portaobjetos con VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc., EUA) para su análisis en el microscopio de fluorescencia.



TEJIDO 1

- Tejido de cerebro de paciente con EA
- Se administraron anticuerpos primarios.
- Se administraron anticuerpos secundarios.



TEJIDO 2

- Tejido de cerebro de paciente con EA.
- Se administraron solo los anticuerpos secundarios.



TEJIDO 3

- Tejido de cerebro que no presenta patología de la EA.
- Se administraron los anticuerpos primarios.
- Se administraron los anticuerpos secundarios.

Figura 7. Diseño experimental de la tinción de tejido cerebral. Se utilizaron cortes de tejido cortical de 3 personas. Dos de estos presentan la patología de la EA, mientras que uno no (control). El Tejido 2 se utilizó como control para descartar la fluorescencia de fondo en el ensayo.

4.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de la medición de absorbancia (nm) en los ensayos ELISA, fueron colectados y analizados por medio del programa EXCEL, de Microsoft Office 2010. Se generaron graficos e imágenes derivadas de los resultados.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación del isotipo del AcM 4G11

Anteriormente en el laboratorio se determinó, por ensayos inmunológicos, que el AcM 4G11 es una inmunoglobulina de clase IgG.

Para determinar la subclase del anticuerpo monoclonal 4G11, se realizó un ensayo de ELISA. Después de analizar los resultados obtenidos a partir de la lectura de absorbancia (Figura 8), determinamos que el anticuerpo 4G11 es una inmunoglobulina de subclase IgG con isotipo 2b. También se observa una reacción hacia IgG total, como se esperaba.

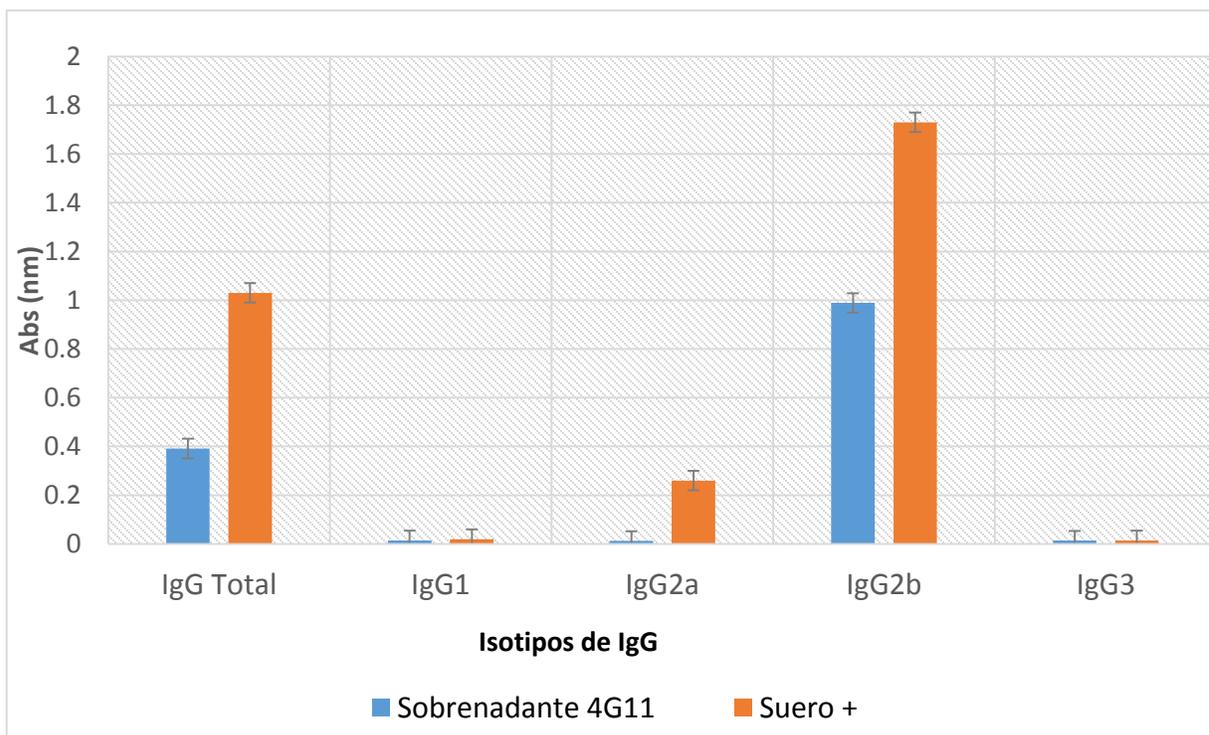


Figura 8. Identificación de subclase del AcM 4G11. Se realizó un ELISA para determinar la subclase de este anticuerpo monoclonal. Los resultados muestran que es un anticuerpo de isotipo IgG2b.

5.2 Evaluación de la especificidad del AcM 4G11

Con el fin de evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-A β pyroGlu 11-42, 4G11, y saber si tiene reactividad cruzada con otras especies del péptido A β , realicé un ELISA utilizando diferentes péptidos amiloides.

En este ensayo se evaluó la reactividad del anticuerpo contra las especies: A β 1-42, A β 11-42 y A β PyroGlu 11-42 y A β pyroGlu 3-42. Los resultados se muestran graficados en la Figura 9.

La mezcla de BAM 10 y BAM 90, reconoce a todas las especies evaluadas. Los sueros, tanto positivo como negativo, no reaccionaron con las especies A β 1-42, A β 11-42 y A β pyroGlu 3-42, sin embargo el suero positivo (+), mostró reacción con A β pyroGlu 11-42. El AcM 4G11 no tiene reactividad cruzada con las otras especies de A β evaluadas, 4G11 reconoce específicamente al péptido A β pyroGlu 11-42.

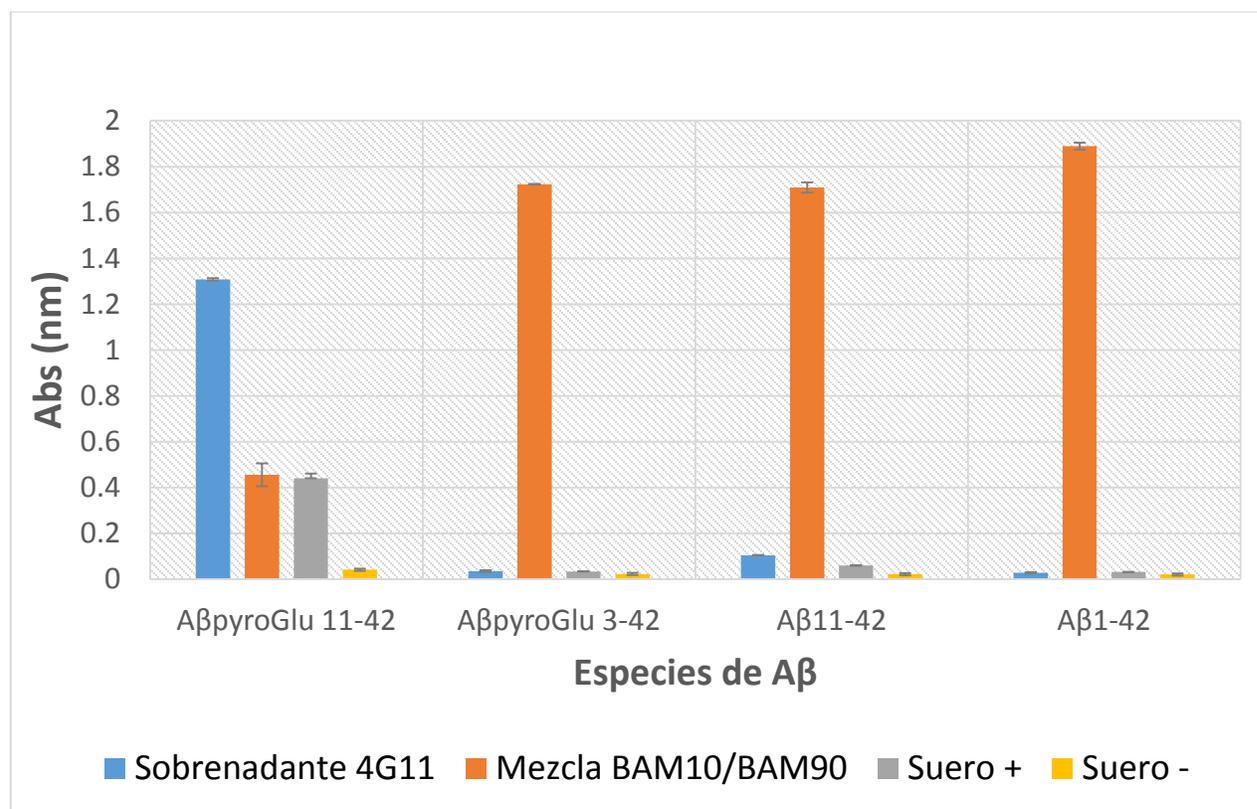


Figura 9. Evaluación de reactividad cruzada del AcM 4G11 contra distintas especies de A β . 4G11 no muestra reactividad cruzada con las especies A β 11-42, A β 1-42 y A β PyroGlu 3-42, solo reconoce a A β pyroGlu 11-42.

5.3 Identificación del epítipo reconocido por 4G11 a partir de un Mapeo de epítipos

Con el objetivo de identificar la región del péptido A β pyroGlu 11-42 a la cual se une el AcM 4G11, se realizó un mapeo de epítipos. En el ensayo ELISA se evaluó la reactividad del anticuerpo contra distintos fragmentos de A β . Estos fragmentos fueron:

A β 1-16, A β 11-25 y A β 12-28.

El anticuerpo monoclonal 4G11 no reacciona con ninguno de los fragmentos evaluados en el ensayo ELISA (Figura 10). La mezcla de BAM10/BAM90 sí reconoce estos fragmentos, lo que nos indica que los péptidos están en la placa.

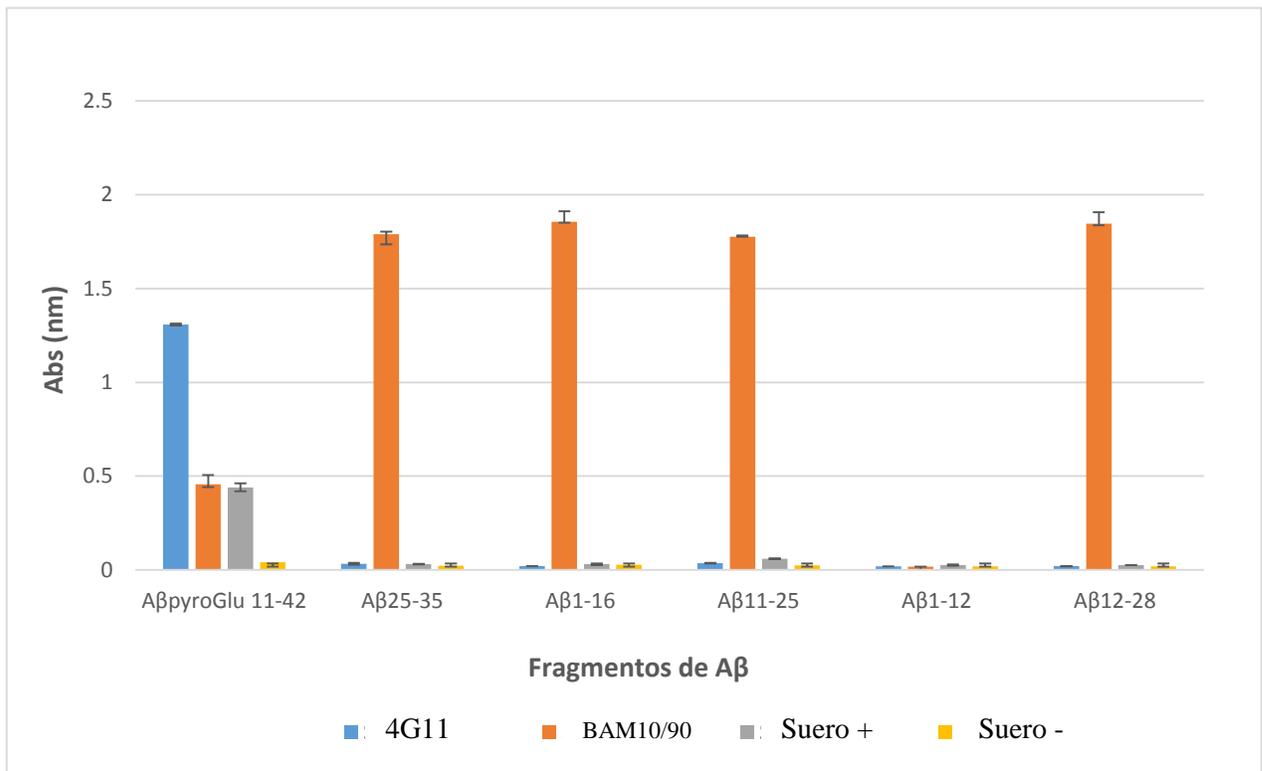


Figura 10. Mapeo de epítipos. Con el fin de identificar la región en la cual 4G11 se une a A β pyroGlu 11-42 se realizó un ensayo ELISA. Ninguno de los fragmentos de A β fue reconocido por 4G11. La mezcla de BAM10/BAM90 reconoce a los tres fragmentos utilizados en el ensayo.

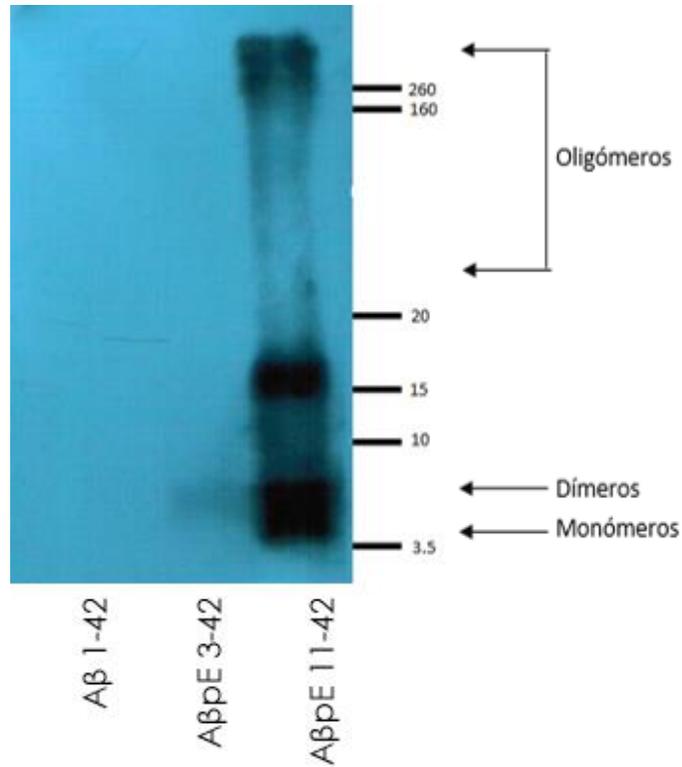
5.4 Análisis por Western blot para evaluar la especificidad y los agregados del péptido A β pyroGlu 11-42 que reconoce el anticuerpo 4G11

Para corroborar la especificidad y para conocer cuáles son los tipos de agregados del péptido A β pyroGlu 11-42 que reconoce nuestro anticuerpo monoclonal 4G11, se realizó un Western blot. Se evaluó el reconocimiento de A β pyroGlu 11-42, A β pyroGlu 3-42 y A β 1-42 por 4G11 y por un anticuerpo comercial anti-A β , 4G8. En las películas obtenidas podemos observar la reactividad de los dos anticuerpos.

En la Figura 11(a), se observa que el anticuerpo 4G11 reconoce a A β pyroGlu 11-42 específicamente, y no reconoce a las otras dos especies. También se observa que reconoce distintos agregados del péptido, principalmente reconoce monómeros, dímeros, tetrámeros y agregados de alto peso molecular (>160 kDa), sin embargo reconoce con menor intensidad agregados de A β pyroGlu 11-42 con peso molecular entre 20 y 160 kDa.

En la Figura 11(b) se muestra el reconocimiento por 4G8 de los péptidos A β pyroGlu 11-42, A β pyroGlu 3-42 y A β 1-42. 4G8 reconoce a A β y su epítipo se encuentra entre los aminoácidos 18-22. En la película se observa que reconoce a las tres especies y a sus agregados.

11 (a)



11 (b)

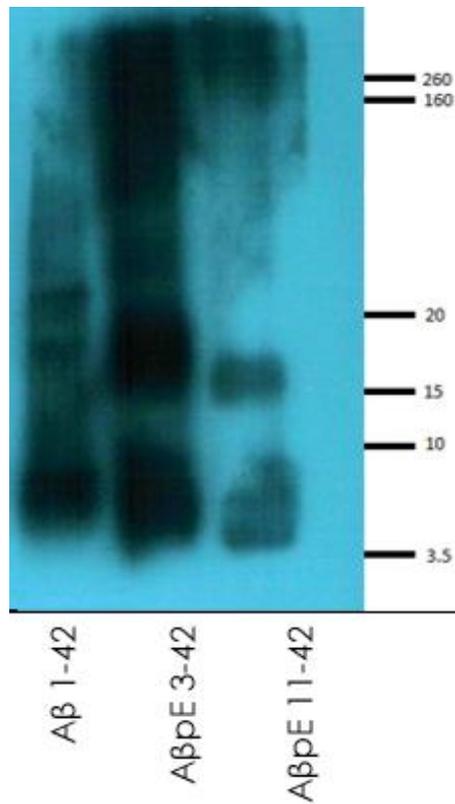


Figura 11. Reconocimiento de agregados de AβpyroGlu 11-42 por 4G11. (a) 4G11 reconoce específicamente a AβpyroGlu 11-42 y puede unirse a distintos agregados de este: monómeros, dímeros, tetrámeros y otros oligómeros. (b) Reconocimiento de péptidos Aβ por el AcM comercial 4G8. En contraste con 4G11, 4G8 reconoce a las tres especies de Aβ evaluadas.

5.5 Purificación del anticuerpo 4G11

Se purificó el anticuerpo 4G11 por medio de una cromatografía de afinidad con proteína A. La proteína A tiene una gran afinidad por la región Fc de las inmunoglobulinas de tipo IgG.

El sobrenadante se sometió a una cromatografía de afinidad, donde las IgG presentes fueron retenidas por las perlas de proteína A. Las IgG retenidas en la columna fueron eluidas por un choque de pH. Se colectaron 4 fracciones en cada una de las 4 cargas de 150 ml de sobrenadante de cultivo y se leyó la absorbancia de cada una de ellas. Se mezclaron las fracciones con la mayor concentración de anticuerpo en cada carga de sobrenadante. En la Figura 12 se muestra los datos obtenidos de cada fracción después de evaluar su absorbancia, además, se obtuvieron las concentraciones de anticuerpo de cada fracción. La concentración de anticuerpos se obtuvo basándonos en los parámetros de densidad óptica conocidos para inmunoglobulinas. Se obtuvieron buenas concentraciones de anticuerpos. El anticuerpo purificado se alicuotó y se mantuvo a una temperatura de -80°C y se utilizó en distintos experimentos, además de continuar con su caracterización.

Tabla 3. Concentración de anticuerpo monoclonal 4G11 purificado. Se realizó una cromatografía de afinidad con proteína A para su purificación. Podemos observar la concentración en mg/ml de cada fracción obtenida de la purificación.

Fracciones	Absorbancia (nm)	Concentración (mg/ml)
Fracción 1	0.961	0.686
Fracción 2	0.931	0.665
Fracción 3	1.023	0.730
Fracción 4	1.082	0.772

5.6 Titulación del anticuerpo monoclonal 4G11 purificado.

Después de obtener el anticuerpo purificado y corroborar su especificidad con un ensayo de Western blot, se realizó la titulación de nuestro anticuerpo.

Se realizó un ensayo ELISA. Se hicieron diluciones seriales de 4G11 purificado en buffer de PBS. Al hacer la lectura de la placa se obtuvo una curva, conforme la concentración del anticuerpo disminuye, la reacción es menor. En la Figura 13 se muestra la curva de titulación obtenida con los datos de la lectura de absorbancia.

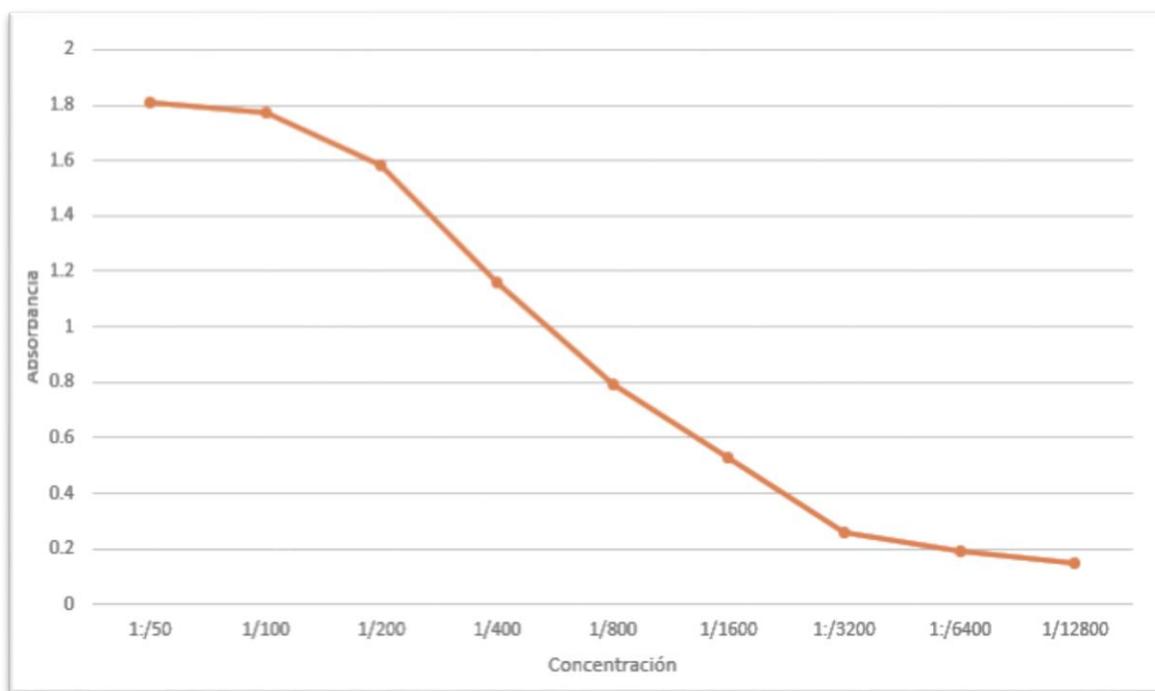


Figura 12. Curva de titulación del AcM 4G11 purificado.

5.7 Evaluación de la capacidad de 4G11 para reconocer a A β pyroGlu 11-42 en cortes de tejido de cerebro humano de pacientes con EA.

Realizamos una tinción de cortes de tejido de cerebro humano con el fin de evaluar la capacidad de 4G11 para reconocer agregados amiloides en cerebros de pacientes con EA.

Nuestros resultados nos muestran que 4G11 es capaz de reconocer agregados amiloides en el cerebro de pacientes con EA (Figura 14).

En los incisos A, B y C de la Figura 14 se muestra el análisis de la región cortical de un corte de tejido cerebral de un paciente diagnosticado con EA. En la 14A se observa la unión de 4G11 a agregados amiloides en la corteza cerebral (verde); en la figura 14B podemos observar el reconocimiento de placas amiloides por el anticuerpo BAM10 (rojo); en la figura 14C se muestra el merge de las figuras 14A y 14B, donde podemos observar una colocalización de algunos agregados reconocidos por 4G11 (verde) y placas de A β reconocidas por BAM10 (rojo). También podemos ver en el merge que la región central de la placa amiloide enfocada en la imagen está coloreada de amarillo, debido a la colocalización de BAM10 y 4G11, lo que sugiere que en el centro de la placa se encuentran A β pyroGlu 11-42 (reconocido por 4G11) y A β 1-42 (reconocido por BAM10).

En los incisos D, E y F de la Figura 14, vemos el análisis de la corteza cerebral de un paciente con EA, que utilizamos como control. En este caso no se agregaron los anticuerpos primarios. No se observa tinción de agregados amiloides por BAM10 ni por 4G11.

En los incisos G, H e I, se muestra el corte cerebral de una persona que no fue diagnosticada con la EA. No presenta tinción de agregados A β , ni de placas amiloides.

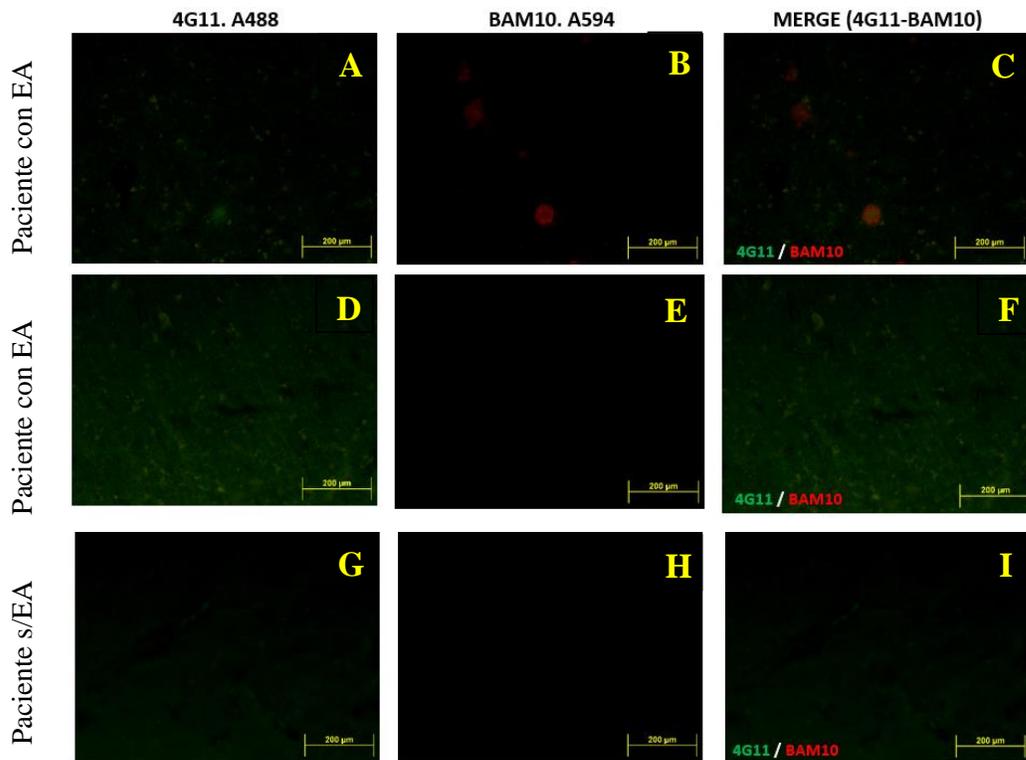


Figura 13. Tinción de tejido de cerebro humano por inmunofluorescencia. Se realizó un ensayo de inmunodetección de agregados amiloides en tejidos de cerebro humano de pacientes con EA. Se muestra la capacidad de 4G11 para unirse a agregados amiloides en tejidos de cerebro de paciente con EA, observamos que 4G11 reconoce agregados colocalizados con las placas amiloides.

6. DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica caracterizada por la disminución de la función cognitiva, la memoria, las manifestaciones neuroconductuales, el aislamiento social y otros síntomas conductuales. La EA es la causa más común de demencia en el envejecimiento y representa el 60–80% de todos los casos (Wu, 2017).

La prevalencia de la EA ha aumentado dramáticamente en la última década y se espera aumente en los próximos años. Esta enfermedad es multifactorial y hasta el momento no hay cura. Por estas razones, la demanda para el desarrollo de opciones adecuadas de prevención y tratamiento de la enfermedad seguirá en aumento (Wu, 2017).

La EA se caracteriza por la presencia de placas seniles y marañas neurofibrilares, que resultan de la acumulación y deposición del péptido β -amiloide ($A\beta$) y la agregación de la proteína tau hiperfosforilada, respectivamente. Inicialmente, se pensó que las fibrillas de $A\beta$, que forman placas amiloides, eran la causa principal de la neurodegeneración en los cerebros con AD, sin embargo muchos estudios confirman que la formación de placas de $A\beta$, principalmente compuestas de $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$, no tiene efectos directos en el desarrollo de la neurodegeneración y otros síntomas clínicos de la EA, incluso se han identificados placas amiloides en cerebros de pacientes que no tienen la EA. Con el tiempo, se fue dando más atención a las formas oligoméricas solubles de $A\beta$, que desempeñan un papel destacado en el desarrollo de déficits cognitivos dirigido a las sinapsis e interrumpiendo las vías de señalización sináptica. Si bien este paradigma es ampliamente aceptado en la actualidad en el campo de la EA, los detalles moleculares no se han aclarado completamente (Pozueta et al, 2013).

Recientemente, se han identificado variantes de $A\beta$ truncados en el extremo amino que son exclusivas de los cerebros de pacientes con EA, incluidos los péptidos piroglutamados. Estos péptidos piroglutamados representan más del 50% del $A\beta$ total de las placas en los cerebros de un número importante de pacientes con EA (Wirhth et al, 2013). En comparación con los $A\beta$ de longitud completa, los piroglutamados tienen más resistencia proteolítica, aumentan la hidrofobicidad y se agregan más rápidamente. Estos hallazgos sugieren que los péptidos piroglutamados son especies importantes e iniciadoras de la patología de la EA, especialmente en etapas tempranas, antes de que se puedan detectar los agregados de $A\beta$. Las terapias dirigidas a especies de $A\beta$ modificadas, principalmente las piroglutamadas, son una vía prometedora para tratar la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

La inmunoterapia ha sido una de las vertientes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer más prometedora. Se han realizado estudios tanto de inmunoterapia pasiva como de activa. Aunque se han visto resultados prometedores en modelos animales, la mayor parte de los ensayos clínicos son detenidos por inutilidad o por efectos secundarios adversos. Los ensayos con inmunoterapia pasiva han sido los mejor

evaluados en ensayo clínicos, ya que han logrado reducir cargas totales de A β en cerebro, además de mejorar el déficit cognitivo alterado por la EA en los pacientes, sin embargo, algunos pacientes llegan a presentar efectos adversos o en algunos casos, los beneficios obtenidos por la terapia no son significativos.

Pese a estos resultados, la inmunoterapia pasiva es una de las alternativas más convincentes para el tratamiento de la EA, ya que esta enfermedad se presenta principalmente en personas mayores a 65 años de edad, cuando el sistema inmunitario comienza a deteriorarse y mostrar un estado senescente.

Así mismo, varios grupos han desarrollado anticuerpos monoclonales con el fin de desarrollar una inmunoterapia para la EA, administrando por medio de una vacuna anticuerpos dirigidos a A β . Algunos de ellos han llegado a ensayos clínicos e incluso hoy en día siguen en evaluaciones clínicas. Sin embargo, estas estrategias de vacunación no discriminan entre las especies de A β de longitud completa y las especies modificadas.

Distintos grupos han descrito la importancia de los péptidos de A β modificados en la EA, y se ha corroborado que las estrategias terapéuticas dirigidas hacia estas especies son prometedoras. En nuestro laboratorio se han desarrollado anticuerpos policlonales dirigidos contra la especie A β pyroGlu 11-42, estos anticuerpos reconocen a las especies A β pyroGlu 11-42, A β pyroGlu 3-42 y a A β 42 (Perez-Garmendia et al, 2010). También se han desarrollado en el laboratorio anticuerpos policlonales contra A β pyroGlu 3-42, los cuales son altamente específicos para A β pyroGlu 3-42 (Acero et al, 2009). Actualmente, se está desarrollando un anticuerpo monoclonal dirigido a A β pyroGlu 3-42, y se ha demostrado que es altamente específico para esta especie.

En este trabajo hemos desarrollado un anticuerpo monoclonal contra la especie A β pyroGlu 11-42, la cual es una especie de A β truncada en el extremo N y modificada por la QC, formando un residuo piroglutamado en el extremo amino.

El anticuerpo anti- A β pyroGlu 11-42 (4G11) fue generado a partir de inmunizaciones con péptido A β pyroGlu 11-42 en ratones de la cepa BALB/c. Posteriormente se generó el anticuerpo monoclonal a partir de la obtención de anticuerpos policlonales. A partir de la obtención de un sobrenadante donde se encontraba el anticuerpo 4G11, se comenzó con la caracterización. Realizar la caracterización de este anticuerpo 4G11, es crucial para conocer el potencial terapéutico y de utilidad en la investigación de la EA.

Con pruebas anteriores en el laboratorio, pudimos detectar que 4G11 es un anticuerpo de clase IgG, por lo que realizamos posteriormente la determinación de la subclase del anticuerpo.

Para determinar la subclase del 4G11, se realizó un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). 4G11 resultó ser un anticuerpo de tipo IgG2b. Saber el isotipo nos ayudará para utilizar los productos correspondientes para IgG2b en los siguientes experimentos.

Es interesante mencionar que el suero positivo, extraído de una muestra de sangre de uno de los ratones inmunizados con A β pyroGlu 11-42 y utilizados para la generación del anticuerpo monoclonal, tiene anticuerpos específicos anti- A β pyroGlu 11-42 de isotipo IgG2b, similar al anticuerpo 4G11, y de isotipo IgG2a. Esto se debe a que en un suero existen anticuerpos policlonales, que pueden reconocer otros epítomos del mismo péptido y a su vez, pertenecer a otra subclase. También, nos indica que hay una respuesta mixta Th1/Th2 en ratones inmunizados con A β pyroGlu 11-42 en adyuvante Freund.

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos con una alta especificidad de reconocimiento de un epítomo presente en la molécula que se utilizó para la inmunización. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales pueden reconocer otras moléculas que tienen el mismo epítomo o un mimótopo que mimetiza el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal. Para evaluar la especificidad de 4G11, realizamos un análisis de reactividad cruzada por medio de un ensayo ELISA. Esto para asegurar que 4G11 reconoce únicamente al péptido A β pyroGlu 11-42 y no reconoce a otros péptidos de A β . Evaluamos la reactividad del anticuerpo monoclonal 4G11 contra A β pyroGlu 3-42, para descartar que reconoce a otros péptidos piroglutamados en el extremo N-terminal. Evaluamos la reactividad de 4G11 con A β 11-42 para saber si reconocía a péptidos de A β con una longitud parecida a A β pyroGlu 11-42. También incluimos a A β 1-42 para asegurarnos de que 4G11 no reconoce péptidos de A β de longitud completa. Demostramos que, ninguno de los péptidos mencionados es reconocido por 4G11.

El epítomo es la región de la molécula diana que reconoce el anticuerpo y al cual se une. 4G11 es un anticuerpo monoclonal, que reconoce específicamente a A β pyroGlu 11-42. Para la identificación del epítomo de 4G11 se realizó un mapeo de epítomos por un ensayo ELISA. En este ensayo utilizamos fragmentos de A β para poder localizar la región a la cual se une 4G11. Se utilizaron los fragmentos: A β 1-16, A β 11-25 y A β 12-28.

En este experimento también usamos la mezcla de BAM10 y BAM90 como control positivo. Observamos que esta mezcla sí reconoce a todos los fragmentos de A β que utilizamos. Por otro lado, 4G11 no presentó reactividad con ninguno de los fragmentos evaluados (Figura 10).

Dada la relevancia de los oligómeros de A β en la patología de la EA que se ha descubierto recientemente, consideramos importante que un anticuerpo utilizado como agente terapéutico contra a EA sea capaz de reconocer distintos agregados amiloides, como monómeros, dímeros y otros oligómeros.

Evaluamos la especificidad del anticuerpo monoclonal 4G11, así como su capacidad para reconocer distintos agregados de A β pyroGlu 11-42 por un ensayo inmunológico de Western blot. 4G11 es capaz de reconocer agregados del péptido A β pyroGlu 11-42 específicamente (Figura 11a) y no reconoce otras especies de A β , como A β pyroGlu 3-42 o A β 1-42. También es capaz de reconocer distintos oligómeros de A β pyroGlu 11-

42, como monómeros, dímeros, tetrámeros y oligómeros de alto peso molecular (>160 kDa).

Esta capacidad de unirse a distintos agregados de A β pyroGlu 11-42 es favorable, la importancia de los péptidos de A β truncados y modificados en la patología de la EA se ha venido comprobando en los últimos años. Estas son especies muy tóxicas y se ha visto que son las especies precursoras para la deposición de A β y la posterior formación de placas amiloides. El que 4G11 pueda reconocer distintos oligómeros de A β pyroGlu 11-42 nos lleva a pensar que el anticuerpo podría llegar a tener una participación importante como agente terapéutico contra la EA, ya que dirigiéndose a estas especies, podría ayudar a detener la progresión de la enfermedad.

En nuestro laboratorio ya se han generado anticuerpos policlonales contra especies modificadas de A β , particularmente se desarrollaron anticuerpos anti-A β 11-42 y anti-pyroGlu 11-42, y se observó que el anticuerpo anti-A β 11-42 es capaz de reconocer agregados amiloides en cerebro de pacientes con EA; por otro lado, el anticuerpo policlonal anti-A β pyroGlu 11-42 es capaz de reconocer agregados amiloides en cerebro de ratones transgénicos 3xTg-AD y en cerebro de pacientes con EA (Rodríguez-Rosales [Tesis de maestría], 2015) (Pérez-Garmendia [Tesis de maestría], 2011).

En los ensayos de detección de agregados amiloides por inmunofluorescencia en tejidos de cerebro de pacientes con EA, podemos observar que 4G11 reconoce agregados amiloides en la región del hipocampo, la cual es una región importante para los procesos cognitivos y de memoria (Figura 14). Además, podemos observar que 4G11 solo reconoce agregados en tejidos de pacientes con EA, pero no reconoce ningún agregado en tejido de personas que no presentan la patología de la EA. Esto puede reforzar la teoría de que A β pyroGlu 11-42 es un péptido importante en el desarrollo de la EA, y se presenta principalmente en personas que padecen la enfermedad, por lo que A β pyroGlu 11-42 es un blanco potencial para dirigir terapias específicas para detener la progresión de la enfermedad.

También podemos observar que 4G11 reconoce agregados que se colocan con las placas amiloides particularmente en la región central de la placa, esto nos lleva a deducir que A β pyroGlu 11-42 se encuentra principalmente en la región central de las placas, pues es una especie que está presente desde etapas tempranas de la enfermedad y es considerada como semilla de agregación.

En la actualidad, no hay terapias efectivas para modificar el curso de la enfermedad de manera eficaz. Los tratamientos actuales disponibles para la EA están limitados a tratamientos sintomáticos que consisten principalmente en inhibidores de la acetilcolinesterasa, como el donepezilo, galantamina y rivastigmina, y el antagonista del receptor N-metil-D-aspartato - memantina. Los estudios más recientes se centran en explorar posibles terapias innovadoras, para evaluar si es posible o no modificar el curso de la EA (Apter et al, 2015; Reiman et al, 2016).

Investigaciones recientes señalan que, A β y sus oligómeros modificados se relacionan directamente con el deterioro cognitivo (Koffie et al, 2009). Además, algunos ensayos realizados recientemente con pacientes con EA familiar y esporádica han revelado una fase preclínica prolongada, esta fase se desarrolla aproximadamente 20 años antes del inicio de la demencia o la aparición de algún síntoma (Bateman et al, 2012; Villemagne et al, 2013). Durante esta etapa, el proceso de deposición A β ha avanzado muy lentamente, por lo que una herramienta de diagnóstico temprana se vuelve necesaria para poder diagnosticar y comenzar un tratamiento terapéutico o de prevención de manera oportuna.

Se han propuesto distintas estrategias para tratar la EA, entre estas, las que están enfocadas a la reducción de A β son de las más estudiadas desde hace una década, aproximadamente. Estas estrategias contra A β tienen dos vertientes, 1) reducir la producción de A β por medio de la inhibición de las enzimas γ -secretasa y β -secretasa y 2) potenciar la degradación de A β con ayuda de anticuerpos específicos contra distintas especies de A β , o contra A β soluble, contra A β fibrilar o contra las placas amiloides.

En la actualidad, la inmunoterapia representa uno de los enfoques más innovadores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se han desarrollado varios estudios donde se desarrollan tanto vacunas para inmunoterapia activa como pasiva (Panza et al, 2012; Li et al, 2013).

Se realizó la caracterización del anticuerpo monoclonal 4G11 dirigido contra la especie A β pyroGlu 11-42, el cual demostró ser altamente específico en el reconocimiento del péptido y fue capaz de reconocer sus agregados en cerebro de pacientes con EA. Aunque se realizó el mapeo de epítomos, este método no fue efectivo para identificar el epítomo de 4G11, es por esto que consideramos que se trata de un epítomo conformacional, por lo que se requerirá realizar otros experimentos en el laboratorio que nos permitan conocerlo.

Proponemos el uso de anticuerpos específicos para especies de A β modificadas, como A β pyroGlu 11-42, como agentes terapéuticos para el desarrollo de vacunas con el fin de generar una terapia de inmunización pasiva dirigida contra las especies de A β modificadas con piroglutamado, las cuales se ha comprobado que son especies muy tóxica, resistentes a aminopeptidasas, con una tasa acelerada de agregación, se presentan en etapas tempranas de la enfermedad y son precursoras de la formación de placas amiloides en el cerebro de pacientes con EA, además se observado que A β pyroGlu 11-42 solo se encuentra en cerebros de pacientes que presentan la patología de la EA, mientras que personas que no padecen esta enfermedad no muestran agregados del péptido.

7. CONCLUSIONES

- a) El anticuerpo monoclonal 4G11, dirigido a la especie A β pyroGlu 11-42 generado en el laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan, es de subclase IgG2b.
- b) El anticuerpo monoclonal 4G11 reconoce específicamente a la especie A β pyroGlu 11-42, y no reconoce otras especies de A β . 4G11 no tiene reactividad con otras especies de A β como: A β 1-42, A β 11-42, A β pyroGlu 3-42.
- c) 4G11 no se une a ningún fragmento de péptido sintético A β evaluado (A β 1-16, A β 11-25 y A β 12-28), y tampoco reconoce al péptido A β pyroGlu 3-42, el cual tiene el extremo amino modificado. Podemos suponer que el anticuerpo 4G11 reconoce un epítipo conformacional.
- d) El anticuerpo 4G11 reconoce específicamente a A β pyroGlu 11-42 en ensayos de Western blot. Reconoce distintos agregados como monómeros, dímeros, tetrameros y otros oligómeros de mayor peso molecular.
- e) 4G11 es capaz de reconocer agregados amiloides en cerebro de pacientes con EA. Los agregados amiloides reconocidos por 4G11 se encuentran en la zona central de las placas amiloides cerebrales.

8. REFERENCIAS

- Abushouk AI, Elmaraezy A, Aglan A, Salama R, Fouda S, Fouda R, AlSafadi A (2017) *Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*. BMC Neurol, 17:66.
- Acerio G, Manoutcharian K, Vasilevko V, Munguia M, Govezensky T, Coronas T, Luz-Madrigal A, Cribbs DH, Gevorkian G (2009) *Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A β -specific antibodies produced in rabbits*. J Neuroimmunol, 213: 39–46.
- Aisen P, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas RG, Thal LJ (2003) *Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial*. JAMA 289, 2819–2826.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) *The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement.,7:270-9.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-White T, Hyman BT (1992) *Neurofibrillary tangles and not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology. 42:1681–1688.
- Arvanitakis Z, Schneider JA, Wilson RS, Li Y, Arnold SE, Wang Z, et al (2006) *Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons*. Neurology; 67(11): 1960–5.
- Bachurin S, Bovina E, Ustyugov A (2017) *Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends*. Med Res Rev. 37:1186–225.
- Baddeley TC, McCaffrey J, Storey JM, Cheung JK, Melis V, Horsley D, Harrington CR, Wischik C (2015) *Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease*. J Pharmacol Exp Ther.; 352:110–8.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000) *Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease*. Nat Med.; 6:916–919.
- Barrera-Ocampo A, Lopera A (2016) *Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease?* Colombia Médica; 47: 203–212.
- Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C (2011) *Autosomal-dominant Alzheimer's disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease*. Alzheimers Res Ther 3:1.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus D, Cairns D, Xie X, Blazey T, Holtzman D, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen P, Ghetti B, Klunk W, McDade E, Martins R, Masters C, Mayeux R, Ringman J, Rossor M, Schofield P, Sperling R, Salloway S, Morris J (2012) *Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease*. N Engl J Med.;367:795–804.
- Bayer T, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G (1999) *It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease*. Mol Psychiatry.; 4:524–28.
- Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, Messer J, Oroszlan K, Rauchenberger R, Richter WF, Rothe C, Urban M, Bardroff M, Winter M, Nordstedt C, Loetscher H (2012) *Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrating sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β* . J Alzheimers Dis 2012; 28: 49–69.
- Bridel C, Hoffmann T, Meyer A, Durieux S, Koel-Simmelink M, Orth M, Scheltens P, Lues I, Teunissen C (2017) *Glutaminyl cyclase activity correlates with levels of A β peptides and mediators of angiogenesis in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients*. Alzheimer's Research & Therapy 9:38.
- Buckley JS, Salpeter SR (2015) *A risk-benefit assessment of dementia medications: systematic review of the evidence*. Drugs Aging.;32:453–67.
- Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C (2018) *Handbook of Clinical Neurology*. Volume 145, Pages 325-337, Chapter 23 - Alzheimer disease. Author links open overlay panel.
- Cao J, Hou J, Ping J, Cai D (2018) *Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease*. Molecular Neurodegeneration, 13:64.

- Cheung ZH, Gong K, Ip NY (2008) *Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2*. J Neurosci; 28:4872–7.
- Chun W, Johnson G (2007) *The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death*. Front. Biosci., 12, 733–756.
- Cummings J, Cohen S, van Dyck C, Brody M, Curtis C, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Rabe C, Brunstein F, Quartino A, Honigberg L, Fuji R, Clayton D, Mortensen D, Ho C, Paul R (2018) *ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease*. Neurology;90:e1889-e1897.
- Cynis H, Schilling S, Bodnar M, Hoffmann T, Heiser U, Saido T, Demuth H (2006) *Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1764, 1618-1625.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2008) *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier*. Stroke; 35:2628–31.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001) *Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci USA.; 98:8850–8855.
- Douaud G, Jbabdi S, Behrens TEJ, Menke RA, Gass A, Monsch AU, Rao A, Whitcher B, Kindlmann G, Matthews PM, Smith S (2011) *DTI measures in crossing-fibre areas: Increased diffusion anisotropy reveals early white matter alteration in MCI and mild Alzheimer's disease*. Neuroimage 55, 880-890.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint AP, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Audia JE (2001) *Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain*. J Neurochem.; 76:173–81.
- Dubois B, Feldman H, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2010) *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. Lancet Neurol.;9:1118-27.
- Festa A, Williams K, D'Agostino R Jr, Wagenknecht LE, Haffner SM (2006) *The natural course of betacell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Diabetes; 55(4):1114–20.
- Friedrich RP, Tepper K, Ronicke R, Soom M, Westermann M, Reymann K, Kaether C, Fandrich M (2010) *Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A β pathogenicity*. Proc Natl Acad Sci., 107:1942-1947.
- Gillman KW, Starrett JE Jr, Parker MF, Xie K, Bronson JJ, Marcin LR, McElhone KE, Bergstrom CP, Mate RA, Williams R, Meredith J, Burton C, Barten D, Toyn J, Roberts S, Lentz K, Houston J, Zaczek R, Albright C, Decicco CP, Macor JE, Olson R (2010) *Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable gamma-secretase inhibitor*. ACS Med Chem Lett.;1:120–4.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM (2005) *Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial*. Neurology.;64:1553–1562.
- Glabe CG (2008) *Structural classification of toxic amyloid oligomers*. J Biol Chem 283:29639–29643.
- Goedert M, Spillantini M, Jakes R, Rutherford D, Crowther R (1989) *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Neuron; 3, 519–526.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide*. Nature Reviews. Molecular cell biology. Volume 8.
- Hanea F, Robinson M, Leec B, Baib O, Leonenkoc Z, Alberta M (2017) *Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment*. Journal of Alzheimer's Disease. 57; 645–665.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science 297, 353–356.
- He W, Barrow CJ (1999) *The A β 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater β -sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A β* . Biochemistry;38:10871-7.
- Hof PR, Bierer L, Purohit D, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP (1995) *Neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease*. Arch Neurol.; 52:81–88.
- Hoozemans J, Veerhuis R, Rozemuller A, Eikelenboom P (2003) *Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease*. Curr. Drug Targets 4, 461–468.

- Hung SY, Fu WM (2017) *Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease*. J Biomed Sci.; 24: 47.
- Hyman B, West H, Rebeck G, Buldyrev S, Mantegna RN, Ukleja M, Havlin S, Stanley H (1995) *Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer's disease: Observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome)*. Proc Natl Acad Sci 92: 3586–3590.
- Johnson LV, Leitner W, Rivest A, Staples M, Radeke M, Anderson D (2002) *The Alzheimer's A β -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration*. Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 11830–11835.
- Kahle-Wroblewski K, Corrada M, Li B, Kawas C (2007) *Sensitivity and specificity of the mini-mental state examination for identifying dementia in the oldest-old: The90+ study*. J Am Geriatr Soc 55, 284-289.
- Kalaria RN (2010) *Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia*. Nutr Rev. (Suppl 2):S74–87.
- Kastenholz B, Garfin DE, Horst J, Nagel KA (2009) *Plant metal chaperones: A novel perspective in dementia therapy*. Amyloid, 16, 81–83.
- Kaveri SV (2012) *Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies*. Autoimmun Rev.;11:792–794.
- Kennedy M, Stamford A, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, Egan M, Ereshefsky L, Hodgson RA, Hyde LA, Jhee S, Kleijn HJ, Kuvelkar R, Li W, Mattson B, Mei H, Palcza J, Scott J, Tanen M, Troyer MD, Tseng JL, Stone J, Parker E, Forman M (2016) *The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS beta-amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients*. Sci Transl Med.; 8:363ra150.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron 63, 287303.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) *Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2*. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:6382-6387.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) *Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends Neurosci 24:219–224.
- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC (2005) *Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review)*. Neurology 56, 1143-1153.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spire-Jones (2009) *Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques*. Proc Natl Acad Sci USA.;106:4012–7.
- Kumar DK, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, Lefkowitz A, McColl G, Goldstein LE, Tanzi RE, Moir RD (2016) *Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease*. Sci Transl Med.; 8:340ra372.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW et al (2007) *A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease*. J Neurosci 27:796–807.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci USA 95:6448–6453.
- Lannfelt L, Relkin N, Siemers ER (2014) *Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease*. Journal of Internal Medicine, 275; 284–295.
- Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, et al (2000) *Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study*. Neurobiology of aging;21:49–55.
- Lee V, Balin B, Otvos L Jr, Trojanowski J (1991) *A major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau*. Science; 251:675–678.
- Li Y, Liu Y, Wang Z, Jiang Y (2013) *Clinical trials of amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease: End of beginning or beginning of end?* Expert Opin Biol Ther.;13:1515–22.

- Limbocker R, Chia S, Ruggeri F, Perni M, Cascella R, Heller G, Meisl G, Mannini B, Habchi J, Michaels T, Challa P, Ahn M, Casford S, Fernando N, Xu C, Kloss N, Cohen S, Kumita J, Cecchi C, Zasloff M, Linse S, Knowles T, Chiti F, Vendruscolo M, Dobson C (2019) *Trodusquemine enhances A β 42 aggregation but suppresses its toxicity by displacing oligomers from cell membranes*. Nature communications. 10:225.
- Listaa S, O'Bryantc S, Blennowd K, Duboisb B, Hugone J, Zetterberg D, Hampel H (2015) *Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease*. Journal of Alzheimer's Disease 47; 291–317.
- Lord A, Gumucio A, Englund H, Sehlin D, Sundquist VS, Söderberg L, Möller C, Gellerfors P, Lannfelt L, Pettersson FE, Nilsson LN (2009) *An amyloid- β protofibril-selective antibody prevents amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis.;36(3):425–434.
- Lues I, Weber F, Meyer A, Bühring U, Hoffmann T, Kühn-Wache K, Manhart S, Heiser U, Pokorny R, Chiesa J, Glund K (2015) *A phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of PQ912, a glutaminyl cyclase inhibitor, in healthy subjects*. Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv.;1:182–95.
- Mahley R, Weisgraber K, Huang Y (2006) *Apolipoprotein E: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 103, 5644–5651.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985) *Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels*. EMBO J.; 4:2757–2763.
- May PC, Willis B, Lowe SL, Dean R, Monk S, Cocke PJ, Audia J, Boggs L, Borders AR, Brier RA, Calligaro D, Day T, Ereshefsky L, Erickson J, Gevorkyan H, Gonzales C, James D, Jhee S, Komjathy SF, Li L, Lindstrom T, Mathes B, Martényi F, Sheehan S, Stout SL, Timm DE, Vaught G, Watson B, Winneroski L, Yang Z, Mergott D (2015) *The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central Abeta pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans*. J Neurosci.; 35:1199–210.
- Mc Khann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement 7, 263-269.
- McGeer PL, McGeer EG (2001) *Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease*. Neurobiol. Aging 22, 799–809.
- McGreal E, Gasque P (2002) *Structure-function studies of the receptors for complement C1q*. Biochem. Soc. Trans. 30, 1010–1014.
- Morgan D (2011) *Immunotherapy for Alzheimer's Disease*. J Intern Med . 2011; 269(1): 54–63.
- Morrison J, Hof PR (1997) *Life and death of neurons in the aging brain*. Science. 1997; 278:412–419.
- Mroczo B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P (2018) *Amyloid β oligomers (A β O) in Alzheimer's disease*. Journal of Neural Transmission, (2):177-191.
- Mroczo B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P (2018) *Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (A β O) in Alzheimer's Disease*. International Journal of Molecular Sciences; 19, 1884.
- Mucke L, Selkoe DJ (2012) *Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction*. Cold Spring Harb Perspect Med; 2:a006338.
- Naslund J, Karlstrom A, Tjernberg L, Schierhorn A, Terenius L, Nordstedt C (1996) *High-resolution separation of amyloid beta-peptides: structural variants present in Alzheimer's disease amyloid*. J. Neurochem., 67(1), 294-301.
- Nasreddine Z, Phillips N, Bedirian V (2005) *The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment*. J Am Geriatr Soc., 53,695-699.
- Nelson P, Alafuzoff I, Bigio E, Bouras C, Braak H, Cairns N, Castellani R, Crain B, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch M, Haroutunian V, Hof P, Hulette C, Hyman B, Iwatsubo T, Jellinger K, Jicha G, Kövari E, Kukull W, Leverenz J, Love S, Mackenzie I, Mann D, Masliah E, McKee A, Montine T, Morris J, Schneider J, Sonnen J, Thal D, Trojanowski J, Troncoso J, Wisniewski T, Woltjer R, Beach T (2012) *Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature*. J Neuropathol Exp Neurol.; 71(5): 362–381.
- Netzer WJ, Dou F, Cai D, Veach D, Jean S, Li Y, Bornmann WG, Clarkson B, Xu H, Greengard P (2003) *Gleevec inhibits beta-amyloid production but not notch cleavage*. Proc Natl Acad Sci U S A.;100:12444–9.

- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) *Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report*. *Nat Med*; 9: 448–52.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) *Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage*. *J. Neurosci.* 17, 2746–2755.
- Nussbaum J, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Ronicke R, Reymann K, Hutter-Paier B, Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Glabe C, Demuth H, Bloom G (2012) *Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β* . *Nature*, 485, 651-655.
- O'Brien R, Wong P (2011) *Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease*. *Annu Rev Neurosci.*; 34: 185–204.
- Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC (2009) *Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice*. *Neurobiol Aging*; 30:1238–44.
- Ostrowitzki S, Deptula D, Thurfjell L, Barkhof F, Bohrmann B, Brooks DJ, Klunk WE, Ashford E, Yoo K, Xu ZX, Loetscher H, Santarelli L (2012) *Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab*. *Arch Neurol.*;69:198–207.
- Ostrowitzki S, Lasser R, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, Ashford E, Retout S, Hofmann C, Delmar P, Klein G, Andjelkovic M, Dubois B, Boada M, Blennow K, Santarelli L, Fontoura P (2017) *A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease*. *Alzheimer's Research & Therapy*; 9:95.
- Panza F, Frisardi V, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Logroscino G, Santamato A, Greco A, Seripa D, Pilotto A (2012) *Immunotherapy for Alzheimer's disease: From anti- β -amyloid to tau-based immunization strategies*. *Immunotherapy*.;4:213–38.
- Panza F, Lozupone M, Dibello V, Greco A, Daniele A, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo B (2019) *Are antibodies directed against amyloid- β (A β) oligomers the last call for the A β hypothesis of Alzheimer's disease?* *Immunotherapy*, 11(1),3–6.
- Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, Imbimbo BP, Lozupone M, Santamato A, Zecca C, Barulli MR, Bellomo A, Pilotto A, Daniele A, Greco A, Logroscino G (2016) *Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease*. *Biomed Res Int.*;2016:3245935.
- Park CR (2001) *Cognitive effects of insulin in the central nervous system*. *Neuroscience Biobehavior Rev.*; 25(4):311–23.
- Perez-Garmendia R, Gevorkian G (2013) *Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer's Disease Immunotherapy*. *Current Neuropharmacology*, 11, 491-498.
- Pozueta J, Lefort R, Shelanski M (2013) *Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models*. *Neuroscience*. Volume 251, Pages 51-65.
- Prince MJ, Bird AS, Blizard RA, Mann AH (1996) *Is the cognitive function of older patients affected by antihypertensive treatment? Results from 54 months of the Medical Research Council's trial of hypertension in older adults*. *BMJ*; 312(7034):801–5.
- Readhead B, Haure-Mirande JV, Funk CC, Richards MA, Shannon P, Haroutunian V, Sano M, Liang WS, Beckmann ND, Price ND, Reiman E, Schadt E, Ehrlich M, Gandy S, Dudley J (2018) *Multiscale analysis of independent Alzheimer's cohorts finds disruption of molecular, genetic, and clinical networks by human herpesvirus*. *Neuron.*;99:64–82 e67.
- Rebeck GW (2017) *The role of APOE on lipid homeostasis and inflammation in normal brains*. *J.Lipid Res.*, 58, 1493–1499.
- Reitz C, Mayeux R (2014) *Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers*. *Biochem Pharmacol* 88:640–651.
- Relkin NR, Thomas RG, Rissman RA, Brewer JB, Rafii MS, van Dyck CH, Jack CR, Sano M, Knopman DS, Raman R, Szabo P, Gelmont DM1, Fritsch S1, Aisen PS (2017) *A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease*. *Neurology.*;88:1768–1775.
- Russo C, Violani E, Salis S, Venezia V, Dolcini V, Damonte G, Benatti U, D'Arrigo C, Patrone E, Carlo P, Schettini G (2002) *Pyroglutamate-modified amyloid -peptides - A β N3(pE) - strongly affect cultured neuron and astrocyte survival*. *J. Neurochem*;82:1480–1489.
- Scheidt H, Adler J, Krueger M, Huster D (2016) *Fibrils of Truncated PyroglutamylModified A β Peptide Exhibit a Similar Structure as Wildtype Mature A β Fibrils*. *Sci. Rep.* 6, 33531; doi: 10.1038/srep33531.
- Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, Jagla W, Schlenzig D, Lindner C, Rudolph T, Reuter G, Cynis H, Montag D, Demuth HU, Rossner S (2008) *Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology*. *Nat Med.*; 14(10), 1106-1111.

- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth H (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.*, 563, 191-196.
- Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Bohm G, Demuth H (2006) *On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro)*. *Biochemistry*, 45(41), 12393-12399.
- Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, Galbreath EJ, Schirtzinger LM, Berridge BR, Gao H, Higgins MA, May PC, Ryan TP (2003) *Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor*. *J Biol Chem.*;278:46107–16.
- Selkoe DJ (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438–447.
- Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzte A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C, Delacourte A (2003) *Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach*. *J Neurochem.*;85:1581-91.
- Serrano-Pozo A, Froesch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189.9
- Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournie-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009) *Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide*. *J Neurochem.*; 109:248– 256.
- Sevigny J, Chiao P, Bussi re T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A (2016) *The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease*. *Nature.*;537(7618):50-6. PubMed.
- Sharma S, Nehru B, Saini A (2017) *Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta aggregation in-vitro by carbenoxolone: Insight into mechanism of action*. *Neurochemistry International*, 0186(17)30146-8.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basu G, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) *Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain*. *Nature*, 402:537-540.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster M, Phelps CH (2011) *Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association work groups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement* 7, 280-292.
- Sullivan C, Berg E, Elliott-Bryanta R, Fishman J, McKee A, Morina P, Shia M, Fine R (2011) *Pyroglutamate-Aβ 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-Aβ 11 forming the central core*. *Neurosci Lett* ; 505(2): 109–112.
- Syvänen S, Hultqvist G, Gustavsson T, Gumucio A, Laudon H, S derberg L, Ingelsson M, Lannfelt L, Sehlin D (2018) *Efficient clearance of Aβ protofibrils in AβPP-transgenic mice treated with a brain-penetrating bifunctional antibody*. *Alzheimers Res Ther.*;10(1):49.
- Takahashi Y, Hayashi I, Tominari Y, Rikimaru K, Morohashi Y, Kan T, Natsugari H, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T (2003) *Sulindac sulfide is a noncompetitive γ-secretase inhibitor that preferentially reduces Aβ42 generation*. *J. Biol. Chem.* 278, 18664–18670.
- Takatori S, Wang W, Iguchi A, Tomita T (2019) *Genetic Risk Factors for Alzheimer Disease: Emerging Roles of Microglia in Disease Pathomechanisms*. Springer Nature Switzerland. P. C. Guest (ed.), *Reviews on Biomarker Studies in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology* 1118.
- Tucker S, M ller C, Tegerstedt K, Lord A, Laudon H, Sjdahl J, Soderberg L, Spens E, Sahlin C, Waara E, Satlin A, Gellerfors P, Osswald G, Lannfelt L (2015) *The murine version of BAN2401 (mAb158) selectively reduces amyloid-beta protofibrils in brain and cerebrospinal fluid of tg-ArcSwe mice*. *J Alzheimers Dis.*;43:575–88.
- Tzourio C, Anderson C, Chapman N, Woodward M, Neal B, MacMahon S, et al (2003) *Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease*. *Archives of internal medicine*; 163(9):1069– 75.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R (1999) *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. *Science* 1999, 286:735-741.

- Villemagne V, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis K, Salvado O, Szoek C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, Ames D, Rowe C, Masters C (2013) *Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) research group. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study.* *Lancet Neurol.* 2013;12:357–67.
- Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, et al (2003) *Insulin increases CSF A β 42 levels in normal older adults.* *Neurology*; 60(12):1899–903.
- Weiner HL, Frenkel D (2006) *Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease.* *Nature Reviews, Immunology*, Volume 6.
- Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenbiel M, Orgogozo JM, Graf A (2012) *Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study.* *Lancet*; 11: 597–604.
- Wirhbs O, Hillmann A, Pradier L, Hartig W, Bayer TA (2013) *Oligomeric pyroglutamate amyloid- β is present in microglia and a subfraction of vessels in patients with Alzheimer's disease: implications for immunotherapy.* *J. Alzheimer's Dis.* 35(4), 741–749.
- Wischik CM, Staff RT, Wischik DJ, Bentham P, Murray AD, Storey JM, Kook KA, Harrington C (2015) *Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease.* *J Alzheimers Dis.*;44:705–20.
- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD (1976) *Neurofibrillary tangles of paired helical filaments.* *J Neurol Sci.* 1976; 27:173–181.
- Wisniewski T, Goni F (2014) *Immunotherapy for Alzheimer's Disease.* *Biochem Pharmacol.*; 88(4): 499–507.
- Wu H (2017) *Can small molecule inhibitors of glutaminyl cyclase be used as a therapeutic for Alzheimer's disease?* *Future Med.Chem.* 9(17),1979–1981.
- Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T (2008) *N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis.* *Neurobiology*, 1319-1333.
- Zhang YW, Thompson T, Zhang H, Xu H (2011) *APP processing in Alzheimer's disease.* *Molecular Brain*, 4:3.
- Zlokovic BV (2004) *Clearing amyloid through the blood-brain barrier.* *J Neurochem*; 89: 807–11.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3: 519-526.
- Barage SH, Sanaware KD (2015) Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52: 1-18.
- Perl DP (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77:32-42.
- Nagy K (2005) Field metabolic rate and body size. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1621-1625.
- Giuffrida ML, Caraci F, De Bona P, Pappalardo G, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A (2010) The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev Neurosci*, 21: 83-93.
- Friedrich RP, Tepper K, Röncke R, Soom M, Westermann M, Reymann K, Kaether C, Fändrich M (2010) Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A β pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci.*107:1942-1947.
- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ (1992) Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 267:17082-6.
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX (2002) Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 512:101-6.
- Perez-Garmendia R, Ibarra-Bracamontes V, Vasilevko V, Luna-Muñoz J, Mena R, Govezensky T, Acero G, Manoutcharian K, Cribbs DH, Gevorkian G (2010) Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: relevance for immunotherapy. *J Neuroimmunol.* 229:248-55.