



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del anticuerpo monoclonal 3B8 dirigido contra el péptido β -amiloide 3-42 modificado en el extremo amino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:
Venegas Jerónimo David Vladimir

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Gohar Gevorkian
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gladis Del Carmen Fragoso González [Instituto de Investigaciones Biomédicas](#) Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez [Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
EPIDEMIOLOGÍA	3
DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD	8
NEUROPATOLOGÍA: LESIONES CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD	12
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	24
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	28
II. JUSTIFICACIÓN	32
III. OBJETIVO	34
GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
IV. METODOLOGÍA	36
PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO 3B8	37
TITULACIÓN DEL ANTICUERPO 3B8	39
CARACTERIZACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MAPEO DE EPITOPOS	42
RECONOCIMIENTO DE AGREGADOS EN TEJIDOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
VI. DISCUSIÓN	66
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. BIBLIOGRAFÍA	I

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermana, que sin ellos nada de esto sería posible, por la dedicación, entrega y ejemplo que me dan cada día.

A la Doctora Gohar Gevorkian (SNI II), por brindarme la oportunidad de desarrollar un proyecto en su laboratorio y por los conocimientos brindados.

Al biólogo experimental y técnico de laboratorio Lic.Gonzalo Acero Galindo, por la paciencia y dedicación para enseñar las técnicas experimentales del laboratorio.

Al Programa UNAM-PAPIIT por el apoyo otorgado para realizar el proyecto #203319.

A mis amigos del posgrado Dra. Ma Helena Tejeda M.Sc, Q.F.B. Miriam Nava Catorce M.Sc, Ph.D, Q. Iovalli Sosa y QI. Manuel Giraldo que fueron un apoyo en mi camino como estudiante de maestría.

Gracias.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
EA	Enfermedad de Alzheimer
DA	Demencia tipo Alzheimer
OMS	Organización Mundial de la Salud
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ADI	Alzheimer's Disease International
DCND	Deterioro Cognitivo No Demencial
MHAS	Mexican Health and Aging Study
ENSANUT 2012	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en 2012
pE	Piroglutamato
N3	Aminotruncado en el 3 ^{er} aminoácido
A β	β -Amiloide
A β pE3-42	β -Amiloide truncado en el aminoácido 3, piroglutamado
ApoE	Apolipoproteína E
WDC	World Dementia Council - Consejo Mundial de la Demencia
MCI	Mild Cognitive Impairment
sAPP(α/β)	Fracción soluble del APP
CENETC	Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud
CTF	C-Terminal Fragments
AICD	APP Intracellular Domain
SAD	Sporadic Alzheimer Disease
FAD	Familiar Alzheimer Disease
PSEN	Presinilina
CAA	Cerebral Amyloid Angiopathy
BACE	β -secretasa
QC	Glutaminil Ciclasa
PET	Positron Emission Tomography
LCR	Líquido cefalorraquídeo
3xTgAD	Modelo de Alzheimer triple transgénico
FDG	18F-fluorodesoxiglucosa
ARIA	Amyloid Related Imaging Abnormalities

RESUMEN

Según *El Reporte Mundial Sobre la Enfermedad de Alzheimer* publicado en 2015 por la *Alzheimer's Disease International (ADI)*, alrededor de 46.8 millones de personas en el mundo padecen de esta enfermedad y se estima que para el año 2050 el número de pacientes con este padecimiento podría incrementarse a 131.5 millones.

La demencia tipo Alzheimer es una patología clínicamente caracterizada por pérdida gradual de la memoria anterógrada y deterioro cognoscitivo progresivo. Así mismo, la enfermedad presenta cambios histológicos característicos en el parénquima cerebral, los cuales fueron descritos por el Dr. Alzheimer hace más de 100 años; y corresponden a lo que hoy conocemos como marañas neurofibrilares, formadas por la proteína Tau-hiperfosforilada, y las placas amiloides, formadas por la agregación del péptido β -amiloide.

Una de las estrategias que se han planteado en los últimos años para el control y tratamiento de esta patología es a través de la inmunoterapia pasiva, la cual posee múltiples ventajas sobre la inmunoterapia activa. No obstante, las pruebas clínicas realizadas hasta el momento no han tenido resultados concluyentes. Sin embargo, aún existe un amplio potencial para la evaluación de anticuerpos y el reconocimiento de diferentes epítomos en agregados de β -amiloide y Tau. No solo como terapia inmunológica, ya que estos también pueden ser de gran utilidad en la búsqueda de nuevos biomarcadores que detecten la enfermedad en fases tempranas o subclínicas.

Uno de los biomarcadores que ha ganado relevancia en los últimos años es el péptido β -amiloide N-truncado, debido a su presencia predominante en los depósitos de β -amiloide en corteza cerebral de pacientes con Alzheimer y síndrome de Down. Así mismo, se ha documentado, en pruebas *in vitro* e *in vivo*, la alta capacidad de agregación y toxicidad de

estos péptidos, en comparación con las especies completas. Además, algunos estudios han señalado la presencia de estas especies en etapas tempranas de la enfermedad, por lo que se piensa podrían funcionar como “semillas de agregación” en la formación de placas amiloides y agregados tóxicos en el sistema nervioso central.

El presente trabajo describe el proceso de caracterización del anticuerpo monoclonal 3B8, que reconoce al péptido β -amiloide pE3-42 a través de un epítipo, posiblemente conformacional, localizado en la región amino terminal. Este anticuerpo fue desarrollado en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los resultados obtenidos pueden ser potencialmente importantes para el desarrollo de nuevos compuestos inmunoterapéuticos dirigidos específicamente a los agregados de $A\beta_{N3}$ (pE). Finalmente, sugerimos que el uso potencial del anticuerpo 3B8 para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer debe ser explorado con mayor profundidad en distintas muestras biológicas.

I. Introducción

Históricamente se reconoce al Dr. Alois Alzheimer, médico de origen alemán, por sus trabajos reportados en el artículo “*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*” (Acerca de una peculiar enfermedad de la corteza cerebral) publicado el 4 de noviembre de 1907, en la Revista General de Psiquiatría y Medicina Psicojudicial. La publicación fue hecha un año después del congreso de Psiquiatría, celebrado en Tübingen, Alemania (Jones & O’Neill, 2009), donde por primera vez se dio a conocer un tipo de demencia que se caracterizaba clínicamente por el deterioro cognoscitivo progresivo, desorientación, alucinaciones, incompetencia psicosocial, y principalmente, daño a la memoria anterógrada. Sin embargo, la aportación más relevante de este documento fue la descripción de las alteraciones histomorfológicas específicas de la enfermedad (Stelzmann et al., 1995).

Auguste D, la paciente del Dr. Alzheimer en quien realizó las observaciones de su primera publicación, falleció a la edad de 51 años por el deterioro del estado mental y complicaciones de una neumonía de lóbulos inferiores, cuatro años y medio después del inicio de su padecimiento y de su ingreso al sanatorio mental *Frankfurt am Main* (Maurer et al., 1997). A su fallecimiento, el doctor Alzheimer describió las alteraciones encontradas en el parénquima cerebral de su paciente; dentro de las alteraciones macroscópicas reportó la atrofia generalizada de la corteza, ensanchamiento de los ventrículos laterales y cambios escleróticos en los grandes vasos. Las modificaciones microscópicas fueron distinguidas gracias al método de Bielschowsky, una tinción con sales de plata, que le permitió observar la presencia de neurofibrillas en múltiples estadios, las cuales finalizaban con la muerte neuronal por efecto de la deposición y acumulación del péptido en forma de marañas.

Durante su descripción, el Dr. Alzheimer propuso una estrecha relación entre la formación de las fibrillas antes mencionadas y la deposición de un metabolito patológico desconocido. Este metabolito, menciona en su artículo, “*se presenta en forma de focos*

miliares dispersos por todo el parénquima cerebral, particularmente en las capas más altas de la corteza, formados por acumulación de un material peculiar, el cual es refractario a las tinciones pero que es visible aún sin teñir” (Strassnig & Ganguli, 2005).

Las dos lesiones mencionadas por el Dr. Alzheimer, en su publicación de 1907, corresponden a los dos marcadores de la patología que actualmente lleva el epónimo de “enfermedad de Alzheimer” (EA) o “demencia tipo Alzheimer” (DA). Este nombre fue propuesto en honor a su descubridor en 1909 por el Dr. Kraepelin, quién incluyó el término en la 8^{va} edición de su renombrado libro de texto *Psiquiatría*, donde publicó, por primera vez, la importancia de los hallazgos hechos por el Dr. Alzheimer en su paciente Auguste D; sin embargo, la Enfermedad de Alzheimer no fue muy reconocida, debido a la baja incidencia de la patología en esa época (Jones & O’Neill, 2009).

EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Alzheimer (EA) representa un grave problema de salud pública mundial, siendo hoy en día una de las enfermedades crónico-degenerativas más prevalentes a nivel global y la primera causa de demencia en mayores de 65 años, con una incidencia estimada en 9.9 millones de nuevos casos anualmente. Según *El Reporte Mundial Sobre la Enfermedad de Alzheimer* publicado en 2015 por la *Alzheimer’s Disease International* (ADI), se estima que alrededor de 46.8 millones de personas en el mundo padecen de esta enfermedad. Además, se pronostica que el número de pacientes, podría incrementarse hasta 131.5 millones para el año 2050. Aunado a esto, se calcula que el costo mundial de la demencia tipo Alzheimer es de aproximadamente \$818 billones de dólares al año, lo que

propone una seria problemática económica mundial, debido al alto gasto y la pérdida de vidas humanas que esta enfermedad representa (Prince et al., 2015, 2016).

Particularmente en México, tanto la disminución de la mortalidad, como el descenso de la fecundidad, han propiciado el aumento del envejecimiento paulatino de su población. El reporte nacional más actual (INEGI 2016) indicó que el 7.2% del total de la población corresponde a la población de adultos mayores (>65 años), equivalente a 8 millones 640 mil personas.

En 2012 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada (ENSANUT 2012), reportó el deterioro cognitivo estadificado en tres bloques: 1) deterioro cognitivo normal, 2) deterioro cognitivo patológico y 3) Deterioro Cognitivo No Demencial (DCND); donde se calcula una prevalencia, en mayores de 65 años, del 7.9% de pacientes con demencia y 7.3% con DCND, siendo los grupos con mayor vulnerabilidad aquellos con bajo grado de escolaridad y vivienda rural (Ensanut, 2012). El DCND es comparable con el *Mild Cognitive Impairment* (Daño Cognitivo Leve) del cual se hablará con mayor detalle posteriormente.

En contraste con lo anterior el *Mexican Health and Aging Study* (MHAS), en el artículo “*Prevalence and Incidence Rates of Dementia and Cognitive Impairment No Dementia in the Mexican Population*” publicado en 2011, se reportó una prevalencia de pacientes con demencia del 6.1% con una tasa de incidencia de 27.3 pacientes por cada 1000 personas al año. Mientras que para DCND se presentó el 28.7% con incidencia de 223 por cada 1000 habitantes al año (Mejia-Arango & Gutierrez, 2011). Finalmente, en el reporte del 2016 de la *Alzheimer’s Disease International*, se estima que en México existen aproximadamente 800 mil personas con este padecimiento, de los cuales el 64% son mujeres. El pronóstico para nuestro país, estima el aumento en la cantidad de pacientes hasta los 1.5

millones en el año 2030, debido al alto índice de obesidad en la población mexicana y su comorbilidad en el incremento de los casos con demencia, además de otras patologías (Prince et al., 2016).

Mild Cognitive Impairment (Deterioro cognitivo leve)

El término *Mild Cognitive Impairment* o MCI por sus siglas en inglés, fue introducido en la década de los 80's por el Dr. Reisberg y colaboradores, esta condición fue basada en la *Escala Global de Deterioro* (GDS) de 7 estadios, la cual fue valorada mediante pruebas cognitivas, de comportamiento y estudios de imagen. Una de las observaciones más relevantes que se hizo en este estudio fue sobre la aparición de cambios progresivos en el deterioro, los cuales se presentaban consistentemente a partir de los estadios dos y tres de la Escala Global de Deterioro (Reisberg et al., 1988).

Dadas estas observaciones, se postuló la presencia de un estadio intermedio entre demencia y no demencia, el cual se conoce actualmente como Deterioro Cognitivo Leve o MCI. Los pacientes que se encuentran en este estado “pre-demencial” se caracterizan por presentar un deterioro de las funciones mentales superiores, más allá de lo esperado para la edad y el nivel de estudios; sin embargo, el deterioro no es tan severo como para incluirlo dentro de las enfermedades demenciales (Ronald C Petersen et al., 2014).

Esta etapa es un hipotético estado de transición, aunque no siempre, entre el deterioro cognitivo propio del envejecimiento y un deterioro patológico demencial. La finalidad de diferenciar a esta categoría como una entidad clínica diferente a la demencia, es debido al mayor grado de riesgo que presentan los pacientes con MCI de progresar a un estado propiamente demencial. Petersen et. Al en su artículo *Mild Cognitive Impairment* menciona que “las personas con MCI parecen tener un mayor riesgo de desarrollar la EA a una tasa del 10% al 12% por año” (R C Petersen, 2003). Dados estos resultados, se ha concluido que la

etapa de MCI es crucial para realizar un diagnóstico temprano y posiblemente el inicio de la terapia.

Factores de Riesgo

En el reporte del 2014 de la *Alzheimer's Disease International* (ADI), se reunieron las evidencias más sólidas encontradas en revisiones sistemáticas, meta-análisis y análisis clínicos sobre los factores protectores y modificables para el deterioro cognitivo y el desarrollo de demencia. La educación deficiente, las enfermedades hipertensivas, así como el tabaquismo y la diabetes de aparición en cualquier etapa de la vida, encabezan la lista de principales factores de riesgo (Prince et al., 2014). Según la literatura, los factores de riesgo para el desarrollo de demencia y daño cognitivo pueden ser subdivididos en dos grandes grupos, debido a su cualidad de ser prevenibles o inherentes (Baumgart et al., 2015).

Factores de riesgo modificables

Se ha observado que el estilo de vida juega un papel importante para la aparición de la enfermedad, es aquí donde se puede realizar el primer hito de intervención temprana. Se ha observado que los hábitos dietéticos pueden influir en el tiempo de aparición de la enfermedad; se destacan las dietas con elevado consumo calórico acompañado de sedentarismo, lo cual genera un desbalance energético, que posteriormente se traduce en obesidad y más tarde en trastornos metabólicos (Brown et al., 2013; Kivipelto et al., 2005). Así mismo, se ha investigado el potencial beneficio del consumo de algunos macro y micronutrientes como vitamina B, Vitamina E, Omega-3 y otros antioxidantes, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes (Prince et al., 2014). En contraste, la actividad física se reconoció como un factor protector importante; indirectamente al reducir el riesgo de

padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares, y de forma directa, al mejorar la perfusión cerebrovascular, reducir la carga de amiloide, disminuir la resistencia a la insulina y aumentar la síntesis de neurotransmisores y factores de crecimiento (BDNF y IGF-I) (Brown et al., 2013; Su et al., 2008).

El tabaquismo, por su parte, ejerce efectos sobre el procesamiento de la proteína precursora de amiloide, reduce el aclaramiento de A β por la microglía, aumenta la respuesta proinflamatoria microglial e induce cambios sinápticos relacionados con la neurodegeneración (Ho et al., 2012). Contrario a lo anterior, se encontró que el consumo moderado de bebidas alcohólicas funciona como un factor protector al reducir el riesgo cardiovascular, debido a la disminución en la cantidad de LDL y el aumento de HDL, y en el caso de los vinos, por su contenido rico en flavonoides (Prince et al., 2014).

Finalmente, en este grupo también se considera a las comorbilidades metabólicas y padecimientos cardiovasculares; es decir padecimientos tales como obesidad, DM2, dislipidemia e hipertensión arterial sistémica, los cuales reportaron asociaciones consistentes, positivas y estadísticamente significativas para el deterioro cognitivo en la vejez y desarrollo de cualquier tipo de demencia (Baumgart et al., 2015; Kivipelto et al., 2005; Profenno et al., 2010).

Factores de riesgo no modificables

En este segundo grupo se encuentran los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la posibilidad de una intervención terapéutica en estos factores de riesgo es limitada. Aquí se tienen los factores de envejecimiento, sexo, raza, etnia y susceptibilidad genética; especialmente el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE $\epsilon 4$), el cual se considera el mayor factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer (Belloy et al., 2019).

APOE

A diferencia de la enfermedad familiar (aproximadamente el 2% de los casos), donde se conocen de manera puntual los genes afectados y las mutaciones ocurridas, se considera que la EA esporádica corresponde a un desorden poligénico-multifactorial, donde la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE), destaca sobre el resto de los factores genéticos (Stocker et al., 2018). En la relación de la poligenicidad del gen ApoE con la aparición de la enfermedad de Alzheimer, se encontró que la presencia homo-/heterocigoto del alelo $\epsilon 2$ funciona como factor protector, mientras que la presencia del alelo $\epsilon 4$ en combinación con el alelo $\epsilon 2$ genera un riesgo cercano al valor de referencia $\epsilon 3/\epsilon 3$ (factor de riesgo de 1.8 a 3.8, con respecto al valor de referencia 1). No obstante, la presencia del homocigoto $\epsilon 4/\epsilon 4$ eleva el factor de riesgo de 12.5 a 14.9 en personas caucásicas y hasta 33.1 en orientales (Farrer et al., 2015).

DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Después de la breve publicación de 1907, el Dr. Alzheimer escribió un segundo documento en 1911, donde discute el caso del paciente Johann F, junto con el ya mencionado caso de la paciente Auguste D. En este documento de 30 páginas, el Dr. Alzheimer proporcionó detalladamente datos clínicos, biográficos y neuropatológicos del paciente Johann F. Cabe destacar el uso, novedoso para la época, de pruebas diagnósticas inmunológicas en sangre y suero, en las cuales se realizó la prueba desarrollada en 1906 por Von Wassermann para la detección de sífilis; también se utilizó la punción lumbar para la extracción de líquido cefalorraquídeo, donde se realizó conteo celular, con resultados negativos (Alzheimer, 1991; Möller & Graeber, 1998).

En ambos casos, el Dr. Alzheimer describe la presencia de signos clínicos los cuales coinciden en la incapacidad para retener información, desorientación de tiempo y lugar, alucinaciones, incapacidad del reconocimiento de objetos, deterioro en la comprensión y la expresión del lenguaje. Ambos pacientes alcanzaron un estado avanzado de deficiencia mental con prominentes trastornos agnósicos, afásicos y apráxicos. Finalmente, la progresión de la enfermedad condujo al deterioro de las funciones cognitivas, a tal grado de presentar un estado demencial profundo, el cual los obligó a permanecer recostados, incapaces de responder a estímulos externos hasta el momento de su muerte, en ambos casos por complicaciones de neumonía (Maurer et al., 1997; Möller & Graeber, 1998).

La *Organización Mundial de la Salud* (OMS) define la demencia como un síndrome “generalmente de naturaleza crónica o progresiva, caracterizado por el deterioro de las funciones cognitivas” (la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio), más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación, sin afección de la conciencia (*OMS / Demencia*, 2017).

Para la *Alzheimer's Disease International* (ADI), el término demencia engloba “aquellos síndromes cerebrales progresivos que afectan la memoria, el pensamiento, el comportamiento y las emociones”. Sus formas y presentaciones pueden ser muy variadas, estimando la existencia de más de 100 tipos de demencia, destacando la demencia tipo Alzheimer, que representa el 50-60% de todos los casos. Otras formas de demencia incluyen la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy y la demencia fronto-temporal (ADI,

2017). Particularmente, la patología conocida como Enfermedad de Alzheimer (EA) presenta cambios histológicos específicos en el parénquima cerebral de los pacientes; los cuales fueron descritos por el Dr. Alzheimer y corresponden a las marañas neurofibrilares, placas amiloides y angiopatía vascular amiloide (Kaj Blennow et al., 2006).

En 1991 H. Braak y E. Braak realizaron un análisis sobre la progresión de la patología a partir de la observación en lesiones de tejido cerebral en 83 individuos con diferentes grados de demencia. De esta forma, se llegó a la conclusión que la localización y la cantidad de marañas neurofibrilares correlacionan con el daño y la progresión de la enfermedad, y que ésta puede subdividirse, además, en diferentes estadios. Se definieron seis etapas, las cuales se agrupan según la distribución de las regiones predominantemente afectadas, estas son: etapa transentorrinal (I y II), etapa límbica (III y IV) y la etapa isocortical (V y VI) (H Braak & Braak, 1991). Por otro lado, la progresión en la carga de depósitos amiloides se estadificó en 3 etapas (A, B y C), predominantemente en el isocortex y las porciones basales de los lóbulos frontal, temporal y occipital. No obstante, concluyeron que el tamaño y la forma de los depósitos son muy variables entre individuos, por lo que es difícil establecer un patrón entre la progresión de la enfermedad y la carga de placas amiloides en el parénquima cerebral (H Braak & Braak, 1991). A pesar de la controversia, múltiples autores sostienen que las alteraciones por el péptido amiloide, anteceden a la aparición y el daño ocasionado por las marañas neurofibrilares (Masters et al., 1985; Serrano-Pozo et al., 2011; Sutphen et al., 2015).

Las alteraciones que ocurren en la enfermedad de Alzheimer son complejas y suceden a diferentes escalas, en un espacio temporal prolongado; además, el deterioro mental

perceptible es subjetivo y varía de individuo a individuo (Perl, 2010). Con base en esto, se ha optado por dividir la progresión del padecimiento en tres fases.

La imagen 1 muestra los eventos ocurridos en las tres fases de la enfermedad. La primera fase corresponde a la fase bioquímica, donde se presenta la formación de agregados de las proteínas implicadas en la patología (proteostasis), lo que genera estrés celular y da pie a la segunda fase de la enfermedad. En la fase celular (fase 2), es posible encontrar cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, alteraciones en la actividad de la neuroglía (microglía, astrogliía, oligodendrocitos) y daño en la conducción sináptica, principalmente en hipocampo, principalmente en los potenciales de larga duración (LTP). Finalmente, en la fase tres (fase clínica), la pérdida de la homeostasis del sistema nerviosos central es perceptible clínicamente debido al deterioro cognitivo el cual puede ser detectado a través de pruebas diagnósticas (estudios de imagen y test cognitivos).

Sin embargo, se estima que desde el inicio de la primera fase, hasta el inicio de la fase final, hay un espacio temporal de aproximadamente 20 años, en el cual es difícil percibir cambios en las personas afectadas (De Strooper & Karran, 2016)

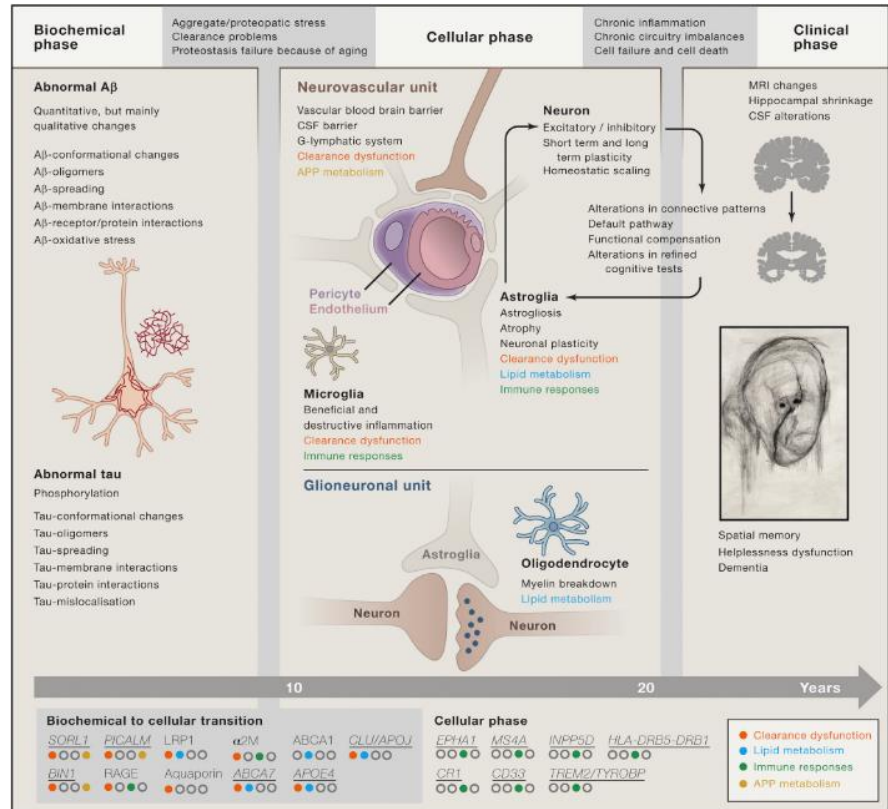


Imagen 1. Fases de progresión de la enfermedad de Alzheimer. Dividida en fase bioquímica, fase celular y fase clínica. Tomada de: De Strooper, B., & Karran, E. (2016). *The Cellular Phase of Alzheimer's Disease*. Cell.

NEUROPATOLOGÍA: LESIONES CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

Desde los hallazgos realizados por el Dr. Alzheimer hace más de 100 años, se ha debatido acerca de los mecanismos que podrían explicar el inicio y la evolución de la patología. Se han identificado varios componentes importantes, los cuales influyen de manera determinante en el establecimiento y progresión de la enfermedad, por ejemplo las mutaciones en la proteína precursora del amiloide (APP), las enzimas presenilinas y la proteína Tau (Kaj Blennow et al., 2006).

Péptido β -Amiloide

Proteína Precursora del Amiloide (APP)

El péptido β -amiloide fue aislado, purificado y secuenciado por primera vez en 1984 por Glenner & Wong como una cadena de 42 residuos de aminoácidos, sin homología con ninguna proteína conocida hasta el momento y que formaba el principal constituyente de los agregados amiloides (Glenner & Wong, 1984); en ese momento se supuso su procedencia a partir del procesamiento de un antecesor proteico de mayor tamaño. La proteína precursora del amiloide (APP) fue descrita 4 años después al aislamiento del péptido amiloide, mediante la amplificación del cDNA en una línea celular de glioblastoma ATCC HTB14, donde se determinó la secuencia del ADN restante, que codifica para una proteína con 8 formas alternativas de splicing (Kitaguchi et al., 1988). Asimismo, se identificó el gen codificante, el cual se localiza en el cromosoma 21, situación que explica la mayor producción de β -amiloide en pacientes con Síndrome de Down (Masters et al., 1985). Además, se identificaron las 3 isoformas predominantes en cerebro (APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀), las cuales poseen la

misma región transmembranal del péptido A β y son potencialmente amiloidogénicas (Wilson et al., 1999).

Actualmente, la función del APP y de sus metabolitos continúa sin definirse completamente. No obstante, se han sugerido diferentes implicaciones en la regulación de la sinaptogénesis, en el tráfico axonal, maduración de neuropéptidos, en adhesión celular, señalización celular, regulación de factores de transcripción y en procesos apoptóticos (Hook et al., 2002; Zhang et al., 2011). La imagen 2 muestra un esquema con adiferentes dominios en la familia de proteínas APP, conservados evolutivamente (Müller & Zheng, 2012).

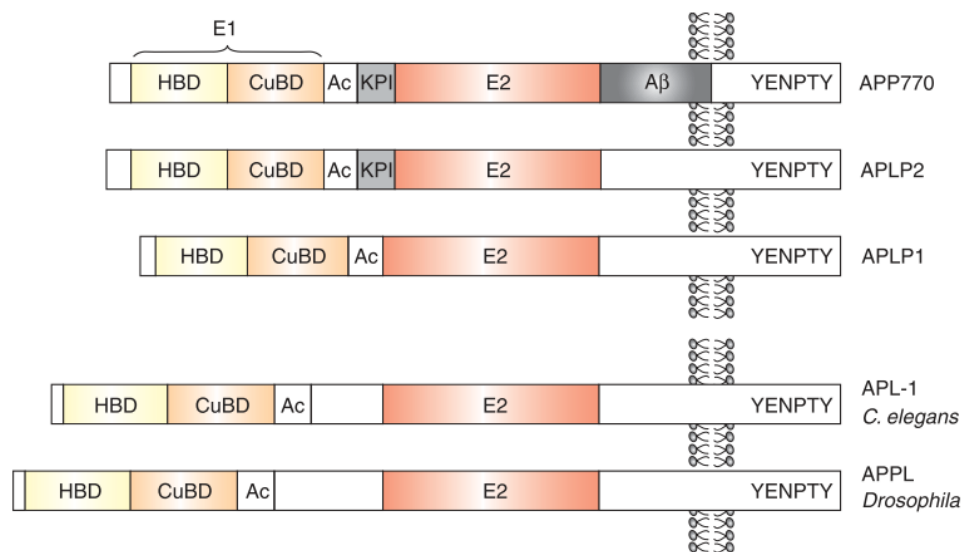


Imagen 2. Vista esquemática de los dominios de la familia de APP. En la imagen se observa el dominio E1 formado por las regiones de unión a heparina (HBD) y de unión a cobre (CuBD), y el dominio E2, ambos conservados evolutivamente. Sólo en la proteína APP770 humana presenta la región transmembranal A β . Imagen obtenida de Müller, U. C., & Zheng, H. (2012). *Physiological functions of APP family proteins*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). doi.org/10.1101/cshperspect.

La proteína APP es procesado por 3 enzimas en dos vías distintas: En la primera vía, que corresponde a la vía no amiloidogénica, la α -secretasa corta en el aminoácido 17 del dominio de A β y libera el fragmento soluble- α del APP (sAPP α). Posteriormente la γ -secretasa corta el fragmento carboxilo terminal- α (α TCF), lo que libera el dominio

intracelular del APP (AICD) y los péptidos de 22 a 24 residuos llamados P3, no formadores de placas amiloides.

En la forma alternativa, la vía amiloidogénica, la β -secretasa corta entre los aminoácidos Met596 y Asp597 de la secuencia total del APP (1Asp del dominio de A β), liberando el fragmento soluble- β del APP (sAPP β), lo que define el primer aminoácido del péptido A β . Posteriormente la γ -secretasa corta el fragmento carboxilo terminal- β (β CTF) en la región trans-membranal, que corresponde al extremo carboxilo-terminal del péptido A β , liberando el péptido mAICD y el péptido β -amiloide (Wilson et al., 1999; Zhang et al., 2011). Entre las variaciones en la longitud de los fragmentos generados, los péptidos β -amiloide A β x-40/42 son predominantes en la formación de placas amiloides (Naslund et al., 1994), dándole a estos péptidos un papel central en el establecimiento y la progresión de la enfermedad (Gunn et al., 2010).

Teoría de la Cascada Amiloide

La teoría de la cascada amiloide es una de las hipótesis más aceptadas para explicar la secuencia de eventos patógenos que conducen a la enfermedad de Alzheimer. Según esta teoría, la acumulación cerebral de A β es la principal influencia en el inicio y el resto del proceso en la enfermedad de Alzheimer. Inclusive, la formación de marañas neurofibrilares de tau es resultado del desequilibrio entre la producción y eliminación de A β (Hardy, J; Selkoe, 2002).

La teoría se formuló después del hallazgo de que las mutaciones autosómicas dominantes, que causan el inicio temprano en la Enfermedad Familiar de Alzheimer (FAD), ocurren en tres genes: PSEN1, PSEN2 (presenilinas 1 y 2; subunidades de γ -secretasa) y en APP. Sin embargo, esta hipótesis se ha ido modificando ya que la correlación entre la

demencia y la acumulación de A β en el cerebro no es lineal, ni en humanos ni en ratones transgénicos (Karran et al., 2011). En realidad, se desconocen las condiciones precisas *in vivo* que intervienen para la formación de agregados de β -amiloide, y del periodo de aparición hasta la edad adulta en la enfermedad esporádica (SAD) y familiar (FAD), así como el mecanismo exacto por el cual estos agregados producen toxicidad. Tampoco se conoce la relación que tiene el β -amiloide con otras proteínas, como la proteína P-Tau y la ApoE en la formación de agregados (De Strooper & Karran, 2016). En la imagen 3 se observa un esquema que resume la teoría de la cascada amiloide y los componentes que intervienen.

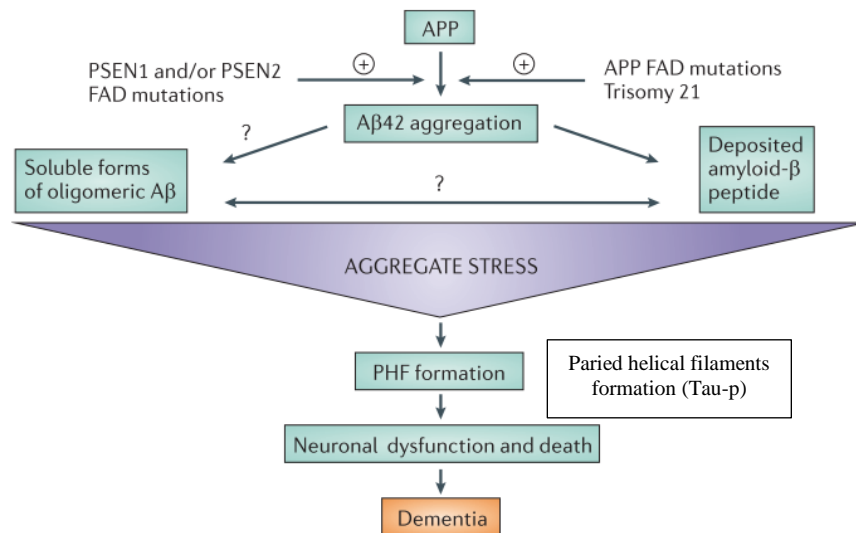


Imagen 3. Teoría de la cascada amiloide La formación de agregados del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer familiar, son causadas por un mal procesamiento de la proteína APP debido a las mutaciones autosómico dominantes en los genes PSEN1 y PESEN2, o por aumento de la producción de APP, como en el caso de la trisomía 21. Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(9), 698–712.

Recientemente, se ha propuesto la formación de ligandos difusibles derivados del β -amiloide (ADDL) u oligómeros solubles para explicar la sinaptotoxicidad y la neurotoxicidad del péptido β -amiloide. Estas estructuras se han postulado como intermediarios dinámicos entre los monómeros de β -amiloide libres y solubles, y la formación de las fibrillas amiloides insolubles. Sin embargo, la estructura molecular exacta de los oligómeros *in vivo* sigue siendo difícil de resolver (Dammers et al., 2017).

Placas amiloides

A grandes rasgos, la agregación de los diferentes tipos de péptido β -Amiloide se produce de una manera dependiente de la nucleación, en la que varias copias del péptido estructurado se ponen en contacto, presumiblemente a través de interacciones hidrófobas y/o electrostáticas, formando núcleos oligoméricos coloidales (Dammers et al., 2017). Después de la formación de núcleos y una fase lag, la agregación avanza rápidamente a través de la unión consecutiva de oligómeros, para formar estructuras de orden superior como protofibrillas, y posteriormente, fibrillas insolubles que contienen una estructura β característica (Finder & Glockshuber, 2007).

Estas fibrillas luego se asocian entre sí y forman agregados densos llamados placas, los cuales son conglomerados altamente estables formados de β -amiloide de diferentes longitudes, además de otros componentes celulares como carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, iones metálicos, entre otros, los cuales se han observado pueden intervenir como catalizadores en la agregación de A β y aumentar su grado de citotoxicidad (Stewart & Radford, 2017). En la imagen 4A se muestra la secuencia de aminoácidos en A β 42 y las regiones de interacción con otras moléculas. Mientras que en 4B se observa una fotografía de un agregado amiloide y el contenido hipotético de diversas biomoléculas.

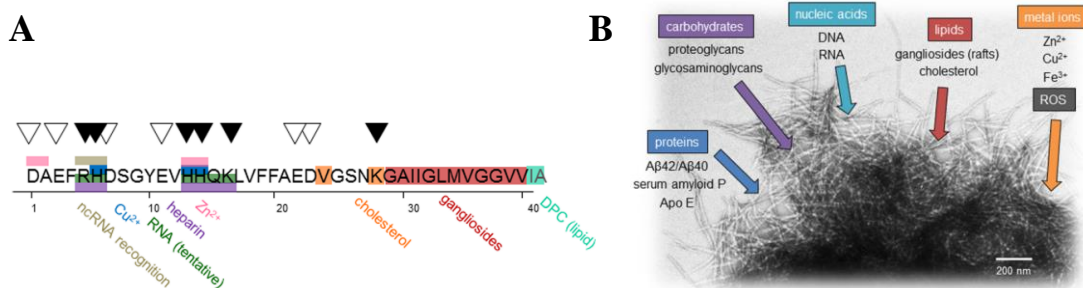


Imagen 4.A) Secuencia de aminoácidos en A β 42 con diferentes regiones de interacción a otras moléculas. B) Fotografía de un agregado amiloide en interacción hipotética con proteínas (azul), carbohidratos (morado), ácidos nucleicos (agua), lípidos (rojo), iones metálicos (naranja). Stewart, K. L. & Radford, S. E. (2017). Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophysical Reviews*, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0271-9>

β -Amiloide pE3-42

Como se mencionó anteriormente, las placas amiloides poseen una composición variada de elementos celulares y especies de A β . Aunado a la variabilidad de especies de A β , estos péptidos pueden sufrir múltiples modificaciones postraduccionales en su cadena de aminoácidos; en la imagen 5 se observan algunos las modificaciones que pueden existir en los diferentes aminoácidos de A β 42: oxidación (Met³⁵), fosforilación (Ser^{8,26} y Tyr¹⁰), nitroxidación (Tyr¹⁰), glicosilación (Tyr¹⁰), isomerización espontanea (Asp^{1,7}), racemización (Ser²⁶, Asp¹) y formación de especies piro en Glu³ y Glu¹¹ (Kummer & Heneka, 2014).

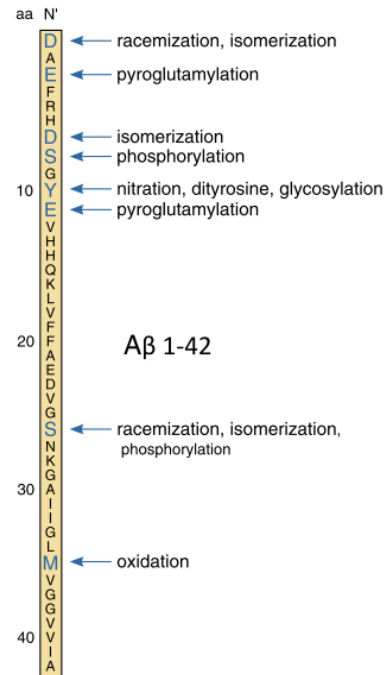


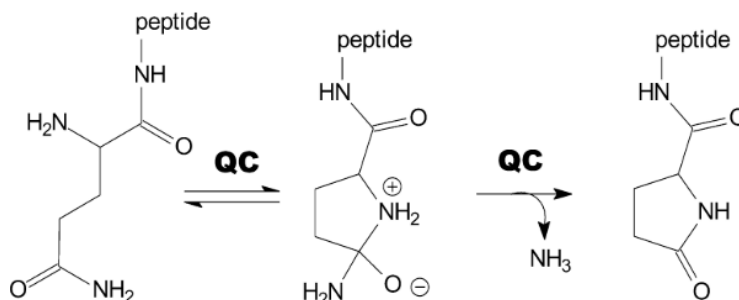
Imagen 5. Modificaciones postraduccionales en el β -amiloide 1-42. Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2014). Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Research & Therapy*

Una de las especies de A β que ha adquirido mayor relevancia en los últimos años es la forma piroglutamato amino-truncada, debido a que se le ha observado en la composición de placas amiloides y en un alto porcentaje de la totalidad de A β en parénquima cerebral de pacientes con EA (Harigaya et al., 2000; Miravalle et al., 2005; Saido et al., 1995).

Para la formación de las especies aminotruncadas, el péptido A β es cortado por acción de la aminopeptidasa-A, la cual elimina los primeros dos aminoácidos de la secuencia de A β , lo cual genera la especie de A β N3 (Sevalle et al., 2009). En un caso distinto, la enzima BACE (β -Secretasa) tiene la capacidad de cortar el APP en una región diferente del sitio- β original (Lee et al., 2003). BACE puede cortar directamente entre los aminoácidos Tyr¹⁰ y Glu¹¹ del dominio del β -amiloide, lo cual se conoce como corte- β' , eliminando los diez

aminoácidos previos al aminoácido Glu11 para formar la especie truncada Aβ N11 (Liu et al., 2002).

Una vez formadas las especies truncadas de Aβ, el ácido glutámico en la primera posición del aminoterminal es susceptible de funcionar como sustrato para la enzima glutaminilciclasa (QC) (Schilling et al., 2004), la cual genera la ciclación de la cadena lateral del aminoácido formando la especie piroglutamato (pE), como se muestra en la imagen 6, lo que confiere al péptido mayor hidrofobicidad, aumenta la formación de oligómeros, disminuye la susceptibilidad contra aminopeptidasas y aumenta la citotoxicidad (Gunn et al., 2010; Kummer & Heneka, 2014). Estudios *in vivo* han demostrado que la inhibición de las glutaminilciclasas disminuye en gran medida la formación de placas amiloides, lo que proporciona evidencia consistente sobre la acción de las especies piro como semillas en la formación de agregados (Schilling et al., 2008).



Scheme 1. N-terminal cyclization of glutamyl peptides by QC.

Imagen 6. Ciclación N-terminal del péptido glutamato sin carga por QC (CE). Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H. U. (2004). Glutamyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. FEBS Letters, 563(1–3)

Las especies piro- se han identificado principalmente en las capas celulares del hipocampo que reciben proyecciones aferentes de la corteza entorrinal y el locus coeruleus, las cuales son poblaciones neuronales ricas en glutaminilciclasa (Hartlage-Rübsamen et al., 2011), particularmente, los depósitos de AβpE se localizan en el estrato molecular del giro

dentado (DG); así como en la capa lacunoso molecular y radial del hipocampo (Hartlage-Rübsamen et al., 2011). En la imagen 7 se muestra un esquema de las regiones del hipocampo y sus diferentes estratos.

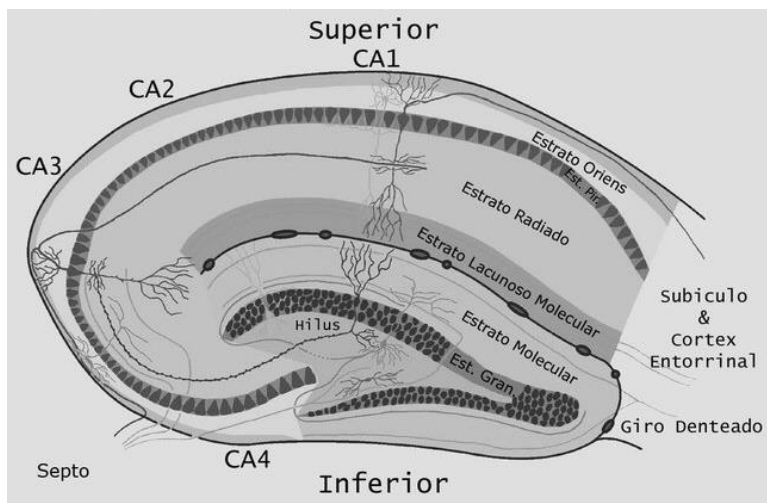


Imagen 7. Formación hipocampal; CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Se ilustran los estratos del hipocampo: Radiado, Lacunoso molecular, Molecular y Granuloso. Fuente: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html

Toxicidad por A β

Durante algún tiempo se consideró a los péptidos con secuencia canónica de A β los principales actores en la EA. Sin embargo, las discrepancias en la teoría de la cascada amiloide, señalaron que podría existir algún cofactor con propiedades patológicas. Una opción viable para jugar el papel de cofactor, son los péptidos de A β con modificaciones en su secuencia de aminoácidos; predominantemente los péptidos truncados en el aminoácido -42 en la región carboxilo y en los aminoácidos 3- y 11- con la modificación piro- en el amino-terminal (Dunys et al., 2018). Las especies piroaminotruncadas de A β x-42 han demostrado tener un mayor grado de toxicidad y agregación en pruebas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* con modelos transgénicos de *Drosophila* (Jonson et al., 2015; Sofola-Adesakin et al., 2016) y modelos murinos (Wirhth et al., 2009; Wirhth, Bethge, et al., 2010), donde la inducción en la expresión de A β pE3-42 ha resultado en el acortamiento de la esperanza de vida, acumulación de diferentes péptidos A β , alteraciones en el sistema locomotor y correlación histológica de las lesiones con la toxicidad de los agregados (Alexandru et al., 2011; Sasaguri et al., 2017).

Actualmente, se han encontrado evidencias que indican la sobre-expresión de la enzima QC en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer, así como regiones subcorticales con alta expresión de QC en modelos transgénicos (Hartlage-Rübsamen et al., 2011), lo cual correlaciona con la presencia de A β pE3-42 y su concentración significativamente mayor en el tejido cerebral de pacientes, en comparación con el tejido de controles sanos (Moro et al., 2018). Más aún, las observaciones de diferentes autores, indican que la localización de esta especie de A β , es predominantemente en depósitos intraneuronales en estadios tempranos y de modo central en la formación de placas amiloides a manera de “núcleo”, diferente de otras especies de A β (Hartlage-Rübsamen et al., 2011; Moro et al., 2018).

A pesar de décadas de investigación, la relación entre tamaño, estructura y toxicidad de los oligómeros de A β 42 siguen sin estar del todo clara, debido a las dificultades técnicas para el estudio de la formación dinámica de dichos oligómeros, caracterización de las especies observadas y asignación de la toxicidad de forma independiente (Bisceglia et al., 2018). Se sospecha que la toxicidad de la especie A β pE3-42 está íntimamente ligada a la rápida formación de agregados de bajo peso molecular y a las modificaciones en la cinética de polimerización (Dammers et al., 2017; Wirths, Erck, et al., 2010). El bloqueo de los oligómeros de A β pE3-42, ha mostrado tener un impacto en la agregación de otros péptidos A β y en el grado de toxicidad en cultivos celulares y en animales transgénicos (Wirths, Erck, et al., 2010). En consecuencia, se postula que las especies piro de A β están implicadas en el inicio de la formación de agregados oligoméricos intracelulares *in vivo*, los cuales pudieran estar funcionando como “semillas de agregación” y con ello la acumulación de otras especies de A β (Sullivan et al., 2011).

Proteína Tau

Marañas fibrilares

Las marañas neurofibrilares están formadas principalmente por agregados de la proteína Tau hiperfosforilada y con plegamiento aberrante. Esta proteína en condiciones normales funciona como un estabilizador de los microtúbulos en el transporte axonal; sin embargo, en las condiciones mencionadas, adquiere una morfología parecida a la de un listón enredado, altamente agregante con propiedades tóxicas (Heiko Braak & Del Tredici, 2012).

Las alteraciones en la proteína Tau se describieron a partir de la identificación de mutaciones en el gen que codifica para esta proteína, asociada a los microtúbulos, en la demencia frontotemporal hereditaria y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) (Hutton, 2001). Estas taupatías se presentan de manera temprana con cambios conductuales, acompañados de alteraciones cognitivas y motrices (Lewis et al., 2000).

La relación de la proteína Tau con el péptido A β no está del todo esclarecida; sin embargo, se propone que los oligómeros de A β pE tienen la capacidad de inducir la fosforilación de la proteína Tau a manera de un catalizador (Mandler et al., 2014). Esta idea ha llevado a pensar a algunos autores que los agregados de A β podrían tener la particularidad de propagarse en forma de infección; es decir, agregados de A β pE con propiedades *prion-like*, donde los oligómeros son diseminados por mecanismos axonales de neurona a neurona por vías anatómicas definidas (Hartlage-Rübsamen et al., 2011), promoviendo la agregación de diversas especies del péptido A β y la fosforilación de la proteína Tau, así como su polimerización (Walker & Jucker, 2015).

Angiopatía Cerebral Amiloide

La angiopatía cerebral amiloide (CAA) es la acumulación de amiloide en los vasos sanguíneos dentro del tejido cerebral, el cual es detectado por tinción con el colorante rojo Congo que se une al amiloide compactado en su estructura secundaria de lámina- β . La CAA ocurre principalmente en las arterias y arteriolas de tamaño mediano en los vasos de las leptomeninges y corticales (Wilcock et al., 2006).

En la EA, los agregados vasculares están formados por las mismas especies de A β que forman las placas amiloides en el parénquima cerebral. La presencia de CAA puede provocar hemorragias que van desde microhemorragias, hasta aneurismas lo que resulta en un mayor deterioro cognitivo e incluso la muerte (Kulic et al., 2012).

Modelo Murino de Alzheimer 3xTgAD

El reconocimiento de las mutaciones autosómico-dominantes en los genes de APP y presenilinas de los pacientes con enfermedad familiar de Alzheimer, ayudo al desarrollo de diversos modelos transgénicos, ya que se demostró que la presencia de las mutaciones modificaban el procesamiento normal del APP, al promover la formación de péptidos β -amiloide con termiación en el residuo 42 y la formación de especies aminotruncadas (Gambetti et al., 2000;Mullan et al., 1992; Selkoe, 1998).

El modelo murino conocido como triple transgénico (3xTgAD), fue construido usando la técnica de microinyección pronuclear, en el cual se insertaron dos transgenes independientes que codifican para la doble mutación genética de humano “Swedish” (APP KM670/671NL), junto con la mutación humana de Tau P301L (Tau_{P301L}) (ambos bajo el control del elemento regulador Thy1.2 de ratón, expresado en células neuronales). Estos

genes fueron colocados en células embrionarias, obtenidas de ratones homocigotos con la mutación PS1_{M146V} (PS1-KI), con un fondo híbrido 129/C57BL6 (Oddo et al., 2003).

El animal resultante mostró tener buena correlación anatomopatológica con las lesiones clásicas presentes en los pacientes de Alzheimer (Belfiore et al., 2019; Oddo et al., 2003); así como el deterioro de memoria que caracteriza a la enfermedad (Stover et al., 2015).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Inicialmente, los protocolos internacionales utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, fueron establecidos por el *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* y la *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) en 1984. Estos protocolos contemplaron los antecedentes clínicos y pruebas clínicas complementarias como cuestionarios neuropsicológicos, como el Mini-Mental State (MMS); además de pruebas de gabinete como electroencefalografía, potenciales evocados y tomografía computarizada (G. McKhann et al., 1984).

Estos criterios fueron revisados y actualizados 27 años después, por un grupo de expertos pertenecientes a la *National Institute on Aging-Alzheimer Association* (NIA-AA), los cuales, definieron la clasificación actual de la enfermedad de Alzheimer: **Demencia Alzheimer probable** y **Demencia Alzheimer probable con mayor nivel de certeza** (la última considera la evidencia de mutaciones genéticas causantes de la enfermedad). **Posible demencia Alzheimer**, subdividida en **progresión atípica** y **etiología de presentación mixta** para diferenciar de aquellas entidades que no cumplen todos los criterios propuestos inicialmente para el diagnóstico de demencia, o para las que se presentan concomitantemente con alguna otra alteración. Finalmente, se menciona el término **probable o posible demencia Alzheimer con evidencia de procesos patofisiológicos de Alzheimer**, destinado para propósitos de investigación. Este último rubro considera el uso de biomarcadores para la detección a través de la cuantificación del péptido A β 1-42 en líquido cefalorraquídeo (LCR) y la detección de agregados amiloides por imagen PET con compuesto-B de Pittsburgh (PiB) (G. M. McKhann et al., 2011).

Otra estrategia empleada, es la detección de degeneración neuronal o de lesión; en este caso se cuantifica la presencia de la proteína Tau total e hiperfosforilada en LCR, la captación de 18F-fluorodesoxiglucosa (FDG) por PET en la corteza temporoparietal, y la atrofia desproporcionada vista a través de TAC estructural en el lóbulo temporal, basal, lateral y la corteza parietal medial (G. M. McKhann et al., 2011).

Cabe destacar que el diagnóstico definitivo se realiza *post mortem*, tras la identificación de las dos lesiones características de la enfermedad. Para su estudio, las placas amiloides son teñidas con Tioflavina-S y Rojo Congo, siendo este último el *gold standard* para la detección de los agregados amiloides en el diagnóstico de la patología. Además, esta tinción permite la clasificación de las lesiones en dos tipos de placa: las placas difusas y las placas densas, esto dependiendo de su morfología y afinidad al colorante. Las placas densas pertenecen a depósitos con núcleos densos y compactos, que típicamente se encuentran rodeadas por neuronas distróficas, astrocitos reactivos y microglía activada; mientras que el otro tipo de placa tiene poca afinidad al colorante (Serrano-Pozo et al., 2011).

Acorde con esta metodología, la NIA-AA publicó en el 2012 un consenso de las guías Estadounidenses y Europeas de la evaluación neuropatológica en la enfermedad de Alzheimer, donde se mencionan los principales cambios neuropatológicos del padecimiento, basados en los datos recopilados en 30 instituciones de Estados Unidos en una cohorte del 2005 al 2010 con más de 1200 autopsias. En este documento se ratificó la presencia de las placas seniles y las marañas neurofibrilares como lesiones esenciales para el establecimiento del diagnóstico *post mortem*, así como la concomitancia de otras patologías que comúnmente coexisten con estos cambios neuropatológicos (Hyman et al., 2012).

Por otro lado, los esfuerzos actuales se han centrado en la identificación temprana de la enfermedad, lo cual implica la diferenciación de manera oportuna entre un estado normal

de decaimiento cognitivo propio del envejecimiento, y un estado prodrómico de demencia. Por consiguiente, la etapa de Mild Cognitive Impairment (MCI) es crucial en el diagnóstico temprano (R C Petersen, 2003). De ahí que la mayoría de las pruebas diagnósticas y los tratamientos en desarrollo estén dirigidas a este tipo de pacientes (Mattsson et al., 2017).

Métodos Diagnósticos en Desarrollo

Compuesto-B de Pittsburgh (PiB)

Una de las técnicas más avanzadas para el diagnóstico de la enfermedad, fue publicada en un estudio del 2004, donde se utilizó un compuesto desarrollado en la Universidad de Pittsburgh (N-metil-[¹¹C]2-(4'-metilaminopenil)-6-hidroxibenzotiazol), una molécula perteneciente a la familia de los benzotiazoles, conocida como “Compuesto-B de Pittsburgh” (PiB). Su administración alcanza el parénquima cerebral en cantidades suficientes y se une a las fibrillas de A β de manera transitoria, lo que permite obtener imágenes por PET y posteriormente eliminar el compuesto del tejido cerebral, sin presentar daño por toxicidad para el cerebro (Klunk et al., 2004).

El estudio en el que se probó la eficacia del compuesto, demostró tener buena correlación entre las áreas marcadas con él PiB y las áreas clásicamente afectadas en pacientes con Alzheimer (corteza frontal, parietal, temporal, occipital y cuerpo estriado) por estudios de imagen PET. Además se encontró correlación inversa con el estudio PET del metabolismo cerebral de la glucosa (18F-fluorodesoxiglucosa) (Klunk et al., 2004).

Detección de A β , Tau y P-Tau en LCR

Estudios han confirmado la presencia, en líquido cefalorraquídeo, de múltiples especies aminotruncadas del péptido A β en fases tempranas de la enfermedad (Kaj Blennow,

2017)(Mattsson et al., 2017)(K. Blennow & Zetterberg, 2018). Courtney L. Sutphen y colaboradores, realizaron un ensayo clínico longitudinal en la Universidad de Washington con pacientes jóvenes propensos a desarrollar la enfermedad de Alzheimer (portadores de alelo ApoE ϵ 4), se detectó la disminución en las concentraciones del péptido A β 42 (nivel basal reportado con Kit INNOTEST 450-650 pg/mL; concentración reportada en el artículo = 1041 pg/mL), contenido en LCR de adultos jóvenes (de 45 a 54 años) y adultos de mediana edad (de 55 a 64 años), previo al desarrollo de la enfermedad y previo a la detección con el PiB. Este estudio concluyó que la formación de oligómeros de A β , en estadios tempranos de la enfermedad, secuestran los oligómeros solubles del péptido A β de la corteza cerebral, los cuales son indetectables para el PET-PiB, pero no así para los biomarcadores de A β 42 en LCR (Sutphen et al., 2015).

De igual forma, se encontró que el aumento promedio anual de las proteínas Tau y P-Tau en LCR, en adultos de 55 a 64 años, correlacionaba significativamente en portadores del alelo ApoE ϵ 4 en comparación con los no portadores del alelo ApoE ϵ 4, lo que a su vez se correlaciona con el daño y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Sutphen et al., 2015).

Según la revisión realizada por Niklas Mattsson et al., las pruebas con A β 42, Tau y P-Tau en LCR para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, ya cuentan con resultados preliminares de estos biomarcadores; actualmente se están probando en estudios longitudinales, para el diagnóstico temprano en estadios de MCI y la determinación de la tasa de detección de casos positivos y falsos (Mattsson et al., 2017).

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente los medicamentos empleados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer son paliativos, esto significa que están orientados solo al mejoramiento de los síntomas, ya que no existe un tratamiento que cure o detenga la enfermedad. Existen dos familias de medicamentos aprobados por la FDA, los cuales pueden ayudar a disminuir los síntomas por tiempo limitado: los inhibidores de la colinesterasa (Galantamina, Rivastigmina, Donepezil), utilizados para mitigar la pérdida de la memoria y aprendizaje, y Memantina, un fármaco antagonista no competitivo del receptor NMDA, que regula la actividad del glutamato y el flujo de calcio. Este último fármaco se utiliza solo o en combinación con Donepezil (Association & Alzheimer's Association, 2017).

Otra clase de medicamentos, considerados en las guías mexicanas de práctica clínica del Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC), son los antidepresivos (Citalopram, Paroxetina, Sertralina), antipsicóticos (Haloperidol, Quetiapina) y estabilizadores del estado de ánimo (Carbamazepina, Valproato de Magnesio)(CENETEC, 2010).

Inmunoterapia

Se han propuesto múltiples estrategias para diagnosticar, prevenir e inclusive detener la progresión o aparición de la enfermedad. Una de estas estrategias es la inmunoterapia, de la cual se reconocen dos clases: la inmunización activa, en la cual se estimula la producción de anticuerpos contra un antígeno determinado; no obstante, los resultados obtenidos no se han obtenido resultados favorables en las pruebas de fase clínica, debido a la incidencia de reacciones adversas durante el tratamiento, como meningoencefalitis y la presencia de edema

y/o hemorragias detectadas por estudios de imagen en parénquima cerebral, conocidas como *Amyloid Related Imaging Abnormalities* (ARIA). Por otro lado, se ha considerado a la inmunización pasiva como una opción de mayor seguridad para el tratamiento de la enfermedad, dada la posibilidad de suspender el tratamiento en caso de efectos adversos (Spencer & Masliah, 2014).

AMYLOID RELATED IMAGING ABNORMALITIES (ARIA)

Los efectos adversos valorados por estudios de imagen, clásicamente por Resonancia Magnética (RM), asociados con la administración experimental de agentes modificadores de la enfermedad, se presentan como: edema vasogénico y microhemorragias cerebrales. Estas lesiones son perceptibles tras la valoración de la secuencia de imágenes de RM y se emplea la terminología de ARIA-E para referirse a las lesiones por edema vasogénico, y ARIA-H para las lesiones por microhemorragia, las cuales se localizan con mayor frecuencia en el parénquima y/o leptomeninges de los lóbulos parietal, occipital y frontal, pero también se han observado en el cerebelo y el tronco encefálico (Workgroup, 2013).

Anticuerpos Monoclonales Anti-A β

Múltiples autores han optado por el desarrollo de anticuerpos de alta especificidad a especies neurotóxicas de A β , para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, por transferencia de inmunidad o “Inmunidad pasiva”. Basados en los resultados obtenidos en modelos transgénicos murinos, se ha demostrado la efectividad de estas terapias, en las cuales se observa disminución de agregados amiloides, así como retraso en la neurodegeneración (Dunkelmann et al., 2018; Sasaguri et al., 2017)

Algunos de estos anticuerpos han logrado llegar a etapas avanzadas de evaluación clínica, por ejemplo, los anticuerpos humanizados: **Bapinezumab** un IgG1 humanizado,

producido por Pfizer/Janssen, dirigido contra la región amino terminal del péptido A β de secuencia completa (región de reconocimiento 1-5)(Hu et al., 2015). **Solanezumab** anticuerpo IgG1 humanizado, producido por Eli Lilly, que reconoce la region intermedia del péptido A β (16-24)(Schwarz et al., 2019). **Crenezumab** es un anticuerpo IgG4, lo que ayuda a disminuir la actividad de los receptores Fc gama, resultando en una menor respuesta inflamatoria, este anticuerpo reconoce la región intermedia del péptido A β (13-24) en oligómeros y fibrillas (Ultsch et al., 2016). Estos tres anticuerpos presentan perfiles similares ya que los tres reconocen especies completas del péptido A β (Bouter et al., 2015). De igual forma, los resultados obtenidos por estos monoclonales no han sido concluyentes, debido a la presencia de ARIAs y a la poca o nula respuesta al tratamiento. La imagen 8 muestra un resumen de los principales anticuerpos en pruebas clínicas para el tratamiento de la EA:

Monoclonal	Clase	Generación	Tipo	Región de reconocimiento	Características	Estadio fase clínica	Efectos adversos	Referencia
Bapinezumab	IgG ₁	Primera Generación	Humanizado (3D6)	N-terminal (1-5)	Atraviesa BH Activación de microglía	III Detenido	ARIA-E	Hu et al., 2015
Ponezumab	IgG ₂ Δ a	Primera Generación	Humanizado	C-terminal (33-40)	Respuesta inmune débil Sin mejoría cognitiva	II Detenido	Buena seguridad	Landen et al., 2017
Solanezumab	IgG ₁	Primera Generación	Humanizado	Central (16-24)	Formas solubles No reconoce agregados	III Expedition 3 Detenido	No ARIA Sin mejoría cognitiva	Schwarz et al., 2019
AAB-003	IgG ₁	Segunda Generación	Humanizado Derivado de Bapinezumab	N-terminal (1-5)	Derivado de Bapinezumab, Fc modificado	Suspendido	ARIA-H En dosis altas	Delnomdedieu et al., 2016
GSK933776	IgG ₁	Segunda Generación	Humanizado	N-terminal (1-5)	No hay datos de la efectividad del tratamiento	II	No	Andreasen et al., 2015
Gantenerumab	IgG ₁	Anticuerpos conformacionales	Humano	N-terminal (3-12) Central (18-27)	Reconoce oligómeros, y fibras, pero no A β soluble.	III MCI	ARIA-E en fase I	Ostrowitzki et al., 2017
Crenezumab	IgG ₄	Anticuerpos conformacionales	Humano	Central (12-23)	Reconoce oligómeros, y fibras de A β ₄₂	III Estudio CREAD	No	Ultsch et al., 2016
BAN2401	IgG ₁	Anticuerpos conformacionales	Humanizado (mAb158)	Protofibrillas de A β ₄₂	Reduce protofibrillas de A β en cerebro y LCR.	III MCI	No	Logovinsky et al., 2016
SAR228810	IgG ₄	Anticuerpos conformacionales	Humanizado	Prefibrillas solubles y agregados fibrilares	Diseñado para no activar respuesta inflamatoria.	I	No	Pradier et al., 2018
Aducanumab	IgG ₁	Anticuerpos conformacionales	Humano Extraído de humanos sanos	Epitopo Conformacional	Reconoce agregados soluble y placas	III	ARIA-E En dosis altas	Selkoe, 2019

Imagen 8. Anticuerpos en pruebas de fase clínica para inmunoterapia pasiva contra A β . BH Barrera hematoencefálica, Fc fracción cristalizabile, LCR Líquido cefaloraquideo. Información disponible en <https://www.alzforum.org>.

La ingeniería de anticuerpos y la dosificación adecuada han logrado disminuir los efectos secundarios adversos, generando mayor seguridad del tratamiento como en los anticuerpos Ponezumab, ABB-003, GSK933776, SAR228810 (Landen et al., 2017)(Delnomdedieu et al., 2016)(Andreasen et al., 2015)(Pradier et al., 2018). No obstante, pocos ensayos han demostrado protección cognitiva en fases clínicas, dando incertidumbre sobre la utilidad de los péptidos de A β 42 de secuencia completa como blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer(Selkoe, 2019) (Bouter et al., 2015; van Dyck, 2018).

A pesar de los resultados poco favorables obtenidos en pacientes con la enfermedad de Alzheimer en estadios intermedios y avanzados, existe la esperanza de que la inmunoterapia contra A β , en pacientes presintomáticos MCI, evite la pérdida neuronal y proporcione beneficios clínicos significativos, que puedan aplicarse a poblaciones más grandes como terapias preventivas, estrategia empleada con los anticuerpos Gantenerumab y BAN2401 (Ostrowitzki et al., 2017)(Logovinsky et al., 2016). La búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia nuevos epítomos continua siendo un campo fértil, ya que aún existen múltiples estrategias que deben ser exploradas (Wang et al., 2017).

Probablemente uno de los biomarcadores con mayor auge en la actualidad es el péptido A β pE 3-42, múltiples grupos de trabajo han centrado su esfuerzo en generar anticuerpos contra esta especie de A β modificado (Mehta et al., 2018)(Li et al., 2017)(Antonios et al., 2015). El antecedente del anticuerpo monoclonal 3B8 proviene de los resultados encontrados por G. Acero et. Al en su artículo del 2009, donde se demostró la región inmunodominante del péptido amino truncado A β pE 3-42, localizado en el extremo amino terminal con la secuencia de aminoácidos EFRH (Acero et al., 2009a).

II. JUSTIFICACIÓN

Múltiples estudios preclínicos han demostrado el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento con las pruebas de transferencia de inmunidad, en ensayos clínicos, no han tenido resultados convincentes.

Los péptidos β -Amiloide con modificaciones en su estructura, tales como el piroglutamato en las posiciones 3 y 11, han adquirido relevancia para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, debido a que se ha demostrado en estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, su mayor grado de toxicidad en comparación con las especies completas, además de un mayor grado de resistencia a la degradación y su mayor propensión a la formación de agregados. Así mismo, se han identificado en fases tempranas de la enfermedad, por lo que son consideradas “semillas de agregación” y, por lo tanto, posibles blancos terapéuticos.

El anticuerpo monoclonal 3B8 fue producido en nuestro laboratorio con la técnica de hibridoma a partir de la fusión de células de mieloma y linfocitos B extraídos de un ratón BALB/C inmunizado con el péptido A β pE3-42 sintético, posteriormente fue clasificado como un IgG3 por ELISA y amplificado en medio enriquecido para cultivo celular; es a partir de este medio que se inició la caracterización del anticuerpo.

Este anticuerpo podría actuar a futuro en la detección del biomarcador A β pE3-42 con muestras biológicas, o bien podría dirigirse su empleo hacia la inmunoterapia pasiva, dirigida a evitar la formación de agregados de A β pE3-42. Recientemente, se han reportado en fases preclínicas múltiples anticuerpos desarrollados contra esta especie modificada de A β , debido a su potencial como blanco terapéutico.

III. OBJETIVO

GENERAL

Purificación y caracterización del anticuerpo monoclonal 3B8, dirigido contra la especie β -Amiloide pE3-42 y determinación del epítipo de reconocimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificación de 3B8 a partir del medio de cultivo celular por cromatografía de afinidad.
- Titulación del anticuerpo 3B8.
- Caracterización de la reactividad de 3B8 con distintas especies de β -Amiloide.
- Identificación de la región de reconocimiento del anticuerpo 3B8 por Biopanning.
- Estudio del reconocimiento de agregados amiloides por 3B8 en tejido cerebral humano y modelo transgénico 3xTgAD.

IV. METODOLOGÍA

PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO 3B8

En la técnica de purificación por cromatografía de afinidad, se utiliza una matriz contenida en la columna de cromatografía, la cual está constituida por la proteína-A de *Staphylococcus aureus* purificada, unida covalentemente a perlas de agarosa. El fundamento de la técnica está en la capacidad que tiene la proteína-A para unir a la porción Fc de las inmunoglobulinas, por lo que es adecuada para la purificación de moléculas de IgG, así como algunas clases de IgM e IgA de humano y ratón. Los anticuerpos IgG2a e IgG2b tienen la mejor afinidad por esta proteína, mientras que la IgG3 posee afinidad moderada y IgG1 baja afinidad (Invitrogen, 2010).

Se empleó el kit de purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad de GIBCO®, según el protocolo del fabricante. Se purificó un volumen total de 1 L de medio del cultivo del hibridoma productor del anticuerpo 3B8, se centrifugó a 5000 xg por 10 minutos para descartar el material insoluble y se filtró con membrana de 0.45µm (Nalgene). Se ajustó el pH a 8 con buffer de tris 2M (pH 8); el total del sobrenadante fue alicuotado en volúmenes de 200 ml.

Se equilibró una columna con 1.5 mL de proteína-A agarosa con 3 ml de Tris-NaCl (0.1M- 0.2M, pH 8.2) y se prepararon viales de recolección de 2 ml con 150 µl de Tris 2M (pH 8). Posteriormente se aplicaron 200 mL del sobrenadante de cultivo en la columna. Después se lavó la columna con Tris-NaCl hasta absorbancia <0.1. Se inició la elución de los anticuerpos con Glicina-HCl (0.2 M pH 2.8).

Se colectó un total de cuatro fracciones por cada 250 mL del sobrenadante y se verificó que el pH estuviera entre 7 y 8. El procedimiento se realizó de la misma manera hasta correr 1 L de sobrenadante del hibridoma 3B8.

Realizamos la lectura de absorbancia de las fracciones colectadas a 280 nm, y determinamos la concentración de anticuerpo (mg/ml) con el parámetro establecido para inmunoglobulinas, 1.4 O.D. = 1 mg/ml (Coeficiente de extinción).

Solo las fracciones con mayor concentración se utilizaron para caracterizar al anticuerpo, el resto de las fracciones se mezclaron en una sola alícuota, la cual fue dializada, liofilizada y almacenada a -20°C, para su posterior uso.

TITULACIÓN DEL ANTICUERPO 3B8

La titulación del anticuerpo se realizó mediante un ensayo de ELISA. Se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pozos con 0.3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ por pozo del péptido sintético β -Amiloide pE3-42, disuelto en Buffer de Carbonatos (pH 9.5) y se incubó toda la noche a 4°C.

Se realizaron tres lavados con 300 μl de la solución de lavado (PBS 1x/Tween 20 al 0.2%) y se realizó el bloqueo con PBS 1x/Tween al 0.2%/Leche descremada 2% (PBLT), durante una hora a 37°C. Al terminar la incubación, se realizaron tres lavados y se agregó el anticuerpo purificado 3B8, disuelto en PBLT por duplicado en diluciones dobles seriales, a partir de 1:1000 hasta 1:128000. La placa de ELISA se incubó durante una hora a 37°C y se realizaron nuevamente tres lavados.

Finalmente, siendo de nuestro conocimiento que 3B8 es un anticuerpo IgG3, se utilizó un anticuerpo comercial anti-IgG3 acoplado a HRP, hecho en cabra anti-Fc de ratón, disuelto 1:1000 en PBLT. Este se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente se realizaron tres lavados, para finalmente añadir 100 μl de ABTS de BIORAD®. La lectura de la placa se realizó con filtro de 420 nm a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

IDENTIFICACIÓN DE AGREGADOS DE β -AMILOIDE SINTÉTICO EN WESTERN BLOT

Mediante un ensayo de Western Blot, se analizó la capacidad de 3B8 para identificar diferentes estados de agregación del péptido pE3-42, así como otras especies del péptido A β (A β 1-42 y A β pE11-42), con el siguiente protocolo: se preparó un gel estándar de acrilamida al 15%, Acrilamida/Bis-acrilamida (T=30%/C=0.8%) Tris 1.5M (pH8.8), Gel concentrador acrilamida/Bis-acrilamida al 4% Tris 0.5M (pH6.8). El gel se cargó con 2 μ g de los péptidos β -Amiloide 1-42, pE3-42 y pE11-42 en buffer de corrida Tris-Glicina 1x. El gel se corrió a 100V por 45 min a temperatura ambiente.

Una vez corridos los gels, las muestras fueron trasferidas a membranas de PVDF BIORAD®, mediante trasferencia semisecca en un equipo TransBlot SD de BIORAD® por 50 min y posteriormente se bloquearon con PBS 1x, Leche 2% toda la noche a 4°C.

La membrana fue lavada al día siguiente 3 veces por 5 minutos con PBS 1x/Tween 0.2% y después incubada con el anticuerpo primario 3B8, a una dilución de 1:10000, en PBS 1x - Leche 2% - Tween 0.2%, toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo comercial anti-IgG3 acoplado a HRP, dilución de 1:10000 en PBS 1x-Leche 2% - Tween 0.2%, por una hora a temperatura ambiente.

Al terminar la incubación, se lavaron las membranas y se revelaron por quimioluminiscencia con el kit de revelado SuperSignal® y una película para quimioluminiscencia. Para realizar el control de carga de las especies de A β , la membrana fue tratada con solución Harsh Stripping (Tris pH6.8 0.5M, SDS 10% y Beta-mercaptoetanol 0.8%) para remover los anticuerpos primarios y secundarios. Posteriormente fue incubada

con el anticuerpo comercial 4G8 (región de reconocimiento de A β 17-24), 1:2000 para revelar y confirmar la presencia de los tres péptidos.

Reactividad Cruzada por ELISA

Para evaluar la reactividad cruzada del anticuerpo 3B8, se realizó un ELISA indirecto con diferentes especies de β -amiloides: A β pE3-42, A β pE11-42 y sus respectivas versiones no piroglutamadas A β 3-42 y A β 11-42. También se incluyeron la especie completa de A β 1-42 y una especie con la secuencia invertida (A β 42-1).

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Maxisorp) con 0.3 μ g de péptido por pozo con cada uno de los péptidos de β -amiloides mencionados, disueltos en 100 μ l de Buffer de Carbonatos (pH9.5), y se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron tres lavados con 300 μ l de Buffer PBS 1x/tween 0.2%. Posteriormente se bloqueó la placa con 200 μ l de solución de bloqueo (Buffer PBS 1x/tween 0.2%/leche descremada 2%) y así se incubó durante una hora a 37°C. Se realizaron tres lavados con la misma solución de lavados y se agregó el anticuerpo primario 3B8, dilución 1:1000 en solución de bloqueo y se incubó durante una hora a 37°C.

Finalmente, se lavó la placa y se agregó el anticuerpo secundario acoplado a HRP anti-IgG3 de ratón, producido en cabra (Invitrogen®) en dilución 1:1000. Se incubó por una hora a 37°C. Después de lavar como antes, se reveló el sistema de anticuerpos en la placa de ELISA con 200 μ l de ABTS por pozo, permitiendo la progresión de la reacción a 37°C y realizando lecturas a los 15 y 45 minutos.

MAPEO DE EPITOPOS

Selección y Amplificación

Incubación de la biblioteca con 3B8

Se sensibilizaron los 4 pozos centrales de una placa de 96 pozos para ELISA, con el anticuerpo comercial de BIOLEGEND® Clona: RMG3-1, anti-IgG3 disuelto en buffer de Carbonatos pH 9.5 a una concentración de 0.2µg/100µl en cada pozo y se incubó por una hora a 37°C.

El bloqueo se realizó con PBS 1x /Leche 2% /Tween 0.02% y se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente, se agregó el anticuerpo monoclonal (3B8) disuelto en PBS 1x/Leche 2%/Tween 0.2% a una concentración de 2µg/100µl por pozo, dejando incubar a 37 °C por una hora.

Se agregaron 10µl de la biblioteca de fagos de 7 aminoácidos (aproximadamente 10¹¹ UFP), en 450µl de PBS al 1x, Leche 2%, Tritón 0.1%, distribuida en los 4 pozos, e incubada toda la noche a 4°C. Simultáneamente, se incubó una colonia de *E. Coli*-TG1 en 10 mL de medio 2xYT a 37°C, en agitación a 150 rpm.

Elusión del bacteriófago

Se lavó la placa de forma manual (7 lavados con una solución PBS al 1X / Tritón 0.2%), a la vez que se preparó un matríz con 50 mL de medio de cultivo 2xYT incubado por 45 min, en agitación a 200rpm a 37 °C con 500µL del cultivo *E. Coli*-TG1 del día anterior.

Para la elución de los fagos, se añadieron 100µl de Glicina-HCl/ pozo en la placa y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, inmediatamente después 10 min a 37 °C. Al

terminar ambas incubaciones, los fagos fueron colectados en un solo microtubo, con 25 μ L de Tris-Base 2M, para equilibrar el pH. El tubo se etiquetó como "Eluído 1ra Ronda".

El cultivo en el matraz de *E. Coli*-TG1, fue inoculado con 400 μ l del virus eluído en la primera ronda y se incubó por 4.5 horas, 37°C en agitación a 200 rpm. El contenido total fue transferido a tubos nuevos y centrifugado a 8000 xg, 4°C por 10 minutos. El sobrenadante, se transfirió a tubos nuevos con 1/5 del volumen de PEG-8000 20%/NaCl 2M y las muestras se incubaron toda la noche a 4°C para la primera precipitación el virus.

Purificación del bacteriófago

Previo al inicio de la purificación, se repitió el protocolo para ELISA del día uno: sensibilización de una placa con el anticuerpo comercial anti-IgG3, disuelto en buffer de Carbonatos (pH 9.5), bloqueo de los pozos e incubación con anticuerpo monoclonal 3B8 para la nueva ronda de selección.

El sobrenadante obtenido el día anterior, incubado toda la noche con 1/5 de vol de PEG-8000 20%/NaCl 2M, se centrifugó a 8000 xg, 4°C por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 1 ml de TBS 1X estéril, se centrifugó a máxima velocidad de microcentrífuga (13000 rpm (9800 xg) a 4°C por 10 minutos) y se recuperó el sobrenadante. Nuevamente se precipitó el fago con PEG-8000 20%/NaCl 2M por 1hr a 4°C. Después de centrifugar a 13000 rpm (9800 xg) a 4°C por 10 minutos, se recuperó el pellet, se resuspendió en 200 μ L de TBS estéril, se centrifugó nuevamente y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, estéril.

De ese amplificado, se tomaron 150µl, se mezclaron con 300 µL de PBS 1X/Leche 2%/Tween 0.2% y se colocaron en la placa sensibilizada anteriormente. Se incubó toda la noche a 4°C.

Segunda y Tercera Ronda de bioselección (Amplificación/Purificación)

Se efectuaron dos rondas más de bioselección en las mismas condiciones anteriores. El eluido de la segunda ronda se amplificó para hacer una tercera ronda, y el eluido de la 3ra ronda se tituló para obtener placas aisladas para seleccionar clonas individuales.

Titulación de Fagos

Cada amplificado y eluido obtenidos fueron titulados indirectamente a través de la infección de bacterias *E. Coli*-TG1 conforme al siguiente protocolo: se prepararon diluciones en medio 2x-YT, a partir de una estimación del factor de dilución requerido para obtener un número cuantificable en los medios de cultivo sembrados con bacterias *E. Coli*-TG1 infectadas con el bacteriófago M13, que pudiera reflejar la cantidad de UFP dentro de un espectro calculado entre 1×10^7 a 1×10^{11} .

La infección de bacterias *E. Coli*-TG1 se realizó en un volumen final de 200µl de medio de cultivo y se añadieron 7µl de X-gal (marcador análogo de lactosa), combinado con el inductor IPTG del operón LAC. Simultáneamente se prepararon tubos de 15ml con 4ml de Top-Agar a 45°C. Al alcanzar esta temperatura, se añadió la mezcla de bacterias e IPTG/X-gal al top-agar, se plaquearon en cajas de medio LB-Agar y se incubaron por 24 hrs a 37°C.

El conteo de las unidades formadoras de placa (UFP) se realizó de manera visual, las cuales eran evidenciadas por la coloración azul de la colonia. A partir de las cajas de titulación del 3er eluido, se aislaron cuidadosamente 21 UFPs al azar, las cuales se

amplificaron en cultivos de *E. Coli*-TG1, en medio líquido 2x-YT, por separado e incubadas en agitación a 200 rpm a 37°C por 4.5hrs.

Posteriormente los cultivos se centrifugaron y de los sobrenadantes se hizo doble precipitación de fagos con 1/5 vol de PEG-80020%/NaCl 2N; se resuspendió el pellet en 150µl de TBS 1x estéril, de cada una de las clonas de fago purificado y se utilizó en un ELISA para confirmar el reconocimiento de las clonas por 3B8. La otra fracción del sobrenadante, fue utilizado para la extracción del material genético de los fagos de cada clona, con el fin de secuenciarlo. El protocolo empleado se describirá con mayor detalle posteriormente.

Selección de Clonas

Las 21 clonas seleccionadas al azar, fueron valoradas mediante un ensayo de ELISA. Las clonas fueron colocadas por duplicado en una placa de 96 pozo, como se muestra en la imagen 9, la mitad de la placa se sensibilizó con el sistema de captura anti-IgG3 y el anticuerpo 3B8 a una concentración de 2µg/100µl por pozo, mientras que del lado control solo se colocó el anticuerpo de captura anti-IgG3. El sistema se incubó por 24 hrs a 4°C.

Blanco	Blanco	3B8.6	3B8.6	3B8.14	3B8.14	Blanco	Blanco	3B8.6	3B8.6	3B8.14	3B8.14
(+)	(+)	3B8.7	3B8.7	3B8.15	3B8.15	(+)	(+)	3B8.7	3B8.7	3B8.15	3B8.15
(-)	(-)	3B8.8	3B8.8	3B8.16	3B8.16	(-)	(-)	3B8.8	3B8.8	3B8.16	3B8.16
3B8.1	3B8.1	3B8.9	3B8.9	3B8.17	3B8.17	3B8.1	3B8.1	3B8.9	3B8.9	3B8.17	3B8.17
3B8.2	3B8.2	3B8.10	3B8.10	3B8.18	3B8.18	3B8.2	3B8.2	3B8.10	3B8.10	3B8.18	3B8.18
3B8.3	3B8.3	3B8.11	3B8.11	3B8.19	3B8.19	3B8.3	3B8.3	3B8.11	3B8.11	3B8.19	3B8.19
3B8.4	3B8.4	3B8.12	3B8.12	3B8.20	3B8.20	3B8.4	3B8.4	3B8.12	3B8.12	3B8.20	3B8.20
3B8.5	3B8.5	3B8.13	3B8.13	3B8.21	3B8.21	3B8.5	3B8.5	3B8.13	3B8.13	3B8.21	3B8.21
3B8 Positivo						3B8 Negativo					

Imagen 9. Diseño de ELISA, distribución de las 21 clonas.

Al día siguiente, se lavó la placa, se agregó suero anti-M13 hecho en conejo, producido en el laboratorio, en una dilución 1:1000, por 1hr a 37°C. Finalmente, se agregó el anticuerpo de revelado, un monoclonal anti-H+L de conejo hecho en cabra, acoplado a HRP, producido comercialmente por NOVEX®, el cual se incubó 1hr a 37°C.

Después de 3 lavados, el sistema fue revelado con ABTS (BIORAD®), teniendo lectura de la reacción a los 15 y a los 45 minutos. La selección de las clonas se realizó bajo el siguiente criterio: las clonas consideradas como positivas, fueron aquellas donde la reacción ocurrió solo con el anticuerpo 3B8. Fueron seleccionadas 14 clonas de las que se obtuvo la cadena sencilla de DNA y fueron secuenciadas. Las clonas restantes se consideraron negativas, con el criterio de su reactividad inespecífica con el grupo control negativo o cuando no existía reacción; una de las clonas negativas fue seleccionada para extracción del material genético y secuenciación, como control negativo. Se repitió el ensayo y se confirmó la presencia de 14 clonas positivas.

Secuenciación del ADN

A partir de los cultivos de las clonas positivas, se centrifugaron los sobrenadantes a 5000 xg para eliminar bacterias. Se transfirieron a tubos estériles y se precipitó cada muestra con PEG-8000 20%/NaCl 2M (1:6), toda la noche a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 8000 xg a 4°C por 10 minutos, posteriormente el precipitado se resuspendió en 150µl de TBS estéril y se transfirió a microtubos. Se agregaron 200µl de PEG-8000 20%/NaCl 2M por una hora a 4°C y se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad de microcentrífuga (13000 rpm (9800 xg)) a 4°C. El sobrenadante fue desechado, mientras que el pellet fue resuspendido

en 200 µl de solución amortiguadora de yoduro de sodio (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM, NaI 4M).

Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 500µl de etanol absoluto, e inmediatamente se centrifugó cada muestra por 10 minutos, a 13000 rpm (9800 xg) en microcentrífuga. El líquido sobrenadante fue descartado, cuidadosamente, mediante aspiración al vacío. El precipitado se lavó con 500 µL de alcohol etílico al 70%, para limpiar las sales del buffer de Yoduros de las muestras, a las mismas condiciones de incubación, centrifugación y aspiración.

Se cuantificó la concentración de ácidos nucleicos (ssDNA) de cada muestra resuspendida en 40µl de agua estéril, mediante espectrofotometría en Nanodrop-1000 (Longitudes de onda: 230nm, 260nm y 280nm). Para ello, se utilizó el software de lectura integrado, para ácidos nucleicos de cadena simple (ssDNA-33), el cual calculó en automático la concentración de ssDNA en ng/µL, además de los cocientes 260/230 y 260/280 que indican el grado de pureza de la muestra.

Integridad y análisis de las secuencias

La integridad del material genético se verificó mediante un ensayo de electroforesis, con un gel de agarosa al 8%. Se consideró la longitud y la doble cadena del material genético (6407pb). El gel fue digitalizado para su análisis con el fotodocumentador MiniBIS PRO®.

Al ser confirmada la integridad del material genético, cada muestra fue debidamente etiquetada y enviada para su secuenciación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los resultados obtenidos por secuenciación, fueron traducidos al código de aminoácidos de una letra y analizados con el software BioEdit v7.0.5, en el sistema operativo Windows.

INMUNOFLUORESCENCIA EN CORTES DE CEREBRO HUMANO Y MURINO

Se probó la capacidad del anticuerpo 3B8 de reconocer agregados en muestras de tejido humano y en tejidos de cerebro ratones 3xTgAD (modelo murino transgénico de la enfermedad de Alzheimer) de diferentes edades. Las muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Alzheimer, fueron obtenidas del Banco Nacional de Cerebros de CINVESTAV-IPN, CDMX, México (Paciente 21-Caso de Alzheimer confirmado, corteza temporal), usando como control negativo un tejido humano sin la enfermedad, proveniente del mismo banco de cerebros.

Se utilizó el anticuerpo 3B8 para la búsqueda y reconocimiento de agregados amiloides de A β pE3-42 en cortes de 30 μ m de cerebro del modelo murino 3xTgAD, donde se analizaron las regiones de amígdala, tálamo, hipocampo y corteza entorrinal. Se emplearon 6 ratones envejecidos de 25 y 26 meses de edad (3xTgAD 25 meses, hembras n=3; 3xTgAD 26 meses, hembras n=3) y un ratón de 9 meses, como control joven, para analizar los patrones de agregados del péptido A β pE3-42, en contraste con especies completas de β -amiloide. Para la detección de β -amiloide completo se utilizó un suero policlonal, producido en nuestro laboratorio, a partir de un conejo inmunizado contra la especie A β 1-42.

Inmunofluorescencia en Tejido Humano

Los tejidos fueron lavados tres veces con TBS 1x (Tris 50mM, NaCl 150mM pH7.2). Para la primera exposición de epítomos, los tejidos se trataron con 50 μ l de ácido fórmico al 80%, por tres minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados, con TBS 1X.

La segunda exposición se realizó incubando el tejido en buffer de citratos (Citrato pH 6 / Tween 0.05%), por 30 minutos a 70°C. Posteriormente se hicieron tres lavados con TBS 1x. En seguida, el tejido fue permeabilizado durante 15 min con TBS-A (TBS 1x/Tritón X-100 0.1%) y bloqueado 30 min con TBS-B (TBS-A/BSA 2%). Al finalizar el bloqueo, se agregó el anticuerpo primario 3B8 (dilución 1:2000) y el anticuerpo comercial BAM10 (IgG1, AA1-12) dilución 1:500, en TBS-A/suero de cabra 5%, se incubó en agitación toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavaron nuevamente los tejidos con TBS 1x y se prepararon con TBS-A y TBS-B. Se utilizaron los anticuerpos comerciales anti-IgG3 con Alexa-488 (dilución 1:1000) y anti-IgG1 con Alexa-594 (dilución 1:1000), se incubó en obscuridad a temperatura ambiente, por una hora y media en agitación.

Finalmente, los tejidos se lavaron con TBS 1x, TBS-A y TBS-B por 5 min cada vez, y se montaron en una laminilla con medio de montaje VectaShield®. Las laminillas se mantuvieron en obscuridad a -20°C, hasta su observación con microscopio de epifluorescencia Ix51 equipado con una cámara Olympus DP71 Nikon®.

Inmunofluorescencia en Tejidos de 3xTgAD

Se emplearon tres tejidos de ratón 3xTgAD hembra de 25 meses, de 26 meses, y de 9 meses. Los tejidos fueron lavados con TBS1X y se llevó a cabo la doble exposición de epítomos con Acido Fórmico 80% por 3 minutos a temperatura ambiente y, después de dos lavados de cinco minutos, con Buffer de Citratos (pH6) en agitación a 70°C. Después de 15 minutos de permeabilización (TBS1X/Tritón X100 0.1%) y 20 minutos de Bloqueo (TBS 1X/Tritón X100 0.1%/BSA %), se agregó el anticuerpo 3B8 (dilución 1:500), y el suero

policlonal de conejo anti-A β 1-42 (dilución 1:250) disueltos en TBS-A + suero de cabra 5% a un volumen total de 150 μ L por tejido. Se incorporó como control positivo un anticuerpo monoclonal comercial (4G8, BIOLEGEND®) específico para A β pE3-42. Los tejidos con los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C en agitación.

Se utilizaron los anticuerpos comerciales anti-IgG3 con Alexa-488 (dilución 1:1000) para 3B8, anti-IgG de conejo con Alexa-594 (dilución 1:1000) para A β 1-42, y anti-IgG2b para 4G8. Se incubó en obscuridad a temperatura ambiente, por una hora y media en agitación.

Ensayo de Inhibición del anticuerpo 3B8

Se realizó un ensayo de inhibición para el anticuerpo 3B8 en dilución 1:1000, con dos concentraciones del péptido A β pE3-42 como inhibidor (concentración 600 ng/mL y concentración baja 800 ng/mL) usando como diluyente TBS 1X/Triton X100 0.1%/suero de cabra 5%. Se utilizaron como controles de especificidad de anticuerpo, los péptidos A β 1-42 y A β pE11-42 en concentración alta (1600ng/mL), se incubó toda la noche a 4°C en agitación.

Posteriormente se seleccionaron cortes de cerebro de ratón 3xTgAD de 25 semanas de edad, se llevó a cabo la doble exposición de epítomos, primero con ácido Fórmico al 80% por 3 min y la segunda con solución buffer de citratos (pH 6) a 70°C en agitación. Se permeabilizaron con TBS1X/Tritón X100 0.1% por 15 min a temperatura ambiente en agitación y se bloquearon con TBS1X/Tritón X100 0.1%/BSA 2% por 20 min en las mismas condiciones.

Los tejidos preparados fueron incubados con 150 μ L de las soluciones incubadas previamente del anticuerpo 3B8 con el péptido A β pE3-42. Una vez lavadas, se agregó un

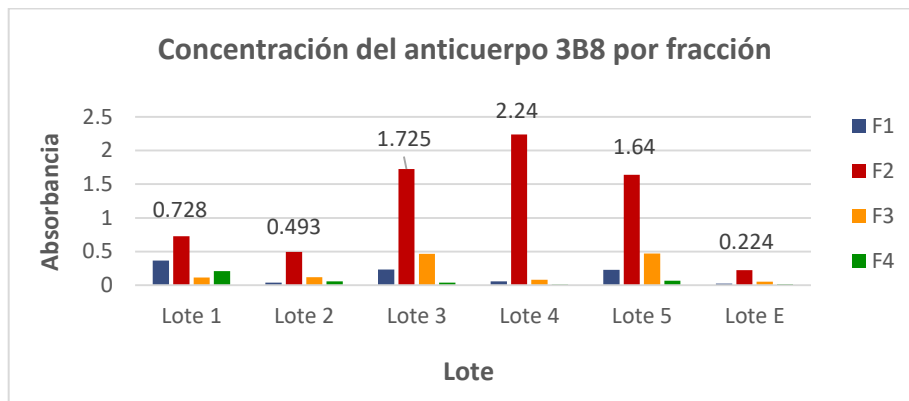
suero policlonal de conejo anti A β 1-42 (dilución 1:250) para su marcaje en flotación y se incubó en agitación toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavaron los tejidos con TBS1X, TBS-A y TBS-B durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se añadieron los anticuerpos secundarios anti-IgG3 (Alexa-488, dilución 1:1000) y el anticuerpo comercial anti IgG (H+L) de conejo (Alexa-594, dilución 1:1000), en TBS-A/suero de cabra 5% por 1 hr en un volumen total de 150 μ L por tejido. Se realizaron los lavados de los tejidos durante 5 minutos cada uno. Finalmente se procedió a montar los tejidos con medio de montaje VectaShield® + DAPI para contrastar los nucleos celulares.

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Purificación del Anticuerpo Monoclonal 3B8

Se purificó el anticuerpo monoclonal 3B8 a partir de un litro de sobrenadante del hibridoma productor del anticuerpo. Al finalizar la purificación, se optó por mezclar los sobrenadantes ya filtrados, para pasar nuevamente por la columna y rescatar la mayor cantidad de anticuerpo posible. Como se muestra en la siguiente gráfica y tabla, las lecturas a 280nm de las fracciones de cada alícuota del sobrenadante:



Fracción	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote E
F1	0.367	0.040	0.232	0.059	0.226	0.022
F2	0.728	0.493	1.725	2.24	1.640	0.224
F3	0.116	0.118	0.468	0.083	0.473	0.053
F4	0.21	0.058	0.038	0.010	0.068	0.013

Imagen 10. Absorbancia de las fracciones obtenidas de cada lote de purificación.

En cada caso, se observó que la fracción 2 (F2) obtenía la lectura más alta de absorbancia, por lo que se decidió juntar los lotes con mejores rendimientos (Lotes 3-F2, 4-F2 y 5-F2) para formar una sola fracción, 3B8-F2. El resto de las fracciones se mezclaron, se dializaron y se liofilizaron; a esta mezcla de purificados se le nombró “3B8-M”.

Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a 280nm de ambas muestras. Se calculó la concentración mediante el coeficiente de extinción para IgG (1.4 D.O.=1mg/ml de IgG).

La concentración obtenida del anticuerpo IgG3 en el purificado 3B8-F2 fue de 1.31mg/ml, mientras que el purificado 3B8-M tuvo una concentración menor, estimada en 0.4mg/ml.

	Abs 1	Abs 2	Promedio	Concentración 1.4 D.O.=1mg/ml
3B8-F2	1.84	1.84	1.84	1.31 mg/ml
3B8-M	0.58	0.54	0.56	0.4 mg/ml

Imagen 11.. Absorbancia y concentración de los purificados.

Se decidió congelar el purificado 3B8-M para su liofilización y su uso en experimentos futuros. A partir de este momento, se continuó la caracterización, exclusivamente con el purificado de mayor concentración, es decir 3B8-F2, el cual simplemente se mencionará como 3B8. Así mismo, este purificado fue fraccionado en alícuotas de 200µl y almacenado a -80°C, para su conservación y su uso paulatino en el resto de los ensayos de caracterización.

Titulación.

Se llevó a cabo la titulación del anticuerpo monoclonal 3B8 por ELISA. En la imagen12 se muestra la curva de titulación del anticuerpo (correlación $R^2 = 0.98$). Donde observamos que el alto título de anticuerpo 3B8 permitió el uso del anticuerpo en dilución 1:10000 en condiciones óptimas; no obstante, la señal aun es apreciable con dilución 1:16000. Finalmente, la reacción fue mínima en la dilución 1:12800.

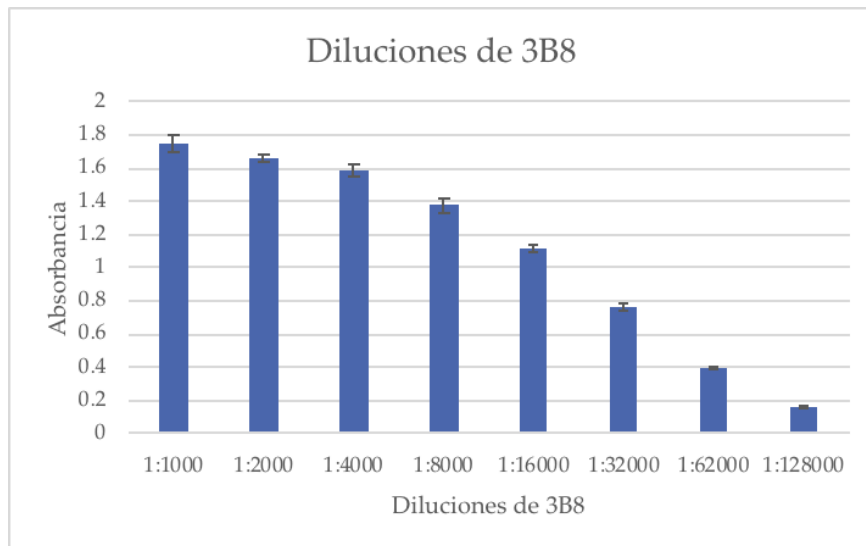
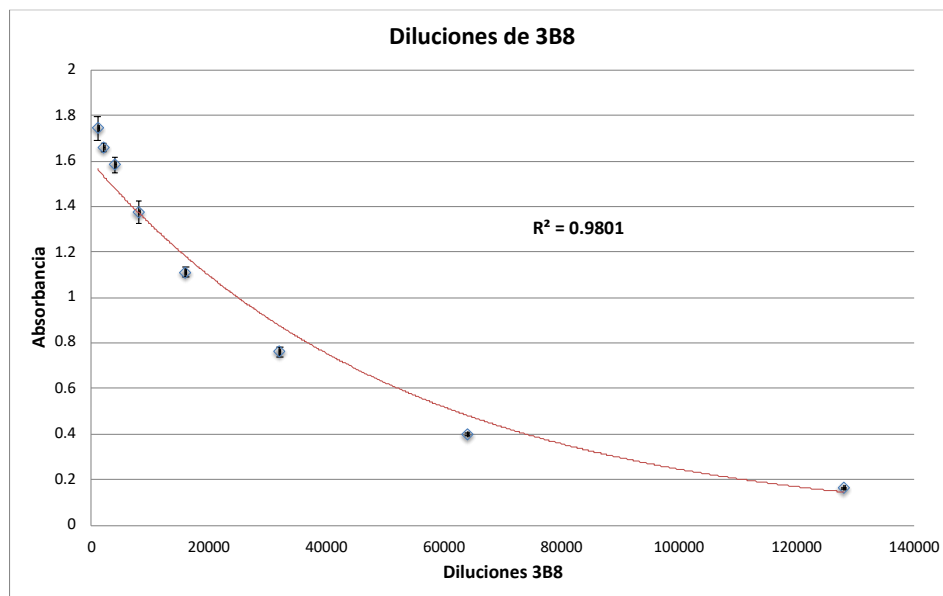
A**B**

Imagen 12. A) Diluciones simultaneas del anticuerpo monoclonal 3B8 B) Regráfico

Reactividad Cruzada.

El resultado de reactividad obtenido por Western Blot (WB), muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal 3B8, por la especie A β p E3-42 (dilución 1:10000). Como se muestra en la imagen 13, el anticuerpo 3B8 reconoció al péptido A β pE3-42 sintético en forma de monómeros y oligómeros.

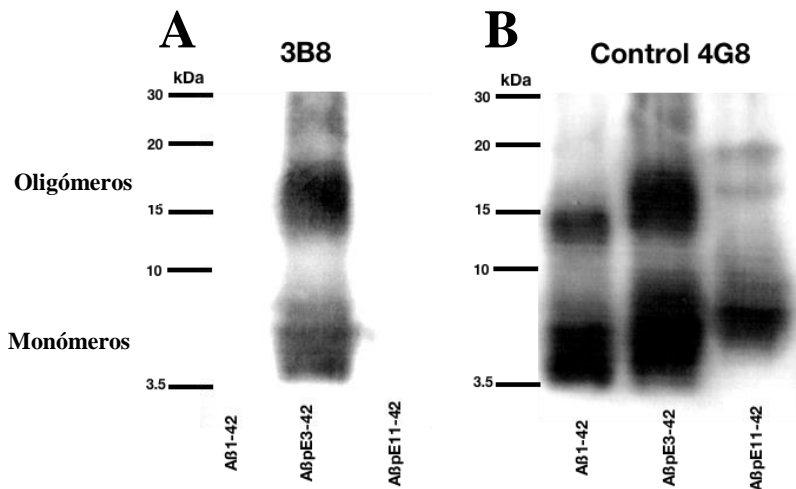


Imagen13. Reactividad cruzada por Western Blot 3B8 y 4G8. En ambos lados se presentan la misma membrana con los tripletes de Aβ 1-42, pE3-42, 11-42. En el primer caso A, observamos el reconocimiento del péptido sintético Aβ pE3-42 por el anticuerpo 3B8 (dilución 1:10000); en el caso B se observa el reconocimiento por el anticuerpo comercial 4G8 (región de reconocimiento 17-24; dilución 1:2000).

El anticuerpo comercial 4G8 confirmó la presencia de las tres especies de Aβ (1-42, pE11-42 y pE3-42) en la misma membrana, en el cual se observa la coincidencia del patrón de bandeos observado con el anticuerpo 3B8 en la columna de Aβ pE3-42.

Por otro lado, la evaluación de reactividad cruzada por ELISA, mostró que la actividad de reconocimiento del anticuerpo 3B8 no es exclusiva para la especie de Aβ pE3-42, ya que también reconoció a la versión no piroglutamada de Aβ 3-42, mientras que no fue el caso del resto de las formas de Aβ (1-42, 42-1, pE11-42 y 11-42).

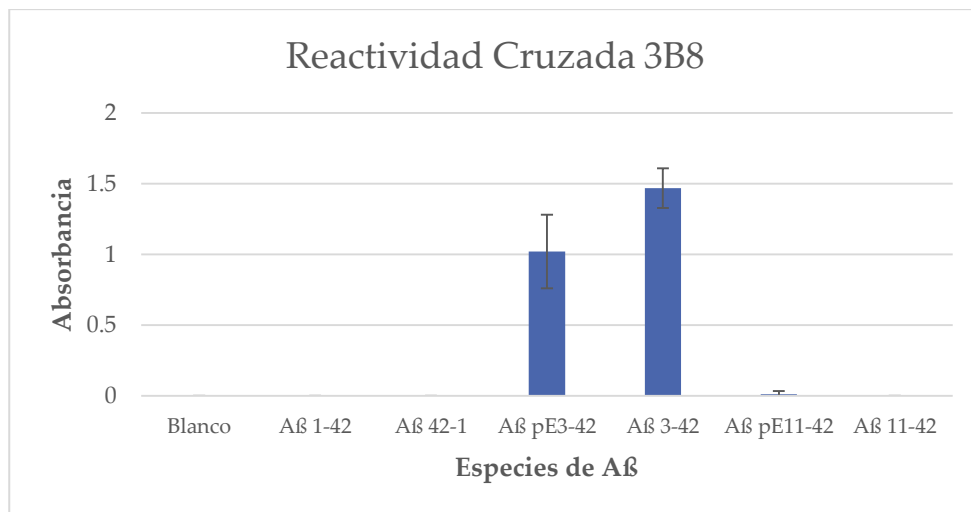


Imagen 14. Reactividad cruzada por ELISA, especies de Aβ 1-42, 42-1, pE3-42, 3-42, pE11-42, 11-42.

Mapeo de Epítomos.

Los resultados mostraron que la secuencia FGSR se presentó en la mayoría de clonas en el primer conjunto de muestras y sólo la clona 7 presentó la secuencia QWRH. Suponiendo que esta secuencia pudiera estar más representada en una ronda previa, decidimos coleccionar clonas de la segunda ronda (en la tabla tiene el prefijo E2) y ampliar el número de clonas coleccionadas de la tercera ronda (prefijo E3). Sin embargo, en el segundo conjunto de muestras se mantuvo la proporción de clonas positivas con las secuencias FGSR y QWRH.

Se identificaron 26 clonas positivas, 14 clonas del primer conjunto de muestras y 12 en un segundo conjunto (n=26), las cuales fueron secuenciadas. Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos de cada clona, fueron traducidos con ayuda del programa BioEdit v7.0.5.

Del total de 26 clonas, la secuencia de aminoácidos **LCFGSRC** se presentó en el 53.85% (14/26), por lo que se consideró la secuencia dominante. En concordancia con este resultado, el motivo **FGSR**, de la secuencia dominante, se repitió en dos marcos de lectura diferentes: **YGIFGSR** y **VPVFGSR**, 65.38% del total de las secuencias (17/26). Este resultado sustenta la hipótesis de que el motivo **FGSR** es determinante para el reconocimiento del péptido β -Amiloide pE3-42 por el anticuerpo monoclonal 3B8. Sin embargo, la secuencia **FGSR** no se encuentra en la secuencia original del péptido A β pE3-42, lo que sugiere la posibilidad de un mimetismo molecular en la secuencia de aminoácidos semejante a la secuencia del β amiloide pE3-42, es decir, un mimótopo.

Por otro lado, el experimento de mapeo de epítomos identificó una segunda secuencia con gran similitud a la secuencia lineal de la región amino-terminal del péptido A β pE3-42. A pesar de que esta clona no fue favorecida en la selección, la secuencia **QF(W)RH** aparece

en cuatro marcos de lectura distintos (**QWRHEPR**, **QWRHFSS**, **QFRHFNT**, **GILFRHR**), 4/26 (15.38% del total de las secuencias). Las secuencias de aminoácidos se resumen en la siguiente tabla, en su código de una letra y su frecuencia de aparición:

Clona	Secuencia							Frecuencia	%
1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 1.12, 1.13, 14, 17, E2.2, E3.2, E3.10	L	C	F	G	S	R	C	14/26	53.85%
19, 21	Y	G	I	F	G	S	R	2/26	7.69%
E2.8	V	P	V	F	G	S	R	1/26	3.85%
E2.1	N	I	F	G	H	L	G	1/26	3.85%
E2.9	G	S	S	G	L	H	V	1/26	3.85%
E3.5	T	P	R	L	P	M	K	1/26	3.85%
7	Q	W	R	H	E	P	R	1/26	3.85%
E3.1	Q	W	R	H	F	S	S	1/26	3.85%
E3.3	Q	F	R	H	F	N	T	1/26	3.85%
E2.5	G	I	L	F	R	H	R	1/26	3.85%
E3.4	N	P	V	A	G	R	K	1/26	3.85%
E3.8	S	N	V	G	I	L	P	1/26	3.85%
Secuencia Aβ pE3-42	pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA								

Imagen 15. Resumen de secuencias obtenidas por Phage Display.

Reconocimiento de agregados por inmunofluorescencia.

En la siguiente imagen se muestran los resultados del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de agregados amiloides, en tejido cerebral de un paciente confirmado con el diagnóstico de Alzheimer. Las imágenes en la Figura 1 son representativas de las observaciones hechas por microscopía de fluorescencia. En color rojo se observan los agregados formados por el péptido A β total, reconocido por el anticuerpo comercial BAM10 (región central 17-24). En color verde se observan los agregados del péptido A β pE3-42, que son reconocido por nuestro anticuerpo monoclonal 3B8.

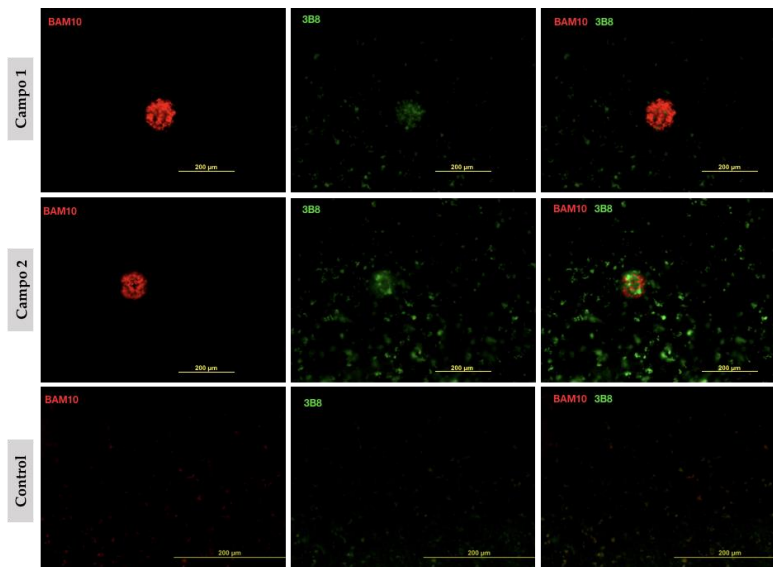


Imagen 16. Paciente 21- Caso de Alzheimer confirmado. Cortes de cerebro humano, corteza temporal. Color Rojo: agregados de A β total, BAM10 (17-24). Color Verde: agregados de A β aminotruncados N3-X, 3B8 (3-10).

De este experimento se pueden plantear tres conclusiones de gran relevancia. En primer lugar, confirmamos que nuestro monoclonal 3B8 tiene la capacidad de reconocer, no solo al péptido sintético *in vitro*, sino que también puede reconocer el péptido en tejido humano. El segundo dato importante, es la confirmación de agregados de A β pE3-42 en las muestras de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer. Y tercero, la diferencia entre los patrones de reconocimiento de ambos anticuerpos, lo cual se muestra en

la tercera columna, ya que no existe colocación entre ambas marcas, sino un patrón de complementariedad, que se puede interpretar como la coexistencia de diferentes especies de A β en la misma placa amiloide.

Una vez confirmada la capacidad del anticuerpo monoclonal 3B8 para reconocer agregados en tejido humano, se procedió a buscar la presencia de agregados en el modelo transgénico murino. La fotografías mostradas en la imagen 17, muestran cortes coronales de cerebro de -2.3 a -2.5 mm de bregma en hipocampo de ratones 3xTgAD de 25 meses (hembra 178) y 26 meses (hembra 628, hembra 632 y hembra 678); doble inmunotinción, suero policlonal producido en conejo anti A β 1-42 en Alexa 488 (verde) y 3B8 en Alexa 594 (rojo).

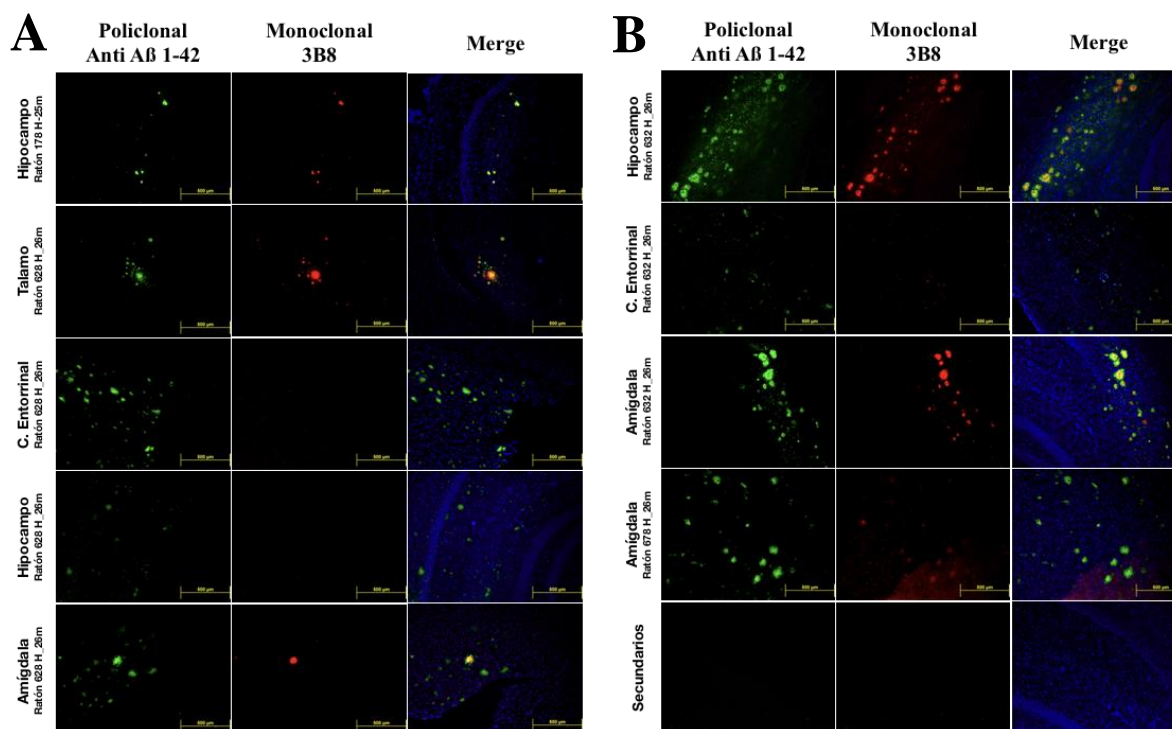


Imagen 17. Doble inmunofluorescencia en tejido cerebral de ratón 3xTgAD. Suero policlonal de conejo antiA β 1-42 (Alexa-488, Verde). Anticuerpo 3B8 antiA β N3 (Alexa-594, Rojo). Ratones 3xTgAD, hembra 178-25 meses, hembra 628-26 meses, hembra 632-26 meses y hembra 678-26 meses (10X).

En los cortes del ratón 3xTgAD de 25 meses, fue posible apreciar agregados amiloides de A β 1-42 y A β pE3-42 solo en hipocampo (Primera fila; Figura 2A). Para los

casos de ratón transgénico de 26 meses, en uno de ellos se observaron agregados de A β pE3-42 en tálamo y amígdala (segunda y quinta fila; Figura 2A) y ningún agregado de A β pE3-42 en hipocampo y corteza entorrinal (tercera y cuarta fila; Figura A2), a pesar de estar presentes agregados de A β 1-42 en estas zonas. En otro de los casos de ratón de 26 meses, mostró una gran cantidad de agregados de A β pE3-42 en hipocampo y amígdala (primera y cuarta fila; Figura 3A), así como una alta densidad de agregados de A β 1-42. Mientras que el tálamo y la corteza entorrinal estuvieron libres de agregados de A β pE3-42 y baja densidad de agregados de A β 1-42 (segunda y tercera fila; Figura 3A). Y en el tercer caso, solo fue posible observar agregados de A β pE3-42 y A β 1-42 en amígdala (quinta fila; Figura 3A).

Al igual que en las muestras de tejido humano, se encontró un patrón de complementariedad entre los agregados de A β pE3-42 centrales y los agregados de secuencia completa en la periferia. La Figura 3 muestra un agregado amiloide de aproximadamente 70 μ m (40X), lo que permitió observar con mayor detalle los patrones de tinción antes señalados; así las especies reconocidas por el suero policlonal anti A β 1-42 conformaron la periferia del agregado y las especies de A β pE3-42 se concentraron en el centro de la placa a modo de núcleo, representadas en la fusión de imágenes con una gama de colores de amarillo y rojo.

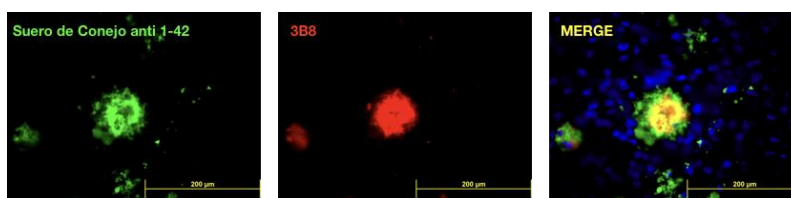


Imagen 18. Acercamiento a 40x de una placa, ratón de 26 meses. En verde se observan los agregados amiloides de A β reconocidos por el suero policlonal. En rojo se observan las especies de A β p3-42, reconocidas por el anticuerpo 3B8. En el contraste de imágenes se observa una localización diferente entre el suero policlonal y 3B8.

Ensayo de inhibición en solución, reconocimiento de 3B8.

Para determinar la especificidad del reconocimiento del péptido A β pE3-42 por el anticuerpo 3B8 en tejidos, se realizó el ensayo de inhibición en solución. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente orden en la Figura 4. En la primera fila se muestra la doble tinción con el suero policlonal anti A β 1-42 (verde) y 3B8 (rojo) libre de inhibidor; se observa la presencia de agregados A β 1-42 y A β pE3-42 con predominio en subículo. En la siguiente fila de imágenes, se muestran los resultados obtenidos después de la incubación con el inhibidor A β 1-42 en solución. Se observa la inhibición de la tinción por el suero policlonal, lo cual se interpreta a partir de la desaparición de la señal en Alexa 488 (verde), confirmando la afinidad del anticuerpo policlonal por la especie completa de A β 1-42, mientras que la marca con Alexa 594 (rojo) permaneció sin alteraciones. Posteriormente, se muestra en la 3ra fila el reconocimiento de ambos anticuerpos al ser incubados con la especie de A β pE11-42, confirmando los resultados previos de no reactividad cruzada con esta especie piroglutamada de A β .

Finalmente, en la segunda columna de imágenes se muestra la inhibición del anticuerpo 3B8, incubado con el péptido sintético A β pE3-42 en concentraciones de 800 ng/mL y 1600 ng/mL en solución. En ambos casos se observa la inhibición del anticuerpo 3B8, ya que no es posible observar claramente la señal de Alexa 594 (rojo) en los tejidos, mientras que la señal con Alexa 488 (verde) permaneció sin cambios, indicando la presencia de especies completas de A β .

Para poder comprobar el reconocimiento atenuado de 3B8 en presencia de su péptido inhibidor y la presencia de especies A β pE3-42, se modificaron las condiciones de tiempo de exposición, ISO y aumento. Las imágenes se analizaron con el objetivo 10x, centrado en la

región de subículo. Bajo estas condiciones se logró observar nuevamente el reconocimiento de agregados de A β pE3 por el anticuerpo 3B8, con diferentes grados de intensidad. Por consiguiente, la última secuencia de imágenes comprueba la presencia de agregados presentes en los tejidos y el reconocimiento por parte del anticuerpo 3B8, a pesar de la presencia del inhibidor A β pE3-42 en solución. No obstante, la mayor concentración de agregados de A β 1-42 y la señal atenuada de 3B8, impide observar el patrón de complementariedad de los agregados, en la fusión de imágenes.

Los resultados del experimento se muestran en la siguiente secuencia de imágenes, las cuales corresponden al complejo hipocampal del ratón 3xTgAD 178 hembra de 26 meses, a un aumento de 4X por microscopía de fluorescencia.

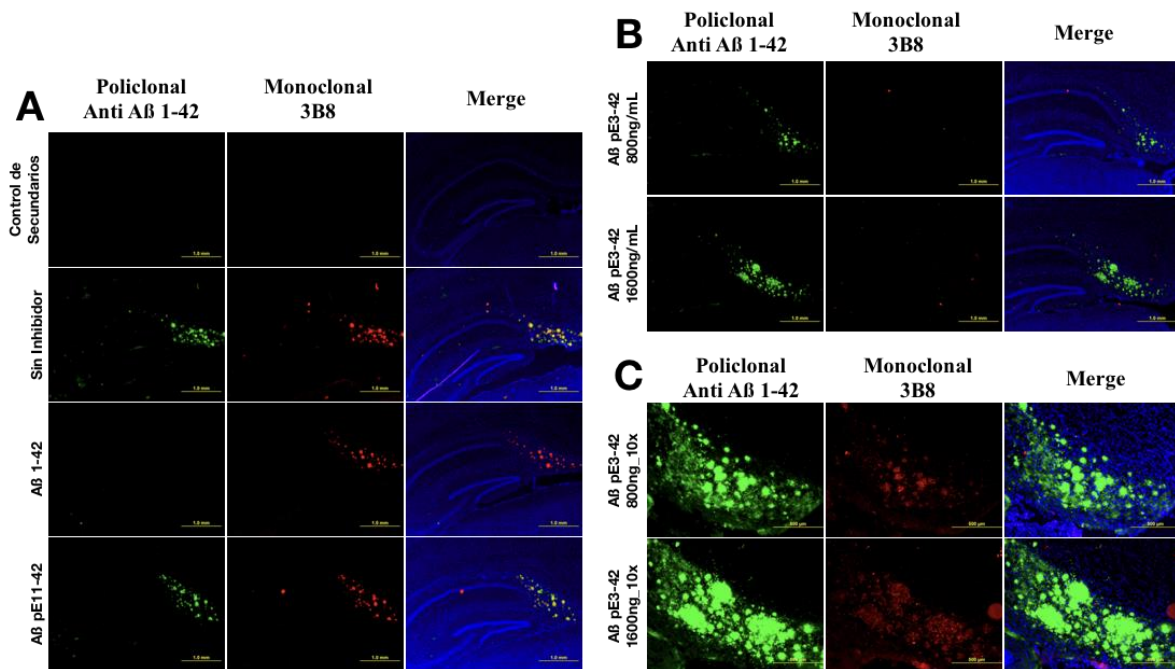


Imagen 19. Ensayo de inhibición del anticuerpo 3B8. A. Aumento 4x, Hipocampo. Sin inhibidor, Inhibidor péptido sintético A β 1-42, Inhibidor péptido sintético A β pE11-42. B. Aumento 4x, Hipocampo, Inhibidor péptido sintético A β pE3-42 a 800ng/mL y 1600ng/mL. C. Aumento 10x, enfoque en Subículo, Inhibidor péptido sintético A β pE3-42 a 800ng/mL y 1600ng/mL.

Anticuerpo comercial anti-A β pE3 vs 3B8.

Al comparar nuestro anticuerpo monoclonal 3B8 contra el anticuerpo monoclonal producido por BIOLEGEND® (ambos dirigidos contra la especie de A β pE3), se observó un mejor reconocimiento de agregados amiloides y mayor intensidad de la señal en las especies truncadas de A β pE por parte de nuestro anticuerpo, además de un menor grado de fluorescencia inespecífica en la zona periventricular.

La imagen 20 muestra una secuencia de imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia, con los anticuerpos 3B8 y anti-A β pE de BIOLEGEND®, donde observamos que los agregados amiloides se presentan de manera predominante en la región de subículo y se diseminan por CA1 del hipocampo.

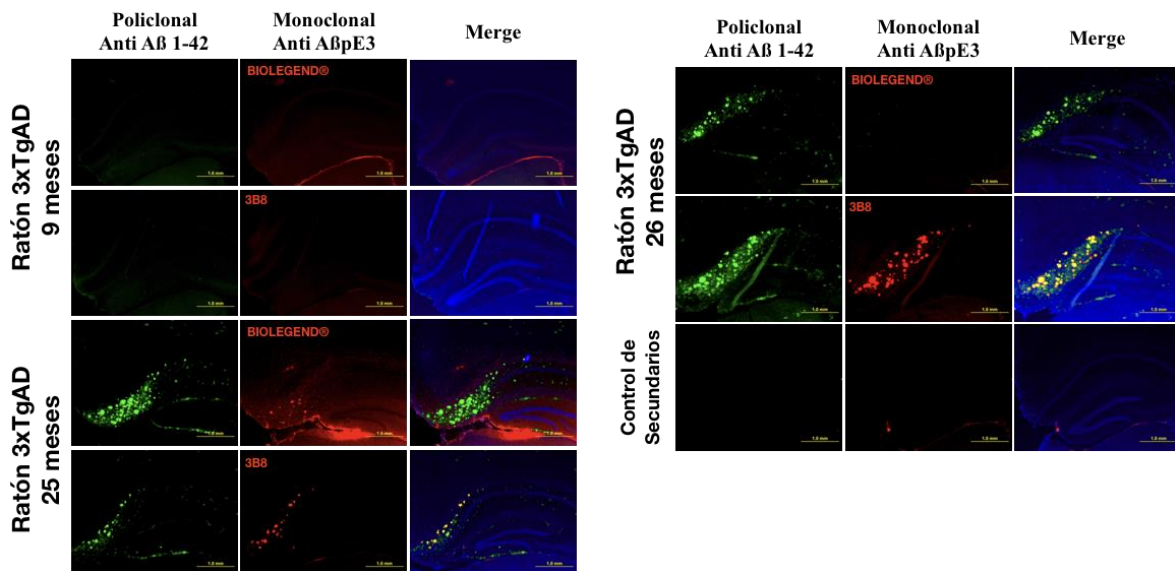


Imagen 20. Inmunofluorescencia, anticuerpo BIOLEGEND® (anti-A β pE3-42) vs 3B8. Aumento 4x, subículo y CA1 del hipocampo. Ratones 3xTgAD de 9, 25 y 26 meses.

En el primer conjunto de imágenes (primeras dos filas), se presentan los tejidos de ratones jóvenes (9 meses), de los cuales se ha documentado la aparición de agregados de A β intracelulares a esta edad. Sin embargo, no hubo reconocimiento de agregados por ninguno de los anticuerpos.

En el siguiente conjunto de imágenes (filas 3 y 4), se muestra la doble tinción en hipocampo del ratón transgénico de 25 meses de edad. El contraste proporcionado por el suero policlonal de conejo en Alexa 488 (verde), delata la densidad de agregados amiloides de secuencia completa, mientras que la tinción del anticuerpo comercial BIOLEGEND®, en Alexa 594 (rojo), presentó bajo reconocimiento de especies A β pE3-42 y autofluorescencia en la región periventricular. En contraste, 3B8 reconoció a una cantidad de agregados, proporcionalmente similar a la reconocida por el suero policlonal en Alexa 488 (verde), sin la presencia de autofluorescencia.

En las columnas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos en la doble tinción del ratón de 26 meses; se observó la falta de reconocimiento de agregados por parte del anticuerpo comercial BIOLEGEND®; a pesar de que se confirmó la presencia de agregados amiloides por el reconocimiento del suero policlonal, con Alexa 488 (verde). Por otro lado, el anticuerpo 3B8 reconoció agregados de A β pE3-42 en subículo, que coinciden con los agregados reconocidos por el suero policlonal en la misma región del hipocampo.

VI. DISCUSIÓN

Alrededor de todo el mundo la enfermedad de Alzheimer ha sido motivo de arduo trabajo en materia de investigación clínica y ciencia básica, con el objetivo de dilucidar los factores de riesgo y mecanismos moleculares implicados en la aparición y desarrollo de la enfermedad. Los avances en investigación alcanzados hasta el momento, han permitido proponer estrategias terapéuticas que tienen como finalidad intervenir en la aparición y la progresión de la enfermedad.

Evidencias clínicas y experimentales respaldan la teoría de la cascada amiloide, donde el desequilibrio entre la producción y el disminución de A β 42 son factores tempranos en la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe & Hardy, 2016). Particularmente, se ha indagado sobre las propiedades fisicoquímicas del péptido A β pE3-42, del cual se han reportado propiedades intrínsecas, donde se modifica la cinética de agregación de las diferentes especies de A β y se favorece la mayor formación de agregados oligoméricos solubles, aumentando el grado de citotoxicidad. Por lo tanto el péptido A β pE3-42 es un blanco idóneo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Sofola-Adesakin et al., 2016) (Bisceglia et al., 2018).

Con respecto a lo anterior, el desarrollo de anticuerpos con alta especificidad ha sido crucial para la identificación y estudio de las diferentes especies de A β detectadas. Además, se ha reconocido su potencial uso en la terapia inmunológica y en la detección de posibles biomarcadores en fase temprana de la enfermedad. Desafortunadamente, los anticuerpos anti-A β 42 que se han evaluado en ensayos clínicos no han demostrado efectividad contundente, lo que lleva al cuestionamiento sobre la legitimidad del péptido A β 42 como blanco terapéutico de la Enfermedad de Alzheimer. No obstante, todavía existe la esperanza de que la inmunoterapia contra especies modificadas de A β 42, en pacientes pre-sintomáticos, evite

la pérdida neuronal y proporcione beneficios clínicos significativos, que puedan aplicarse como terapias preventivas (Wang et al., 2017).

Según el sitio web de Alzforum.org, el anticuerpo monoclonal Donanemab, producido por Eli Lilly®, con reconocimiento a Aβ pE3-42, concluyó la primera fase clínica en agosto del 2016, con resultados positivos, disminuyendo significativamente la carga de placas en pacientes con Alzheimer leve. Este anticuerpo inició la segunda fase de evaluación clínica en Diciembre del 2017, llamada TRAILBLAZER (estudio aleatorizado, en 266 pacientes mayores de 60 años, con administración de Donanemab I.V. durante 18 meses), con evaluación en la modificación de la carga de placas y deposición de TAU por PET, cambios en el volumen del parénquima cerebral por MRI y cambios cognoscitivos por test (iADRS, MMSE, CDR-SB, ADAS-Cog13). El estudio se estima concluirá en noviembre del 2021 (“Antibodies Search | ALZFORUM,” n.d.).

Los resultados obtenidos experimentalmente en la caracterización del anticuerpo monoclonal 3B8, demostraron su capacidad para reconocer péptidos sintéticos por WB y ELISA, con especificidad para las especies truncadas en el tercer aminoácido del péptido Aβ 3-42 y Aβ pE3-42. Debido a la ausencia de reconocimiento del péptido Aβ 1-42, que posee la totalidad de los aminoácidos contenidos en Aβ 3-42, se piensa que la interacción del anticuerpo 3B8 con su epítipo no es de tipo lineal y que requiere forzosamente de la pérdida de los dos primeros aminoácidos: Aspartato 1 (D¹) y Alanina 2 (A²), que provoca una modificación estructural en la configuración secundaria del péptido, distinta a la estructura del péptido Aβ de secuencia completa. Además, estos resultados indican que el residuo piroglutamato en el extremo amino-terminal no es un factor determinante para el reconocimiento por el anticuerpo. Esta aseveración se sustenta en el hecho de que la presencia

o ausencia del residuo piroglutamato en el péptido A β 3-42 no influyó en la reactividad de 3B8; por otro lado, la especie A β pE11-42 no fue reconocida, en ninguno de los experimentos, a pesar de también poseer un piroglutamato en el amino terminal.

Se demostró la capacidad del anticuerpo de reconocer agregados de A β pE3-42, en tejidos cerebrales de humano y en el modelo murino transgénico, a través de inmunofluorescencia; las tinciones fueron comparables con las de anticuerpos comerciales dirigidos contra la misma especie de A β . De igual modo, se observó el patrón de reconocimiento central de las especies de A β piroglutamadas, en agregados amiloides, descritas anteriormente por otros autores, apoyando la teoría de las especies piroaminotruncadas como semillas de agregación (Hartlage-Rübsamen et al., 2011; Moro et al., 2018; Sullivan et al., 2011).

Se identificaron dos secuencias de aminoácidos (EFRH y FGSR), relacionadas con el determinante antigénico reconocido por el anticuerpo 3B8 en el extremo aminoterminal de los péptidos A β 3-42 y A β pE3-42. Acorde con nuestros resultados, la secuencia EFRH, que coincide con la secuencia lineal de los primeros cuatro aminoácidos de la secuencia de A β 3-42, fue reportado previamente por otro grupo de investigación en este laboratorio, que identificó la secuencia como un epítipo inmunodominante en el reconocimiento de anticuerpos policlonales producidos en conejo, contra A β x-42 y A β pE3-42 (Acero et al., 2009b; Gevorkian et al., 2004).

La obtención de dos secuencias diferentes, una con gran similitud a la secuencia original y otra con alta frecuencia de aparición en las secuencias encontradas, es indicativo de que ambas son relevantes en la interacción del anticuerpo con su epítipo. Cabe la

posibilidad de que la suma de ambas secuencias, **FGSR** y **QF(W)RH**, estén formando un solo epítipo de tipo conformacional o que cada secuencia, por separado, esté mimetizando el mismo epítipo; probablemente ubicado en los primeros 10 aminoácidos de la región amino terminal del péptido β -Amiloide 3-42.

Por su parte, la secuencia FGSR, a pesar de no tener relación explícita con la secuencia de aminoácidos en A β 3-42, presentó dominancia antigénica frente a la secuencia EFRH y frente a otros epítopos. La búsqueda en BLAST reveló homología del 83% de la secuencia CFGSRC con la secuencia CFGGRC (E = 13), presente en la proteasa ADAM22 (región 310-315), en el dominio ACR (*ADAM Cysteine Rich Domine*). Esta proteína tiene alta expresión en cerebro, y se ha vinculado con la regulación de adhesión, maduración sináptica postnatal, inhibición de la proliferación celular y regulación sináptica; debido a su papel en la regulación del canal de potasio postsináptico Kv1 (Hivert et al., 2019). Las alteraciones de esta enzima y su ligando GLI1 se han reportado en pacientes con encefalopatía grave de progresión rápida, atrofia cerebral, convulsiones intratables y discapacidad intelectual profunda (Muona et al., 2016). Nuestros resultados están señalando a una posible homología entre el péptido A β 3-42 y la proteasa ADAM22, y este hallazgo merece ser explorado. La imagen 21 muestra las estructuras teóricas de las secuencias obtenidas por Phage Display, modeladas en el programa PyMol.

En resumen, ambas secuencias (EFRH y FGSR) son de gran relevancia para el reconocimiento de 3B8; sin embargo, la información obtenida en este trabajo, no es suficiente para determinar la conformación estructural de ambas secuencias y las interacciones con 3B8. A pesar de ello, es posible realizar una aproximación con simulación *in silico* y existe la opción de realizar experimentos de biopanning con bibliotecas de mayor extensión en las secuencias peptídicas (12 aminoácidos), cristalografía de Rayos X, picroismo circular, entre

otras; lo cual podría ayudar a dilucidar el orden y la conformación estructural de los aminoácidos en interacción con 3B8. Creemos que los resultados obtenidos en este trabajo son potencialmente importantes para el desarrollo de nuevos compuestos inmunoterapéuticos, dirigidos específicamente a los agregados de A β pE3-42; además, el potencial de diagnóstico de 3B8 debe ser explorado en futuros trabajos.

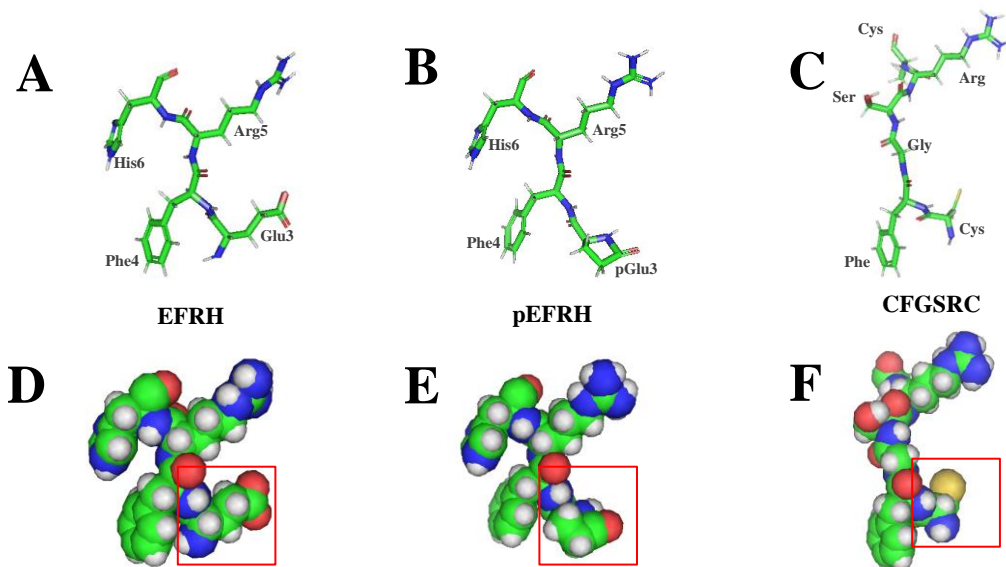


Imagen 21. Modelado teórico de las secuencias A) AEFRH, B) pEFRH y C) CFGSR. En las figuras D, E y F se muestran las estructuras enfatizando el aminoácido terminal con un recuadro rojo.

VII. CONCLUSIONES

- 3B8 es un anticuerpo monoclonal, de clase IgG3, producido en ratón, con capacidad de reconocimiento de especies truncadas en el tercer aminoácido del péptido β -amiloide (A β 3-42 y A β pE3-42).
- 3B8 tiene la capacidad de reconocer agregados de A β 3-42 y A β pE3-42 en cortes de cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y tejido cerebral de ratones 3xTgAD.
- Los patrones de reconocimiento de 3B8, en la doble inmunotinción de tejido cerebral, son similares a los reportados por otros autores, y apoyan la teoría de las especies piro-aminotruncadas como “semillas de agregación” en la cascada amiloide.
- El epítipo de 3B8 tiene relación con las secuencias de aminoácidos EFRH y FGRS, las cuales pudieran ser mimótopos de un solo epítipo conformacional de mayor extensión, ubicado en la región aminoterminal del péptido A β pE3-42.
- La relación de la secuencia CFGSRC con el dominio ACR de la proteasa ADAM22, debe ser explorada con la finalidad de confirmar o descartar una homología relevante con esta proteína.

Perspectivas:

Dadas las cualidades del anticuerpo monoclonal 3B8 para reconocer agregados de A β pE3-42, se sugiere iniciar con pruebas en animales para probar su efectividad *in vivo*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acero, G., Manoutcharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M. E., Govezensky, T., Coronas, G., Luz-Madrigal, A., Cribbs, D. H., & Gevorkian, G. (2009a). Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A β -specific antibodies produced in rabbits. *Journal of Neuroimmunology*, 213(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.06.003>
- Acero, G., Manoutcharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M. E., Govezensky, T., Coronas, G., Luz-Madrigal, A., Cribbs, D. H., & Gevorkian, G. (2009b). Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A β -specific antibodies produced in rabbits. *Journal of Neuroimmunology*, 213(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.06.003>
- ADI. (2017). *About dementia | Alzheimer's Disease International*. <http://www.alz.co.uk/about-dementia>
- Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Becker, A., Bauscher, C., Kohlmann, S., Sedlmeier, R., Raber, K. A., Cynis, H., Ronicke, R., Reymann, K. G., Petrasch-Parwez, E., Hartlage-Rubsamen, M., Waniek, A., Rossner, S., Schilling, S., Osmand, A. P., Demuth, H.-U., & von Horsten, S. (2011). Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A Is Induced by Pyroglutamate-A Formation. *Journal of Neuroscience*, 31(36), 12790–12801. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1794-11.2011>
- Alzheimer, A. (1991). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. *History of Psychiatry*, 2(5), 74–101. <https://doi.org/10.1177/0957154X9100200506>
- Andreasen, N., Simeoni, M., Ostlund, H., Lisjo, P. I., Fladby, T., Loercher, A. E., Byrne, G. J., Murray, F., Scott-Stevens, P. T., Wallin, A., Zhang, Y. Y., Bronge, L. H., Zetterberg, H., Nordberg, A. K., Yeo, A. J., Khan, S. A., Hilpert, J., & Mistry, P. C. (2015). First administration of the Fc-attenuated anti- β amyloid antibody GSK933776 to patients with mild Alzheimer's disease: A randomized, placebo-controlled study. *PLoS ONE*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098153>
- Association, A., & Alzheimer's Association. (2017). *FDA-approved treatments for Alzheimer's*. Alz.Org. [https://www.alz.org/dementia/downloads/topicsheet_treatments.pdf%0Afile:///D:/002 current projects/003 NO APPROVAL/9999 review pojects/ALZ REVIEW/AD new trial review 123@gmail.com/ALZHEIMER REVIEW.Data/PDF/3492138826/topicsheet_treatments.pdf](https://www.alz.org/dementia/downloads/topicsheet_treatments.pdf%0Afile:///D:/002%20current%20projects/003%20NO%20APPROVAL/9999%20review%20pojects/ALZ%20REVIEW/AD%20new%20trial%20review%20123@gmail.com/ALZHEIMER%20REVIEW.Data/PDF/3492138826/topicsheet_treatments.pdf)
- Baumgart, M., Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Fazio, S., Kim, H., & Johns, H. (2015). Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimer's and Dementia*, 11(6), 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.05.016>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/acer.12873>
- Belloy, M. E., Napolioni, V., & Greicius, M. D. (2019). A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron*, 101(5), 820–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.056>

- Bisceglia, F., Natalello, A., Serafini, M. M., Colombo, R., Verga, L., Lanni, C., & De Lorenzi, E. (2018). An integrated strategy to correlate aggregation state, structure and toxicity of A β 1–42 oligomers. *Talanta*, 188(February), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.062>
- Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer’s disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>
- Blennow, Kaj. (2017). A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer’s Disease: Moving from CSF to Blood. In *Neurology and Therapy* (Vol. 6, pp. 15–24). <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0073-9>
- Blennow, Kaj, de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer’s disease. In *Lancet* (Vol. 368, Issue 9533, pp. 387–403). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bouter, Y., Noguerola, J. S. L., Tucholla, P., Crespi, G. A. N., Parker, M. W., Wiltfang, J., Miles, L. A., & Bayer, T. A. (2015). Abeta targets of the biosimilar antibodies of Bapineuzumab, Crenezumab, Solanezumab in comparison to an antibody against N-truncated Abeta in sporadic Alzheimer disease cases and mouse models. *Acta Neuropathologica*, 130(5), 713–729. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1489-x>
- Braak, H, & Braak, E. (1991). Acta H’ pathologica Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, Heiko, & Del Tredici, K. (2012). Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer’s disease begin? *Current Opinion in Neurology*, 25(6), 708–714. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835a3432>
- Brown, B. M., Peiffer, J. J., & Martins, R. N. (2013). Multiple effects of physical activity on molecular and cognitive signs of brain aging: can exercise slow neurodegeneration and delay Alzheimer’s disease? *Molecular Psychiatry*, 18(8), 864–874. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.162>
- CENETEC. (2010). Diagnóstico y Tratamiento de la DEMENCIA TIPO ALZHEIMER. In *GUÍA DE PRACTICA CLINICA* (pp. 1–55).
- Dammers, C., Reiss, K., Gremer, L., Lecher, J., Ziehm, T., Stoldt, M., Schwarten, M., & Willbold, D. (2017). Pyroglutamate-Modified Amyloid- β (3–42) Shows α -Helical Intermediates before Amyloid Formation. *Biophysical Journal*, 112(8), 1621–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.007>
- De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. In *Cell* (Vol. 164, Issue 4, pp. 603–615). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
- Delnomdedieu, M., Duvvuri, S., Li, D. J., Atassi, N., Lu, M., Brashear, H. R., Liu, E., Ness, S., & Kupiec, J. W. (2016). First-In-Human safety and long-term exposure data for AAB-003 (PF-05236812) and biomarkers after intravenous infusions of escalating doses in patients with mild to moderate Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research and Therapy*, 8(1), 4–13. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0177-y>
- Dunkelmann, T., Teichmann, K., Ziehm, T., Schemmert, S., Frenzel, D., Tusche, M., Dammers, C., Jürgens, D., Langen, K. J., Demuth, H. U., Shah, N. J., Kutzsche, J., Willuweit, A., & Willbold,

- D. (2018). A β oligomer eliminating compounds interfere successfully with pEA β (3–42) induced motor neurodegenerative phenotype in transgenic mice. *Neuropeptides*, 67(November 2017), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.011>
- Dunys, J., Valverde, A., & Checler, F. (2018). Are N- and C-terminally Truncated A β species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *Journal of Biological Chemistry*, 293, jbc.R118.003999. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003999>
- Ensanut. (2012). Ensanut 2012. In *Instituto Nacional de Salud Pública*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., & van Duijn, C. M. (2015). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349–1356. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343467>
- Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, 4(1), 13–27. <https://doi.org/10.1159/000100355>
- Gambetti, P., Ghetti, C., Hulette, L., Lannfelt, C., Lippa, C., & Russo, C. (2000). Neurobiology: Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature*, 405, 531. <https://doi.org/10.1038/35014735>
- Gevorkian, G., Petrushina, I., Manoutcharian, K., Ghochikyan, A., Acero, G., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., & Agadjanyan, M. G. (2004). Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar β amyloid. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.06.004>
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885–890. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4)
- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. A. (2010). Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(12), 1915–1918. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.015>
- Hardy, J; Selkoe, D. (2002). the Amyloid Hypothesis of Alzheimer ' S Disease. *Amyloid International Journal Of Experimental And Clinical Investigation*, 297(5580), 353–357.
- Harigaya, Y., Saido, T. C., Eckman, C. B., Prada, C. M., Shoji, M., & Younkin, S. G. (2000). Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 422–427. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3490>
- Hartlage-Rübsamen, M., Morawski, M., Waniek, A., Jäger, C., Zeitschel, U., Koch, B., Cynis, H., Schilling, S., Schliebs, R., Demuth, H. U., & Roßner, S. (2011). Glutamyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-A β deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathologica*, 121(6), 705–719. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0806-2>

- Hivert, B., Marien, L., Agbam, K. N., & Faivre-Sarrailh, C. (2019). ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *Journal of Cell Science*, 132(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.219774>
- Ho, Y. S., Yang, X., Yeung, S. C., Chiu, K., Lau, C. F., Tsang, A. W. T., Mak, J. C. W., & Chang, R. C. C. (2012). Cigarette smoking accelerated brain aging and induced pre-alzheimer-like neuropathology in rats. *PLoS ONE*, 7(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036752>
- Hook, V. Y. H., Sei, C., Yasothornsrikul, S., Toneff, T., Kang, Y.-H., Efthimiopoulos, S., Robakis, N. K., & Van Nostrand, W. (2002). The Kunitz Protease Inhibitor Form of the Amyloid Precursor Protein (KPI/APP) Inhibits the Proneuropeptide Processing Enzyme Prohormone Thiol Protease (PTP). *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 3165–3172. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.3165>
- Hu, C., Adedokun, O., Ito, K., Raje, S., & Lu, M. (2015). Confirmatory population pharmacokinetic analysis for bapineuzumab phase 3 studies in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, 55(2), 221–229. <https://doi.org/10.1002/jcph.393>
- Hutton, M. (2001). Missense and splice site mutations in tau associated with FTDP-17: multiple pathogenic mechanisms. *Neurology*, 56(11 Suppl 4), S21-5. https://doi.org/10.1212/WNL.56.suppl_4.S21
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Thies, B., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., Montine, T. J., Hyman, B. T., ... Al., E. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.10.007>
- Invitrogen. (2010). *Protein A Agarose* (Issue 223). <https://doi.org/10.1007/s12250-011-3179-8.4>
- J., L., Y.J., W., M., Z., Z.Q., X., C.Y., G., C.Q., F., J.C., Y., H.D., Z., Li, J., Wang, Y. J., Zhang, M., Xu, Z. Q., Gao, C. Y., Fang, C. Q., Yan, J. C., & Zhou, H. D. (2011). Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology*, 76(17), 1485–1491. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318217e7a4>
- Jones, S., & O'Neill, E. (2009). Context-aware messaging. *Proceedings of the 8th International Conference on Mobile and Ubiquitous Multimedia - MUM '09*, 1–10. <https://doi.org/10.1145/1658550.1658558>
- Jonson, M., Pokrzywa, M., Starkenberg, A., Hammarstrom, P., & Thor, S. (2015). Systematic A β analysis in drosophila reveals high toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 peptides, and emphasizes N-and C-terminal residues. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133272>
- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(9), 698–712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., & Ito, H. (1988). Novel precursor of

- Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*, 331(6156), 530–532. <https://doi.org/10.1038/331530a0>
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E. L., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Nissinen, A. (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 62(10), 1556–1560. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.10.1556>
- Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G. F., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M. L., Barletta, J., Price, J. C., Sandell, J., Lopresti, B. J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., ... Långström, B. (2004). Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of Neurology*, 55(3), 306–319. <https://doi.org/10.1002/ana.20009>
- Kulic, L., McAfoose, J., Welt, T., Tackenberg, C., Späni, C., Wirth, F., Finder, V., Konietzko, U., Giese, M., Eckert, A., Noriaki, K., Shimizu, T., Murakami, K., Irie, K., Rasool, S., Glabe, C., Hock, C., & Nitsch, R. M. (2012). Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice expressing the Osaka intra-A β APP mutation. *Translational Psychiatry*, 2(11), e183. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.109>
- Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2014). Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(3), 28. <https://doi.org/10.1186/alzrt258>
- Landen, J. W., Cohen, S., Billing, C. B., Cronenberger, C., Styren, S., Burstein, A. H., Sattler, C., Lee, J. H., Jack, C. R., Kantarci, K., Schwartz, P. F., Duggan, W. T., Zhao, Q., Sprenger, K., Bednar, M. M., & Binneman, B. (2017). Multiple-dose ponezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease: Safety and efficacy. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 3(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.04.003>
- Lee, E. B., Skovronsky, D. M., Abtahian, F., Doms, R. W., & Lee, V. M. Y. (2003). Secretion and intracellular generation of truncated Ab in b-site amyloid-b precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4458–4466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210105200>
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W. L., Yen, S. H., Dickson, D. W., Davies, P., & Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics*, 25(4), 402–405. <https://doi.org/10.1038/79109>
- Li, G., Hu, Z. W., Chen, P. G., Sun, Z. Y., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2017). Prophylactic Vaccine Based on Pyroglutamate-3 Amyloid β Generates Strong Antibody Response and Rescues Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Model Mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(3), 454–459. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00336>
- Liu, K., Doms, R. W., & Lee, V. M. Y. (2002). Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A β production upon BACE overexpression. *Biochemistry*, 41(9), 3128–3136. <https://doi.org/10.1021/bi015800g>
- Logovinsky, V., Satlin, A., Lai, R., Swanson, C., Kaplow, J., Osswald, G., Basun, H., & Lannfelt, L.

- (2016). Safety and tolerability of BAN2401 - A clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A β antibody. *Alzheimer's Research and Therapy*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0181-2>
- Mandler, M., Walker, L., Santic, R., Hanson, P., Upadhaya, A. R., Colloby, S. J., Morris, C. M., Thal, D. R., Thomas, A. J., Schneeberger, A., & Attems, J. (2014). Pyroglutamylated amyloid- β is associated with hyperphosphorylated tau and severity of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 128(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1296-9>
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4245–4249. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>
- Mattsson, N., Lönneborg, A., Boccardi, M., Blennow, K., & Hansson, O. (2017). Clinical validity of cerebrospinal fluid A β 42, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 52, pp. 196–213). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.034>
- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. In *Lancet* (Vol. 349, Issue 9064, pp. 1546–1549). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)10203-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)10203-8)
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., & Katzman, R. (1984). views & reviews Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : *Neurology*, 34(7), 939. <https://doi.org/10.3233/JAD-122299>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (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. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 7, Issue 3, pp. 263–269). <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Mehta, P. D., Patrick, B. A., Barshatzky, M., Mehta, S. P., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Wegiel, J., Wisniewski, T., & Miller, D. L. (2018). Generation and Partial Characterization of Rabbit Monoclonal Antibody to Pyroglutamate Amyloid- β 3-42(pE3-A β). *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(4), 1635–1649. <https://doi.org/10.3233/JAD-170898>
- Mejia-Arango, S., & Gutierrez, L. M. (2011). Prevalence and Incidence Rates of Dementia and Cognitive Impairment No Dementia in the Mexican Population. *Journal of Aging and Health*, 23(7), 1050–1074. <https://doi.org/10.1177/0898264311421199>
- Miravalle, L., Calero, M., Takao, M., Roher, A. E., Ghetti, B., & Vidal, R. (2005). Amino-terminally truncated AB peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry*, 44(32), 10810–10821. <https://doi.org/10.1021/bi0508237>
- Möller, H. J., & Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 248(3), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s004060050027>

- Moro, M. L., Phillips, A. S., Gaimster, K., Paul, C., Mudher, A., Nicoll, J. A. R., & Boche, D. (2018). Pyroglutamate and Isoaspartate modified Amyloid-Beta in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0505-x>
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genetics*, 1(5), 345–347. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>
- Müller, U. C., & Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>
- Muona, M., Fukata, Y., Anttonen, A. K., Laari, A., Palotie, A., Pihko, H., Lönnqvist, T., Valanne, L., Somer, M., Fukata, M., & Lehesjoki, A. E. (2016). Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. *Neurology: Genetics*, 2(1). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000046>
- Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S. E., Winblad, B., & Greengard, P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8378–8382. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8378>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- OMS | Demencia. (2017). WHO; World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- Ostrowitzki, S., Lasser, R. A., 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 and Therapy*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0318-y>
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157.Neuropathology>
- Petersen, R C. (2003). Mild cognitive impairment clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 646–653. <https://doi.org/10.1038/nrd1155>
- Petersen, Ronald C, Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., & Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: A concept in evolution. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 214–228. <https://doi.org/10.1111/joim.12190>
- Pradier, L., Blanchard-Brégeon, V., Bohme, A., Debeir, T., Menager, J., Benoit, P., Barneoud, P., Taupin, V., Bertrand, P., Dugay, P., Cameron, B., Shi, Y., Naimi, S., Duchesne, M., Gagnaire, M., Weeden, T., Travaline, T., Reczek, D., Khiroug, L., ... Cohen, C. (2018). SAR228810: An antibody for protofibrillar amyloid β peptide designed to reduce the risk of amyloid-related imaging abnormalities (ARIA). *Alzheimer's Research and Therapy*, 10(1), 1–23.

<https://doi.org/10.1186/s13195-018-0447-y>

- Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M., & Prina, M. (2014). World Alzheimer report 2014 dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. *London: Alzheimer's Disease International*, 104. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2014.pdf>
- Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., & Karagiannidou, M. (2016). World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Disease International (ADI)*, 1–140. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Gemma-Claire, A., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International*, 84. <https://doi.org/10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x>
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. V. (2010). Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biological Psychiatry*, 67(6), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.013>
- Reisberg, B., Ferris, S. H., de Leon, M. J., Franssen, E. S. E., Kluger, A., Mir, P., Borenstein, J., George, A. E., Shulman, E., Steinberg, G., & Cohen, J. (1988). Stage-specific behavioral, cognitive, and in vivo changes in community residing subjects with age-associated memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer type. *Drug Development Research*, 15(2–3), 101–114. <https://doi.org/10.1002/ddr.430150203>
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M. A., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, 14(2), 457–466. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90301-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90301-1)
- Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., Hardy, J., Vassar, R., Winblad, B., & Saido, T. C. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *The EMBO Journal*, 4621111, e201797397. <https://doi.org/10.15252/embj.201797397>
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H. U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters*, 563(1–3), 191–196. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00300-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00300-X)
- 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, H.-U., & Rossner, S. (2008). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Medicine*, 14(10), 1106–1111. <https://doi.org/10.1038/nm.1872>
- Schwarz, A. J., Sundell, K. L., Charil, A., Case, M. G., Jaeger, R. K., Scott, D., Bracoud, L., Oh, J., Suhy, J., Pontecorvo, M. J., Dickerson, B. C., & Siemers, E. R. (2019). Magnetic resonance imaging measures of brain atrophy from the EXPEDITION3 trial in mild Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 5, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.007>

- Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, 8(11), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01363-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01363-4)
- Selkoe, D. J. (2019). Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 365–366. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0205-1>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(e201606210), 1–14. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. In *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., Fournié-Zaluski, M. C., Roques, B., & Checler, F. (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid β -peptide. *Journal of Neurochemistry*, 109(1), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05950.x>
- Sofola-Adesakin, O., Khericha, M., Snoeren, I., Tsuda, L., Partridge, L., Serrano-Pozo, A., Frosch, M., Masliah, E., Hyman, B., Hardy, J., Higgins, G., Wirths, O., Multhaup, G., Bayer, T., Mao, P., Reddy, P., Zhu, X., Raina, A., Rottkamp, C., ... Sun, X. (2016). pGluA β increases accumulation of A β in vivo and exacerbates its toxicity. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0380-x>
- Spencer, B., & Masliah, E. (2014). Immunotherapy for alzheimer's disease: Past, present and future. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 6, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00114>
- Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). VIEWPOINT An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clinical Anatomy*, 8, 429–443. http://info-centre.jenage.de/assets/pdfs/library/stelzmann_et_al_alzheimer_CLIN_ANAT_1995.pdf
- Stewart, K. L., & Radford, S. E. (2017). Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophysical Reviews*, 9(4), 405–419. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0271-9>
- Stocker, H., Möllers, T., Perna, L., & Brenner, H. (2018). The genetic risk of Alzheimer's disease beyond APOE ϵ 4: systematic review of Alzheimer's genetic risk scores. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0221-8>
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 289, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>
- Strassnig, M., & Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907. *Psychiatry*, 2(412), 30–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21120106>
- Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P. I., Lee, H., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2008). Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 5(6), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2008.02.007>

- Sullivan, C. P., Berg, E. A., Elliott-Bryant, R., Fishman, J. B., McKee, A. C., Morin, P. J., Shia, M. A., & Fine, R. E. (2011). Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neuroscience Letters*, 505(2), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.071>
- Sutphen, C. L., Jasielc, M. S., Shah, A. R., Macy, E. M., Xiong, C., Vlassenko, A. G., Benzinger, T. L. S., Stoops, E. E. J., Vanderstichele, H. M. J., Brix, B., Darby, H. D., Vandijck, M. L. J., Ladenson, J. H., Morris, J. C., Holtzman, D. M., & Fagan, A. M. (2015). Longitudinal Cerebrospinal Fluid Biomarker Changes in Preclinical Alzheimer Disease During Middle Age. *JAMA Neurology*, 72(9), 1029. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1285>
- Ultsch, M., Li, B., Maurer, T., Mathieu, M., Adolfsson, O., Muhs, A., Pfeifer, A., Pihlgren, M., Bainbridge, T. W., Reichelt, M., Ernst, J. A., Eigenbrot, C., Fuh, G., Atwal, J. K., Watts, R. J., & Wang, W. (2016). Structure of crenezumab complex with A β shows loss of β -hairpin. *Scientific Reports*, 6(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep39374>
- van Dyck, C. H. (2018). Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biological Psychiatry*, 83(4), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.010>
- Walker, L. C., & Jucker, M. (2015). Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annual Review of Neuroscience*, 38(1), 87–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>
- Wang, Y., Lu, H., & Lin, B. (2017). *Lessons from Anti-Amyloid- β Immunotherapies in Alzheimer Disease : Aiming at a Moving Target*. 242–250. <https://doi.org/10.1159/000478741>
- Wilcock, D. M., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2006). Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nature Protocols*, 1(3), 1591–1595. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.277>
- Wilson, C. A., Doms, R. W., & Lee, V. M.-Y. (1999). Intracellular APP Processing and A β Production in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(8), 787–794. <https://doi.org/10.1097/00005072-199908000-00001>
- Wirhth, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P. J., Multhaup, G., Brody, D. L., Esparza, T., Ingelsson, M., Kalimo, H., Lannfelt, L., & Bayer, T. A. (2010). Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *Journal of Neural Transmission*, 117(1), 85–96. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0314-x>
- Wirhth, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H. U., & Bayer, T. A. (2009). Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathologica*, 118(4), 487–496. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0557-5>
- Wirhth, O., Erck, C., Martens, H., Harmeier, A., Geumann, C., Jawhar, S., Kumar, S., Multhaup, G., Walter, J., Ingelsson, M., Degerman-Gunnarsson, M., Kalimo, H., Huitinga, I., Lannfelt, L., & Bayer, T. A. (2010). Identification of low molecular weight pyroglutamate A β oligomers in Alzheimer disease: A novel tool for therapy and diagnosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41517–41524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178707>

Workgroup, A. A. R. R. (2013). Amyloid Related Imaging Abnormalities (ARIA) in Amyloid Modifying Therapeutic Trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *NIH Public Access*, 7(4), 367–385.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2351>. Amyloid

Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>