



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO SOBRE LA INMUNOGENICIDAD
DE EPÍTOPOS DEL PÉPTIDO
BETA-AMILOIDE MODIFICADO EN EL
EXTREMO N-TERMINAL**

T E S I S

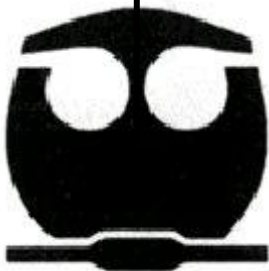
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

LAURA ALEJANDRA PEREDO VÁSQUEZ

Tutor: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN



MÉXICO, D. F.

Enero 2012



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.

ESTUDIO SOBRE LA INMUNOGENICIDAD DE EPÍTOPOS DEL PÉPTIDO
BETA-AMILOIDE MODIFICADO EN EL EXTREMO N-TERMINAL

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Gohar Gevorgyan Markosian	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Karen Manucharian Airapetian, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de sub-clonación de péptidos.

Se reconoce la asesoría técnica del Biol. Gonzalo Asariel Acero Galindo en todos los experimentos de inmunización y evaluación de anticuerpos.

Se reconoce la asesoría técnica de la M.C. María Elena Munguía Zamudio en los experimentos de sub-clonación.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (proyecto 58081) y DGAPA-UNAM (proyecto IN209610). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en enero de 2012.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Edda Sciutto Conde	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Angélica Zepeda Rivera	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gohar Gevorgyan y al Dr. Karen Manucharian. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto. A la Dra. Gohar, por su apoyo en la difícil tarea de ser mamá y estudiante.

A Gonzalo Acero, muchas gracias amigo y maestro. Gracias por caminar lado a lado con todos nosotros, por enseñarnos lo necesario para llevar a cabo exitosamente nuestro trabajo y por tus valiosos consejos de vida. Tu persona hace una gran diferencia en nuestro laboratorio.

A Mariel Munguía, por escuchar y abrir las puertas de tu casa a esta comunidad de estudiantes.

A mi comité tutorial que semestre tras semestre enriqueció este trabajo y a los miembros del jurado que con sus observaciones contribuyeron a mi formación profesional.

Al Sr. Martín, cuyo trabajo es tan importante que hace que el nuestro fluya cada día.

A mis compañeros de laboratorio, Roxanna, Luis, Dulce, Anllely, Adriana, Rafael, Yessica, Paulina, Claudia, César, Jairo, Paco, Goretti y Lucía. ¡Gracias por sus muestras de cariño y el apoyo que me brindaron!

Y a aquellos amigos que hoy en día están presentes o ausentes, porque cada uno ha contribuido de manera inimaginable en mi camino por la vida.

A mi esposo, por amarme en mis desiertos, días soleados y tormentas. Sin tu apoyo no habría podido dar este paso y culminarlo. Gracias a Dios porque no somos más dos, sino uno.

A nuestro pequeño hijo, por enseñarme que el amor que se recordará a lo largo de la vida se siembra en los momentos sencillos del día a día.

A ti que vienes en camino, por la alegría de verte crecer en mi vientre.

*A mis padres, porque uno no entiende lo difícil que es ser padre y madre hasta que llega a serlo y a mi hermano, porque a pesar de la distancia vives en mi corazón.
¡Gracias porque todavía me hacen sentir el tierno cariño como cuando era pequeña!*

Porque Tu diestra me ha sostenido...

Índice

	Pág.
Abreviaturas	8
Resumen	9
Introducción	12
1. Características patológicas de la Enfermedad de Alzheimer	13
2. Importancia del péptido beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer	15
3. Producción de beta-amiloide	16
4. Fragmentos modificados de beta-amiloide	21
5. Hipótesis de la cascada amiloide	24
6. Terapias contra la enfermedad de Alzheimer	26
7. Estrategias sintomáticas	
7.1 Terapia colinérgica	27
7.2 Memantina: antagonista del receptor NMDA	27
8. Estrategias que modulan la producción de β -amiloide	28
9. Estrategias que inhiben la agregación de β -amiloide	30
10. Estrategias que estimulan la eliminación de β -amiloide	31
11. Estrategias auxiliares	32
12. Inmunoterapia	34
12.1 Mecanismos de acción de la inmunoterapia	35
12.2 Inmunoterapia activa	37
12.3 Alternativas para la inmunización activa	39
12.4 Inmunoterapia pasiva	44
13. Ensayos clínicos	46
14. Tecnología del despliegue de péptidos en el fago M13	49
Planteamiento del problema	52
Hipótesis	53

Objetivos	53
Materiales y métodos	
Secuencias y reactividad de los péptidos seleccionados previamente	54
Protocolos de Inmunización	54
Sub-clonación de epítomos en la proteína pVIII del fago M13	56
Secuenciación	59
Amplificación del vector sub-clonado en la proteína pVIII	59
Purificación del amplificado	59
Titulación de los fagos sub-clonados	60
Inmunoblot	60
Protocolo general del ELISA de captura de anticuerpo	60
a) Detección de IgG en suero de conejos inmunizados con epítomos en baja copia	61
b) Detección de IgM en suero de ratones inmunizados con epítomos en baja copia	61
c) Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con epítomos en baja copia	61
d) Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con epítomos en alta copia	61
e) Evaluación de la reactividad de anti-A β (pE)3-42 contra diferentes péptidos	62
f) Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con 20 μ g de péptido PC11V o PN	62
g) Detección de IgG en suero de conejos inmunizados con los péptidos PC11V, 11-25 y PN	62
h) Evaluación de la reactividad del suero anti-A β 11-25 contra diferentes péptidos de A β	62
Protocolo general del ELISA de competencia	63
a) Evaluación de la especificidad de los epítomos de A β (pE)3-42. Péptido A β (pE)3-42	63
b) Evaluación de la reactividad de los péptidos PN y PC11V con anti-A β (pE)3-42	63
c) Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti-A β 11-25 en disolución contra diferentes especies de A β	63
ELISA de captura de antígeno doble sándwich para detección de IgG en suero de ratones inmunizados con 40 μ g de péptido PC11V o PN	64

Resultados

a) Evaluación de epítomos de A β (pE)3-42 expresados en pIII del fago M13	65
b) Evaluación IgG en los sueros de conejos inmunizados con epítomos en M13 pIII	66
c) Evaluación de IgM en los sueros de ratones inmunizados con epítomos en M13 pIII	68
d) Evaluación de IgG en los sueros de ratones inmunizados con epítomos en M13 pIII	69
e) Sub-clonación de epítomos de A β (pE)3-42 en la proteína pVIII del fago M13	71
f) Evaluación de los epítomos sub-clonados en pVIII de M13 por Inmuno-blot	72
g) Evaluación de IgG en los sueros de ratones inmunizados con epítomos en M13 pVIII	74
h) Caracterización de los péptidos sintéticos PC11V y PN	75
i) Evaluación de los péptidos PN y PC11V	76
j) Evaluación de IgG en los sueros de ratones inmunizados con los péptidos PC11V y PN	77
k) Evaluación de IgG en los sueros de un segundo grupo de ratones inmunizados con los péptidos PC11V y PN	78
l) Evaluación de IgG en los sueros de conejo inmunizados con los péptidos PC11V, 11-25 Y PN	79
m) Evaluación del suero anti-A β 11-25 en su interacción con diferentes péptidos	81
Discusión	83
Conclusiones	90
Perspectivas	91
Referencias	92

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
ApoEϵ4	Apolipoproteína E, alelo o isoforma ϵ 4
LOAD	Late onset Alzheimer's disease
FAD	Familial Alzheimer's disease
APP	Proteína precursora de amiloide
βA o Aβ	Beta-amiloide
(pE)	Piroglutamato
APPα	Fragmento soluble amino-terminal de la proteólisis de APP por α -secretasa
α-CTF o C83	Fragmento carboxilo terminal del corte proteolítico de APP por α -secretasa
BACE	Enzima fragmentadora de APP en el sitio beta (β -secretasa)
APPβ	Fragmento soluble amino-terminal de la proteólisis de APP por β -secretasa
β-CTF o C99	Fragmento carboxilo terminal del corte proteolítico de APP por β -secretasa
AICD o γ-CTF	Dominio citoplasmático carboxilo terminal de APP
PS1/PS2	Presenilinas 1 y 2
NTF	Fragmento amino terminal
CTF	Fragmento carboxilo terminal
NCT	Nicastrina
kDa	Kilodaltones
iso-Asp	Iso-aspartilo
Tg2576	Modelo murino de la EA, contiene la mutación Swedish de APP 695-K670/M671L. Modela deposición de placas amiloides de la EA
ACHE	Acetilcolinesterasa
NMDA	Receptor ionotrópico de glutamato
LTP	Potenciación de largo plazo
PDAPP	Modelo murino de la EA, con la mutación Indiana de APP V717F. Modela deposición de placas amiloides.
LCR	Líquido cefalorraquídeo
IDE	Enzima degradadora de insulina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
NSAIDs	Anti-inflamatorios no-esteroides

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA), fue descrita por Alois Alzheimer en 1906 como un caso de demencia progresiva con presencia de placas y marañas en el cerebro post-mortem de una paciente de 55 años de edad. A poco más de 100 años, la EA se ha convertido en un foco de atención para investigadores, trabajadores sociales, asociaciones civiles y gobiernos porque se considera un problema de salud pública debido al creciente número de casos en todo el mundo y a la falta de terapias efectivas que detengan el desarrollo de la enfermedad. La EA representa el 70% de todos los casos de demencia senil y la incidencia aumenta con el envejecimiento.

Clínicamente la EA se caracteriza por un deterioro cognitivo crónico y progresivo que termina por destruir la personalidad e inhabilita al individuo. Patológicamente se caracteriza por la presencia de placas seniles extracelulares, constituidas por la proteína β -amiloide plegada y marañas neurofibrilares intracelulares, compuestas por la proteína tau hiperfosforilada.

La EA se clasifica en enfermedad de Alzheimer tardía o esporádica (late onset Alzheimer's disease o LOAD) y familiar (familial Alzheimer's disease o FAD). La EA esporádica representa el 98% de los casos y se han descrito como factores de riesgo el envejecimiento y la presencia del gen de la apolipoproteína E alelo 4 (ApoE ϵ 4). La EA familiar constituye el 2% restante y tiene un claro componente genético, mutaciones en la proteína precursora de amiloide (APP) y en las enzimas presenilinas (PS 1 y 2).

La hipótesis de la cascada amiloide propone que la proteína β -amiloide (β A o A β) es primordial en el desarrollo de la EA y, últimamente se ha sugerido que inclusive favorece la hiperfosforilación de la proteína tau. El péptido β A se deriva del corte proteolítico de APP por las enzimas β -secretasa y el complejo γ -secretasa, que genera especies de xx-37(-43) residuos de longitud. La especie A β 1-42 tiene mayor propensión a agregarse y su toxicidad se atribuye a su acumulación, favorecida por la conformación β -plegada que adquiere y que permite formar oligómeros y fibrillas. Estos agregados provocan daño neuronal y activación de la microglía que llevan a un proceso crónico de estrés oxidante, inflamación y neurodegeneración.

Otras especies neurotóxicas son las amino-truncadas modificadas, como el A β (pE)3-42 y A β (pE)11-42 que se forman post-traduccionalmente por la enzima glutaminil ciclasa que cataliza la ciclización del glutamato N-terminal. Esta modificación les confiere mayor resistencia a la

degradación, hidrofobicidad y tendencia a agregarse. $A\beta(pE)3-42$ puede llegar a representar más del 25% de las especies de βA constituyentes de las placas seniles y ha demostrado ser neurotóxico en cultivos neuronales, induciendo apoptosis y necrosis neuronal. En modelos transgénicos se ha demostrado que la presencia de $A\beta(pE)3-42$ deteriora intensamente el aprendizaje y la memoria, y correlaciona con el progreso de la patología y la pérdida neuronal. En pacientes con EA esta especie podría ser esencial en la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo. Por ello, es necesario que las terapias contra la EA incluyan como blanco a estas especies amino truncadas modificadas.

Las terapias contra la EA que han sido aprobadas por la FDA se enfocan en atenuar la sintomatología clínica, mas no en detener el progreso de la enfermedad. Varias aproximaciones se han estudiado con la finalidad de modular la producción de βA , de favorecer su degradación o de impedir su agregación, entre otras. Una de estas estrategias es la inmunoterapia, que se refiere al uso de la inmunización activa y pasiva.

La inmunoterapia activa consiste en la administración de un inmunógeno capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos anti- βA , mientras que la inmunoterapia pasiva se basa en la introducción directa de anticuerpos anti- βA que generan un beneficio similar al de la inmunización activa. El propósito de ambas inmunoterapias es hacer presentes en el organismo anticuerpos específicos anti- βA capaces de prevenir y/o atenuar los efectos tóxicos de la proteína β -amiloide. Los mecanismos de acción propuestos de la inmunoterapia son: la neutralización de los oligómeros de βA y/o desagregación de placas amiloides por unión directa de los anticuerpos específicos a los péptidos de βA en el cerebro, fagocitosis mediada por microglía y el decaimiento de la concentración del βA cerebral hacia el plasma sanguíneo. La inmunoterapia tanto activa como pasiva, han demostrado ser capaces de cambiar la patología de la EA, así como de mejorar las funciones cognitivas.

Una alternativa para la inmunoterapia activa involucra el uso de epítomos/mimótopos conjugados a sistemas acarreadores. Esta estrategia ha posibilitado la elección de epítomos de células B del péptido βA que representan una estrategia más segura porque no incluyen a los epítomos capaces de activar a las células T autorreactivas. Esto permite la producción de anticuerpos específicos anti- βA pero sin reacciones inflamatorias indeseables.

En el presente trabajo se evaluó la inmunogenicidad de epítomos/mimótopos del motivo inmunodominante del extremo amino terminal del péptido A β (pE)3-42. Se encontró que estos mimótopos no son capaces de inducir una respuesta inmune de tipo humoral y que son epítomos conformacionales. Es probable que el residuo piroglutamato (pE) y la conformación proteica sean esenciales en la estimulación del sistema inmune para la producción de anticuerpos específicos anti-A β . Se sugiere el diseño de un mimótopo que posea el residuo piroglutamato en el extremo amino terminal, en vez del residuo glutamina; que se encuentre en tándem y conjugado a un sistema hidrofóbico para añadir inmunogenicidad. También se sugiere realizar un análisis de la interacción A β (pE)3-42 con el anticuerpo anti-A β (3-42) que permita elucidar los residuos claves en esta unión antígeno-anticuerpo y un mejor diseño del mimótopo en cuestión. Esto permitiría obtener un inmunógeno capaz de neutralizar los efectos tóxicos del péptido A β (pE)3-42.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia entre adultos mayores de 65 años de edad (Cedazo-Minguez, 2007). La enfermedad se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas, cambios en el comportamiento y pérdida de la independencia (McMenemey et al, 1939; Longridge, 1939).

La gran mayoría de casos de la EA es esporádica (Late Onset Alzheimer's Disease –LOAD-) y aunque las principales causas de la enfermedad todavía no se conocen, se han descrito como factores de riesgo para la enfermedad al envejecimiento (Podtelezchnikov et al., 2011) y al gen ApoE ϵ 4 (apolipoproteína E alelo 4), pues se ha sugerido que este alelo disminuye la eliminación de A β y favorece el procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide APP (por sus siglas en inglés amyloid precursor protein) (Kim et al., 2009). Por otro lado, hay un pequeño porcentaje de casos familiares (Familial Alzheimer's Disease –FAD-) con un claro componente genético relacionado a mutaciones en APP y en las presenilinas que favorecen la producción de A β 1-42 altamente amiloidogénico (Cedazo-Minguez, 2007; Hardy, 2006).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001 la enfermedad de Alzheimer afectaba a 11 millones de personas en el mundo y se prevee que para el 2025 el número de personas con la EA se duplicará (OMS, 2001). Esto es preocupante porque la EA se ha convertido en un problema de salud pública debido a que los pacientes con esta enfermedad sufren un deterioro rápido y progresivo de las capacidades para valerse por sí mismos, por ejemplo para llevar a cabo actividades básicas como alimentarse, bañarse, vestirse y realizar sus necesidades fisiológicas por lo que se ven imposibilitados para trabajar y ser independientes. Esto implica la necesidad de un cuidador de tiempo completo que generalmente es un familiar. Para este significa un desgaste a nivel personal por la tensión física, mental y emocional que conlleva cuidar a un paciente con enfermedad de Alzheimer lo que trae como consecuencia agotamiento y alteración nerviosa que merma su capacidad y ánimo para dar un apoyo eficaz y el afecto que su ser querido necesita. Además genera gastos económicos para la atención médica del paciente y si este y/o su cuidador representan un sostén económico familiar, la situación se torna más difícil. A nivel social implica la pérdida de fuerza laboral (del paciente y/o su cuidador) y gastos médicos cubiertos por el estado cuando el gobierno así lo dispone (Alzheimer's Association; OMS, 2004).

Por lo tanto, es importante desarrollar estrategias preventivas y/o terapéuticas que disminuyan los costos sociales y económicos que ésta genera y generará y que a su vez, provean una mejor calidad de vida para aquellas personas con la enfermedad de Alzheimer y sus cuidadores.

1. Características patológicas de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la formación de fibrillas de β -amiloide (β A) largas e insolubles que se acumulan en depósitos difusos o como placas seniles en el parénquima cerebral y en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales y leptomeningeos. Estos agregados se originan por desórdenes en el plegamiento y oligomerización de la proteína β -amiloide (β A) que se acumulan a una edad temprana en la vida del individuo, pero que solo se manifiestan clínicamente en la mediana edad o tardía (Kalback et al., 2002).

Se estima que los péptidos de β A representan el 80% del total de la masa de las fibrillas amiloides en la EA con un remanente de 20% compuesto de una mezcla de glicoproteínas y glicolípidos que aumentan la insolubilidad de las fibrillas amiloides (Kalback et. al., 2002; Skovronsky et al., 2006; Pimplikar, 2009).

Otro marcador de la EA son las llamadas marañas neurofibrilares intracelulares (agregados de la proteína tau anormalmente fosforilada) y aunque tanto tau como el péptido β -amiloide participan en la patogénesis de la EA (Hardy y Allsop, 1991), se considera que el péptido β -amiloide es un importante iniciador (Blurton-Jones y LaFerla, 2006; Jin et al., 2011; Lloret et al., 2011).

Las características patológicas adicionales son la inflamación, la pérdida neuronal selectiva y la pérdida sináptica. Por ejemplo, los oligómeros de β -amiloide activan a la microglía, induciendo la liberación excesiva de NO y otros factores que también activan a los astrocitos; además, los factores liberados por los astrocitos pueden activar a la microglía, retroalimentándose mutuamente (Streit et al., 2004). Se ha sugerido que esta retroalimentación entre la microglía y los astrocitos activados amplifican las respuestas inflamatorias, provocando neurotoxicidad y muerte neuronal. Esta inflamación sostenida podría contribuir a la neurodegeneración en la EA (Glass et al., 2011).

Respecto a la pérdida neuronal selectiva, en un análisis de cortes de cerebro de pacientes con la EA se demostró atrofia considerable y pérdida de axones colinérgicos en el complejo amigdalóide. Esta depleción podría contribuir a la serie de patologías clínicas observadas en la EA, debido a la innervación colinérgica existente entre la amígdala y el hipocampo, la corteza, el tallo cerebral y el hipotálamo (Emre et al, 1993). Entre las funciones afectadas se encuentran las alteraciones en el estado de ánimo y expresión afectiva (reguladas directamente por la amígdala), del aprendizaje y la memoria de corto plazo (reguladas principalmente por el hipocampo), de las funciones autónomas como la regulación de la función cardíaca, respiratoria, el tono muscular, el sistema vigilia-sueño-soñar (reguladas por el tallo cerebral), el apetito, la sed, la temperatura, el sueño, así como de la regulación endócrina (reguladas por el hipotálamo) (Emre et al, 1993; Jaques-Michel, 2000).

En un estudio de la patología inducida por β A y la pérdida neuronal en ratones doblemente transgénicos (con los genes de APP/PS1K1, que tienen las características de presentar pérdida neuronal extensiva en la región CA1 del hipocampo que precede a la intensa acumulación intraneuronal de β A, patología motora severa, degeneración axonal y cambios de comportamiento a la edad de 6 meses) el análisis de cortes de cerebro reveló que la acumulación intracelular de β -amiloide induce la degeneración y muerte selectiva de las neuronas colinérgicas de los núcleos motores del tallo cerebral. Esto indica que la acumulación intraneuronal de β A podría contribuir a la pérdida de neuronas motoras causando los déficits motores observados en la EA (Christensen et al., 2008).

También se ha descrito que en la EA existe pérdida selectiva de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (West et al., 1994) y que son los oligómeros de $A\beta$ los responsables de esta neurodegeneración selectiva. En esta región del hipocampo se llevan a cabo los procesos de aprendizaje y memoria por lo que la pérdida selectiva de las neuronas involucradas en la función cognitiva correlaciona con la severidad de la enfermedad (Kim et al., 2003).

Otra de las características patológicas de la EA es la disminución de la densidad sináptica en el hipocampo y neocorteza. En un estudio llevado a cabo por Shenkar, et al., en rebanadas de hipocampo de rata, encontraron que dímeros y trímeros (mas no monómeros) de $A\beta$ son capaces

de inducir la pérdida de la densidad de las espinas dendríticas y de reducir el número y fuerza de las sinápsis en neuronas piramidales del hipocampo, demostrando la toxicidad de estos oligómeros. Esta pérdida sináptica se ha considerado como la correlación más fuerte del grado de deterioro clínico presente en los pacientes con EA (Shankar et al., 2007).

2. Importancia del péptido beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer

La evidencia de que el amiloide juega un papel importante en la patogénesis temprana de la EA está sustentada por varios estudios cuyas principales contribuciones se describen a continuación:

- a) El análisis genético de varias familias con EA hereditaria ha revelado mutaciones en el gen para la proteína precursora de amiloide (APP), cerca o dentro de la secuencia β -amiloide (Mullan et. al. 1992; Van Duinen et al. 1987), además de mutaciones dentro de los genes de las presenilinas 1 y 2 (Tomita et al, 1997; Hutton et al. 1997). La mayor parte de estas mutaciones llevan a un incremento en la producción de β A1-42 y/o β A total, mientras que algunas aumentan la fibrilogenicidad de β A y aumentan su vida media en el cerebro (Goate et. al. 2006; Tsubuki et al., 2003).
- b) Los pacientes con síndrome de Down tienen 3 copias del gen para el precursor de la proteína amiloide (APP) de modo que desarrollan la enfermedad de Alzheimer a edad temprana (Glennner et. al. 1984).
- c) Los oligómeros solubles de β -amiloide causan pérdida de la sinápsis (Lacor et. al., 2007; Takamura et. al., 2011), correlacionan mejor que el número de placas amiloides con la presencia y grado de neurodegeneración (McLean et. al., 1999) y se considera que juegan un papel principal en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Tabner et al., 2005; Fifre et al., 2006).
- d) Se ha reportado que la neutralización *in vitro* de los oligómeros de β -amiloide por anticuerpos específicos anti-A β puede inhibir la formación de fibrillas, así como desagregarlas con reducción de la toxicidad en cultivos celulares (McLaurin et. al., 2002). En estudios *in vivo*, se ha reportado que la inmunización de ratones transgénicos

con estos anticuerpos atenúa el daño cognitivo sin necesariamente disminuir la carga de placas de β -amiloide (Dodart et. al., 2002; Janus et. al., 2000).

3. Producción de beta-amiloide

La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína que se encuentra de manera constitutiva en la membrana de todos los tipos celulares. Existen estudios que reportan que la APP puede funcionar como una molécula de adhesión celular, debido a que posee una estructura similar a la de otras proteínas de adhesión conocidas, que estimula el crecimiento celular aumentando el número de las sinápsis y que es capaz de restablecer la memoria de ratones amnésicos. Esto sugiere que la APP participa en la formación y/o consolidación de la memoria al estabilizar los contactos entre las neuronas y al fortalecer las sinápsis involucradas en la formación de esta (Meziane et al., 1998).

En dos estudios llevados a cabo con ratones deficientes de APP demostraron que estos presentan peso corporal bajo, disminución de la actividad locomotora y reducción de la fuerza muscular, indicando compromiso de la función neuronal o muscular (Zheng et al., 1995). Así como, deterioro de la plasticidad sináptica, aprendizaje espacial y memoria, sugiriendo que APP juega un papel principal en el mantenimiento de la función sináptica (Dawson et al., 1999). También se ha descrito que APP tiene una función neuroprotectora al regular los niveles de calcio intracelular, por ejemplo cuando las neuronas son estimuladas por glutamato, evitando el daño por excitotoxicidad (LaFerla, 2002).

En la figura 1 se observa la vía de procesamiento de APP, en la cual se ha propuesto que una vez que la APP se genera en los ribosomas y se transloca al lumen del retículo endoplásmico (RE) se procesa por las enzimas β y γ -secretasas, generando especies truncadas de $A\beta_{42}$ ($A\beta_{x-42}$) que permanecen en el RE en estado insoluble, mientras que la APP se empaqueta en vesículas de transición para viajar hacia el aparato de Golgi. En la red trans-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés trans-Golgi network) reside la mayoría de las moléculas de APP y aquí, las β y γ -secretasas generan las especies de β -amiloide $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ y las especies truncadas $A\beta_{x-40}$, $A\beta_{x-42}$, que constituyen el reservorio principal de $A\beta$ que se secreta constitutivamente. Estos péptidos solubles de $A\beta$ y la APP viajan a través de las vesículas secretoras post-trans-Golgi

hacia la membrana plasmática. Entonces, la APP sufre un procesamiento por la α -secretasa en la vía secretora o, principalmente, en la membrana celular (Greenfield et al., 1999). Aquellas proteínas de APP que esta enzima no fragmenta se internalizan en los endosomas y subsecuentemente las β y γ -secretasas las cortan para generar más A β . Los péptidos de A β que se producen en la red trans-Golgi y en los compartimentos endocíticos se secretan al espacio extracelular (Priller, 2006). Otra fracción de las moléculas de APP endocitadas se recicla hacia la membrana celular y otra se internaliza para degradarse en el lisosoma (Thinakaran y Koo, 2008).

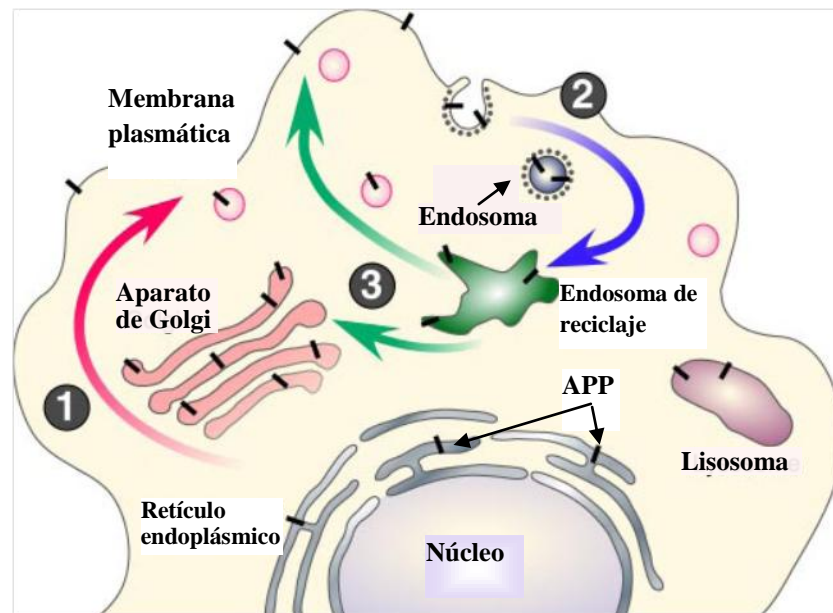


Fig. 1. Tránsito intracelular de APP. Las moléculas nacientes de APP (barras en negro) maduran a través de la vía secretora constitutiva (paso 1). Una vez que la APP alcanza la membrana plasmática, rápidamente se internaliza (paso 2) y subsecuentemente se transporta a través de los componentes recicladores y endocíticos para regresar a la membrana plasmática (paso 3) o se degrada en el lisosoma. El procesamiento no-amiloidogénico ocurre principalmente en la membrana plasmática. El procesamiento amiloidogénico involucra el tránsito a través de organelos endocíticos, donde la APP encuentra a las β - y γ -secretasas (tomado de Thinakaran y Koo, 2008).

En la figura 2 se observa el procesamiento proteolítico de la APP, el cual procede a través de dos vías. Una de ellas se lleva a cabo por la enzima α -secretasa que corta a la mitad del dominio A β (entre Lys¹⁶ y Leu¹⁷). Este corte libera un fragmento largo y soluble, resultante del corte por la enzima α -secretasa (APP α) que se secreta, dejando otro de 83 residuos anclado a la membrana. Este fragmento C83 (o α -CTF) sufre entonces corte proteolítico por la γ -secretasa liberando un fragmento que se considera no-amiloidogénico: p3, que no obstante, se ha encontrado depositado en las placas difusas (LaFerla, 2002).

APP también puede fragmentarse por la β -secretasa (BACE: enzima fragmentadora de APP en el sitio β), enzima responsable de lo que se conoce como ruta amiloidogénica. El corte proteolítico de esta β -secretasa produce un ectodominio llamado β -APP soluble (APPs β) y un fragmento carboxilo terminal transmembranal de 99 residuos (C99 o β -CTF) que contiene el extremo amino-terminal del β A (LaFerla, 2002). Además, BACE puede cortar dentro del dominio β A entre la Tyr¹⁰ y el Glu¹¹. Este procesamiento amiloidogénico de la APP ocurre en los microdominios lipídicos membranales enriquecidos con colesterol y esfingolípidos de organelos intracelulares (Thinakaran y Koo, 2008). La membrana retiene los fragmentos que entonces se hidrolizan dentro de sus dominios transmembranales por la γ -secretasa, liberando el β A (pequeños péptidos hidrofóbicos) al espacio extracelular y los dominios intracelulares (AICDs: APP intracelular domain o γ -CTF) al citoplasma (Haas y Selkoe, 2007).

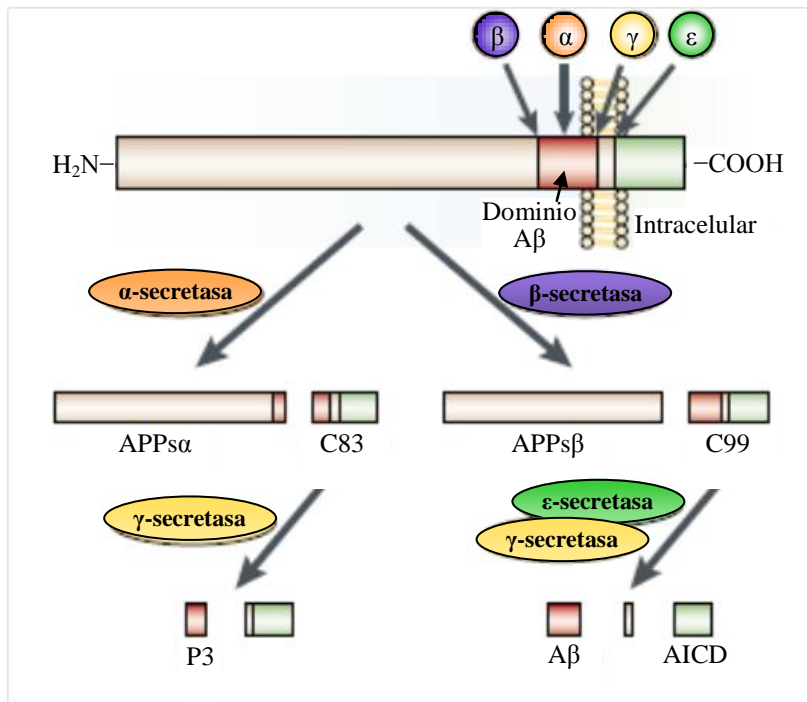


Fig. 2. Procesamiento proteolítico de la APP. La proteína transmembranal APP sufre el corte proteolítico de la α -secretasa dentro del dominio de A β (entre los residuos 16 y 17 de este dominio) liberando una porción amino terminal soluble de APP (APPs α) y un fragmento carboxilo terminal de 83 residuos (C83). Posteriormente la γ -secretasa corta a C83 liberando el péptido P3. Para liberar a las especies de A β , APP es cortada por la enzima BACE-1 que corta en el extremo amino terminal de la secuencia de A β generando un extremo amino terminal soluble (APPs β) y el fragmento carboxilo terminal amiloidogénico (C99). La enzima γ -secretasa corta a C99 primero en el sitio denominado ϵ , liberando un fragmento carboxilo terminal de 50 residuos, conocido como el dominio intracelular de APP (AICD). Entonces la γ -secretasa vuelve a cortar al fragmento que contiene la secuencia A β en el sitio- γ , en los residuos 40 o 42 de A β (modificado de LaFerla, 2002).

En la figura 3 se observa el complejo enzimático de la γ -secretasa, el cual está formado por cuatro subunidades esenciales: la presenilina-1 (PS1) o PS2, nicastrina, APH1 y PEN2. Los fragmentos carboxilo terminal de la APP fragmentada por la α - y β -secretasas sufren proteólisis por este complejo enzimático para liberar p3 (3 kDa) y β A (4kDa) respectivamente (Thinakaran y Koo, 2008). Este complejo puede cortar en diferentes sitios (γ , ζ y ϵ) del dominio transmembranal. El corte final en el sitio γ libera el β A a los fluidos biológicos. El corte γ es variable y ocurre después de los aminoácidos 38, 40, 42 o hasta 43 (Haas y Selkoe, 2007). Aunque también se han detectado cantidades menores de péptidos de β A más cortos de 37 residuos (Thinakaran y Koo, 2008). Los sitios precisos de estos cortes γ tienen una importante influencia en el potencial de auto-agregación y en la patogenicidad resultante del β A, siendo el péptido β A42 el que tiene más fuerte propensión a oligomerizarse *in vivo* (Hass y Selkoe, 2007). El complejo γ -secretasa, junto con su actividad enzimática está presente en múltiples compartimentos, incluidos el retículo endoplásmico (R.E.), el compartimento intermedio al R.E.-Golgi, Golgi, red trans-Golgi, endosomas y membrana plasmática. Sin embargo, se ha descrito que el péptido β -amiloide se produce principalmente en la red trans-Golgi y en los endosomas, a medida que la APP se transporta a través de las vías secretora y recicladora (Thinakaran y Koo, 2008).

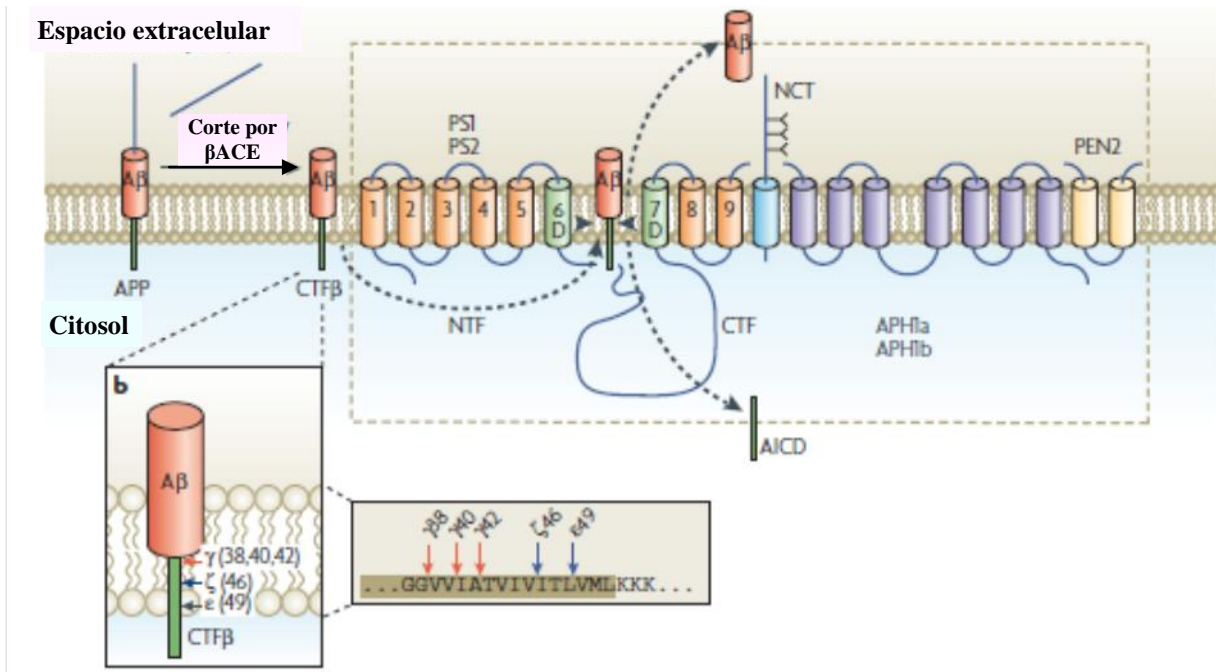


Fig. 3. Generación de la proteína β -amiloide por el procesamiento proteolítico normal del precursor de la proteína β -amiloide (APP). a) Procesamiento amiloidogénico del precursor de la proteína β -amiloide (APP) por la enzima fragmentadora de APP en el sitio- β (BACE) y el complejo γ -secretasa. b) Varios sitios de corte intramembranales propuestos para la proteólisis por la γ -secretasa (tomado de Haass y Selkoe, 2007).

El corte realizado por la γ -secretasa produce principalmente β A40 (cerca del 90% del β A secretado), mientras que β A42 corresponde a menos de un 10% del péptido β A (Thinakaran y Koo, 2008). Sin embargo, este es más propenso a agregarse y es la principal especie de β A encontrada en las placas amiloides. En la EA familiar ligada a mutaciones, se incrementa la producción de β A1-42. Hasta el momento se ha identificado que todas las mutaciones de la APP causantes de la EA ocurren ya sea en los flancos o dentro de la región β A. Por consiguiente, las mutaciones en los flancos de la región β A incrementan la producción de la isoforma de β A1-42 altamente amiloidogénica, mientras que las mutaciones dentro de la región de β A mejoran la oligomerización del péptido (Haass y Selkoe, 2007). Esto favorece la agregación de péptidos β -amiloide en las placas seniles u oligómeros, lo cual resulta altamente tóxico y constituye una causa importante en el desarrollo de la patología de la EA.

4. Fragmentos modificados de beta-amiloide

Se ha demostrado que los agregados de β A presentes en la EA son diferentes en composición y neurotoxicidad en comparación con los agregados asociados al envejecimiento normal. Esto puede estar relacionado con el predominio de especies truncadas en el extremo N-terminal (Piccini et al., 2005). En algunos cerebros de pacientes con EA y síndrome de Down, se ha encontrado que arriba del 90% de β -amiloide presente termina en x-42(43). Las especies identificadas son β A1-42 de longitud completa (con masa molecular relativa de 4.5 kDa), péptidos truncados en el residuo 3 (β A3-42), en el residuo 11 (β A11-42) -con masas relativas de 4.2 y 3.5 kDa respectivamente- (Vanderstichele et al., 2005), en el residuo 2 (Wiltfang et al., 2001), en el residuo 4 (Lewis et al., 2006) o isomerizados en los residuos 1 ó 7 (Roher et al., 1993). (También se ha reportado que las especies de β A predominantes en cerebros con envejecimiento normal son β A1-40 y β A1-42 mientras que con la EA es β Apy3-42 (Harigaya et al., 2000).

La formación de β A modificado en el residuo aspartato (isoaspartato o isoAsp) ocurre por medio de un proceso químicamente espontáneo durante la etapa senil por ciclización de los residuos de ácido aspártico. La formación de isoAsp introduce un metileno extra a la cadena principal del β -amiloide, lo que podría alterar su estructura y función (figura 4) (Hook et al., 2008).

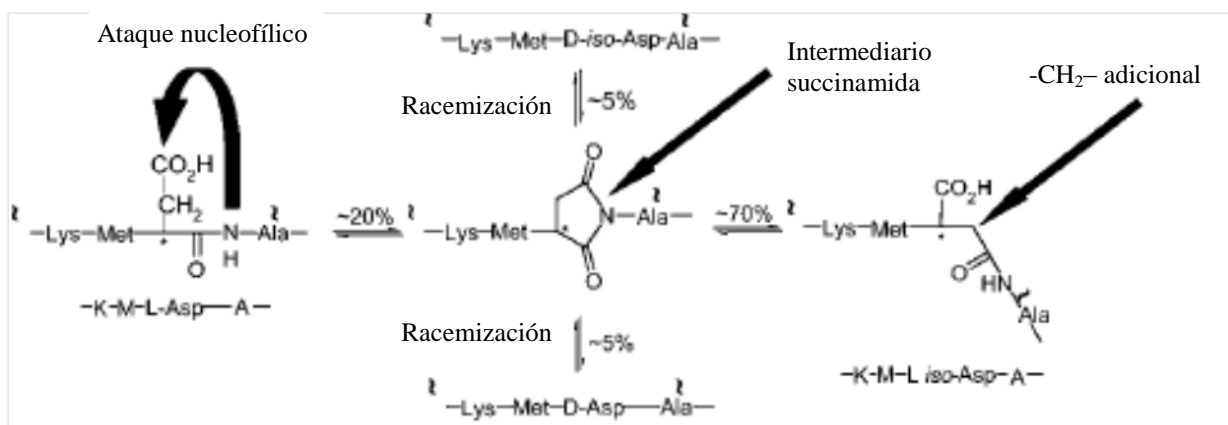


Fig. 4. Formación de péptidos isoAsp peptídico. Los residuos de L-ácido aspártico o L-asparagina dentro de una cadena peptídica, pueden sufrir ciclización intramolecular con liberación de agua o amoníaco, respectivamente. La succinamida metaestable generada se

descompone espontáneamente en L-isoAsp, L-Asp y D-isoAsp, D-Asp en una proporción de 70:20:5:5. L-Asp y D-Asp, son isómeros levógiro y dextrógiro del ácido aspártico, respectivamente. L-isoAsp y D-isoAsp, son los isómeros del isoaspartato (modificado de Hook et. al., 2008).

El A β (pE)3-42 se forma post-traduccionalmente en el aparato de Golgi por medio de la glutaminil ciclasa que convierte los aminoácidos N-glutamato o N-glutamina en piroglutamato (Figura 5) (Cynis et al., 2008). La formación del piroglutamato en el extremo N-terminal, resultado de la pérdida de dos cargas positivas y una negativa, lo hace más estable, más propenso a la agregación, favorece la formación de la estructura β -plegada, lo hace más hidrofóbico (He y Barrow, 1999) y más resistente a la degradación. Su velocidad de agregación *in vitro* respecto a β A 1-42 es mayor y se considera que actúa como un núcleo de agregación (D'Arrigo et al., 2009). Su acumulación podría contribuir a la agregación intracelular observada frecuentemente en pacientes con síndrome de Down y con EA (Wirhth et al., 2009).

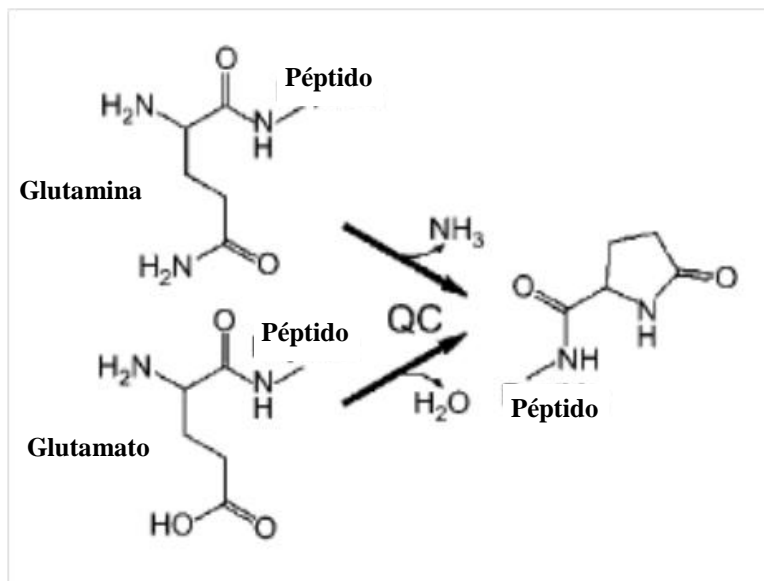


Fig. 5 Modificación piroglutamato de péptidos de β -amiloide por la glutaminil ciclasa. Los residuos Glutamina o Glutamato del extremo amino-terminal de A β se modifican en piroglutamato por acción del enzima glutaminil ciclasa (QC), generando las formas modificadas de A β : A β (pE)3-40(42) (tomado de Hook et al., 2008).

Las especies modificadas/truncadas en el N-terminal comienzan a agregarse en las etapas tempranas de la EA, aún antes de la aparición de los síntomas clínicos y las especies A β (pE)3-42 y A β (pE)11-42 constituyen más del 50% del β A en las placas seniles (D'Arrigo et al., 2009). Se ha descrito que algunos pacientes con la EA, con mutaciones en la presenilina 1, desarrollan una

proporción más alta de A β (pE)3-42, A β (pE)11-42 / A β 1-42 que los pacientes con EA esporádica (Russo et al., 2000) y que los individuos sanos con placas seniles y marañas neurofibrilares muestran menor proporción de A β (pE)3-42 / A β 1-42 soluble que aquellos con la EA. Esto parece indicar que la proporción soluble de estos péptidos está relacionada con los síntomas clínicos y la severidad de la enfermedad en la EA familiar (Tabaton y Piccini, 2005).

Los oligómeros de A β (pE)3-42 inyectados intra-cerebro ventricularmente deterioran intensamente el aprendizaje y la memoria de ratones transgénicos, induciendo apoptosis neuronal e involucrando la activación de la vía pro-inflamatoria dependiente del ácido araquidónico y la vía de las caspasas (Youssef et al., 2008). También inducen la externalización de fosfatidil serina y la pérdida de la integridad de la membrana, por lo que la exposición a la forma oligomérica de A β (pE)3-42 produce apoptosis y necrosis neuronal (Acero et al., 2009).

Es por esto que se considera que las estrategias terapéuticas en la EA deberían tener como blanco particular a las especies truncadas en el extremo N-terminal del péptido β -amiloide.

A manera de resumen, en la figura 6 se muestran las especies modificadas del péptido β -amiloide que han sido identificadas en cortes de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y sin demencia senil, así como en extractos de cerebro y en líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EA (Iwatsubo et al., 1996, Wiltfang et al., 2001; Lewis et al., 2006; Roher et al., 1993):

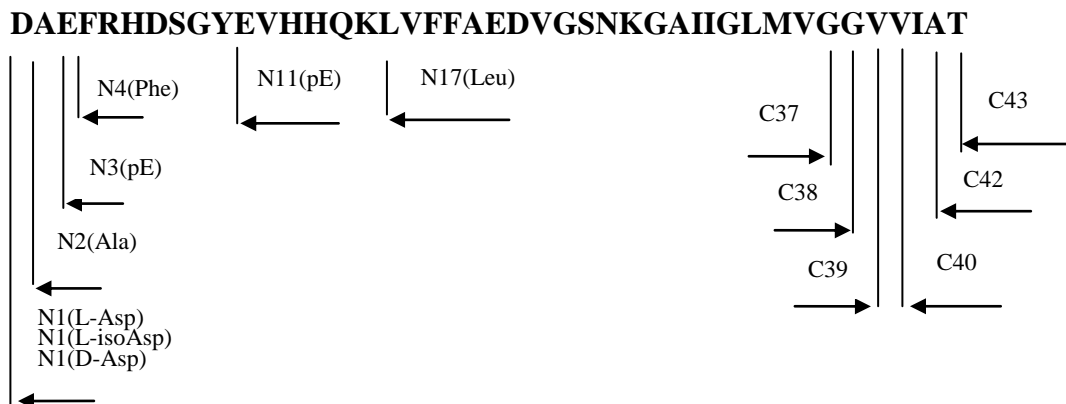


Fig. 6 Esquemización de las especies del péptido A β carboxilo y amino terminales con o sin modificaciones. N1(L-Asp) péptido β -amiloide (A β) que comienza con el residuo aspartato levógiro en la posición 1; N1(L-isoAsp), péptido A β que comienza con el residuo isoaspartato levógiro en la posición 1; N1(D-Asp) péptido β -amiloide que comienza con el residuo aspartato dextrógiro en la posición 1. N2(Ala), péptido A β truncado en el residuo 2, alanina. N3(pE) y

N11(pE) péptidos truncados en las posiciones 3 y 11, respectivamente y modificados (piroglutamados) en el extremo amino (N) terminal. N17(Leu), fragmento p3 resultante del procesamiento de APP por la α -secretasa y que comienza con el residuo leucina en la posición 17 de la región A β . C37, C38, C39, C40, C42 y C43 terminaciones en las posiciones 37, 38, 39, 40, 42 y 43 del extremo carboxilo terminal del péptido A β (modificado de Iwatsubo et al., 1996).

5. Hipótesis de la cascada amiloide

Esta hipótesis postula que la excesiva deposición y acumulación del péptido β -amiloide podría desencadenar una compleja cascada que da por resultado los síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

Los niveles de concentración de la proteína β A en el cerebro pueden elevarse gradualmente por medio de un aumento de la producción y/o por una reducción de la degradación de β A. En particular, la proporción de β A42/ β A40 puede aumentar por mutaciones en tres genes diferentes (proteína precursora del β -amiloide –APP–), presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2) que causan las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer. Este incremento relativo de β A1-42 favorece la formación de oligómeros, el cual causa primero cambios sutiles y después alteraciones severas y permanentes de la función sináptica. En paralelo, se observan depósitos microscópicos de β A1-42 en el parénquima cerebral, primero como placas difusas no fibrilares. Conforme las placas difusas se van haciendo fibrillas se observa inflamación local (microgliosis y astrogliosis). También ocurre pérdida sináptica y distrofia neuronal. Con el tiempo esto resulta en estrés oxidante, alteración de la homeostasis iónica (por ejemplo, calcio) y una gran cantidad de cambios bioquímicos. Las marañas neurofibrilares son inducidas por alteración de las actividades cinasa y fosfatasa y contribuyen con defectos adicionales, por ejemplo en el transporte axonal. La cascada culmina en disfunción sináptica/neuronal extendida y muerte celular, lo cual lleva a demencia progresiva por patología extendida de β A y tau (Haas y Selkoe, 2007) (Figura 7).

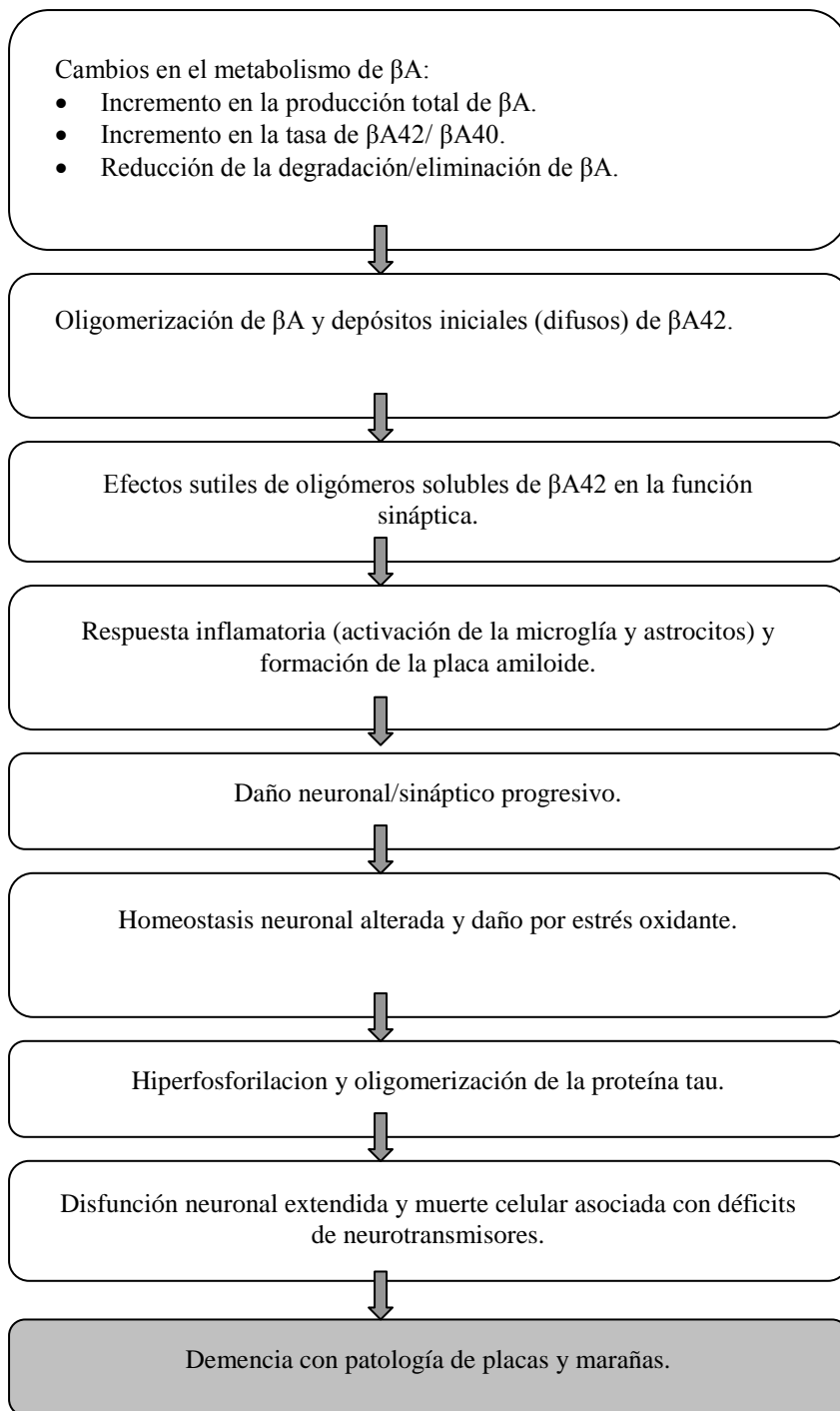


Fig. 7 Hipótesis de la cascada amiloide. Los cambios en el metabolismo del péptido $A\beta$ llevan a su agregación y acumulación, que inducen una serie de acontecimientos que generan alteración sináptica, activación de astrocitos y microglía, hiperfosforilación de tau y pérdida neuronal progresiva con deficiencias de neurotransmisores y deterioro cognitivo (tomado de Haas y Selkoe, 2007).

6. Terapias contra la enfermedad de Alzheimer

Los principales esfuerzos en el desarrollo de terapias están dirigidos hacia la prevención de la producción de β -amiloide, de su agregación o de la cascada de eventos neurotóxicos. De modo que cada uno de los pasos que llevan al plegamiento, oligomerización y fibrilización del β -amiloide representa un blanco potencial para la intervención terapéutica (Skovronsky et al., 2006; Wolfe et al., 2002) (Fig. 8).

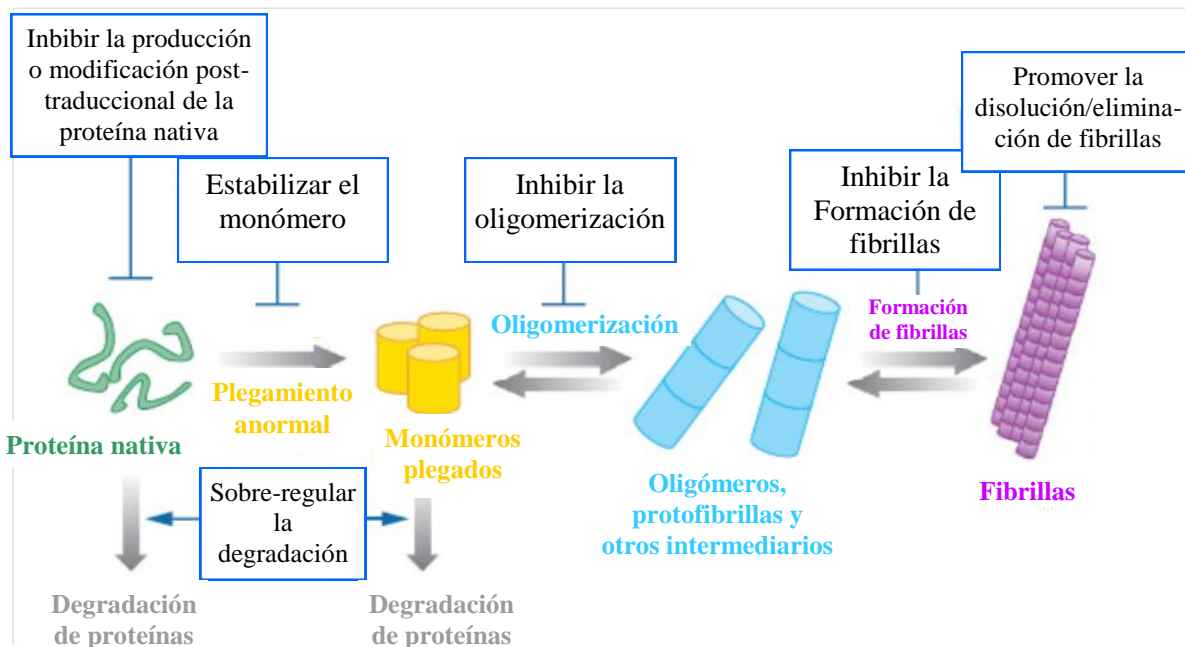


Fig. 8 Intervenciones terapéuticas propuestas para la neutralización y/o eliminación de β A. La proteína nativa soluble se pliega y se asocia en la forma de oligómeros y otros intermediarios que eventualmente dan lugar a la generación de fibrillas. Las posibles intervenciones terapéuticas se muestran en los recuadros (modificado de Skovronsky et al., 2006).

No obstante, se ha sugerido que las estrategias terapéuticas contra la EA deberían tener como blanco los oligómeros de β A, ya que aunque el incremento en los niveles de β -amiloide en el cerebro correlaciona con el deterioro cognitivo existen correlaciones relativamente débiles entre la densidad de placa de amiloide fibrilar y la severidad de la demencia (Näslund et al., 2000; Gong et al., 2003). Se ha demostrado que los oligómeros solubles de β A aplicados a rebanadas de cerebro o inyectados *in vivo* inhiben la potenciación de largo plazo del hipocampo, por lo que se ha sugerido que la pérdida de la plasticidad sináptica asociada al deterioro cognitivo se debe a la

neurotoxicidad que exhiben los oligómeros (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002). Por lo tanto, al atacar a los oligómeros de β A puede deshacerse el equilibrio entre los monómeros y los agregados de A β altamente ordenados, trayendo como resultado la neutralización de las especies tóxicas solubles (Skovronsky et al., 2006).

Estos esfuerzos por retrasar o revertir los síntomas clínicos de la EA son necesarios debido a que esta enfermedad se hará más presente a medida que la población humana continúa haciéndose cada vez más senil.

7. Estrategias sintomáticas

7.1 Terapia colinérgica

Una de las terapias para la EA son los inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACHE). La base de esta propuesta radica en que la EA correlaciona con pérdida sustancial de las neuronas colinérgicas que provoca un déficit sustancial de acetilcolina y por ende deficiencias en el desempeño cognitivo, motor, así como alteración de actividades reguladas por el sistema autónomo. Los inhibidores de ACHE retardan la degradación de acetilcolina en el espacio sináptico, lo cual mantiene la transmisión colinérgica y aminora el déficit colinérgico. Esto resulta en una aparente disminución de los síntomas clínicos de la EA. Desafortunadamente, este tipo de terapia no detiene la pérdida progresiva de las neuronas colinérgicas y provee solo mejoría moderada a los 6 meses de tratamiento. Una mejor propuesta sería desarrollar agentes que afecten a las moléculas que son responsables de la iniciación de la neurodegeneración (Wolf, 2002; Klafki et al., 2006; Fan et al., 2010).

7.2 Memantina: antagonista del receptor NMDA

El β -amiloide tiene la capacidad de alterar el funcionamiento del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), provocando el influjo de iones de Ca^{++} al citosol y a la mitocondria. Esta sobrecarga de Ca^{++} despliega una serie de cascadas de señalización que trae como consecuencia daño por estrés oxidante y finalmente apoptosis (Hynd, et al., 2004). Por otro lado, el β -amiloide también ha demostrado alterar la potenciación de largo plazo (LTP) dependiente del receptor memantina

en la región CA1 y el giro dentado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Yamin, 2009). La memantina es un antagonista del receptor NMDA de afinidad moderada que puede proteger a las neuronas del daño por excitotoxicidad. Se ha reportado que la memantina puede reducir los síntomas psicológicos y de comportamiento relacionados con la demencia (Maidment, 2008). Sin embargo, también se ha reportado que después de 6 meses de tratamiento de pacientes con EA moderada a severa con Memantina, la mejoría cognitiva es difícilmente detectable a nivel clínico (Castellani et al., 2010).

Actualmente son cinco los medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer:

Inhibidores de la acetilcolinesterasa:

- Tacrina (Cognex®; Sciele)
- Donepezil (Aricept®; Pfizer)
- Rivastigmina (Exelon®; Novartis)
- Galantamina (Razadyne®; Ortho-McNeil Janssen)

Antagonista del receptor NMDA:

- Memantina (Namenda®; Forest)

La tacrina es un compuesto de primera generación que muy rara vez era administrado debido a sus potenciales efectos hepatotóxicos. El donepezil, la rivastigmina y la galantamina tienen efectos terapéuticos similarmente efectivos en la atenuación de las alteraciones sintomáticas funcionales y cognitivas en todas las etapas de la EA. La memantina provee resultados similares, pero solo en pacientes con EA moderada a severa. Los efectos clínicos de estos medicamentos son leves y no son duraderos (Kerchner y Bochner, 2010).

8. Estrategias que modulan la producción de β -amiloide

Debido a que el β A está directamente relacionado con la EA, las proteasas que generan este péptido (β - y γ -secretasas) son los principales blancos para el desarrollo de terapéuticos (Wolfe, 2002).

La β -secretasa (β ACE) es un miembro de la familia de las pepsinas y una proteasa de tipo aspartilo anclada a la membrana que corta a la proteína APP en el sitio β , en lo que se ha llamado la vía amiloidogénica porque genera al péptido β -amiloide (Wolfe, 2002). Para disminuir la producción de β -amiloide y con ello sus efectos neurotóxicos, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de encontrar un inhibidor de β ACE que sea capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Chang y colaboradores, reportaron que la inmunización de ratones transgénicos Tg2576 (modelo de ratón transgénico que contiene la doble mutación Swedish de APP, K670M/N671L y que representa la deposición de placas amiloides de la EA) con Memapsina-2 (inhibidor de la enzima BACE) resultó en la reducción de β -amiloide y mejoría del desempeño cognitivo sin respuesta inflamatoria (Chang et al., 2007). Por otro lado, recientemente se ha reportado un anticuerpo bi-específico con dos brazos diferentes: uno que inhibe la actividad de BACE-1 y otro que se une al receptor transferrina para facilitar su paso a través de la barrera hematoencefálica por transcitosis. Este anticuerpo ha demostrado alta especificidad y capacidad para disminuir la carga de β -amiloide 1-40 en el cerebro de ratones silvestres (Yu et al., 2011).

No obstante, un problema con esta estrategia es que como muchas otras enzimas que procesan varios sustratos, la β -secretasa procesa la proteína transmembranal ST6Gal, una sialiltransferasa que es particularmente importante en la función de las células B del sistema inmune (Wolfe, 2002). También se sabe que los ratones knock-out deficientes de BACE-1 muestran hipomielinización ya que BACE-1 corta a la neuregulina-1, la cual es necesaria para la mielinización (De Strooper et al., 2010). Con respecto a la inhibición de BACE-1, se ha considerado que aún existen varios aspectos importantes que faltan por resolver. Por ejemplo, saber si su administración en humanos podría tener el mismo efecto colateral observado en los ratones mencionados o si su administración crónica traería efectos secundarios en modelos animales, entre otros. Tampoco se sabe si la inhibición de BACE-1 traería efectos colaterales debido al procesamiento insuficiente de otros sustratos de esta enzima diferentes de APP (Gandy, 2011).

Otra enzima blanco es la γ -secretasa. En ratones transgénicos PDAPP (que poseen la mutación Indiana de APP, V717F y que modela la deposición de placas amiloides) el inhibidor no selectivo LY450139 de Ely Lilly mostró la capacidad de reducir un 60% el β -amiloide 1-40 en plasma, LCR e hipocampo, con reducción de la carga amiloide en corteza e hipocampo, por lo

cual pasó a la etapa de ensayos clínicos. Sin embargo, este inhibidor de γ -secretasa no pasó la fase 2 debido a un aumento inesperado del deterioro cognitivo (Castellani et al., 2010; Gandy, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, un obstáculo en el uso de inhibidores enzimáticos es que, en general, las enzimas procesan diferentes sustratos. La γ -secretasa además de procesar APP, también procesa a Notch, un importante grupo de receptores transmembranales. Por ejemplo, se ha visto que los ratones knock-out deficientes de Notch exhiben una neuroplasticidad reducida en el hipocampo, neurodegeneración y deterioro cognitivo. Otro obstáculo que se ha visto es que la administración de inhibidores de la γ -secretasa en modelos animales está asociada a efectos secundarios en el sistema gastrointestinal, el timo y el bazo (Khairallah y Aal Kassem, 2011). Por esta razón se ha buscado el uso de moduladores, en vez de inhibidores de la γ -secretasa.

El Tlarenflurbil (MPC-7869, Myriad Pharmaceuticals) es un agente capaz de disminuir el amiloide de manera selectiva y es un modulador de la γ -secretasa que no interfiere con el procesamiento de otros sustratos. En la fase II de los ensayos clínicos se demostró en 207 pacientes con EA, mejora de las funciones cognitivas en los pacientes con EA leve pero no en los pacientes con EA moderada. Actualmente este modulador de la γ -secretasa se encuentra en fase III en pacientes con EA leve (Castellani et al., 2010).

9. Estrategias que inhiben la agregación de β -amiloide

De acuerdo a la hipótesis de la cascada amiloide los agregados de β -amiloide son tóxicos para las neuronas, por lo que la prevención de su agregación tendría un impacto benéfico para los pacientes con EA. En este sentido se sabe que los glucosaminoglucanos sulfatados se unen a monómeros de β -amiloide favoreciendo su agregación y la formación de placas. El Tramiprosato, es un compuesto que compite por los sitios de unión a los glucosaminoglucanos, inhibiendo de esta manera su unión al β -amiloide, bloqueando la formación de agregados y por lo tanto la deposición de placas amiloides. En ratones transgénicos el Tramiprosato fue capaz de reducir la patología de placas seniles y de disminuir los niveles de A β 1-42 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Khairallah y Aal Kassem, 2011) -la evaluación de los niveles de A β 1-42 en el LCR se ha

propuesto como biomarcador de criterio diagnóstico de la EA (Fagan et al., 2011)-. En los ensayos clínicos de fase II, el Tramiprostato fue capaz de reducir la concentración de A β 1-42 en el LCR pero sin ningún impacto significativo en los niveles de β A1-40 o tau en este fluido, ni en las evaluaciones psicométricas. No obstante, este compuesto pasó a ensayos de fase III en Estados Unidos donde finalmente fue declarado sin efectos positivos por la FDA (Khairallah y Aal Kassem, 2011).

10. Estrategias que estimulan la eliminación de β -amiloide

Los métodos alternativos para la disminución de los niveles de β A incluyen el incremento de la eliminación de β A. Se ha propuesto que varias enzimas son responsables de la degradación de β -amiloide, tales como: neprilisina, IDE (por sus siglas en inglés insulin-degrading enzyme), enzima convertidora de angiotensina, enzima convertidora de endotelina y plasmina (Turner et al., 2004; Wolfe, 2002; Zhang y Lee, 2011).

Se considera que la neprilisina es la principal enzima degradadora de β -amiloide extracelular en el cerebro. La neprilisina es una metalopeptidasa dependiente de zinc, asociada a la membrana plasmática y que actúa degradando moléculas de señalización en el sistema circulatorio, inmune y nervioso. En un estudio llevado a cabo por Marr, et al., demostraron que la inyección intracerebroventricular a ratones transgénicos (que modelan la formación de placas de A β) de un lentivirus que expresa neprilisina, fue capaz de reducir la deposición de A β y de reducir la neurodegeneración. Esto sugiere que la neprilisina participa en la regulación de la deposición de A β en el cerebro (Marr et al., 2003).

Junto con la neprilisina, la enzima IDE es una importante enzima degradadora de A β . La IDE es una metalopeptidasa dependiente de zinc, que corta a la insulina, además de otros sustratos. La IDE se secreta de las células para degradar A β en el espacio extracelular o permanece en el citoplasma donde está involucrada en la degradación de los AICDs (por sus siglas en inglés APP intracelular domain). Se ha reportado que la proteína Bri2 (British precursor protein, una proteína cuya forma mutada está asociada a la demencia danesa pero que en su forma silvestre no se conocen sus funciones fisiológicas) aumenta la secreción de IDE, la cual es capaz de disminuir la deposición de A β en el cerebro de ratones transgénicos y los niveles de este péptido en cultivos celulares (Kilger et al., 2011).

La plasmina es una proteasa de serina que aunque no parece contribuir significativamente en el catabolismo de β A, algunos estudios sugieren que la acumulación de β A se debe en parte a la pérdida de plasmina. La habilidad de las proteasas IDE y plasmina para degradar β A se retarda cuando el β A está agregado, pero son eficientes cuando se encuentra en su estado monomérico (Betts et al., 2008). Como el proceso degenerativo en la EA está asociado a la producción, eliminación (degradación) y acumulación del β A; se ha propuesto que aumentar los niveles de expresión de estas enzimas por medios farmacológicos podría ser neuroprotector (Turner et al., 2004).

11. Estrategias auxiliares

Otras estrategias para la prevención de la cascada de efectos neurotóxicos cuyo inicio se atribuye al β A incluyen el uso de:

- 11.1 Quelantes metálicos: El β A tiene alta afinidad por los metales Fe, Cu y Zn, generando especies reactivas de oxígeno (EROs), como el H_2O_2 y radicales libres de β A (Smith et al., 2007). Estas EROs producen estrés oxidante, asociado a la disfunción mitocondrial y apoptosis características de las enfermedades neurodegenerativas (Manton et al., 2004). En estudios clínicos se ha evaluado el uso de agentes quelantes como el clioquinol y un derivado de 8-hidroxiquinoleína, demostrando mejoras cognitivas. También se ha propuesto el uso de moléculas bi-funcionales que quelan metales, a la vez que interaccionan con el β A. Esto ha resultado en la modulación de la producción de EROs y desensamble de agregados de β A (Choi et al., 2010).
- 11.2 Antioxidantes: El estrés oxidante juega un papel importante en la patogénesis de la EA, por lo que se considera que el consumo de antioxidantes podría proteger de la neurodegeneración. Aunque los estudios clínicos no han demostrado algún beneficio de los suplementos de antioxidantes en la EA, se ha relacionado el alto consumo dietario de vitamina E con una disminución moderada del riesgo a desarrollar demencia (Devore et al., 2010).
- 11.3 Anti-inflamatorios: La inflamación es un componente importante en la EA, por lo que se considera que la administración de NSAIDs (anti-inflamatorios no esteroideos) podría

disminuir el riesgo de desarrollar EA. Sin embargo, la evaluación de naproxeno e ibuprofeno en ensayos clínicos no ha demostrado disminución significativa del deterioro cognitivo. Algunos estudios sugieren que los efectos neuroprotectores de los NSAIDs ocurren principalmente en pacientes menores de 65 años de edad, antes de que la patología de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares estén presentes porque entonces el daño es irreversible (Potter, 2010).

- 11.4 Agentes neuroprotectores: Se ha propuesto el uso de compuestos capaces de inhibir a la NADPH oxidasa (enzima responsable de la producción de EROs) para detener la respuesta inflamatoria amplificada por estas y presente en la EA. Estos compuestos incluyen al dextrometorfano, naloxona, morfina, dopamina, IL-10, entre otros (Block, 2008).
- 11.5 Neurotróficos: En la EA existe pérdida selectiva de las neuronas colinérgicas (Emre et al., 1993; Christensen et al., 2008) por lo que se ha propuesto el uso de factores de crecimiento nervioso para rescatar la pérdida neuronal y funcional característica de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Enciu et al., 2011). Por ejemplo, el tratamiento de células madre pluripotenciales con el factor de crecimiento nervioso NGF (por sus siglas en inglés, nerve-growth factor) ha demostrado la capacidad de promover su diferenciación a células colinérgicas maduras y funcionales (Wicklund et al., 2010). De hecho, en el año 2005 se reportó el uso de este tipo de terapia génica en ensayos clínicos de fase I. En esta evaluación se utilizaron fibroblastos autólogos modificados genéticamente para expresar NGF humano en el cerebro de pacientes con la EA y resultó en mejoría cognitiva de los pacientes (Tuszinsky et al., 2005).
- 11.6 Estatinas: Se ha demostrado que las estatinas promueven la degradación de A β extracelular a través de la estimulación de la secreción de la enzima proteolítica IDE (insulin-degrading enzyme) por la microglía (Tamboli et al., 2010). La administración de simvastatina reduce los niveles de β A en el cerebro, así como un decremento de las maraña neurofibrilares. Los resultados obtenidos hasta ahora en diversos estudios sugieren que las estatinas podrían retardar el progreso del proceso neurodegenerativo pero no serían capaces de revertir la degeneración neuronal una vez que ha ocurrido (Castellani et al., 2010).

12. Inmunoterapia

Los tratamientos actuales contra la EA proveen efectos moderados en algunos pacientes en cuanto a la sintomatología, pero no modifican el progreso de la enfermedad. Los estudios pre-clínicos y ensayos clínicos han demostrado que la inmunoterapia activa y pasiva son una estrategia potencial para modificar el desarrollo de la EA. La inmunización activa con β A consiste en la administración del péptido β A sintético o fragmentos de β A conjugados a una proteína acarreadora y un adyuvante que estimula la respuesta inmune en el huésped, con el fin de generar anticuerpos anti- β A. En la inmunoterapia pasiva se administran de manera directa los anticuerpos anti- β A (o anticuerpos conformacionales), evitando comprometer el sistema inmune del huésped. La finalidad de ambas inmunoterapias es remover el β A del cerebro (Fu et al., 2010) (Fig. 9).

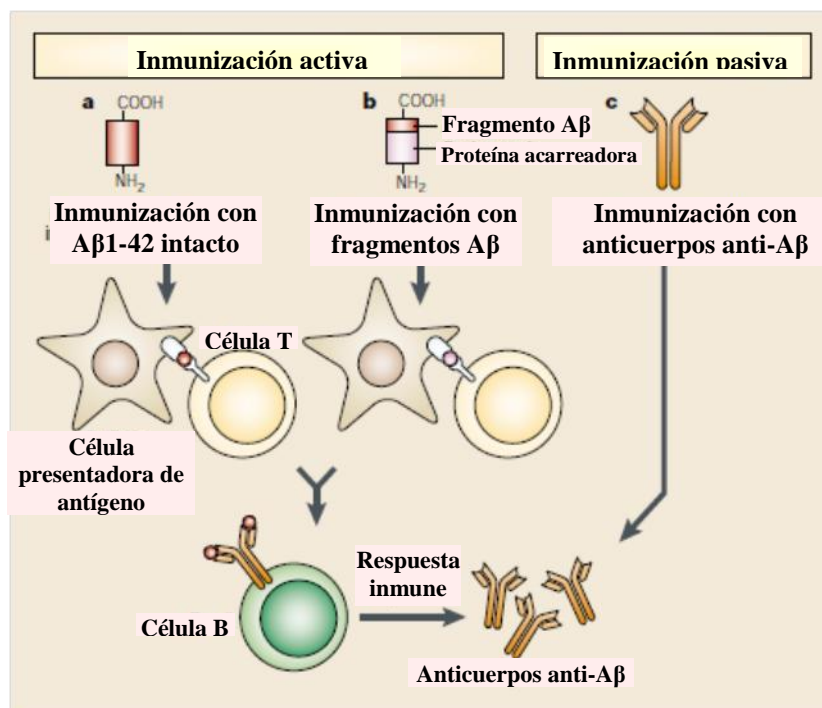


Fig. 9 Tres aproximaciones para la aplicación de anticuerpos anti- β A. a) Inmunización activa con el péptido β A1-42 de longitud completa. Las células presentadoras de antígeno fagocitan al β A1-42, lo procesan y presentan a las células T. b) Inmunización activa con fragmentos de β A conjugados a una proteína acarreadora no relacionada. c) Inmunización pasiva con anticuerpos anti- β A. No requiere el compromiso inmunológico del huésped por lo cual es útil en individuos que de otro modo no podrían montar una respuesta inmune (tomado de Schenk, 2002).

12.1 Mecanismos de acción de la inmunoterapia

Existen tres mecanismos de acción propuestos para explicar la disminución de β -amiloide a través de la inmunoterapia. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes ya que podrían estar actuando de manera concertada. El mecanismo de acción podría depender de la vía de administración y del estado de desarrollo de la enfermedad, en el cual existe variabilidad en cuanto al nivel de producción de β -amiloide, la proporción de isoformas de β -amiloide y el estado de desarrollo de agregados de β -amiloide (Klafki et al., 2006; Lemere, 2009).

12.1.1 Disociación de agregados de β -amiloide por anticuerpo

Los anticuerpos se unen directamente a los monómeros de β A, induciendo un cambio conformacional que previene su oligomerización y fibrilización (Cribbs y Agadjanyan, 2005). Se ha propuesto que los anticuerpos actúan sobre la estructura secundaria de los monómeros de β A, cambiándola en una estructura que es menos propensa a formar agregados oligoméricos y fibrilares (Solomon et al., 1997; Solomon et al., 1999). Estudios *in vivo* han demostrado que los anticuerpos anti- β A son capaces de disociar placas y de bloquear la neurotoxicidad inducida por oligómeros de β A (McLaurin et al., 2002; Morgan et al., 2000; Bacskai et al., 2001; Klyubin et al., 2005) (Figura 10).

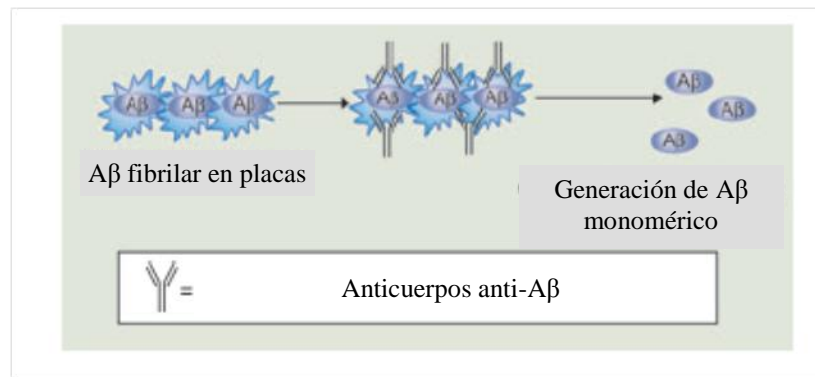


Fig. 10 Modificación de la conformación. El anticuerpo se une al β A y modifica la estructura secundaria a una que minimiza la formación de agregados (modificado de Morgan, 2011).

12.1.2 Fagocitosis mediada por microglía

Este mecanismo se basa en la capacidad de los anticuerpos de opsonizar antígenos, induciendo la fagocitosis por parte de los macrófagos y la activación del complemento. Aproximadamente 0.1% de los anticuerpos monoclonales murinos 3D6 y 10D5 (dirigidos contra

las regiones 1-5 y 3-7 de A β , respectivamente) administrados intraperitonealmente a ratones transgénicos PDAPP entran al sistema nervioso central y se unen al β A, activando la función fagocítica de la microglía residente o de macrófagos/monocitos infiltrados que fagocitan el complejo antígeno-anticuerpo por unión al receptor Fc de los anticuerpos (Bard et al., 2006). El hallazgo de anticuerpos decorando placas de β -amiloide después de la administración intracraneal a ratones transgénicos Tg2576, corrobora este mecanismo (Wilcock et al., 2003) (Figura 11).

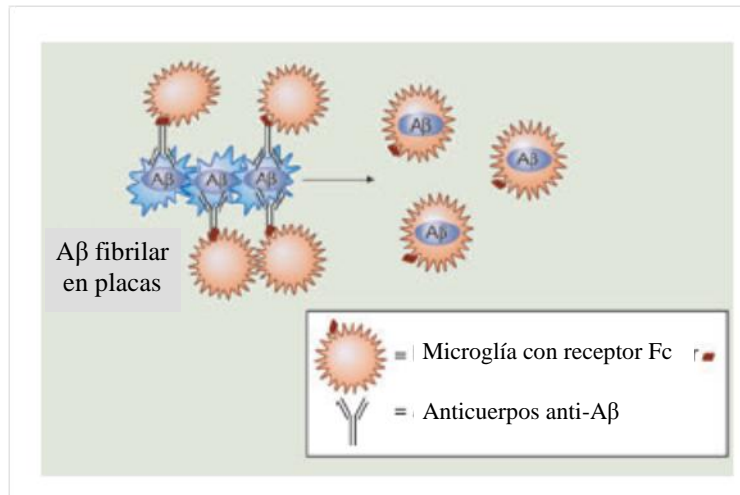


Fig. 11 Opsonización y fagocitosis. Los anticuerpos anti- β A se unen a los agregados de β A en el SNC. Este complejo inmune estimula la fagocitosis por microglía activada que se une al receptor Fc-gamma (modificado de Morgan, 2011).

12.1.3 Decaimiento periférico

Los anticuerpos anti- β A circulantes en el torrente sanguíneo remueven el β A del cerebro al unirse al β A que se encuentra en el plasma, esto rompe el equilibrio entre la concentración de β A en el SNC y el plasma. El resultado es un gradiente de concentración que remueve el β A cerebral hacia la periferia. Este mecanismo se propuso a partir del estudio realizado por DeMattos y colaboradores, en el que el anticuerpo m266 dirigido hacia la región central de β A y administrado periféricamente fue capaz de reconocer β A soluble, incrementando los niveles de β A plasmático, con marcada reducción de la deposición de β A en el cerebro. Este mecanismo fue confirmado posteriormente por estudios de inmunización pasiva y activa contra β A (DeMattos et al., 2001; Fu et al., 2010) (Figura 12).

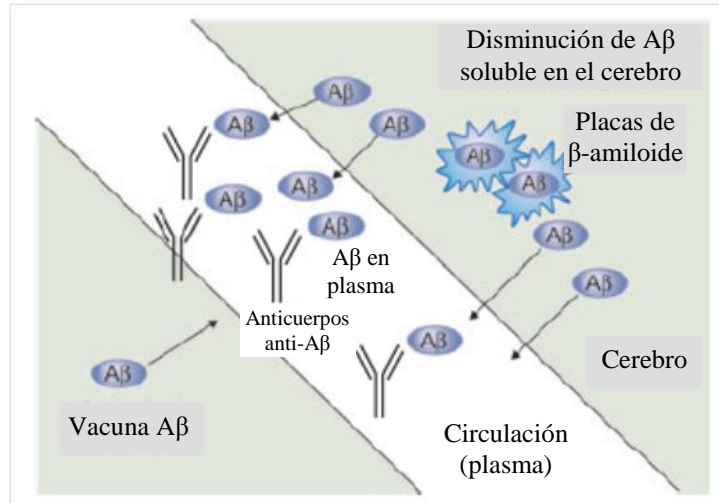


Fig. 12 Decaimiento periférico. Los anticuerpos anti- β A circulantes se unen al β A libre en el plasma e incrementan el eflujo de β A desde el cerebro (Morgan, 2011).

12.2 Inmunoterapia activa

La evaluación clínica de la inmunoterapia para el tratamiento de la EA se impulsó con el hallazgo de que la inmunización activa de ratones transgénicos que modelan la EA es efectiva para modificar las características patológicas, así como para mejorar el desempeño cognitivo de los mismos. A continuación se describen brevemente los tres trabajos que sustentan el uso de la inmunoterapia activa para el tratamiento de la EA:

En 1999, Schenck y colaboradores de Elan Pharmaceuticals reportaron los efectos de la inmunización activa con el péptido β A1-42 de ratones transgénicos PDAPP (que sobreexpresan APP con la mutación V717F y que desarrollan de manera progresiva la deposición de β A). La inmunización de los ratones a las seis semanas de edad, antes de la aparición de la neuropatología de la EA, previno la formación de placas, la aparición de neuritas distróficas y de la astrogliosis. En los ratones de 11 meses de edad, en los cuales la deposición de β A y los cambios neuropatológicos ya estaban bien establecidos, la inmunización redujo el β A total un 72-81%. También encontraron células que parecían contener β A y que asemejaban a la microglía activada. Ambos experimentos indicaron claramente que la inmunización con β A1-42 previene el desarrollo de la neuropatología de la EA. Por otro lado, realizaron un examen de órganos,

incluyendo cerebro y riñón, encontrando que no había signos de complicaciones mediadas por el sistema inmune (Schenk et. al., 1999).

Posteriormente, Janus y colaboradores reportaron en el año 2000 un estudio en el cual inmunizaron con β A1-42 a ratones transgénicos TgCRND8 (que poseen mutaciones en APP en los residuos 670, 671 y 717 y que muestran déficits de aprendizaje espacial a los 3 meses de edad junto con aumento de β A soluble, así como aumento progresivo de placas amiloides en el cerebro). Este estudio demostró que la inmunización con β A1-42 (en conformación hoja β -plegada) mejora el déficit cognitivo de los mismos, haciéndose comparable al desempeño mostrado por sus pares no-transgénicos. También encontraron que el número y tamaño de las placas amiloides en hipocampo y corteza disminuyó 50% a las 25 semanas de edad (Janus et al., 2000).

En el mismo año, Morgan y colaboradores reportaron otro estudio en el cual inmunizaron con β A1-42 ratones transgénicos que sobre-expresan APP y APP+PS1. En este estudio encontraron que la inmunización es capaz de inducir una reducción de depósitos de β A y proteger a los ratones de los déficits de memoria (Morgan et al., 2000).

Por lo tanto, en ese mismo año 2000 se realizó un estudio de fase I (seguridad) en pacientes con EA esporádica moderada, con 80 individuos de 70 años de edad en promedio. A los pacientes se les administró AN1792 (la misma preparación de agregado de β A1-42 usada en los ratones transgénicos) junto con la saponina QS21 como adyuvante o placebo. Se realizaron cuatro inmunizaciones en un periodo de 6 meses por vía intramuscular. Cuatro personas murieron durante el estudio pero ninguno de los fallecimientos fue atribuido al estudio. Los pacientes mostraron algunos efectos secundarios, tales como alucinaciones, hostilidad y convulsiones, pero se ha reportado que todos ellos ocurren también en pacientes con EA no tratada. En general el tratamiento fue bien tolerado por lo que avanzaron a la fase II de los ensayos clínicos. Durante el desarrollo de los ensayos de fase II un paciente proveniente de la fase I desarrolló encefalopatía subaguda, no se recuperó y murió, encontrándose meningoencefalitis con predominio de linfocitos T en la necropsia. No hubo una clara relación entre el título de anticuerpos anti- β A1-42 y la meningoencefalitis encontrada, sin embargo los investigadores propusieron como mecanismos potenciales la infiltración de células T y la activación de microglía (Orgogozo et al., 2003; Brody y Holtzman., 2008).

La fase II del estudio terminó después de sólo 1-3 de las 6 inmunización planeadas debido a que 6% de los pacientes (18/300) presentaron encefalitis. Doce de los pacientes se recuperaron a lo largo de algunas semanas, mientras que seis pacientes presentaron secuelas neurológicas o invalidez cognitiva. Estos sucesos adversos no habían sido predichos en los estudios pre-clínicos desarrollados antes de iniciar los ensayos clínicos (Brody y Holtzman, 2008).

El hallazgo más importante del ensayo clínico de AN-1792 fue la evidencia de que los anticuerpos anti- β A son capaces de cambiar la patología de la EA y que estos podrían disminuir el progreso de la enfermedad. Sin embargo, despertó sospechas acerca de la seguridad y eficacia de la inmunización activa con el péptido β A1-42 completo. El bajo número de pacientes que respondieron generando anticuerpos y los bajos títulos de estos en plasma sugieren que es necesario desarrollar nuevos protocolos de inmunización (Ghochikyan, 2009).

Hoy en día se considera que la inmunoterapia activa contra la EA es efectiva pero que sería mejor aplicarla de modo profiláctico en vez de terapéutico. El desafío se encuentra el desarrollo de vacunas con mejor inmunogenicidad que sean capaces de inducir anticuerpos específicos anti- β A pero sin exacerbar la neuroinflamación de por sí ya presente en la enfermedad, así como de desarrollar técnicas de neuroimagen y evaluación de biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano a nivel de “pre-sintomático de EA” (Gandy, 2011).

12.3 Alternativas para la inmunización activa

Una de las preocupaciones en cuanto a la inmunización activa con β A1-42 es la autoinmunidad que ocurre en humanos y que no ha sido reportada en ratones transgénicos APP (modificados para expresar el gen de APP humano) inmunizados con el péptido. La autoinmunidad es una reactividad inmune adquirida contra auto-antígenos y las enfermedades autoinmunes ocurren cuando estas respuestas generan daño tisular. Las diferencias en la respuesta inmune a auto-antígenos entre ratones y humanos pueden ser significativas. Además de tener altos niveles de APP humano, los ratones transgénicos también expresan APP de ratón en niveles endógenos. El APP humano y su derivado β A tienen una secuencia de aminoácidos diferente de las de ratón y en el estudio reportado por Schenk y colaboradores (Schenk et al., 1999) los ratones inmunizados con β A1-42 tuvieron títulos mucho más altos de anticuerpos contra el β A

humano que contra el β A de ratón. Por consiguiente, los ratones pueden ser menos propensos a desarrollar una enfermedad autoinmune que los humanos quienes expresan sólo β A humano (Sigurdsson et al., 2002).

También se considera que la inmunización con β A1-42 no es apropiada en humanos porque el péptido puede cruzar la barrera hematoencefálica y formar núcleos de fibrilización. Las fibrillas de β A1-42 pueden entonces causar inflamación y neurotoxicidad. (Sigurdsson et al., 2002).

Otro factor importante en la inmunoterapia contra β A es el tipo de respuesta inmune estimulada. La respuesta inflamatoria observada en individuos durante la inmunización activa con β A1-42 se ha atribuido a la activación de células T. Los epítomos que estimulan células T han sido mapeados a la mitad de la región carboxilo-terminal (residuos 15-42) del β A. Por lo tanto, la inmunización con el péptido β A1-42 de longitud completa que contiene tanto los epítomos estimuladores de las células B como de las células T, resulta en una activación extensiva de células T autoreactivas (Gelinas et al., 2004) (Figura 13).



Fig. 13. La secuencia de epítomos estimuladores de células B y T dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido β A1-42, determinada por algoritmos matemáticos (tomado de Gelinas et al., 2004).

Las alternativas actuales para la inmunoterapia activa tienen la finalidad de reforzar la inducción de anticuerpos, así como de minimizar la respuesta inmune pro-inflamatoria de tipo Th1. Estas alternativas incluyen:

12.3.1 La generación de inmunógenos de fragmentos/epítomos específicos de β A que evadan la respuesta de células T autoreactivas

En un estudio realizado por Petrushina, et al., utilizaron un epítomo foráneo de células T, denominado PADRE, activador de células T específicas pero no auto-antigénicas, unido al epítomo de β A1-15. Este epítomo PADRE estimula fuertemente las señales co-estimuladoras que

amplifican la respuesta inmune específica al antígeno, generando altos títulos de anticuerpos IgG con alta afinidad. La respuesta inmune humoral se genera solamente contra el epítipo de células B y no contra PADRE (Petrushina et al., 2007). En estudios clínicos ha demostrado ser seguro y bien tolerado (Ghochikyan, 2009).

Otra estrategia ha sido utilizar un inmunógeno que consiste en dos monómeros de β A1-15 unidos covalentemente por dos lisinas, en una formulación con un adyuvante de enterotoxina de E. coli. La inmunización de ratones transgénicos con este inmunógeno generó altas concentraciones de anticuerpos anti- β A de tipo Th2, no inflamatoria (IgG1 e IgG2b) después de la administración via intranasal. Así como una reducción significativa de los niveles de β A en el cerebro y mejora en la adquisición de la memoria en comparación con ratones silvestres (Maier et al., 2006).

Otro ejemplo es una vacuna experimental que está compuesta de una serie repetida de 4 copias de β A1-15 (4x β A1-15) en un vector adenoviral. Esta vacuna disminuyó los niveles de β A en el cerebro con mejoría del desempeño cognitivo en ratones Tg2576 (Zou et al., 2008).

Un acercamiento interesante es la introducción de 11 copias del epítipo de β A1-9 dentro de la cápside viral (vacunas basadas en partículas virales –VLP-) que permite la expresión del epítipo en la superficie del VLP de manera repetitiva y ordenada. Esta organización del epítipo podría inducir la activación de células B independiente de células T y producir anticuerpos anti- β A capaces de eliminar el β A cerebral (Zamora et al., 2006). Este mismo epítipo ha sido incorporado al bacteriófago Q β , y se ha demostrado que esta construcción induce una respuesta inmune a dosis bajas y sin el uso de adyuvantes (Chackerian et al., 2006). Con base en estas estrategias terapéuticas se ha desarrollado una vacuna (CAD106) que consiste en la introducción del epítipo de β A1-6 unido a VLPs y que actualmente está en investigación clínica (Ghochikyan, 2009).

12.3.2 La evaluación de diferentes adyuvantes que modulen hacia una respuesta inmune de tipo Th2 en lugar de una respuesta pro-inflamatoria para evitar efectos adversos

También es necesario que los protocolos de inmunización estimulen la producción de anticuerpos, disminuyan la respuesta pro-inflamatoria Th1 y resulten en la liberación de citocinas anti-inflamatorias que tienen el potencial de mitigar condiciones inflamatorias crónicas de por sí ya presentes en pacientes con EA (Sigurdsson et al., 2002).

En un estudio de evaluación de los adyuvantes CFA, Alum, TiterMax Gold (TMG) y QS21 como adyuvantes individuales en la terapia activa con β A1-42 demostró que los adyuvantes CFA y QS21 de tipo Th1 indujeron una respuesta humoral anti- β A más fuerte que Alum, un adyuvante de tipo Th2 que generó una respuesta humoral intermedia (Cribbs et al., 2003). Entonces, en un estudio posterior se evaluó el efecto del adyuvante de tipo Th1 Quil A y el de tipo Th2 Alum, junto con la vacuna PADRE- β A1-15, de manera separada y en combinación. El resultado encontrado fue que al iniciar la terapia con Alum y después cambiar por Quil A, se incrementa la producción de anticuerpos en comparación con solamente el uso de Alum y mantiene la respuesta de tipo Th2 (anti-inflamatoria) (Ghochikyan, 2006).

A pesar de los efectos secundarios demostrados en los diversos estudios pre-clínicos y un estudio clínico reportados, actualmente se sigue utilizando QS21 como adyuvante en algunos estudios clínicos. Todavía se está en la búsqueda de adyuvantes que modulen hacia una respuesta de tipo Th2, con la finalidad de evitar la activación de células T autoreactivas e inflamación en el parénquima cerebral y vascular, y cuyo uso pueda ser seguro en humanos con la EA.

12.3.3 La producción de vacunas de β A-ADN

Las vacunas de ADN consisten en vectores plasmídicos a los que se les ha insertado un gen que codifica la proteína antigénica contra la cual se quiere generar una respuesta inmune. La expresión genética se lleva a cabo por la presencia de un promotor que permite la expresión de la proteína antigénica en las células que son transfectadas in vivo tras la inyección del vector plasmídico (Reyes y Pinto, 2002). Las vacunas de ADN tienen la habilidad de inducir la síntesis de antígeno endógeno de manera prolongada y este se procesa dentro de las células del huésped. Además del antígeno de interés, puede introducirse cDNA de citocinas que pueden actuar como adyuvantes moleculares para dirigir hacia una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2 (Ghochikyan, 2009). Un ejemplo de este tipo de vacunas es la formada por la quimiocina derivada de macrófagos (MDC) como adyuvante molecular, 3 copias del epítipo de células B β A 1-11 y el epítipo PADRE. Esta vacuna indujo en el ratón transgénico 3xTg-AD una robusta respuesta de tipo Th2 y altos niveles de anticuerpos (Movsesyan et al., 2008).

12.3.4. El uso de diferentes vías de administración

La optimización de diferentes vías de administración es otra estrategia para incrementar la seguridad de las vacunas para inmunización activa, así como para aumentar la generación de anticuerpos anti- β A. Por ejemplo, en un estudio donde se evaluó el adyuvante compuesto por la toxina de E. coli (E.coli heat-labile enterotoxin LT(R192G) por vía de administración subcutánea, se generó una respuesta intensa Th1 así como Th2. Pero al realizar administración intranasal se generó la respuesta Th2 (Fu et al., 2010). También se ha demostrado que la administración transcutánea de β A1-15 con el adyuvante LT(R192G) induce una respuesta Th2 y un moderado título de anticuerpos neuroprotectores (Seabrook et al., 2007).

12.3.5 El uso de otros epítomos del péptido β A

La mayor parte de los estudios pre-clínicos, en cuanto a la inmunización activa, están dirigidos hacia el epítomo EFRH que corresponde a la región amino terminal del péptido β A de cadena completa. Sin embargo, las especies patológicas de β A truncadas en el extremo amino, entre ellas el péptido A β N(pE)3-42, no contienen este motivo EFRH (Acero et al., 2009). También se sabe que el A β N(pE)3-42 constituye aproximadamente el 25% del total de β A en las placas seniles, que es más resistente a la degradación y que se agrega con mayor rapidez que las especies de longitud completa no modificadas (Harigaya et al., 2000; Sanders et al., 2009). Por último, se ha demostrado que el A β N(pE)3-42 aparece en etapas iniciales de la EA, antes de la aparición de la sintomatología clínica, y que su acumulación intraneuronal en ratones transgénicos es altamente tóxica, generando pérdida neuronal masiva y muerte prematura (Acero et al., 2009; Wirths et al., 2009). Por ello, es necesario encontrar inmunógenos que sean capaces de neutralizar el efecto neurotóxico del A β N(pE)3-42 y así aumentar la efectividad de la inmunoterapia contra la EA.

12.4 Inmunoterapia pasiva

En el año 2000, Bard y colaboradores llevaron a cabo un estudio en ratones transgénicos PDAPP a los cuales les administraron periféricamente anticuerpos anti- β A. Observaron reducción de las placas amiloides junto con activación de microglía que aparecía decorando las placas. Concluyeron que los anticuerpos fueron capaces de entrar al SNC y opsonizar a las placas para su eliminación por fagocitosis (Bard et al., 2000).

Al siguiente año, DeMattos y colaboradores reportaron un estudio en el cual administraron por vía intravenosa el anticuerpo monoclonal m266 dirigido contra la región central de β A a ratones transgénicos PDAPP. Encontraron que los anticuerpos eran capaces de secuestrar el β A desde el SNC hacia la periferia aumentando los niveles de β A en plasma, alterando el equilibrio en la concentración de β A entre el cerebro y el plasma. También encontraron disminución significativa de la carga de β A en el cerebro (DeMattos et al., 2001). Posteriormente, este mismo grupo reportó que los niveles basales de β A en plasma no correlacionan con la carga amiloide en el cerebro de ratones transgénicos. Sin embargo, después de administrarles periféricamente el anticuerpo m266 los niveles de β A en plasma correlacionaron directamente con la carga de β A en la corteza e hipocampo, indicando que este procedimiento podría utilizarse como método diagnóstico para cuantificar la carga amiloide en pacientes con EA pre-clínica, así como para monitorear la respuesta a la terapia anti- β A (DeMattos et al., 2002). Otro grupo reportó que la administración crónica del anticuerpo m266 fue capaz de mejorar el desempeño de ratones transgénicos en algunas pruebas de aprendizaje y memoria, encontrando además la presencia de complejos de β A y anticuerpo en el plasma y el LCR (Dodart et al., 2002).

La inyección directa de anticuerpos anti- β A puede ser una estrategia relativamente más segura para revertir los efectos de la EA porque no desencadena la respuesta inmune de tipo Th1 (Fu et al., 2010). Sin embargo, se ha encontrado en algunos modelos de EA la presencia de microhemorragias cerebrales al inmunizar pasivamente a los ratones. Este hecho es de particular atención puesto que el 83% de los pacientes con EA tienen depósitos de β A en los vasos sanguíneos cerebrales, una patología denominada angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Town, 2009).

Una estrategia estudiada en modelos murinos de la EA que minimiza el riesgo de microhemorragias causadas por la inflamación desencadenada por el complejo inmune β A/anti- β A en los sitios con CAA, ha sido la co-administración de minociclina junto con la inmunoterapia pasiva. Este fármaco tiene la capacidad de suprimir la activación de la microglía y los monocitos y aunque no afecta el número de microhemorragias presentes sí disminuye levemente el tamaño de estas. Otro enfoque ha sido el uso de anticuerpos des-glicosilados en la fracción Fc, con la finalidad de reducir la activación del complemento y la inflamación mediada por el receptor Fc. Esta estrategia disminuye significativamente los depósitos de β A vascular y las microhemorragias (Vasilevko et al., 2010).

Una de las estrategias que se han llevado a cabo en estudios pre-clínicos y clínicos es la administración de un pool de auto-anticuerpos de humanos sanos, incluyendo anti- β A, por vía intravenosa (denominados IVIg). Se ha demostrado in vitro que estos anticuerpos neutralizan oligómeros de β A e interfieren con su fibrilización, son neuroprotectores en cultivos celulares expuestos a concentraciones tóxicas de β A, son capaces de eliminar el β A desde el cerebro hacia la periferia y de atravesar la barrera hematoencefálica. También se ha reportado cierta mejoría en las funciones cognitivas sin efectos adversos en pacientes con EA inmunizados con IVIg (Fu et al., 2010; Magga et al., 2010).

Otra estrategia es el uso de Bapineuzumab, la versión humanizada (de isotipo IgG1) del anticuerpo murino monoclonal 3D6 dirigido contra la región amino terminal de β A₁₋₅ y que actualmente se encuentra en la fase III de los ensayos clínicos. En los estudios de fase II Bapineuzumab resultó con efectos benéficos en al menos un sub-grupo de los pacientes participantes, también se demostró que los portadores del genotipo ApoE ϵ 4 son menos beneficiados que los no portadores ya que el edema vascular cerebral es un efecto secundario potencial que depende de la dosis, sobre todo en pacientes ApoE ϵ 4 y por último, que parece facilitar la eliminación de β A desde el cerebro (Kerchner y Boxer, 2010).

13. Ensayos clínicos

Las terapias actualmente aprobadas por la FDA se refieren a terapias sintomáticas, por tal razón es necesario encontrar una estrategia terapéutica que permita detener el desarrollo de la enfermedad. Algunos de los ensayos clínicos que hasta el momento se están llevando a cabo son los siguientes:

Tabla 1. Ensayos clínicos para la inmunoterapia de la EA (www.clinicaltrials.gov).

Tipo de inmunoterapia	Intervención	Propósito del estudio	Fase clínica	Fecha de término
Pasiva	IVIG Inmunoglobulinas humanas intravenosas	Evaluar pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), un estado que se considera en riesgo de desarrollar EA, como terapia potencialmente preventiva.	Fase II	Enero 2013
Pasiva	IVIG	Evaluar si IVIG disminuye o previene el progreso de la demencia en pacientes con EA leve a moderada.	Fase III	Febrero 2013
Pasiva	Bapineuzumab Anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 dirigido contra β A1-5	Evaluar la eficacia y seguridad de dosis múltiples en pacientes con EA leve a moderada portadores de ApoE ϵ 4	Fase III	Junio 2013
Pasiva	Bapineuzumab	Evaluar la eficacia y seguridad de dosis múltiples en pacientes con EA leve a moderada no portadores de ApoE ϵ 4	Fase III	Junio 2014
Pasiva	Bapineuzumab	Evaluar seguridad y tolerancia a largo plazo en pacientes que participaron en el estudio anterior de Bapineuzumab	Fase III	Junio 2017

		con portadores de ApoEε4		
Activa	ACC-001 + QS21 ACC-001 es el epítipo βA1-7 acoplado a una proteína acarreadora.	Evaluar la eficacia y seguridad a diferentes dosis en pacientes con EA leve a moderada.	Fase II	Agosto 2014
Pasiva	AAB-003 (Bapineuzumab)	Evaluar la seguridad de dosis múltiples en pacientes con EA leve a moderada.	Fase I	Agosto 2013
Activa	ACC-001 + QS21	Determinar la seguridad, tolerancia e inmunogenicidad en pacientes con EA leve a moderada.	Fase II	Marzo 2013
Activa	ACC-001 + QS21	Evaluar seguridad, tolerancia y la capacidad de ACC-001 de disminuir la carga amiloide en el cerebro en pacientes con EA temprana.	Fase II	Mayo 2014
Pasiva	Solanezumab Anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 dirigido contra βA13-28.	Evaluar la cantidad promedio de βA en sangre después de la administración de Solanezumab.	Fase II	Junio 2012
Pasiva	Solanezumab	Estudio de seguimiento a pacientes que han participado en dos estudios anteriores con Solanezumab para monitorear seguridad.	Fase III	Julio 2014
Pasiva	Ponezumab PF-04360365 Anticuerpo	Evaluar el efecto de PF-04360365 en la eliminación de βA desde el líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes	Fase I	Mayo 2012

	monoclonal humanizado IgG2a dirigido contra β A33-40	con EA leve y sanos. Evaluar farmacocinética y farmacodinamia en la relación plasma-LCR.		
Pasiva	MABT5102A	Evaluar los efectos de MABT5102A en la carga amiloide y otros biomarcadores en pacientes con EA leve a moderada.	Fase II	Agosto 2014
Pasiva	Gantenerumab	Evaluar el efecto en la función cognitiva, así como seguridad y farmacocinética en pacientes con síntomas tempranos de EA.	Fase II	Abril 2015
Activa	CAD-106 Fragmento β A1-6 acoplado a partícula viral (VLP) sin adyuvante	Evaluar seguridad y tolerancia de CAD-106 vía intramuscular en pacientes con EA leve.	Fase II	Enero 2013
Activa	V950-001 Mimótopo de 6 aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal	Evaluar la seguridad, tolerancia y respuesta inmune generada por V950-001.	Fase I	Marzo 2012

14. Tecnología del despliegue de péptidos en el fago M13

La técnica de despliegue en fago se basa en el principio de que se pueden desplegar péptidos exógenos en la superficie de fagos filamentosos. Esta técnica fue descrita por primera vez por Smith a mediados de los años 80's y permite la construcción de bibliotecas de arriba de 10^9 péptidos exógenos en diferentes permutaciones (Koivunen et al., 1999). La tecnología de despliegue en fago permite diferenciar estructuras peptídicas que mimetizan epítomos naturales, por lo cual se les llama mimótopos (Knittelfelder et al., 2009). Las bibliotecas de péptido tienen la posibilidad de caracterizar la especificidad de unión de péptidos de diferentes proteínas, tales como anticuerpos. Además, ofrece la posibilidad de encontrar péptidos con el potencial de desarrollar fármacos péptidomiméticos. Las bibliotecas de péptidos han tenido gran aplicación no solo en la expresión de péptidos pequeños, sino también de dominios proteicos de mayor tamaño como los anticuerpos de cadena sencilla (Koivunen et al., 1999).

Un fago que se une a una molécula blanco se puede eluir y después amplificar mediante su crecimiento en una bacteria. Al proceso de captura y elución se le llama biopanning o bioselección y se repite muchas veces hasta obtener los péptidos que mejor se unen al blanco de interés. La secuencia de estos péptidos se obtiene por secuenciación de la parte del genoma que codifica estos péptidos y finalmente el péptido se puede reproducir como un péptido recombinante o sintético. Por medio de esta tecnología se pueden encontrar ligandos específicos y selectivos para receptores blanco (Koivunen et al., 1999).

El fago M13 es un bacteriófago filamentosos de forma cilíndrica, delgada, de 900 nm de longitud y 6-7 nm de diámetro. Su genoma es de cadena sencilla, de 6,407 pares de bases de longitud que codifican 11 genes, 5 de los cuales son proteínas de la cápside. De estas, la principal es la proteína pVIII que se presenta en al menos 2,700 copias y encapsula el DNA del fago. En el extremo distal se encuentran las proteínas pVII y pIX con 5 copias cada una y en el extremo proximal de 4 a 5 copias de cada una de las proteínas pIII y pVI (Figura 14). El fago M13 infecta solamente bacterias macho, por ejemplo células de *E. coli* que poseen el plásmido F que codifica al pili-F. La infección ocurre a través de la proteína pIII del fago y el pili-F de la bacteria. Este fago tiene la característica de que una vez que infecta a la célula huésped no la lisa, sino que continúa replicándose en ella y se libera de la membrana celular en múltiples copias mientras la

bacteria continúa creciendo y dividiéndose, a diferencia de los fagos líticos T4 y T7 (Carmen y Lemutz, 2002).

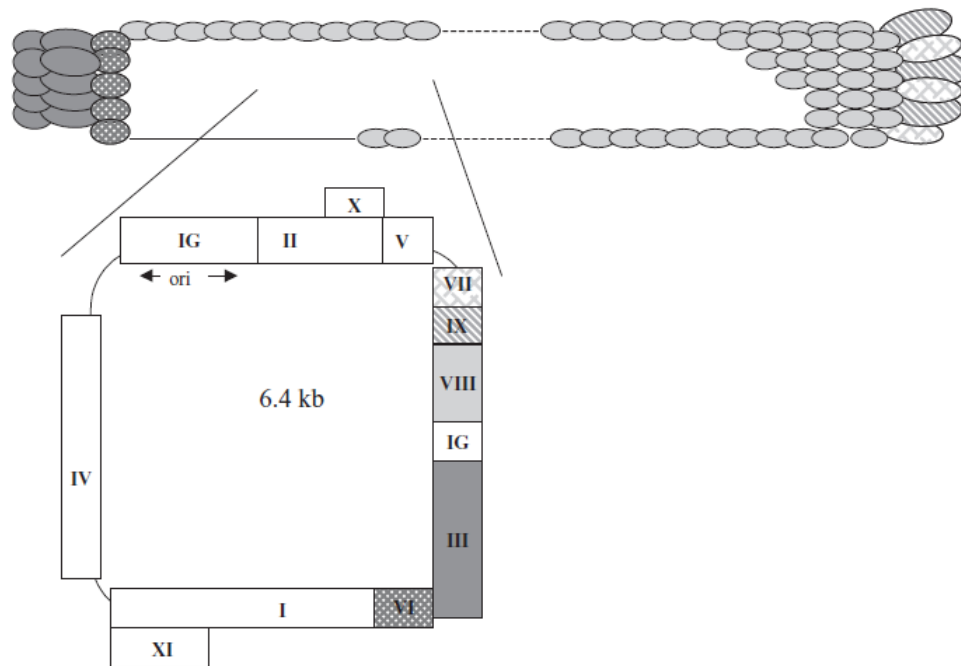


Fig. 14 Estructura de la partícula de fago M13. El fago M13 es de forma cilíndrica (900 nm de longitud) y solo 6-7 nm de diámetro. Las proteínas que no son estructurales están en blanco. Todas las proteínas de la cápside están sombreadas de acuerdo con su gen correspondiente en el genoma. Las regiones intergénicas están marcadas como IG. La proteína pVIII es la proteína principal de la cápside y está presente en aproximadamente 2,700 copias. Las proteínas menores de la cápside son pIII, pVI, pVII y pIX y están presentes en alrededor de 5 copias cada una (tomado de Carmen y Lemutz, 2002).

Los fagos filamentosos son altamente inmunogénicos y se sabe que inducen respuestas inmunes de tipo humoral y celular dirigidas contra las proteínas de la cápside. Son las proteínas pIII y pVIII las que frecuentemente se han utilizado en la técnica de despliegue en fago. El DNA externo se inserta en los genes de las proteínas pIII o pVIII creando una proteína de fusión que se exporta a la superficie y se despliega en la cápside del bacteriófago (Figura 15). En el caso de M13 la respuesta de anticuerpos contra el fago se restringe a 12 de los residuos del extremo amino terminal de pVIII y a los dominios externos de pIII (Hashiguchi et. al., 2010).

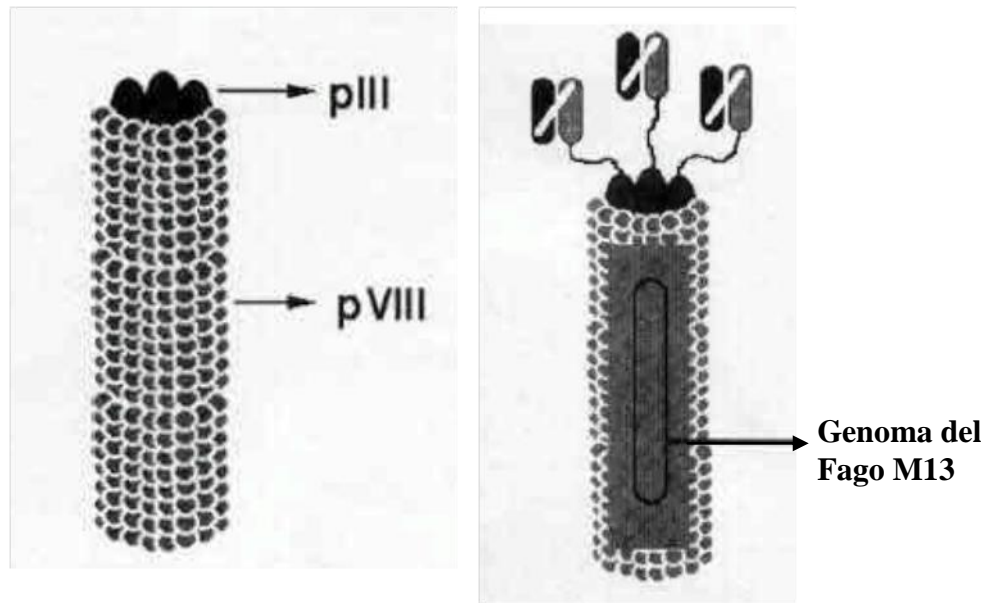


Fig 15. Bacteriófago M13 silvestre, con las proteínas pIII y pVIII comúnmente utilizadas para la sub-clonación de péptidos (izquierda) y bacteriófago modificado con péptidos insertados en la proteína pIII (derecha) (modificado de Pini y Bracci, 2000).

En el presente trabajo se utilizó una serie de péptidos expresados en el fago M13, previamente elegidos en el laboratorio por bioselección con base en su reactividad con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 (Acero et al., 2009). Estos péptidos son mimótopos del extremo amino terminal de la proteína A β (pE)3-42 y se utilizaron para evaluar su capacidad inmunogénica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EA es un problema potencial de salud pública por el aumento del número de casos conforme aumenta la población mundial. Además, los medicamentos hasta ahora aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA atacan únicamente la sintomatología pero no detienen el progreso de la enfermedad.

La mayor parte de los ensayos clínicos de inmunoterapia activa que se están realizando actualmente están enfocados en el empleo de epítomos del extremo amino-terminal de los péptidos de βA de longitud completa, es decir, en el motivo EFRH no contenido en las especies patológicas amino-truncadas piroglutamadas.

Se sabe que estas especies de βA , como es el caso del $A\beta(pE)3-42$, constituyen cerca del 50% del contenido de las placas seniles, comienzan a acumularse intracelularmente en etapas tempranas de la EA y son altamente neurotóxicas, por lo que se considera importante atacar a estas especies de βA .

También se ha demostrado que la inmunoterapia activa es más segura con el uso de inmunógenos compuestos de epítomos de células B del péptido βA , que estimulan la producción de anticuerpos y que no contienen los epítomos de células T capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria y con ello el riesgo de meningoencefalitis y microhemorragias a nivel vascular.

Por lo tanto, se considera de suma importancia encontrar inmunógenos que puedan ser utilizados en la inmunoterapia de la EA que permitan que el tratamiento de esta sea más efectiva atacando varias especies patológicas del βA .

HIPÓTESIS

Los epítomos de A β (pE)3-42 seleccionados previamente en el laboratorio, serán capaces de inducir anticuerpos con las mismas características que el péptido de longitud completa (A β)(pE)3-42, sin inducir respuesta pro-inflamatoria debido a la ausencia del epítomo de células T ubicado en la región central del péptido.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la capacidad inmunogénica de epítomos del péptido A β (pE)3-42 amino-terminal con la finalidad de neutralizar el efecto tóxico de agregados de β -amiloide.

Objetivos particulares:

1. Expresar los epítomos del A β (pE)3-42 en alta copia en el fago M13 con el fin de obtener un inmunógeno con múltiples copias del epítomo.
2. Inmunizar conejos y ratones con los epítomos de A β (pE)3-42 en baja y alta copia.
3. Evaluar la producción de anticuerpos en cada caso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente en el laboratorio se identificaron epítomos de A β (pE)3-42 por bioselección de una biblioteca comercial de péptidos de siete residuos expresados en el extremo amino terminal de la proteína pIII del fago M13. Consistió de una serie de 3 rondas y se eligieron 21 clonas individuales después de la última ronda, se amplificaron y se utilizó la técnica de ELISA para evaluar su unión al anticuerpo anti-A β (pE)3-42. Se obtuvo DNA de cadena sencilla de cada uno de los péptidos positivos y uno negativo, y se secuenciaron (Acero, et al., 2009). La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Tabla 2. Secuencias de los péptidos y reactividad por ELISA de los epítomos seleccionados con suero de conejo anti-A β (pE)3-42.

Clonas	Secuencia								OD 405 nm
C5	T	P	S	Y	V	S	K	0.03 +- 0.001	
C8	W	P	V	G	G	E	H	0.8 +- 0.008	
C3, C10, C18	Q	F	R	H	D	W	Y	1.42 +- 0.04	
C11	Q	F	R	H	D	D	P	1.39 +- 0.046	
C12	Q	F	R	V	P	Y	P	0.78 +- 0.06	
C17	Q	F	R	S	D	S	T	0.82 +- 0.142	
C 3.15	S	Y	E	F	R	H	H	0.03 +- 0.005	

(Acero, et al., 2009).

Los péptidos positivos se consideraron como mimótopos del extremo amino terminal de la proteína A β (pE)3-42 y en el presente trabajo se utilizaron para evaluar su capacidad inmunogénica.

Protocolos de Inmunización

Se inmunizaron vía subcutánea (s.c.) conejos Nueva Zelanda albinos de 2.0 kg de peso con 10^{12} unidades formadoras de placa/100 μ L/conejo de los epítomos expresados en el fago M13 pIII bajo la siguiente clasificación experimental (un conejo por cada una): Pool de clonas (clonas C10, C11, C12, C17), control negativo (clona C5) y control positivo (clona C3.15). El esquema

de inmunización fue el siguiente: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 14 días. Sangrado final a los 8 días después del cuarto refuerzo.

Se inmunizaron vía intraperitoneal (i.p.) grupos de 3 ratones BalbC/AnN de 6 semanas de edad con 10^{11} ufp/ratón de los epítomos expresado en M13 pIII organizados de la siguiente manera: experimentales (grupo 1: clona C10, grupo 2: clona C11 y grupo 3: clonas C12 y C17), controles negativos (grupo 4: TBS y grupo 5: clona C5), control positivo (grupo 6: clona C3.15). El esquema de inmunización fue el siguiente: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 14 días. Sangrado final a los 8 días después del cuarto refuerzo.

Para el caso de los ratones inmunizados con los epítomos expresados en M13 pVIII ($1.00E+11$ ufp/ratón) se inmunizaron vía i.p. grupos de 5 ratones BalbC/AnN de 6 semanas de edad agrupados de la siguiente manera: grupo experimental (clona C11.2) y control negativo (clona C5.2); bajo el siguiente esquema de inmunización: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 10 días. Sangrado final a los 8 días después del cuarto refuerzo.

Se inmunizaron vía s.c. grupos de 3 ratones BalbC/AnN de 6 semanas de edad con 20 µg de péptido sintético PC11V o PN + Adyuvante de Freund (AF) relación 1:1, clasificados de la siguiente manera: grupo experimental (PC11V, correspondiente a la secuencia de la clona C11) y control negativo (PN, péptido no relacionado). El protocolo de inmunización fue el siguiente: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 10 días. Sangrado final a los 8 días después del cuarto refuerzo.

Se inmunizaron vía i.p. grupos de 5 ratones BalbC/AnN de 8 semanas de edad con 40 µg de péptido sintético PC11V o PN + AF relación 1:1, agrupados de la siguiente manera: grupo experimental (PC11V, correspondiente a la secuencia de la clona C11) y control negativo (PN, péptido no relacionado). El protocolo de inmunización fue el siguiente: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 10 días. Sangrado final a los 8 días después del cuarto refuerzo.

Se inmunizaron grupos de 2 conejos Nueva Zelanda vía s.c. con 100 µg de péptido sintético PC11V, 11-25 o PN + Adyuvante de Freund 1:1, como sigue: grupo experimental (PC11V, correspondiente a la secuencia de la clona C11), 11-25 (fragmento 11-25 del péptido βA 1-42) y control negativo (PN, péptido no relacionado). El protocolo de inmunización fue el siguiente: Primera inmunización (prime) y 4 refuerzos cada 10 días. Sangrado final a los 8 días

después del cuarto refuerzo. En el tercer y cuarto refuerzo de los grupos 11-25 y PC11V, respectivamente, se dobló la dosis a 200 µg/conejo.

Sub-clonación de epítomos en la proteína pVIII del fago M13

La secuencia de los oligonucleótidos que se sub-clonaron en la proteína pVIII del fago M13 y que corresponden a los diferentes epítomos que se utilizaron para evaluar su inmunogenicidad es la siguiente:

Tabla 3. Secuencia de oligómeros correspondientes a los epítomos experimentales, sub-clonados en la proteína pVIII del fago M13.

Clona	Secuencia de nucleótidos	Dirección
C5	CAT GAC CCC GAG CTA TGT GAG CAA AA TG GGG CTC GAT ACA CTC GTT TTT CGA	5' → 3' ("hacia adelante") 3' ← 5' ("reverso")
C10	CAT GCA GTT TCG CCA TGA TTG GTA TA GT CAA AGC GGT ACT AAC CAT ATT CGA	5' → 3' 3' ← 5'
C11	CAT GCA GTT TCG CCA TGA TGA TCC GA GT CAA AGC GGT ACT ACT AGG CTT CGA	5' → 3' 3' ← 5'
C12	CAT GCA GTT TCG CGT GCC GTA TCC CA GT CAA AGC GCA CGG CAT AGG CTT CGA	5' → 3' 3' ← 5'
3.15	CAT GAG CTA TGA ATT TCG CCA TCA TA TC GAT ACT TAA AGC GGT AGT ATT CGA	5' → 3' 3' ← 5'

Cada uno de los oligonucleótidos se reconstituyeron (de cada una de las direcciones "hacia adelante" y "reverso") con agua miliQ estéril y se llevaron a una concentración final de 1µg/µL. Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 de cada uno de los oligonucleótidos con agua miliQ estéril y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% cargando 1 µL del colorante

azul de bromofenol y xilensianol + 2 μL de muestra (en dil. 1:10), en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE) 1x a 100-120 mV. Se calculó la relación 3':5' de cada uno de los oligonucleótidos y de acuerdo a ello se calculó una relación 1:1, entonces se colocaron en tubos por separado cada uno de los pares 3'-5' de acuerdo a las concentraciones calculadas, llevándose a un volumen final de 50 μL .

Para el alineamiento de los oligonucleótidos se calentó cada muestra durante 5 min a 70°C y se dejó enfriar lentamente en el termoblock (Dri-bath 16500, Thermoline) hasta que la temperatura marcó 30°C. Entonces se terminó de enfriar en hielo. Para llevar a cabo la sub-clonación se calculó una relación 1:1 molar de la ligación con el vector.

Para preparar el vector para la sub-clonación se digirió el vector NRpG8SAET (un fagémido que codifica una secuencia señal, la proteína pVIII del fago M13 y un marcador de resistencia a antibióticos) con la enzima de restricción HindIII como sigue: 0.9 μg de vector, 2 μL de buffer (2) 10x (NewEngland), 10 Unidades/ μL de la enzima de restricción HindIII (NewEngland) y 10 μL agua miliQ estéril; incubando a 37°C por 90 min. Se corroboró que la digestión haya sido completa por medio de una electroforesis en agarosa al 2% en TBE 1x a 100 V. A la digestión se añadieron 2 μL de buffer (3) 10x (NewEngland), 20 Unidades/ μL de la enzima de restricción NcoI (NewEngland) y 10 μL de agua miliQ estéril y se incubaron a 37°C por 90 min. Se corroboró que la digestión haya sido completa por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 2% en TBE 1x a 100 Volts y usando como control el vector NRpG8SAET superenrollado, se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se observó en un transiluminador UV (Life Technologies Gibco BRL). Con la misma finalidad también se llevó a cabo una electroporación como sigue: 45 μL de células E. coli competentes como control de crecimiento celular, 4 ng del vector NRpG8SAET superenrollado (no digerido) + 45 μL de células E. coli competentes, 4 ng de vector digerido + 45 μL de células E. coli competentes y 0.5 μg del plásmido pUC (USB) + 45 μL de células E. coli competentes como control óptimo de DNA.

La electroporación consistió en la aplicación de un pulso eléctrico de 2.5 kV/mseg y con una resistencia de entre 200 y 700 Ohms en el electroporador (Biorad) a células de E. coli electrocompetentes TG1. Después de la electroporación cada reacción se llevó a un volumen de 1 mL en medio SOC y se incubó a 37°C por 40 min. Posteriormente se plateó la quinta parte del

volumen total en cajas Petri con LB agar con 50 µg/mL de carbinicilina (Invitrogen), como sigue: vector ligado, vector lineal, pUC y células competentes cada uno por separado y se incubó toda la noche a 37°C. Una vez verificado que el vector se ha digerido se purificó utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up system (Promega. Madison, WI., USA) y se cuantificó en un espectrofotómetro UV-visible (Nanodrop 1000 de Acceso Lab).

Para la sub-clonación (ligación) se hizo un coctel de la siguiente manera: 1 µL de buffer de ligasa 10x (Promega), 1.5 Unidades/µL de Ligasa (Promega) y 4 ng de vector digerido para cada uno de los pares de oligonucleótidos a ligar. Se llevó a un volumen final de 5.5 µL con agua miliQ estéril y se añadió a cada oligonucleótido alineado, completando con agua miliQ estéril a un volumen final de 10 µl. Para el control se mezclaron 5.5 µl del coctel y se llevó a 10 µl con agua miliQ estéril. Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C. Para corroborar que los oligonucleótidos (mimótopos de interés) se sub-clonaron en el vector NRpG8SAET se llevó a cabo una electroporación como sigue: 45 µL de células E. coli competentes, como control de células; 1 µL del vector NRpG8SAET digerido + 45 µg de células E. coli competentes, como control negativo del vector; 1 µL de cada una de las ligaciones (sub-clonaciones) + 45 µL de células competentes E. coli y 0.5 µg del plásmido pUC (USB) + 45 µL de células E. coli competentes, como control de la eficiencia de la transformación de las células de E. coli.

Cada una de las electroporaciones se incubaron a 37°C durante 40 min y se platearon en cajas Petri con LB agar con 50 µg/mL de carbinicilina de la siguiente manera: 100 µL de muestra sub-clonada, 400 µL de muestra sub-clonada, 200 µL de células competentes, 100 µL de pUC y 400 µL del vector NRpG8SAET, cada uno por separado. Se incubaron toda la noche a 37°C. Al siguiente día se comparó el crecimiento bacteriano. Para corroborar que las colonias obtenidas contenían el vector recombinante se llevó a cabo una PCR en el termociclador (Corbett Research) que permitió analizar la presencia o ausencia del inserto en cada colonia elegida. Se utilizaron los oligonucleótidos F8 y PYSAET como cebadores bajo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 95°C, un ciclo por 3 min seguido de 30 ciclos de 30 seg cada uno; temperatura de hibridación 62°C, 30 ciclos de 30 seg cada uno; temperatura de extensión 72°C, 30 ciclos de 30 seg cada uno, seguido de un ciclo de 1 min a 4°C. Posteriormente se corrió una electroforesis en gel de agarosa 2.5 % a 80 Volts y se tiñó de acuerdo a las condiciones anteriormente descritas para hacer evidentes los insertos amplificados de las colonias elegidas para la PCR.

Secuenciación

Para comprobar que los insertos sub-clonados en el vector NRpG8SAET corresponden a las secuencias de los epítomos de interés se enviaron a secuenciar. Esta se llevó a cabo usando el equipo Genetic Analyzer (Applied Biosystems) modelo 310, con el kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit.

Amplificación del vector sub-clonado en la proteína pVIII

En un tubo Corning de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo 2YT broth (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 10 μ L de carbinicilina se incubó una colonia de E. coli transformada con el vector sub-clonado 5-6 h a 37°C en agitación. Se infectaron 2 mL de este crecimiento bacteriano con una moi de 10 de fago helper (M13K07) para ensamblar el fago M13 completo y se incubó 30 min a 37°C sin agitación (con el resto se hicieron gliceroles para almacenarlos a -80°C). Se escaló a 50 mL de medio 2YT con 50 μ L/mL de ampicilina y se incubó 1 h a 37°C en agitación. Se escaló a 500 mL de medio 2YT con 50 μ g/mL de ampicilina y 50 μ g/mL de kanamicina, se incubó de 16-20 h a 30°C en agitación. Se centrifugó a 1000 rpm en un rotor JA-14, 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 100 mL de polietilenglicol 8000 (PEG) (Promega) para precipitar los fagos y se incubó toda la noche a 4°C.

Purificación del amplificado

Los fagos pre-incubados se centrifugaron, recuperando el pellet con 1.5 mL de TBS estéril. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm 5 minutos a 4°C para eliminar las células muertas precipitadas. Se recuperó el sobrenadante y otra vez se centrifugó. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1/5 parte del volumen total de PEG para recuperar los fagos, se vortexeó y se dejó en reposo en hielo 1 h. Se centrifugó a 10000 rpm 5 min y se recuperó el precipitado. Se centrifugó otra vez 5 min, retirando el sobrenadante para dejar seco el pellet. Este se resuspendió en 1 mL de TBS y se centrifugó 5 min, repitiendo la operación dos veces y recuperando el sobrenadante.

Titulación de los fagos sub-clonados

A partir de tres diluciones seriales 1:1000 se infectaron 200 μ L de células TG1 con 5 μ L y 50 μ L de la dilución III en dos tubos por separado. Se incubaron 45 min a 37°C y después se plaquearon en cajas petri con medio LB con carbinicilina 1:1000. Se incubó toda la noche a 37°C. El título del amplificado se obtuvo mediante el conteo del número de colonias y el número de diluciones realizadas, el cual se expresa como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL).

Inmunoblot

Por electroforesis desnaturizante (SDS PAGE) en un gel de poliacrilamida de gradiente 4-12% (NuPAGE Novex, Invitrogen), se corrieron muestras correspondientes a las secuencias C5.2, C10, C11.2, C12.2 y 3.15.3 expresadas en la proteína pVIII del fago M13 10^9 y 10^{11} ufc/mL. Se tiñó uno de los geles con azul de Coomassie y otros se transfirieron en un equipo de transferencia semi-seca (Biorad) a membranas de nitrocelulosa a 25 Volts durante 40 min. Se bloquearon con PBS-Leche 2% toda la noche a 4°C en agitación. Para exponer los epítomos las membranas se sellaron en una bolsa con PBS y se calentaron en baño maría 10 min. La membrana se bloqueó con PBS-Leche 2% toda la noche a 4°C. Después de 5 lavados manuales de 5 min cada uno con PBS-Tween 20 0.2% se agregó el anticuerpo primario (anti-M13 1:1000, anti-A β (pE)3-42, anti-A β 1-42 o suero control 1:100) y se incubó toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas se agregó el anticuerpo secundario acoplado a HRP 1:3500 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron y se revelaron por quimioluminiscencia.

Protocolo general del ELISA de captura de anticuerpo.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc MaxiSorp) con 0.2 μ g/pozo de péptido en un amortiguador de carbonatos (pH 9.6) o, además con 10^{10} unidades de fago M13 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Se hicieron 4 ciclos de lavados automáticos (en un equipo Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA) con un amortiguador de PBS 1x/Tween 20 0.2% y se bloqueó con PBS 1x/Leche 2% 1 h a 37°C. Después de lavar los pozos se agregaron 100 μ l/pozo de anticuerpo primario y se incubó 1 h a 37°C. Después de lavar la placa se agregaron 100

μl/pozo de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés horseradish peroxidase) en PBS 1x/Leche 2%/Tritón 0.2 %, 1 h a 37°C. Después de los lavados se reveló con 100 μl/pozo de sustrato de H₂O₂ con el indicador ABTS (2,2'-azina-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y se tomó la lectura a 405 nm en un lector automático de microplacas (Dynex, Virginia).

Los péptidos utilizados para la sensibilización de la placa, así como los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en cada uno de los ELISA de captura de anticuerpo realizados en este trabajo se presentan a continuación:

- a) **Detección de IgG en suero de conejos inmunizados con epítomos en baja copia.** Péptidos Aβ 1-42, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42 y el péptido no relacionado PAF3, además de 10¹⁰ ufc/mL de fago M13. Anticuerpo primario: sueros problema (pool, control negativo y control positivo) y anticuerpo secundario: anti-IgG (H+L) de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate) 1:3000.
- b) **Detección de IgM en suero de ratones inmunizados con epítomos en baja copia.** Péptidos βA 1-42, 1-16, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42, 12-28 y el péptido no relacionado PAF3 además de 10¹⁰ ufc/mL de fago M13. Anticuerpo primario: suero problema de ratón y anticuerpo secundario: anti-IgM de ratón acoplado a peroxidasa 1:2500.
- c) **Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con epítomos en baja copia.** Péptidos Aβ 1-42, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42 y el péptido no relacionado PAF3 además de 10¹⁰ ufc/mL de fago M13. Anticuerpo primario: suero problema de ratón y anticuerpo secundario: anti-IgG (H+L) de ratón hecho en cabra acoplado a peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate) 1:1000.
- d) **Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con epítomos en alta copia.** Péptido Aβ(pE)3-42 y el péptido no relacionado T1C, además de 10¹⁰ ufp/mL de fago M13. Anticuerpo primario: suero problema 1:100 y sueros control anti-M13 pVIII (para el fago M13) y anti-Aβ(pE)3-42 (para Aβ(pE)3-42 y T1C). Anticuerpo secundario: anti-IgG (H+L) de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa (goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate) 1:1000.

- e) **Evaluación de la reactividad de anti-A β (pE)3-42 contra diferentes péptidos.** Péptidos A β (pE)3-42, PN, PC11V y el péptido no relacionado PAF3. Anticuerpo primario: suero anti-A β (pE)3-42 y anticuerpo secundario: anti-IgG (H+L) de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500.
- f) **Detección de IgG en suero de ratones inmunizados con 20 μ g de péptido PC11V o PN.** Péptidos A β (pE)3-42, PN, PC11V y el péptido no relacionado T1C. Anticuerpos primarios: sueros problema (de ratón) y como controles anti-A β (pE)3-42 policlonal y anti-adyuvante (hechos en conejo). Anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa (goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500 para los sueros problema y anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500 para anti-A β (pE)3-42 y anti-adyuvante.
- g) **Detección de IgG en suero de conejos inmunizados con los péptidos PC11V, 11-25 y PN.** Péptidos A β (pE)3-42, 11-25, A β (pE)11-42 y el péptido no relacionado PAF3. Anticuerpos primarios: Sueros problema PN (1), PN (2), PC11V (1), PC11V (2) y como controles anti- A β (pE)3-42 y anti-adyuvante, además de los sueros pre-inmune 11-25 (1), pre-inmune 11-25 (2), 11-25 (1), 11-25 (2) y como controles, A β (pE)11-42, Bam90.1 y anti-adyuvante. Anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500 para los sueros de los conejos inmunizados, anti-A β (pE)3-42 policlonal y anti-adyuvante; y anti-IgG de ratón hecho en cabra (goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500 para Bam90.1.
- h) **Evaluación de la reactividad del suero anti-A β 11-25 contra diferentes péptidos de A β .** Sensibilización de la placa con los péptidos A β 11-25, A β 1-42, A β 11-42, A β (pE)11-42, A β (pE)3-42 y el péptido no relacionado PAF3. Anticuerpo primario: anticuerpos policlonales de conejo anti-A β 11-25 obtenido de la inmunización del conejo (2) con A β 11-25. Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo hecho en cabra (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500.

Protocolo general del ELISA de competencia.

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc MaxiSorp) con 0.2 µg de péptido en un amortiguador de carbonatos (pH 9.6), toda la noche a 4°C. Se pre-incubaron independientemente cada uno de los epítomos expresados en fago o péptido a diferentes concentraciones, con una solución de anticuerpo primario en PBS 1x/Leche 2%/Tritón 0.2%, toda la noche a 4°C en agitación paralela. Los lavados se hicieron con un amortiguador de PBS 1x/Tween 20 0.2% en un equipo Well Wash, Thermo Electron Corporation, USA, usando un ciclo de 4 lavados. Se bloqueó con PBS 1x/Leche 2% por 1 h a 37°C. Los pozos se lavaron y se agregaron 100 µl/pozo de las reacciones de competencia por 1 h a 37°C. Después de los lavados se agregaron 100 µl/pozo de anticuerpo secundario en PBS 1x/leche 2%/triton 0.2 %, 1 h a 37°C. La placa se lavó y se reveló con 100 µl/pozo de sustrato H₂O₂ con el indicador ABTS (2,2'-azina-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) durante 15 minutos a 37°C. Finalmente se tomó la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector de automático de microplacas (Dynex, Virginia).

Los péptidos utilizados para la sensibilización de la placa, así como los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en cada uno de los ELISA de competencia realizados en este trabajo se presentan a continuación:

- a) **Evaluación de la especificidad de los epítomos de Aβ(pE)3-42.** Péptido Aβ(pE)3-42 (AnaSpec). Se preincubaron 10¹¹, 10¹⁰ y 10⁹ ufp/mL de cada uno de los epítomos expresados en fago, con una solución de anticuerpos anti-Aβ(pE)3-42 policlonal hecho en conejo. Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa 1:5000.
- b) **Evaluación de la reactividad de los péptidos PN y PC11V con anti-Aβ(pE)3-42.** Péptido Aβ(pE)3-42. Se preincubaron 0.5 µg, 1 µg y 2 µg de los péptidos PN o PC11V con anti-Aβ(pE)3-42. Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa 1:5000.
- c) **Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti-Aβ11-25 en solución contra diferentes especies de Aβ.** Sensibilización de la placa con péptido Aβ11-25. Independientemente se pre-incubaron 10 µg, 20 µg y 40 µg de los péptidos Aβ(pE)11-42, Aβ11-42 (no piroglutamato), 1-42 y Aβ(pE)3-42 con anti-11-25 (conejo 2). Anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa 1:5000.

ELISA de captura de antígeno doble sándwich para detección de IgG en suero de ratones inmunizados con 40 µg de péptido PC11V o PN

Se sensibilizó una placa de microtitulación con anti-IgG de conejo o de ratón 0.2 µg/pozo/100 µl en un amortiguador de carbonatos ($\text{CO}_3^{2-}/\text{H}_2\text{CO}_3$) a pH 9.6 1 h a 37 °C. Se lavó automáticamente en un ciclo de 4 lavados con un amortiguador de PBS 1x/Tween 20 0.2% y se bloqueó con PBS 1x/Leche 2% por 1 h a 37°C. Después de lavar la placa se agregaron 100 µl/pozo de suero PN, suero PC11V, anti- Aβ(pE)3-42 y anti-adyuvante (hechos en conejo) en PBS 1x/Leche 2%/Tritón 0.2% 1h a 37°C. Se lavaron los pozos y se agregaron 10^{10} ufp/pozo de las clonas C5 o C11 expresadas en pIII de M13 en PBS 1x/Leche 2%/Tritón 0.2% pre-incubadas por 30 min y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de los lavados se agregaron anti-M13 hecho en ratón 1:2500 y hecho en conejo 1:1000 en PBS 1x/Leche 2%/Tritón 0.2%, 1 h a 37°C. Se lavaron los pozos y se agregaron 100 µl/pozo de anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a peroxidasa (goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjúgate) 1:2500 en PBS 1x/leche 2%/triton 0.2 % o anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa (goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjúgate) 1:2500 1 h a 37°C. La placa se lavó y se reveló con 100 µl/pozo de sustrato de H_2O_2 con el indicador ABTS (2,2'-azina-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) a 37°C por un tiempo máximo de 40 min. Finalmente se tomó la lectura a diferentes intervalos de tiempo hasta obtener una lectura estable en un lector automático de placas a 405 nm.

RESULTADOS

a) Evaluación de epítomos de A β (pE)3-42 expresados en pIII del fago M13 (clonas C5, C8, C10, C11, C12 y C17)

Con el fin de confirmar la especificidad de las clonas seleccionadas previamente utilizando anticuerpo anti-A β N(pE)3-42, se realizó un ensayo de ELISA de competencia. Este ensayo evalúa la interacción antígeno-anticuerpo en solución, por lo que podemos ver la capacidad que tienen los diferentes epítomos expresados en el fago M13 pIII de inhibir la interacción del anticuerpo anti-A β N(pE)3-42 con el péptido A β N(pE)3-42 inmovilizado en la placa (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la unión de anticuerpos anti-Ab(pE)3-42 al péptido A β (pE)3-42 de las clonas positivas respecto a la clona negativa C5 a una concentración de 10E11 ufp/mL.

CLONA	SECUENCIA							% de Inhibición (10E11 ufp/pozo)
C8	W	P	V	G	G	E	H	11.0 %
C10	Q	F	R	H	D	W	Y	84.4 %
C11	Q	F	R	H	D	D	P	37.1 %
C12	Q	F	R	V	P	Y	P	32.5 %
C17	Q	F	R	S	D	S	T	33.1 %

Las clonas C10, C11, C12 y C17 inhiben la interacción anti-A β (pE)3-42 con el péptido A β (pE)3-42, mientras que la clona C8 no modificó significativamente la capacidad de asociación entre el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 y el péptido A β (pE)3-42. Por esta razón se seleccionaron las clonas C10, C11, C12 y C17 como aquellas que expresaban epítomos de interés y eran candidatas para evaluar su inmunogenicidad (Tabla 6).

b) Evaluación IgG en los sueros de conejos inmunizados con fagos que expresan epítomos de A β (pE)3-42 en pIII (baja copia)

Con la finalidad de estudiar la inmunogenicidad de los epítomos expresados en baja copia en las clonas seleccionadas se procedió a inmunizar conejos Nueva Zelanda (un conejo por cada grupo). A estos se les dio un primer estímulo de 10^{12} ufp/conejo y 4 inmunizaciones de 10^{12} ufp/conejo de los fagos purificados a un título de 10^{13} ufp/mL en TBS estéril. Las clonas de fagos se usaron en los siguientes grupos experimentales:

Pool: clonas C10, C11, C12, C17. Secuencias de los insertos:

C10 (QFRHDWY), C11 (QFRHDDP), C12 (QFRVPYP) y C17 (QFRSDST).

Control negativo: clona C5 (secuencia del inserto: TPSYVSK) y,

Control positivo: clona C3.15 (secuencia del inserto: SYEFRHH).

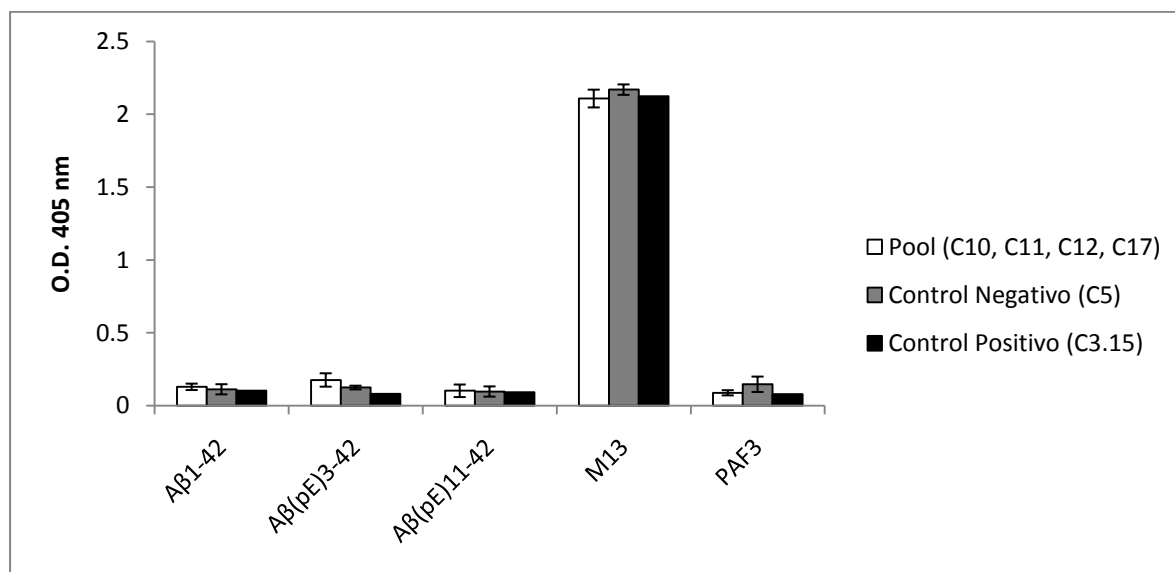


Figura 16. Reactividad por ELISA de los sueros de conejos inmunizados con los epítomos en M13 pIII, con los péptidos Ab1-42, A β (pE)3-42, A β (pE)11-42, el péptido no relacionado PAF3 y el fago M13. Los sueros se obtuvieron después de un 4º refuerzo y se usaron en dilución 1:100. Cada dato es el promedio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes.

Los tres conejos inmunizados con las diferentes clonas generaron una fuerte respuesta humoral contra el fago M13 (Fig.16). En cambio, el suero del conejo inmunizado con el pool de clonas experimentales no mostró reactividad contra ninguno de los péptidos, incluyendo el péptido A β (pE)3-42, del cual las clonas poseen un mimótopo del extremo amino terminal

(Fig.13). Para descartar que la falta de reactividad es debida a la dilución de suero utilizado, procedimos a hacer una segunda evaluación por ELISA, esta vez usando una dilución de suero 1:45.

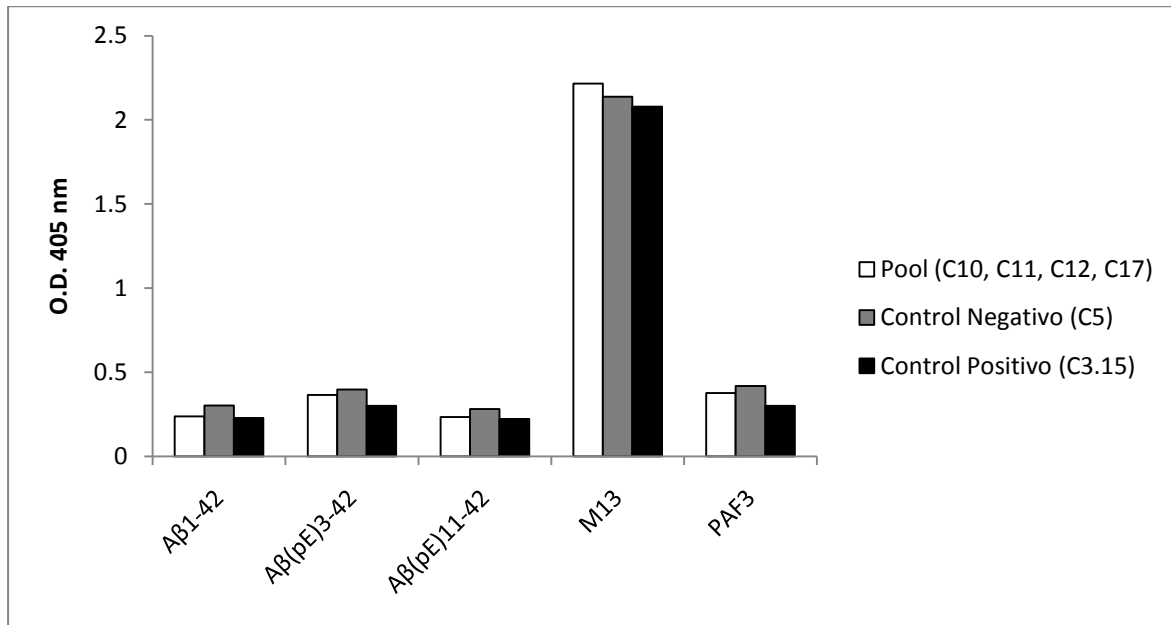


Figura 17. Reactividad por ELISA de los sueros de conejos inmunizados con los epítomos en M13 pIII, con los péptidos Aβ1-42, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42, el péptido no relacionado PAF3 y el fago M13. Los sueros se obtuvieron después de un 4º refuerzo y se usaron en dilución 1:45.

Al repetir el ensayo con la dilución 1:45 de los sueros obtuvimos resultados similares. No se detectaron anticuerpos específicos en el conejo inmunizado con el pool de clonas experimentales (Fig.17).

Por último decidimos hacer un quinto refuerzo con los mismos inmunógenos y volvimos a evaluar la presencia de anticuerpos específicos después de once días. Nuevamente no detectamos anticuerpos βA específicos, lo que podemos atribuir, probablemente, al bajo número de copias de péptido por partícula viral (Fig. 18).

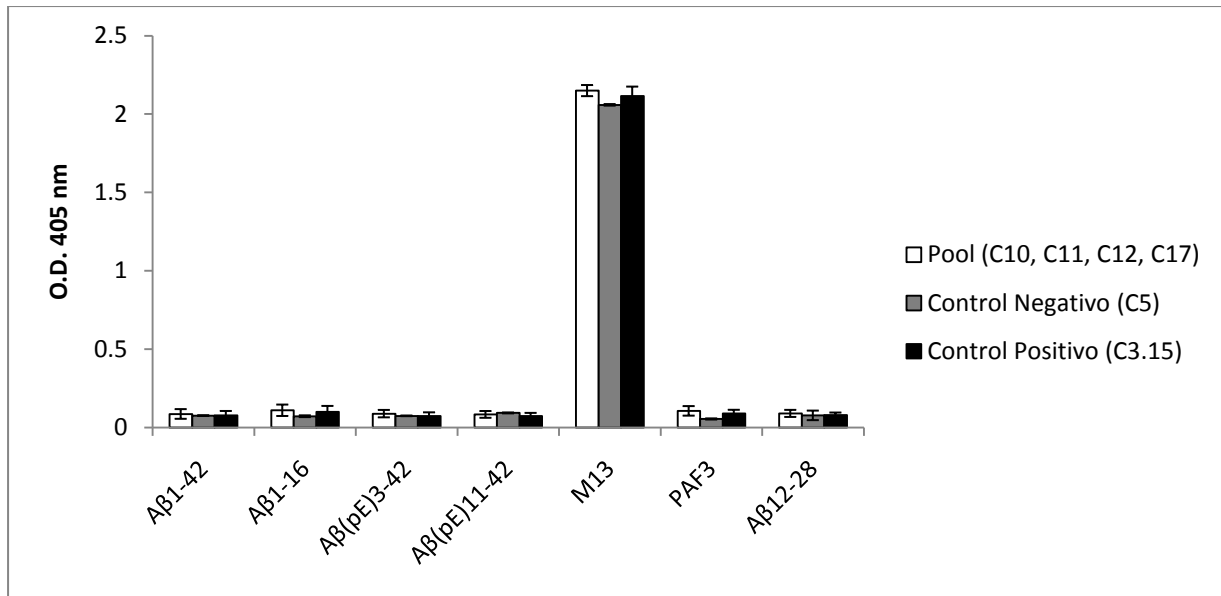


Figura 18. Reactividad por ELISA de los sueros de conejos inmunizados con los epítomos en M13 pIII, con los péptidos Aβ1-42, Aβ1-16 Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42, Aβ12-28, el péptido no relacionado PAF3 y el fago M13. Los sueros se obtuvieron después de un 5° refuerzo y se usaron en dilución 1:120. Cada dato corresponde al promedio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes.

c) Evaluación de IgM en los sueros de ratones BALB/c AnN inmunizados con fagos que expresan epítomos de Aβ(pE)3-42 en pIII

Los ratones fueron inmunizados con 10^{11} ufp/ratón de los fagos purificados a un título de 10^{13} ufp/mL en TBS estéril. Los sueros se obtuvieron antes del primer estímulo y 21 días después de la primera inmunización. Se usaron 6 grupos experimentales de tres ratones cada uno como sigue:

Grupo 1: clona C10

Grupo 2: clona C11

Grupo 3: clonas C12 y C17

Controles Negativos: Grupo 4 (TBS) y Grupo 5 (clona C5)

Control Positivo: Grupo 6: clona C3.15

No se detectaron anticuerpos específicos en ningún grupo (Fig. 19).

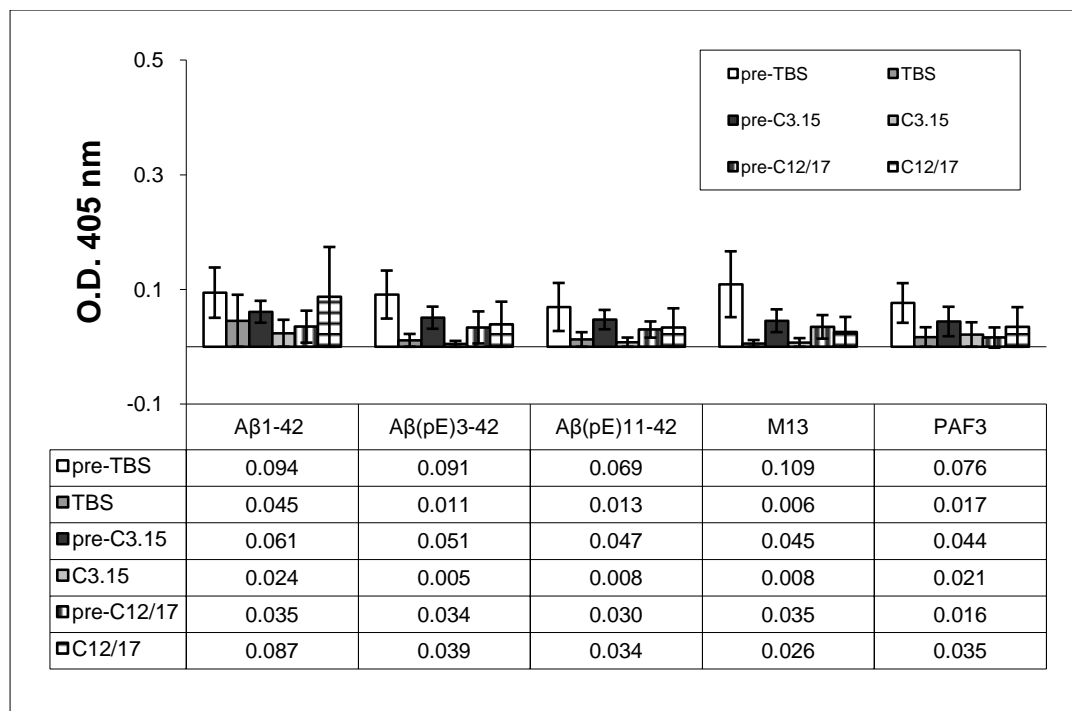


Figura 19. Reactividad por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con los epítomos en M13 pIII, con los péptidos Aβ1-42, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42, el péptido no relacionado PAF3 y el fago M13. Los sueros se obtuvieron antes de la primera inmunización (pre-) y 21 días después de esta. Se usaron en dilución 1:250. Los datos son el promedio ± desviación estándar de tres ratones por grupo.

d) Evaluación de IgG en los sueros de ratones BALB/cAnN inmunizados con fagos que expresan epítomos de Aβ(pE)3-42 en pIII

Los ratones se inmunizaron con 10^{11} ufp/ratón de los fagos purificados a un título de 10^{13} ufp/mL en TBS estéril. Los sueros se obtuvieron después de un primer estímulo y 4 inmunizaciones. Se usaron 6 grupos experimentales de tres ratones cada uno como sigue:

Grupo 1: clona C10

Grupo 2: clona C11

Grupo 3: clonas C12 y C17

Controles Negativos: Grupo 4 (TBS) y Grupo 5 (clona C5)

Control Positivo: Grupo 6 (clona C3.15)

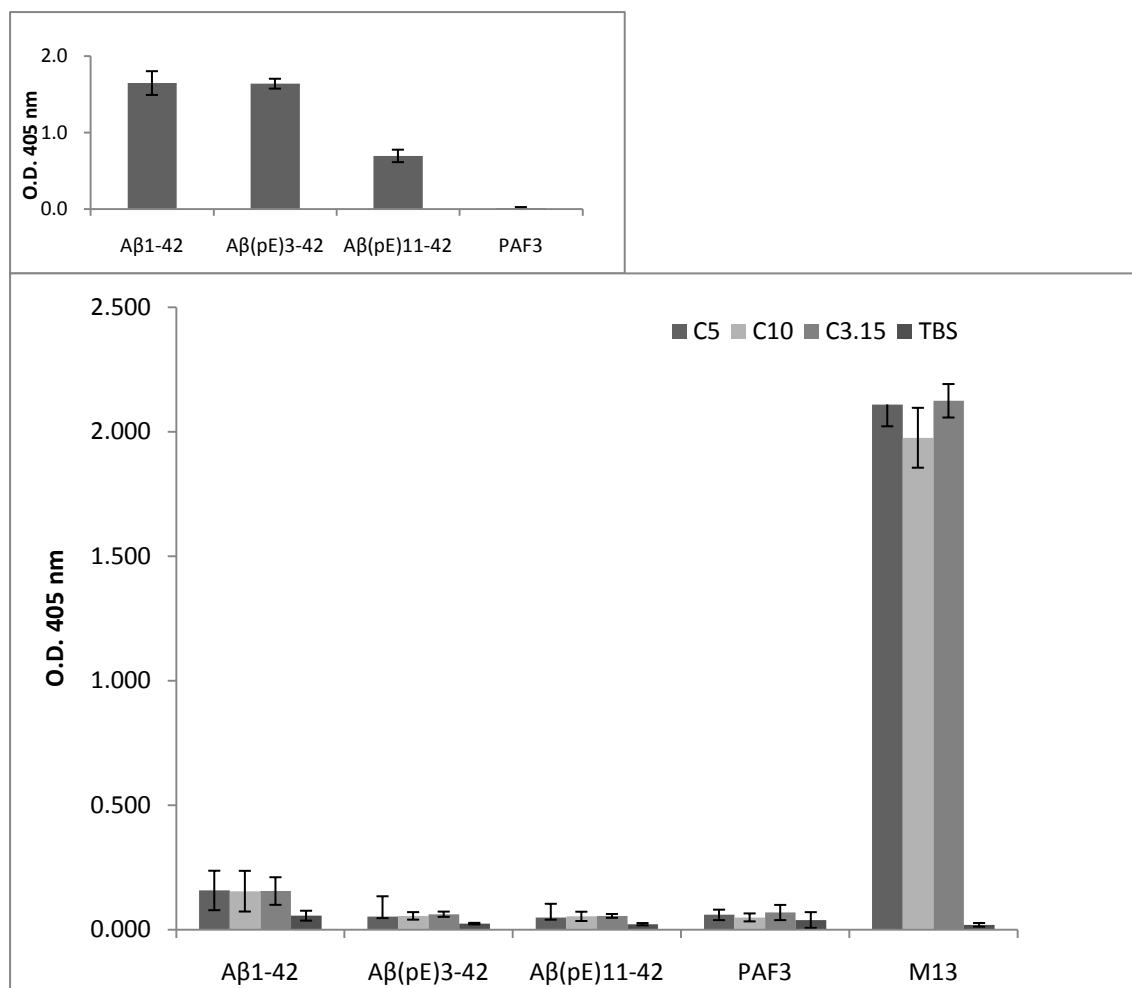


Figura 20. Reactividad por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con los epítotos en M13 pIII, con los péptidos Aβ1-42, Aβ(pE)3-42, Aβ(pE)11-42, el péptido no relacionado PAF3 y el fago M13. Los sueros se obtuvieron después de un 4º refuerzo y se usaron en dilución 1:250. Los datos son el promedio ± desviación estándar de tres ratones por grupo y dos experimentos independientes. En el recuadro se muestra la reactividad de los sueros usados como controles anti-Aβ1-42, anti- Aβ(pE)3-42 y anti-Aβ(pE)11-42 con su péptido correspondiente.

No se detectaron anticuerpos específicos anti-Aβ. Sin embargo, en este caso como anteriormente, se generaron anticuerpos anti-M13 (Fig. 20). Desafortunadamente los ratones de los grupos 2 y 3 no pudieron ser evaluados al finalizar el esquema de inmunizaciones, debido a que murieron en el bioterio por causas ajenas a las condiciones del experimento.

e) Sub-clonación de epítomos de A β (pE)3-42 en la proteína pVIII del fago M13 (alta copia)

Para obtener un mayor número de copias por fago de los epítomos seleccionados y mejorar así su inmunogenicidad, se procedió a sub-clonarlos en la proteína pVIII del fago M13. Las clonas correspondientes a los epítomos son C5 (epítomo no relacionado), C10, C11 y C12 (mimótopos del extremo amino terminal de A β (pE)3-42 y C3.15 (mimótopo que contiene la secuencia EFRH del péptido A β 1-42). Después de sub-clonarlos se verificó por medio de secuenciación que cada plásmido contuviera el inserto correspondiente a cada uno de los epítomos. La secuencia de nucleótidos de los insertos es correcta (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la secuenciación obtenida después de la sub-clonación de los oligómeros correspondientes a los epítomos experimentales en la proteína pVIII del fago M13.

Clona		
C5.2	T P S Y V S K	Secuencia de aminoácidos
	CCATGACCCCGAGCTATGTGAGCAAAAAGCTT	Secuencia de nucleótidos
C10	Q F R H D W Y	
	CCATGCAGTTTCGCCATGATTGGTATAAGCTT	
C11.2	Q F R H D D P	
	CCATGCAGTTTCGCCATGATGATCCGAAGCTT	
C12.2	Q F R V P Y P	
	CCATGCAGTTTCGCGTGCCGTATCCGAAGCTT	
3.15.3	S Y E F R H H	
	CCATGAGCTATGAATTCGCCATCATAAGCTT	

f) Evaluación de los epítomos sub-clonados en pVIII de M13 por Inmuno-blot

Con la finalidad de caracterizar y comprobar la reactividad de los epítomos C5.2, C10, C11.2, C12.2 y 3.15.3 expresados en la proteína pVIII del fago M13 se realizó una tinción de Coomassie para visualizar a las proteínas pIII y pVIII del fago M13. También se realizó un ensayo de inmuno-blot revelando con los anticuerpos anti-A β (pE)3-42, anti-M13 y anti-adyuvante.

En la figura 21A, se observa la presencia de las proteínas pIII y pVIII en los fagos M13 recombinantes, clonas C5.2, C10, C11.2, C12.2 y C3.15.3. Esta es semejante a la del fago M13 sin inserto alguno (Fig.21D). Respecto a la reactividad con el anticuerpo anti-M13, en el fago sin inserto M13 y en dos clonas, C11pIII y C11.2 pVIII se observa el mismo patrón, indicando que todas las proteínas del fago M13 están presentes (Fig.21F). Esto confirma que el ensamble del fago después de la sub-clonación fue adecuada.

En cuanto al reconocimiento por el anticuerpo anti-A β (pE)3-42, se observa la reactividad positiva para la clona C11.2 en el peso molecular correspondiente a la proteína pVIII del fago y para la clona C11 pIII en el peso molecular correspondiente a la proteína pIII, esto concuerda con el hecho de que el epítomo C11 fue sub-clonado en las proteínas pVIII y pIII respectivamente, y demuestra que ambas contienen el inserto de interés (Fig. 21B y E).

Respecto a la evaluación de los fagos con suero de conejo inmunizado con adyuvante observamos que hay reconocimiento inespecífico de algunas proteínas del fago, aunque ninguna corresponde al patrón observado con anticuerpo anti-Ab(pE)3-42 (Fig. 21C).

Estos resultados demuestran que la clona C11.2 pVIII tiene el inserto por lo que puede ser utilizada para la evaluación de la inmunogenicidad de su epítomo, expresado en la proteína pVIII del fago M13. Otras clonas que no contenían el inserto fueron descartadas.

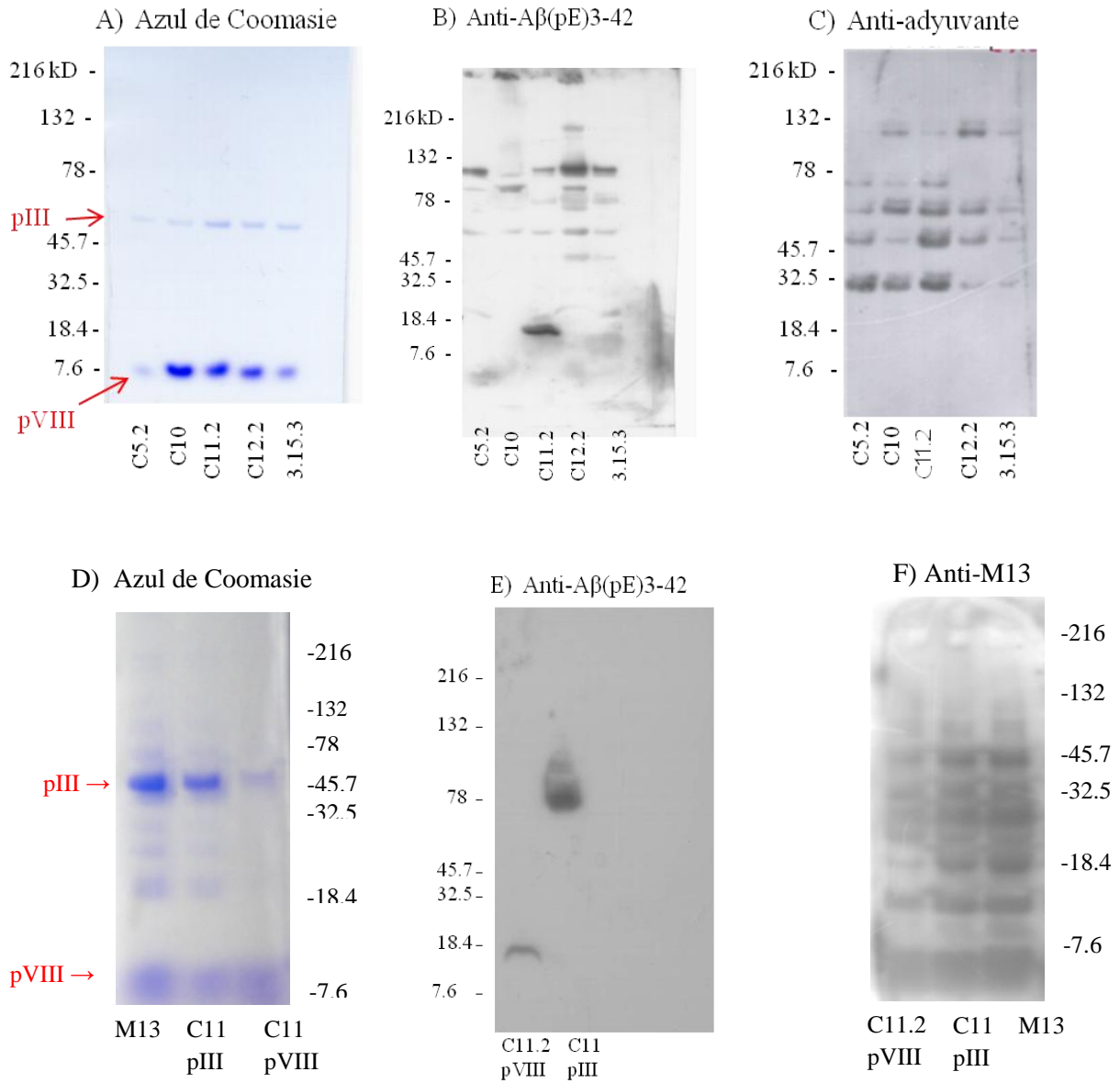


Figura 21. Caracterización de los epítomos expresados en la proteína pVIII del fago M13, revelado con azul de Coomassie y con los anticuerpos anti-Aβ(pE)3-42 y anti-M13.

g) Evaluación de IgG en los sueros de ratones BALB/cAnN inmunizados con fagos que expresan un epítipo de A β (pE)3-42 en pVIII (alta copia)

Con la finalidad de evaluar la inmunogenicidad del mimótopo QFRHDDP insertado en la clona C11.2 y expresado en alta copia en el fago M13, se procedió a inmunizar un grupo de ratones BalbC/AnN. Se efectuó un primer estímulo con 10^{11} ufc/ratón y 4 inmunizaciones con 10^{11} ufc/ratón de los fagos purificados a un título de 10^{13} ufc/mL en TBS estéril. Las clonas de fagos se usaron en 2 grupos experimentales de cinco ratones cada uno como sigue:

Control negativo: C5.2

Grupo experimental: C11.2

Nuevamente no observamos anticuerpos anti-A β (pE)3-42 y detectamos anticuerpos anti-M13 (Fig. 22).

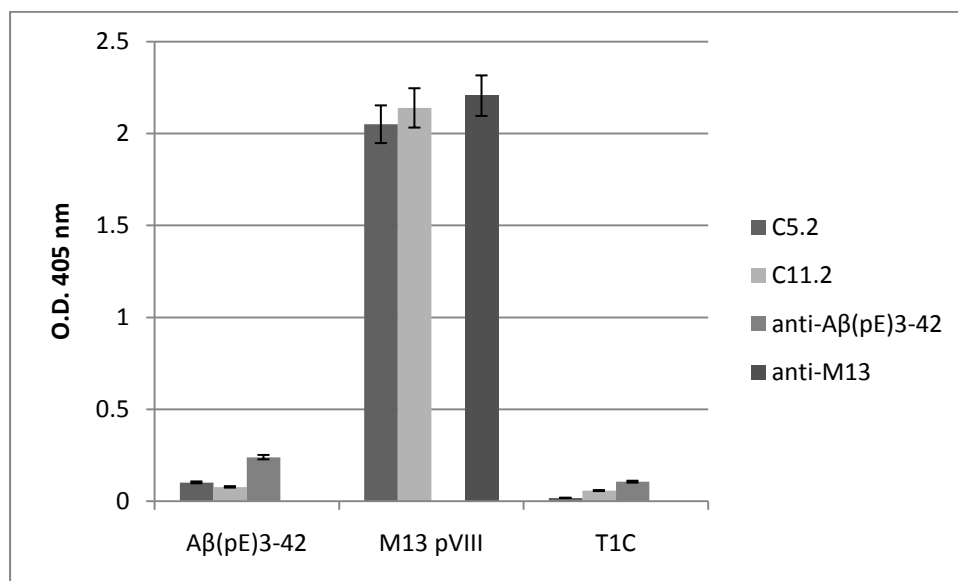


Figura 22. Reactividad por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con el epítipo de la clona C11.2 en M13 pVIII, con los péptidos A β (pE)3-42, fago M13 y el péptido no relacionado T1C. Los sueros se obtuvieron después de un 4^o refuerzo y se usaron en dilución 1:100. Los datos son el promedio \pm desviación estándar de cinco ratones por grupo y dos experimentos independientes.

h) Caracterización de los péptidos sintéticos PC11V y PN por ELISA de captura de anticuerpo

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad del epítipo de A β (pE)3-42 correspondiente a la clona C11.2, decidimos utilizar el péptido con la secuencia del inserto de dicha clona. A este péptido lo denominamos PC11V y tiene la secuencia QFRHDDPGGGSA, un mimótopo del extremo amino terminal de A β (pE)3-42 (secuencia piro₃EFRHDSGYEVHH₁₄). También se sintetizó un péptido de secuencia no relacionada, denominado PN y cuya secuencia es SITMGQNGGGSA. Primero se caracterizó la reactividad de ambos péptidos con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 por medio de ELISA.

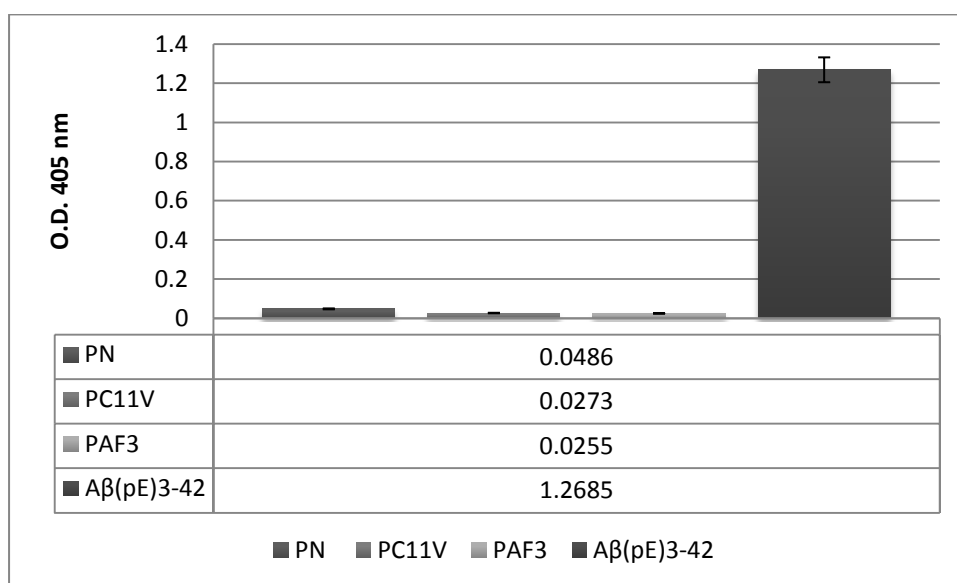


Figura 23. Reactividad de los péptidos sintéticos PN y PC11V con anti-A β (pE)3-42. PN y PAF3 son péptidos no relacionados, PC11V es el mimótopo N-terminal del péptido A β (pE)3-42. El resultado es el promedio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes.

En la figura 23 se observa que el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 no reconoce al péptido PC11V cuya secuencia es un mimótopo del extremo N-terminal del péptido A β (pE)3-42 de longitud completa. En contraste, hay reconocimiento claro del péptido A β (pE)3-42. Por esta razón se procedió a evaluar a PC11V (péptido experimental) por ELISA de inhibición.

i) Evaluación por ELISA de competencia de los péptidos PN y PC11V

Para evaluar la reactividad del péptido PC11V con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 en solución se realizó un ensayo de inhibición. En la figura 24 se muestran las lecturas obtenidas en uno de los experimentos y en la tabla 6 estos resultados se expresan como el porcentaje de inhibición respecto al péptido PN (cuya secuencia no está relacionada al motivo inmunodominante del β A-py3-42) de dos ensayos independientes.

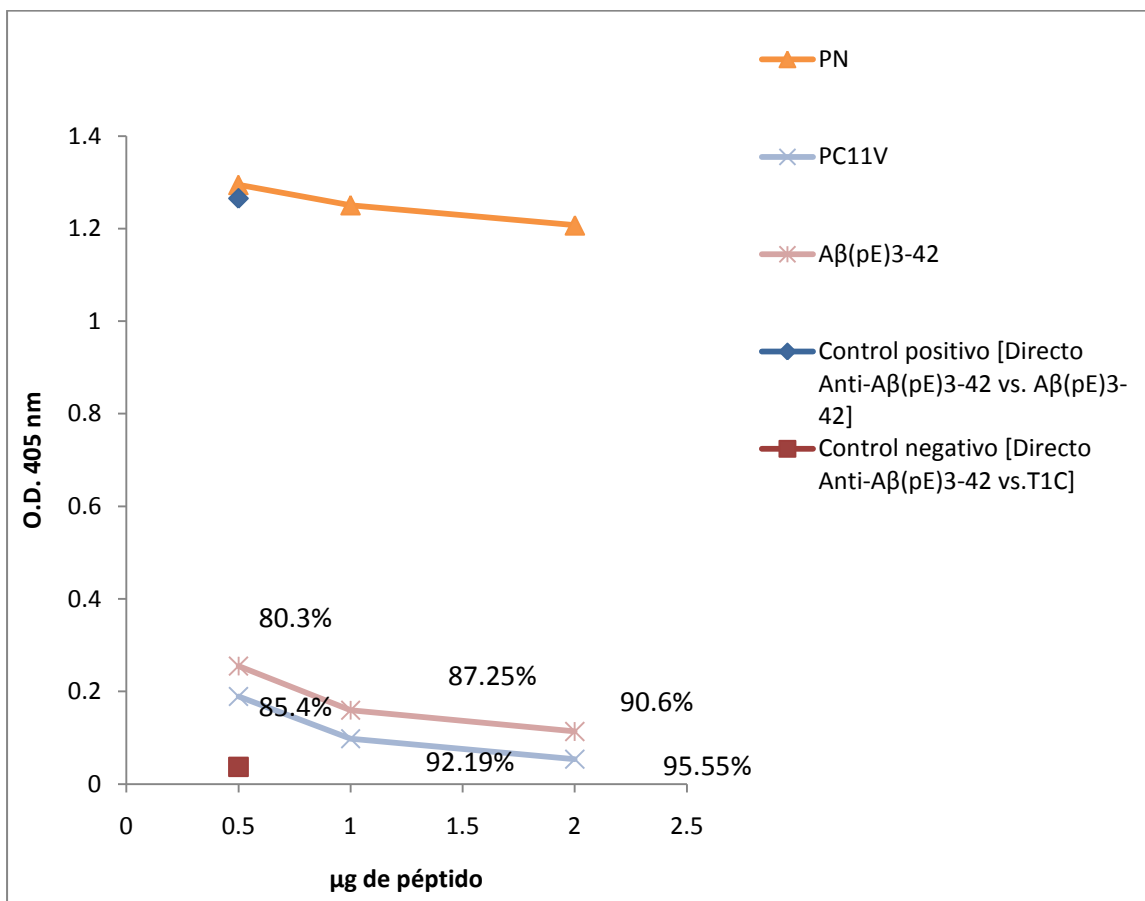


Figura 24. Lecturas de O.D. de las reacciones de inhibición obtenidas a 405 nm y porcentaje de inhibición de los péptidos PC11V y A β -(pE)3-42 de la interacción anti- A β (pE)3-42/A β -(pE)3-42. Los porcentajes se obtuvieron con respecto a la densidad óptica obtenida por el péptido no relacionado PN. Cada dato es el promedio \pm desviación estándar de dos ensayos independientes.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de epítomos de β A-py3-42 respecto del control negativo PN. El resultado es el promedio de dos ensayos independientes.

PÉPTIDO	SECUENCIA	% Inhibición		
		0.5 μ g	1 μ g	2 μ g
PC11V	QFRHDDPGGGSA	86.43 \pm 0.014	92.85 \pm 0.009	95.55 \pm 0
A β (pE)3-42	Piro ₃ EFRHDSGYEVHH ₁₄	79.39 \pm 0.013	87.09 \pm 0.002	90.60 \pm 0

Se observa interacción entre el péptido PC11V y el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 de manera dosis-dependiente, esto indica que aunque el péptido PC11V no es reconocido por el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 cuando está adsorbido en placa, sí lo es cuando ambos se encuentran en solución. Por lo tanto, el péptido PC11V puede ser utilizado para inmunización en animales de experimentación. La interacción entre el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 y su propio antígeno Abeta3-42 es similar.

j) Evaluación de IgG en los sueros de ratones BALB/cAnN inmunizados con péptido y adyuvante de Freund

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad del péptido PC11V procedimos a inmunizar un grupo de ratones BALB/cAnN. Los sueros se obtuvieron después de un primer estímulo con 20 μ g de péptido/ratón y 4 inmunizaciones con 20 μ g/ratón de los péptidos en PBS estéril + adyuvante de Freund 1:1 por vía de administración sub-cutánea. Los péptidos se usaron en grupos experimentales de tres ratones cada uno como sigue:

Control negativo: PN (péptido no relacionado, secuencia: SITMGQNGGGSA).

Grupo experimental: PC11V (secuencia de la clona C11: QFRHDDPGGGSA).

No observamos anticuerpos específicos al realizar ELISA de captura de anticuerpo utilizando los sueros de ratones inmunizados (Fig. 25). Los sueros se evaluaron por medio de dos formatos de ELISA: de captura de anticuerpo y doble sándwich, para descartar que los sueros no podían

detectar el A β (pE)3-42 adsorbido en placa. Sin embargo, bajo ninguno de los dos formatos pudimos detectar anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42. Por esta razón decidimos realizar una segunda evaluación, esta vez aumentando la dosis de los péptidos PC11V y PN y cambiando la vía de administración.

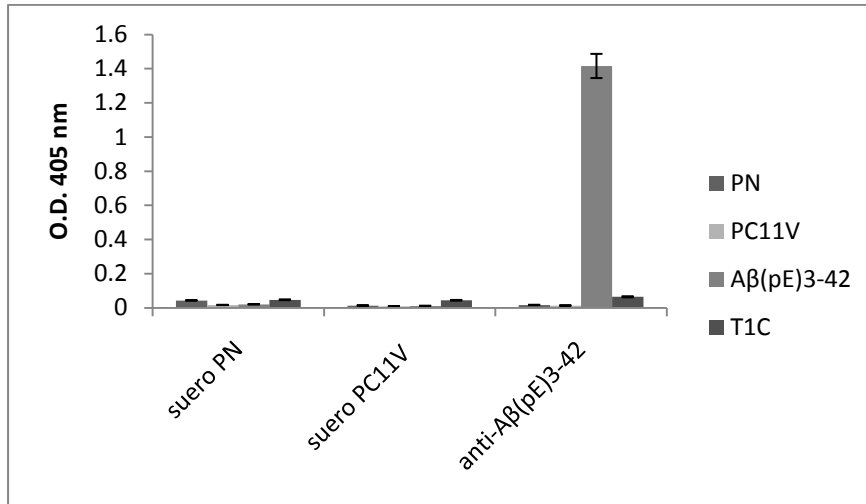


Figura 25. Reactividad por ELISA de los sueros de ratones inmunizados con los péptidos PN o PC11V y adyuvante de Freund vía s.c., contra los péptidos PN (no relacionado), PC11V (cuya secuencia es un motivo inmunodominante de A β N(pE)3-42) y T1C (péptido no relacionado). Los sueros se usaron en dilución 1:100. Cada dato es el promedio \pm desviación estándar de tres ratones por grupo y dos ensayos independientes.

k) Evaluación de IgG en los sueros de un segundo grupo de ratones BALB/cAnN inmunizados con péptido y adyuvante de Freund

Para poder descartar que la falta de inmunogenicidad observada en el grupo de ratones inmunizados anteriormente es porque la que la dosis no fue suficiente para estimularlos o a que la vía de administración no fue la adecuada, inmunizamos otro grupo de ratones BALB/cAnN cambiando ambas condiciones y utilizando los mismos péptidos. Los sueros se obtuvieron después de un primer estímulo con 40 μ g de péptido/ratón y 5 inmunizaciones con 40 μ g/ratón de los péptidos en PBS estéril + adyuvante de Freund 1:1 por vía de administración intraperitoneal. Los péptidos se usaron en grupos experimentales de cinco ratones cada uno como sigue:

Control negativo: PN (péptido no relacionado, secuencia: SITMGQNGGGSA).

Grupo experimental: PC11V (secuencia de la clona C11: QFRHDDPGGGSA).

Nuevamente no obtuvimos anticuerpos anti-A β (pE)3-42 (Fig. 26).

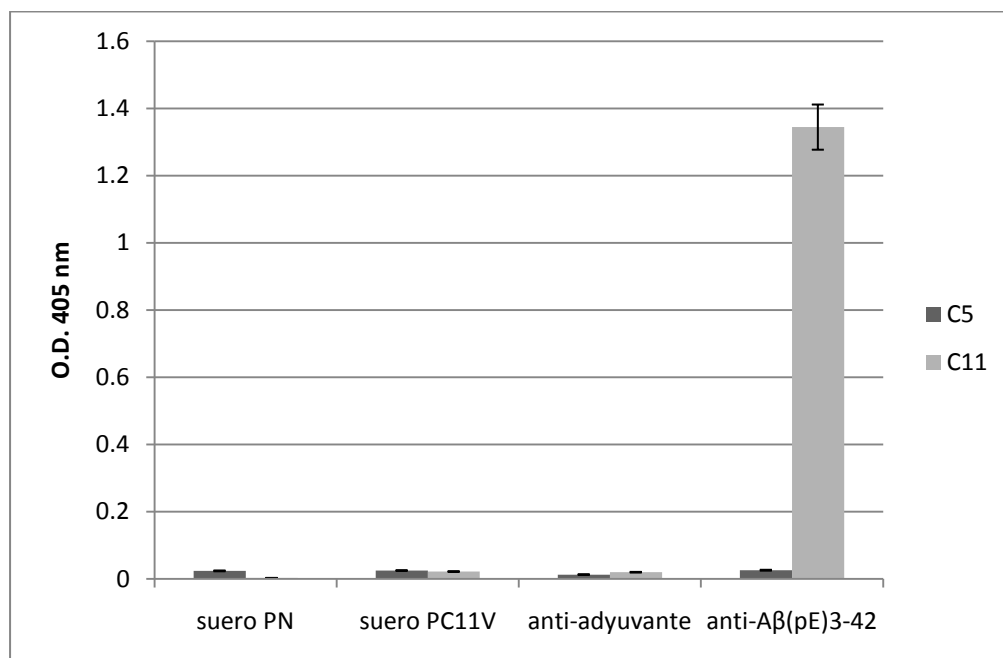


Figura 26. Reactividad por ELISA doble sándwich de los sueros de ratones inmunizados con 40 μ g/ratón de los péptidos PN (péptido no relacionado) o PC11V (mimótopo de A β (pE)3-42) y adyuvante de Freund vía i.p., después de un 5^o refuerzo. Los sueros se usaron en dilución 1:50 y se evaluaron contra las clonas C11 (cuyo inserto es un motivo inmunodominante de A β 3-42) y C5 (secuencia no relacionada). Cada dato es el promedio de cinco ratones por grupo y dos ensayos independientes \pm desviación estándar.

1) Evaluación de IgG en los sueros de conejo Nueva Zelanda inmunizados con péptido y adyuvante de Freund

Con la finalidad de descartar que la especie de los animales de experimentación es la causa de la falta de reconocimiento inmunológico del epítipo de interés (PC11V) decidimos inmunizar conejos Nueva Zelanda, esta vez usando como péptido control un péptido de similar número de residuos, el fragmento 11-25 del péptido A β 1-42.

Los sueros se obtuvieron después de un primer estímulo con 100 μ g de péptido/conejo y 4 inmunizaciones con 100 μ g de los péptidos en PBS estéril + adyuvante de Freund 1:1 por vía de administración sub-cutánea. En el 3er. o 4^o refuerzo se aplicó una dosis de 200 μ g de péptido a

los grupos inmunizados con 11-25 o PC11V, respectivamente. Los péptidos se usaron en grupos experimentales de dos conejos cada uno como sigue:

Control negativo: PN (péptido no relacionado, secuencia: SITMGQNGGGSA).

Grupos experimentales:

PC11V (secuencia de la clona C11: QFRHDDPPGGGSA) y,

11-25 (secuencia de la región 11-25 de β A 1-42: EVHHQKLVFFAEDVG).

Nuevamente no encontramos anticuerpos anti- $A\beta$ (pE)3-42 en los conejos inmunizados con el péptido PC11V, sin embargo hubo anticuerpos anti-11-25 en uno de los conejos inmunizados con el péptido 11-25 (conejo 2) (Fig. 27). Para estudiar la interacción de los anticuerpos anti-11-25 con diferentes péptidos decidimos realizar un ELISA de inhibición.

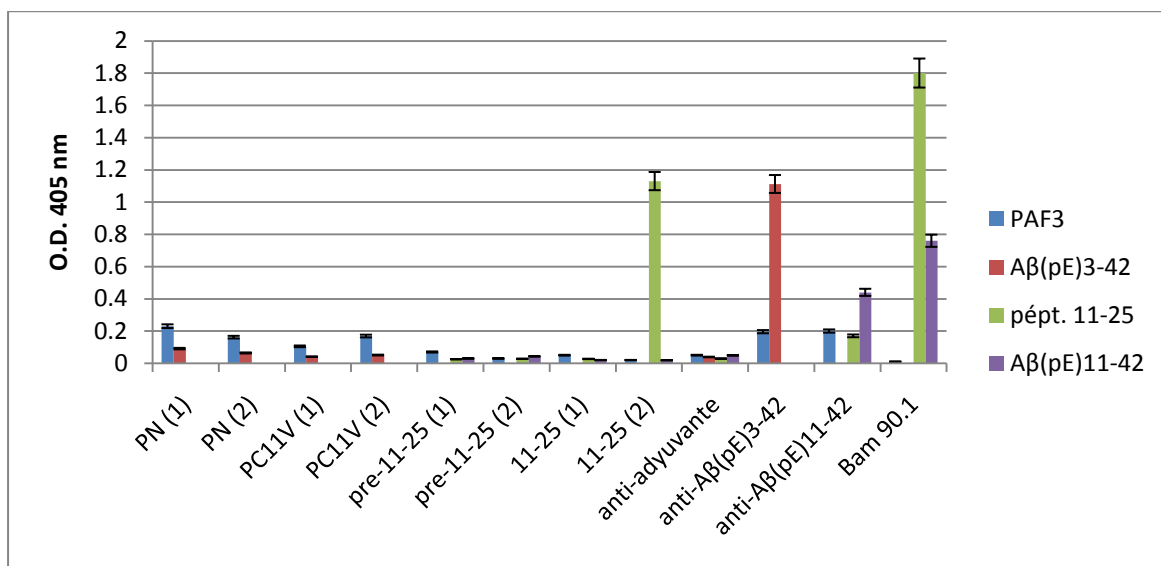


Figura 27. Reactividad por ELISA de los sueros de conejos inmunizados con los péptidos PN, PC11V u 11-25. El suero fue evaluado contra los péptidos PAF3 (no relacionado), A β (pE)3-42, el fragmento 11-25 y A β (pE)11-42 después de un 4° refuerzo. Los sueros anti-A β (pE)3-42, anti-A β (pE)11-42 y anti-adyuvante, así como el anticuerpo monoclonal Bam90.1 (que reconoce la región 13-28 de A β) se usaron como controles. Los sueros PN, PC11V, anti-A β (pE)3-42 y anti-adyuvante se usaron en dilución 1:50, los sueros 11-25, su correspondiente anti-adyuvante, anti-A β (pE)11-42 y Bam90.1 se usaron en dilución 1:200. Cada dato es el promedio de dos conejos por grupo y tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

m) Evaluación del suero anti-A β 11-25 en su interacción con diferentes péptidos

Para evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-A β 11-25 en solución con diferentes especies de A β , se realizó un ensayo de competencia. En la figura 28, se observa que el fragmento A β 11-25, pre-incubado con el anticuerpo anti-A β 11-25, es capaz de inhibir la interacción anti-A β 11-25 con el péptido A β 11-25 (este último inmovilizado en la placa de microtitulación) aproximadamente un 75%. El péptido A β 1-42 la inhibe en un rango de 28.2% a 41.2%. El fragmento A β 11-42 (no piroglutamado) y los péptidos piroglutamados A β (pE)11-42 y A β (pE)3-42 inhiben dicha interacción en un rango de 10% a 23% aproximadamente, ambos de manera similar.

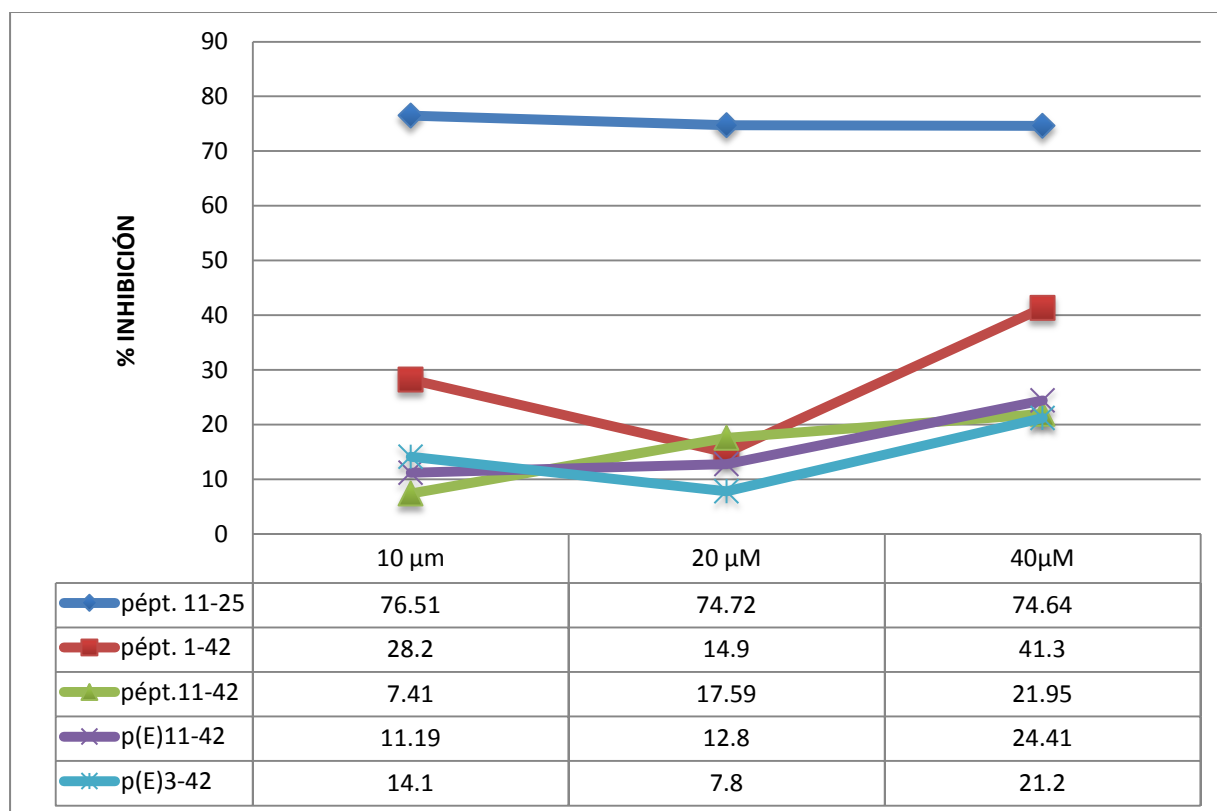


Figura 28. Porcentaje de inhibición obtenido por ELISA de competencia del suero de conejo inmunizado con el péptido A β 11-25. El suero fue evaluado con el fragmento A β 11-25 y los péptidos A β 1-42, A β 11-42, A β (pE)11-42 y A β (pE)3-42. El suero anti-A β 11-25 se usó en dilución 1:200.

En la figura 29, se observa que la reactividad del suero anti-A β 11-25 con los péptidos A β 1-42, A β (pE)11-42 y A β (pE)3-42, cuando estos están inmovilizados en la placa, es similar a la reactividad con el péptido no relacionado PAF3. Esto contrasta con la reactividad del suero anti-A β 11-25 con los péptidos A β 11-42 (no piroglutamado) y el fragmento A β 11-25.

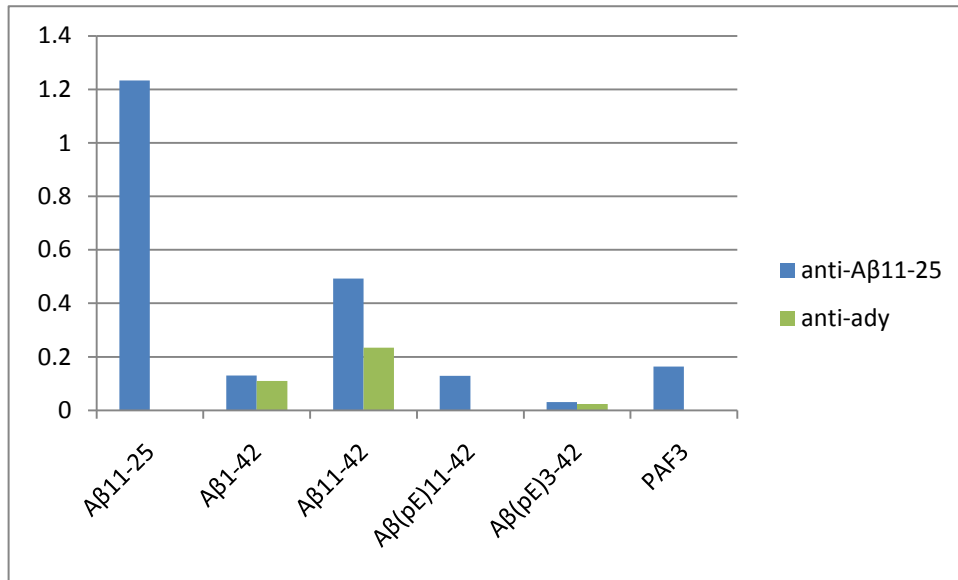


Figura 29. Reactividad por ELISA de captura de anticuerpo del suero de conejo inmunizado con el péptido 11-25. El suero fue evaluado contra el fragmento 11-25 y los péptidos A β 1-42, A β 11-42, A β (pE)11-42 y A β (pE)3-42. El suero anti-11-25 se usó en dilución 1:200.

Esto parece indicar que los anticuerpos anti-A β 11-25 se unen a los péptidos A β 1-42, A β (pE)11-42 y A β (pE)3-42 en disolución, pero no así cuando los péptidos están inmovilizados en la placa.

DISCUSIÓN

Se sabe que las especies amino-truncadas y piroglutamadas de β A se encuentran principalmente en cerebros de personas que han desarrollado la EA (Piccini, 2005). Estas especies se generan a nivel intracelular en el aparato de Golgi por medio de la glutaminil ciclasa (Cynis et al., 2008) y ejercen un efecto neurotóxico por estrés oxidante, apoptosis (Youssef et al., 2008) y necrosis (Acero et al., 2009) causando muerte celular y deterioro cognitivo en modelos animales (Youssef et al., 2008). En pacientes con EA se acumulan aún antes de la aparición de los síntomas clínicos con efectos igualmente degenerativos, sugiriendo que son especies de β -amiloide involucradas en el desarrollo de la EA (Piccini et al., 2005). Por lo tanto, se consideran un blanco importante en la inmunoterapia de esta enfermedad.

La inmunoterapia es una estrategia prometedora para la prevención y/o tratamiento de la EA en el futuro. Se ha demostrado que la inmunización activa con el péptido β -amiloide o sus fragmentos inmunodominantes es capaz de disminuir la patología y mejorar las funciones cognitivas (Cribbs et al., 2005; Gelinas et al., 2004; Lemere et al., 2004; Li et al., 2010; Tabira et al., 2010). Sin embargo, las estrategias descritas anteriormente no están considerando las especies truncadas del péptido β -amiloide. Es por esto que se considera que la inmunización activa con fragmentos de $A\beta(pE)3-42$ podría ser importante para disminuir el efecto de estas especies también.

En un estudio anterior se identificaron mimótopos desplegados en el fago M13 de $A\beta N(pE)3-42$ correspondientes a la región N-terminal del péptido (Acero et al., 2009). En el presente trabajo se evaluó la inmunogenicidad de 5 de los péptidos identificados. Los resultados demuestran que ninguno de los péptidos seleccionados expresados en la proteína pIII del fago M13 tuvieron la capacidad de inducir la producción de anticuerpos anti- $A\beta(pE)3-42$ en conejos Nueva Zelanda y ratones BALB/cAnN. No obstante, las proteínas del fago M13 desencadenaron una respuesta inmune con producción de anticuerpos IgM y posteriormente de IgG.

Esto puede deberse a que la expresión de los péptidos es en baja copia (de 3 a 5 péptidos expresados en cada fago), de modo que el tamaño del fago impide que el sistema inmune pueda reconocer a los péptidos. Es muy probable que, de manera predominante, estén siendo

reconocidas las proteínas pVIII de la cápside, las cuales se encuentran más abundantemente a lo largo del filamento de M13.

Por lo tanto, se procedió a la sub-clonación de los mimótopos en la proteína pVIII del fago M13. Sin embargo, tampoco se generaron anticuerpos anti-A β (pE)3-42, pero sí anti-M13. Estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios anteriores donde de igual manera evalúan la inmunogenicidad de epítomos de 9 a 12 residuos de longitud expresados en M13, obteniendo anticuerpos que reconocen al inserto (Dam-Tuxen et al., 2009; Villa-Mancera et al., 2011).

Sin embargo, para descartar la posibilidad de que las proteínas del fago interfieren con el reconocimiento de nuestro epítomo, procedimos a la evaluación de la inmunogenicidad de péptidos sintéticos, uno de los cuales tiene la secuencia de uno de los insertos identificados.

La inmunización de ratones con una dosis de 20 μ g de péptido/ratón con adyuvante de Freund y por vía sub-cutánea, no indujo una respuesta inmune contra el péptido evaluado. Cabe la posibilidad de que la dosis no haya sido suficiente y/o que la vía de administración no fuera la adecuada para montar una respuesta inmune. Al aumentar la dosis al doble y cambiar la vía de administración a intraperitoneal tampoco se obtuvieron anticuerpos contra el péptido sintético. En este caso, el genotipo murino podría ser un factor que esté impidiendo el adecuado reconocimiento del antígeno (Kindt, 2007). Por lo tanto, se procedió a evaluar la inmunogenicidad del péptidos sintéticos en conejos Nueva Zelanda, incluyendo esta vez otro péptido sintético que corresponde a la región 11—25 del péptido β A de longitud completa. Nuevamente, hubo ausencia de anticuerpos contra el péptido PC11V (que corresponde al mimótopo identificado). Sin embargo, encontramos anticuerpos anti-A β 11-25, indicando que el tamaño del péptido no es la principal razón para la ausencia de la respuesta inmune hacia el mimótopo. También podemos descartar que las características biológicas a las cuales se enfrenta el antígeno, tales como: la constitución genética de los animales de experimentación, la dosis, la vía de administración y el adyuvante (Kindt et al., 2007), son los factores que están determinando la falta de inmunogenicidad del péptido PC11V.

Los mimótopos evaluados corresponden a la región inmunodominante del extremo N-terminal de A β (pE)3-42 clasificada como epítomo de células B. Se sabe que estos epítomos se componen de aminoácidos hidrofílicos que se encuentran en la superficie de la proteína, cuya

movilidad maximiza la complementariedad con el anticuerpo, que pueden ser secuenciales o conformacionales y que la afinidad de un anticuerpo a un epítipo flexible suele ser más baja que a un epítipo rígido (Kindt et al., 2007). En la tabla 7 se observa que las secuencias de las clonas C10 y C11 (QFRHDWY y QFRHDDP, respectivamente) son secuencias que coinciden en un 57% con la secuencia del péptido N-terminal de A β (pE)3-42 (secuencia p(E)FRHDSG) y que mostraron una reactividad alta con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42. La secuencia de las clonas C12 (QFRVPYP) y C17 (QFRSDST) coinciden en un 29% y 57%, respectivamente, y mostraron una reactividad positiva pero menor con el suero anti-A β (pE)3-42. Aunque la clona C17 también posee cuatro residuos iguales a la secuencia N-terminal de A β (pE)3-42 como las clonas C10 y C11, claramente se observa que la interacción de la clona C17 con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 es menor.

De los resultados de los ensayos de ELISA de inhibición de estos mimótopos de la interacción del anticuerpo anti-A β (pE)3-42 y el péptido A β (pE)3-42, se encontró que a pesar de que la clona C11 mostró una reactividad semejante a la clona C10 en los ensayos de ELISA de captura de anticuerpo, el porcentaje de inhibición en ELISA de competencia fue de 37.1% en el caso de la clona C11 y 84.4% en el caso de la clona C10. La diferencia en la estructura primaria de estos péptidos radica en la presencia de triptofano (W) y tirosina (Y) en la clona C10, en vez de ácido aspártico (D) y prolina (P) en la clona C11 (Tabla 7). Esto sugiere que los residuos adyacentes W y Y pudieran resultar críticos en la conformación adquirida por el mimótopo en solución de tal forma que permite un mejor reconocimiento de este por parte del anticuerpo anti-A β (pE)3-42. Otro aspecto a considerar es el hecho de que los antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. Esta asociación específica depende de fuerzas intermoleculares tales como: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas; que en general son efectivas a distancias cortas (Calderón, 2007). Es posible que la diferencia en el tipo de residuos que constituyen a cada uno de los mimótopos evaluados tiene influencia en el arreglo espacial de la molécula y con ello en la interacción antígeno-anticuerpo, esto podría afectar la obtención de anticuerpos específicos contra el péptido silvestre A β (pE)3-42. No obstante, este análisis requiere ser evaluado mediante otros estudios.

Tabla 7. Análisis comparativo de la secuencia, reactividad y porcentaje de inhibición de los mimótopos evaluados en este trabajo.

Clona	Secuencia	% de residuos contenidos en el epítipo N-terminal de Aβ(pE)3-42	O.D. 405 ELISA de captura de antígeno	% de inhibición de la interacción anti-Aβ(pE)3-42/Aβ(pE)3-42
C10	Q F R H D W Y	57 %	1.42	84.4 %
C11	Q F R H D D P	57 %	1.39	37.1 %
C12	Q F R V P Y P	29 %	0.78	32.5 %
C17	Q F R S D S T	57 %	0.82	33.1 %

<p>p(E) F R H D S G Secuencia del epítipo de células B de Aβ(pE)3-42 N-terminal</p>

La reactividad de estas clonas, seleccionadas previamente en el laboratorio con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42, sugiere que los residuos correspondientes a los diferentes mimótopos y que coinciden con el epítipo de A β (pE)3-42 son suficientes para proveer una interacción antígeno-anticuerpo. Además, se sabe que el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 únicamente reconoce a su propio antígeno, A β (pE)3-42 y no a A β (pE)11-42, otro péptido A β amino-truncado piroglutamado, indicando que la región inmunodominante del péptido A β (pE)3-42 corresponde a la región amino-terminal (Acero et al., 2009, Perez-Garmendia et al., 2010). Si el reconocimiento antígeno-anticuerpo está basado en los residuos 3-10 de A β (pE)3-42 y al menos tres de los mimótopos estudiados coinciden en un 57%, se esperaría que fueran capaces de desencadenar una respuesta inmune humoral. Sin embargo, en los estudios experimentales descritos en este trabajo no fue posible inducir anticuerpos anti-A β (pE)3-42 utilizando los mimótopos seleccionados.

Por otro lado, y más importante aún ¿qué hace diferentes a todas las secuencias de los mimótopos ya descritos, del epítipo amino-terminal de $A\beta(pE)_{3-42}$, además de los residuos claramente distintos? Es la ausencia de piroglutamato (pE), que en el caso de las secuencias de las clonas seleccionadas está sustituido por glutamina (Q).

Estas observaciones, junto con los resultados obtenidos en la evaluación de sueros de ratones y conejos inmunizados con fagos en baja y alta copia, que expresan estos mimótopos y con el péptido sintético que corresponde al inserto de una de las clonas, nos lleva a la hipótesis de que el residuo piroglutamato (pE) es indispensable para la inducción de anticuerpos anti- $A\beta(pE)_{3-42}$.

En este estudio también se demostró que el péptido PC11V, con la secuencia del inserto de la clona C11 además de una extensión de 5 residuos correspondientes a la proteína pIII del fago M13 (QFRHDDPGGSA), es un epítipo conformacional que fue reconocido por el anticuerpo anti- $A\beta(pE)_{3-42}$ solo en disolución y no cuando estaba inmovilizado en la placa de microtitulación. A pesar de haber demostrado la especificidad de este péptido, tampoco pudimos inducir anticuerpos anti- $A\beta(pE)_{3-42}$ en los animales de experimentación. Es muy probable que este péptido sintético, además de requerir al residuo piroglutamato, también requiere una conformación específica para ser inmunogénico.

La evaluación del suero anti- $A\beta_{11-25}$ también demuestra que un péptido de 15 residuos puede adquirir una conformación diferente cuando se encuentra libre, a diferencia de cuando forma parte de un péptido de mayor longitud. Por ejemplo, el suero anti- $A\beta_{11-25}$ es capaz de reconocer ampliamente a su propio antígeno ($A\beta_{11-25}$) en placa y en disolución. Sin embargo, en los ensayos de ELISA de captura de anticuerpo se encontró que el suero anti- $A\beta_{11-25}$ no es capaz de reconocer a los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta(pE)_{11-42}$, ni $A\beta(pE)_{3-42}$, que contienen el epítipo 11-25, cuando estos se encuentran inmovilizados en la placa, pero sí los reconocen cuando se encuentran en disolución. Comparando la reactividad del suero anti- $A\beta_{11-25}$ con el péptido $A\beta_{11-42}$ no piroglutamado y $A\beta(pE)_{11-42}$ adsorbidos en la placa de microtitulación, es probable que el epítipo 11-25 contenido en el péptido $A\beta(pE)_{11-42}$ no esté disponible para su reconocimiento por el anticuerpo anti- $A\beta_{11-25}$, quizás porque se encontraba en un estado de agregación influido por el residuo piroglutamato (He y Barrow, 1999) que imposibilita el reconocimiento del epítipo (Necula et al., 2007). Esto sugiere que el reconocimiento del epítipo

A β 11-25 por el anticuerpo específico anti-A β 11-25 se ve influido por los residuos que componen al resto de la molécula y en particular por el residuo piroglutamato.

Cabe señalar que a través de la bioselección de péptidos desplegados en fago no todos los mimótopos imitan realmente al epítipo relevante del antígeno original. Aunque tales péptidos son capaces de inhibir la unión de los anticuerpos que los caracterizaron con el epítipo original, fallan en inducir una respuesta inmune específica hacia el antígeno original. Se sabe que los epítipos de células B son conformacionales por naturaleza, por lo cual es posible que los anticuerpos dirigidos contra estos reconocen ciertas conformaciones de epítipos que no se despliegan en el fago en el mismo contexto estructural que presenta el antígeno natural. Estas limitaciones subrayan la principal dificultad de la tecnología de despliegue de epítipos en fago, que dificulta la selección de mimótopos verdaderos, basada exclusivamente en sus características de unión a anticuerpos. Por otro lado, se plantea que la inmunización con mimótopos no garantiza la inducción de anticuerpos que despliegan el parátipo apropiado para el antígeno original, enfatizando también una posible contribución del modelo animal en el resultado de la inmunización (Latzca, et al., 2011).

Otros aspectos importantes son la posibilidad de que el péptido A β (pE)3-42 presente un epítipo único porque los anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42 no reconocen A β 1-42 ni A β (pE)11-42 (Perez-Garmendia, et al., 2010) y que el estado estructural del inmunógeno utilizado permite obtener anticuerpos que reconocen preferentemente tal conformación (Janus et al., 2000).

Se ha reportado que el epítipo inmunodominante del péptido A β (pE)3-42 corresponde a la región amino-terminal del mismo, representada por los mimótopos estudiados en el presente trabajo (Acero et al., 2009). Sin embargo, es probable que este epítipo inmunodominante consista de un arreglo estructural muy específico, que al parecer está influido por la presencia del residuo piroglutamato y que adquiere una conformación que resulta inmunogénica en su estado natural. Esto parece indicar que los mimótopos desplegados en el fago no presentan la conformación natural de este epítipo de células B de A β (pE)3-42, necesaria para inducir anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42.

En resumen, podemos concluir que los mimótopos correspondientes a la región N-terminal de A β (pE)3-42 no son inmunogénicos bajo las condiciones evaluadas en este estudio.

Como ya se mencionó, el 90% de los epítomos de células B son epítomos conformacionales constituidos por un grupo de residuos separados en la secuencia primaria del antígeno pero cercanos espacialmente como resultado del plegamiento de la proteína. También se ha descrito que la función de unión a anticuerpo de un residuo antigénico está determinada no solo por el mismo, sino por los residuos que lo rodean (Ansari y Raghava, 2010). Por lo tanto, y a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere incluir en el diseño de un nuevo mimótopo (que podría ser la secuencia de la clona C10) un residuo piroglutamato (pE) N-terminal y presentar a la molécula en repeticiones, para favorecer un arreglo en el espacio capaz de asemejar la conformación natural del epítomo de A β (pE)3-42. Esta repetición de residuos le añade tamaño molecular y complejidad química, lo cual es importante porque se sabe que la secuencia repetida de un epítomo es capaz de aumentar la inmunogenicidad de una molécula y que a su vez, las células B son activadas eficientemente por antígenos altamente ordenados de estructura repetida (Agadjanyan et al., 2005; Hong-Duck et al., 2007; Kindt et al., 2007; Bach et al., 2009; Bachmann y Jennings, 2010; Hashiguchi et al., 2010).

Se considera que los mimótopos desplegados en fagos filamentosos M13 no son apropiados para su evaluación en ensayos clínicos en humanos, porque aunque los fagos M13 son altamente inmunogénicos debido a los epítomos de células T en las proteínas de su superficie, poseen ADN externo y resistencias a antibióticos. Por esta razón y tomando en cuenta la posibilidad de que una vacuna de epítomo pueda llegar a ser evaluada en humanos, se propone la conjugación del mimótopo en cuestión a sistemas acarreadores alternativos, tales como la hemocianina de lapa gigante (KLH) o la proteína estreptocócica de unión a albúmina (ABP) (Knittelfelder et al., 2009).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró que los mimótopos de A β (pE)3-42, de 7 residuos de longitud y seleccionados anteriormente en el laboratorio no son capaces de inducir anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42. Es probable que el residuo piroglutamato (pE) del extremo amino-terminal de A β (pE)3-42 y la conformación de esta región inmunodominante sean imprescindibles para la estimulación del sistema inmune en la producción de anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42.

El péptido A β 11-25 con la secuencia de la región central de A β 1-42 es capaz de inducir anticuerpos que reconocen al péptido A β 11-42 lo que indica que la región 11-25 es epítipo del A β 11-42.

PERSPECTIVAS

Con la finalidad de obtener un inmunógeno que sea capaz de desarrollar anticuerpos específicos anti-A β (pE)3-42, se sugiere:

- El diseño de un nuevo mimótopo que:
 - a) Contenga la secuencia de la clona C10 con la inclusión de un residuo piroglutamato (pE) en el extremo amino-terminal en lugar del residuo glutamina (Q),
 - b) Una presentación del mimótopo en una serie de repeticiones, con la finalidad de aumentar su inmunogenicidad,
 - c) Conjugado a una proteína acarreadora diferente del fago M13 que provea tamaño molecular y estimulación de células T para mejorar la inmunogenicidad sin el riesgo de material de ADN exógeno y de genes de resistencia a antibióticos.

- Y el análisis de la interacción A β (pE)3-42 con el anticuerpo anti-A β (pE)3-42 para determinar el número y tipo de residuos que participan en esta unión antígeno-anticuerpo. Esto sería importante para el diseño de inmunógenos a partir de mimótopos.

REFERENCIAS

1. Acero G., Manoutcharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M.E., Govezensky, T., Coronas, G., Luz-Madrigal, A. Cribbs, D.H., Gevorkian, G. Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified A β -specific antibodies produced in rabbits. *Journal of Neuroimmunology*. 2009; 213:39-46.
2. Agadjanyan, MG., Ghochikyan, A., Petrushina I., Vasilevko, V., Movsesyan N., Mkrtychyan M., Saing T., Cribbs DH. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B Cell Epitope from β -Amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *Journal of Immunology*. 2005; 174(3):1580-6.
3. Alzheimer's Association. <http://www.alz.org/espanol/care/cuidadores.asp>
4. Ansari H.R. and Raghava G.P.S. Identification of conformational B-cell epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Research*. 2010 6:6.
5. Asuni A.A., Boutajangout A., Scholtzova H., Knudsen E., Li Y.S., Quatrain D., Frangione B., Wisniewski T., Sigurdsson E.M. Vaccination of Alzheimer's model mice with A β derivative in alum adjuvant reduces A β burden without microhemorrhages. *The European Journal of Neurosciences*. 2006; 24(9):2530-2542.
6. Bach, P., Tscha \ddot{u} pe, J., Kopietz, F., Braun, G., Baade JK., Wiederhold K-H., Staufenbiel M., Prinz M., Deller T., Kalinke U., Buchholz, C.J. and Mu \ddot{u} ller U.C. Vaccination with A β -Displaying Virus-Like Particles reduces soluble and insoluble cerebral A β and lowers plaque burden in APP transgenic mice. *The Journal of Immunology*. 2009; 182:7613-7624.
7. Bachmann MF and Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews. Immunology*. 2010; 10(11):787-96.
8. Bacskai B.J., Kajdasz S.T., Christie R.H., Carter C., Games D., Seubert P., Schenck D., Hyman B.T. Imaging of amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nature Medicine*. 2001; 7(3):369-72.
9. Bard F., Cannon C., Barbour R.L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine*. 2000; 6:916-919.
10. Betts V., Leissring M.A., Dolios G., Wang R., Selkoe D.J. and Walsh D.M. Aggregation and catabolism of disease-associated intra-A β mutations: reduced proteolysis of A β 21G neprilysin. *Neurobiology of Disease*. 2008; 31(3):442-50.
11. Block M.L. NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*. 2008; 9(Suppl 2):S8.

12. Blurton-Jones M. and LaFerla F.M. Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Current Alzheimer Research*. 2006; 3(5):437-48.
13. Brody DL, Holtzman DM. Active and Passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev. Neurosci*. 2008; 31:175-193.
14. Calderón Pascacio RV. Instituto de Biotecnología, UNAM, 2007. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
15. Carmen S. and Jermutz L. Concepts in antibody phage display. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2002; 1(2):189-203.
16. Castellani Rudy J., Rolston Raj K. and Smith Mark A. Alzheimer Disease. *Disease-a-month : DM*. (2010) 56(9):484-546.
17. Cedazo-Minguez, A. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007; 11(6):1227-1238.
18. Chackerian B., Rangel M., Hunter Z. and Peabody D.S. Virus and virus-like particle-based immunogens for Alzheimer's disease induce antibody responses against amyloid-beta without concomitant T cell responses. *Vaccine*. 2006; 24(37-39):6321-31.
19. Chang W.P., Downs D., Huang X.P., Da H., Fung K.M, Tang J. Amyloid-beta reduction by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitor. *FASEB Journal*. 2007; 21:3184-3196.
20. Choi J-S, Braymer J.J., Nanga R.P.R., Ramamoorthy A. and Lim M.H. Design of small molecules that target metal-A β species and regulate metal-induced A β aggregation and neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*. 2010; 107:51.
21. Christensen DZ, Bayer TA and Wirths O. Intracellular A β triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1K1 mouse model of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. 2008; doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.022.
22. Cribbs, D.H., Agadjanyan M.G. Immunotherapy of Alzheimer's disease: potential problems and possible solutions. *Current Immunology Reviews*. 2005; 1:139-155.
23. Cribbs, D.H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N., Babikyan, D., Kesslak, P., Kieber-Emmons, T., Cotman, C.W., Agadjanyan, M.G. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunizations with β -amyloid. *International Immunology*. 2003; 15(4):505-514.
24. Cribbs D.H., Ghochikyan A., Vasilevko V., Tran M., Petrushina I., Sadzikava N., Babikyan D., Kesslak P., Kieber-Emmons T., Cotman C.W. and Agadjanyan M.G. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid. *International Immunology*. 2003; 15(4):505-514.
25. Cynis H., Scheel E., Saido TC., Schilling S., Demuth HU. Amyloidogenic Processing of Amyloid Precursor Protein: Evidence of a Pivotal Role of Glutaminyl Cyclase in Generation of Pyroglutamate-Modified Amyloid- β . *Biochemistry*. 2008; 47:7405-7413.
26. D'Arrigo C., Tabaton M., Perico A. N-terminal truncated pyroglutamil β -amyloid peptide A β py3-42 shows a faster aggregation kinetics than the full-length A β 1-42. *Wiley Interscience*. 2009; www.interscience.wiley.com DOI 10.1002/bip.21271.

27. Dam-Tuxen R., Riise E. Antibodies against a Class II HLA-Peptide Complex Raised by Active Immunization of Mice with Antigen Mimicking Peptides. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009; 70(2):93-100.
28. Dawson GR., Seabrook GR., Zheng H., Smith DW., Graham S., O'Dowd G., Bowery BJ., Boyce S., Trumbauer ME., Chen HY., et.al. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 1999; 90(1):1-13.
29. Deane R., Wu Z. and Zlokovic B.V. RAGE (yin) versus LRP (yan) balance regulates Alzheimer amyloid {beta}-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 2004; 35:2628-2631.
30. De Felice FG., Velasco PT., Lambert MP., Viola K., Fernandez SJ., Ferreira ST., Klein WL. A β Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Mechanism That is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(15):11590-11601.
31. DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Dodart J-C, Paul S.M. and Holtzman D.M. Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 96:15.
32. DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Paul S.M. and Holtzman D.M. Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*. 2002; 295(5563):2264-7.
33. De Stropper B., Vassar R. and Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*. 2010; 6(2):99-107.
34. Devore E.E., Grodstein F., Van Rooij F.J.A., Hofman A., Stampfer M.J., Witteman J.C.M. and Breteler M.M.B. Dietary antioxidants and long-term risk of dementia. *Archives of Neurology*. 2010; 67(7):819-825.
35. Dodart, J.C., Bales K.R., Gannon K.S., Greene S.J., DeMattos R.B. Mathis C., DeLong C.A., Wu X., Holtzman D.M., Paul S.M. Immunization reverses memory deficits without reducing A β burden in Alzheimer's disease model. *Nature neuroscience*. 2002; 5(5):452-457.
36. Emre Murat, Heckers Stephan, Mash Deborah C. Cholinergic innervation of the amygdaloid complex in the human brain and its alterations in old age and Alzheimer's disease. *The Journal of Comparative Neurology*. 1993; 336(1):117-134.
37. Enciu AM, Nicolescu MI, Manole CG, Mureşanu DF, Popescu LM, Popescu BO. Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC neurology*. 2011; Jun 23;11:75.
38. Fagan AM, Shaw LM, Xiong C, Vanderstichele H, Mintun MA, Trojanowski JQ, Coart E, Morris JC, Holtzman DM. Comparison of analytical platforms for cerebrospinal fluid measures of β -amyloid 1-42, total tau, and p-tau181 for identifying Alzheimer disease amyloid plaque pathology. *Archives of Neurology*. 2011; 68(9):1137-44.
39. Fan Ling-Yun and Chia Ming-Jang. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurologica Taiwanica*. 2010; 19:228-245.

40. Fifre A., Sponne I., Koziel V., Kriem B., Yen Potin F.T., Bihain B.E., Olivier J.L., Oster T., Pillot T. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induces neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(1):229-40.
41. Fu H.J., Liu B., Frost J.L. and Lemere C.A. Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 2010; 9(2):197-206.
42. Gandy S. Perspective: prevention is better than cure. *Nature*. 2011; 475(7355):S15. doi: 10.1038/475S15a.
43. Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P., McLaurin J. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *PNAS*. 2004; 101(2):14657-14662.
44. Gevorkian, G., Gonzalez-Noriega, A., Acero G., Ordoñez J., Michalak C., Munguia M.E., Govezensky T., Cribbs D.H., Manoutcharian K. Amyloid- β peptide binds to microtubule-associated protein 1B (MAP1B). *Neurochemistry International*. 2008; 52:1030-1036.
45. Ghochikyan A. Rationale for peptide and DNA based epitope vaccines for Alzheimer's disease immunotherapies. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2009; 8(2):128-43.
46. Ghochikyan A., Mkrtychyan M., Petrushina I., Movsesyan N., Karapetyan A., Cribbs D.H., Agadjanyan M.G. Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-A β antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch. *Vaccine*. 2006; 24(13):2275-82.
47. Glass Christopher K., Saijo Kaoru, Winner Beate, Marchetto Maria Carolina and Gage Fred H. Mechanisms underlying inflammation en neurodegeneration. *Cell*. 2010; 140(6): 918-934.
48. Glenner GG and Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 122(3):1131-5.
49. Goate, Alison. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2006; 9(3 Suppl): 341-347.
50. Gong Y., Chang L., Viola KL., Lacor PN., Lambert MP., Finch CE., Klein WL. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *PNAS*. 2003; 100(18):10417-10422.
51. Hardy J. A hundred years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron*. 2006; 52:3-13.
52. Haass C., Selkoe, J. Soluble protein oligómeros in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007; 8:101-112.
53. Hardy J., and Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*. 1991; 12(10):382-8.
54. Harigaya Y., Saido T., Eckman CB., Prada C-M., Shoji M., Younkin SG. Amyloid β 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*. 2000; 276:422-427.

55. Hashiguchi S., Yamaguchi Y., Takeuchi O., Akira S., Sugimura K. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 402:19-22.
56. He W, Barrow CJ. The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*. 1999; 38(33):10871-7.
57. Hong-Duck K, Kazuki T, J. Adam M, et al. Nasal inoculation of an adenovirus vector encoding 11 tandem repeats of A β 1-16 upregulates IL-10 expression and reduces amyloid load in a Mo/Hu APP^{swe} PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Gene Medicine*. 2007; 9:88-98.
58. Hongmei L., Wang Z., Wang B., Guo Q., Dolios G., Tabuchi K., Hammer RE., Südhof TC., Wang R., Zheng H. Genetic Dissection of the Amyloid Precursor protein in Developmental Function and Amyloid Pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(40):30598-605.
59. Hook V., Schechter I., Demuth U., Hook G. Alternative pathways for production of β -amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biological Chemistry*. 2008; 389:993-1006.
60. Hutton M. and Hardy J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 1997; 6(10): 1639-1646.
61. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 2004; 45(5):583-95.
62. Iwatsubo Takeshi, Saido Takaomi C., Mann David M.A., Lee Virginia M.Y. and Trojanowski John Q. Full-length amyloid- β (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid- β 42(43) deposit in diffuse plaques. *American Journal of Pathology*. 1996; 149(6):1823-1830.
63. Jaques-Michael Robert. *Entendamos nuestro cerebro*. México, Fondo de Cultura Económica, 2000, pp. 52-68.
64. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 408:21/28 December:979-982.
65. Jin Ming, Shepardson Nina, Yang Ting, Chen Gang, Walsh Dominic and Selkoe Dennis J. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *PNAS*. 2011; 10.1073/pnas 1017033108.
66. Kalback W, Watson MD, Kokjohn TA, Kuo YM, Weiss N, Luehrs DC, Lopez J, Brune D, Sisodia SS, Staufenbiel M, Emmerling M, Roher AE. APP transgenic mice Tg2576 accumulate A β peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry*. 2002; 41:922-928.
67. Kerchner G.A. and Boxer A.L. Bapineuzumab. *Expert Opinion in Biological Therapy*. 2010; 10(7):1121-1130.

68. Khairallah Mervat Ibrahim and Aal Kassem Lobna Abdel. Alzheimer's disease: Current status of etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2011; 14(4):257-272.
69. Kilger E, Buehler A, Woelfing H, Kumar S, Kaeser SA, Nagarathinam A, Walter J, Jucker M, Coomaraswamy J. BRI2 protein regulates β -amyloid degradation by increasing levels of secreted insulin-degrading enzyme (IDE). *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(43):37446-57.
70. Kim, H.D., Tahara, K., Maxwell, J.A., Lalonde, R., Fukuiwa, T., Fujihashi, K., Van Kampen, K.R., Kong, F. K., Tang, D.C., Fukuchi, K. Nasal inoculation of an adenovirus vector encoding 11 tandem repeats of A β 1-6 upregulates IL-10 expression and reduces amyloid load in a Mo/Hu APPswe PS1dE9 mouse of Alzheimer's disease. *The Journal of Gene Medicine* (2007) 9:88-98.
71. Kim H.D., Jin J.J., Maxwell J.A., Fukuchi K. Enhancing Th2 immune responses against amyloid protein by a DNA prime-adenovirus boost regimen for Alzheimer's disease. *Immunology letters*. 2007; 112(1):30-38.
72. Kim H-J., Chae S-C., Lee D-K., Chromy B., Lee S.C., Park Y-C., Klein W.L., Krafft G.A., Hong S-T. Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta-protein. *The FASEB Journal*. 2003; 17(1):118-20.
73. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009; 63(3):287-303.
74. Kindt TJ, Golsdby RA, Osborne B. *Inmunología de Kuby*. México, McGraw-Hill, 2007, pp. 77-81.
75. Klafki H-W., Staufenbiel M., Kornhuber J. and Wiltfang J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*. 2006; 129:2840-2855.
76. Klyubin I, Walsh D.M., Lemere C.A., Cullen W.K., Shankar G.M., Betts V., Spooner E.T., Anwyl R., Selkoe D.J. and Rowan M.J. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes A β oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nature Medicine*. 2005; 11(5):556-61.
77. Knittelfelder, R. Riemer A.B. and Jensen-Jarolim E. Mimotope vaccination-from allergy to cancer. *Expert Opinion in Biological Therapy*. 2009; 9(4):493-506.
78. Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *Journal of Nuclear Medicine*. 1999; 40(5):883-8.
79. LaFerla Frank M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002; 3:862-872.

80. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1998; 95(11):6448-53.
81. Latzka J, Gaier S, Hofstetter G, Balazs N, Smole U, Ferrone S, Scheiner O, Breiteneder H, Pehamberger H, Wagner S. Specificity of mimotope-induced anti-high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA) antibodies does not ensure biological activity. *PLoS One*. 2011; 6(5):e19383.
82. Lemere CA, Beierschmitt A, Iglesias M, Spooner ET, Bloom JK, Leverone JF, Zheng JB, Seabrook TJ, Louard D, Li D, Selkoe DJ, Palmour RM, Ervin FR. Alzheimer's disease A β vaccine reduces central nervous system A β levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *American Journal of Pathology*. 2004; 165(1):283-296.
83. Lemere C.A., Maier M., Peng Y., Jiang L., Seabrook T.J. Novel A β immunogens: is shorter better? *Current Alzheimer Research*. 2007; 4:427-436.
84. Lemere Cynthia A. Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Progress in Brain Research*. 2009; 175:83.doi:10.1016/S0079-6123(09)17506-4.
85. Lewis H., Beher D., Cookson N., Oakley A., Piggot M., Morris CM., Jaros E., Perry R., Ince P., Kenny RA, Ballard CG., Shearman MS, Kalaria RN. Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2006; 32(2):103-18.
86. Li Q., Gordon M.N., Chackerian B., Alamed J., Ugen A.E., Morgan D. Virus-like peptide vaccines against A β N-terminal or C-terminal domains reduce amyloid deposition in APP transgenic mice without addition of adjuvant. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2010; 5:133-142.
87. Lloret A., Badia M.C., Giraldo E., Ermak G., Alonso M.D., Pallardó F.V., Davies K.J., Viña J. Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011; 27(4):701-709.
88. Longridge R.G. Alzheimer's Disease. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1939 32(3):222-4.
89. Maezawa Izumi, Zimin Pavel I., Wulff Heike and Jin Lee-Way. Amyloid- β protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(5):3693-3706.
90. Magga J., Puli L., Pihlaja R., Kanninen K., Neulamaa S., Malm T., Grosche J., Goldsteins G., Tanila H., Kohistinaho J., Koistinaho M. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A β toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2010; 7:90.

91. Maidment ID, Fox CG, Boustani M, Rodriguez J, Brown RC, Katona CL. Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2008; 42(1):32-8.
92. Maier M., Seabrook T.J. Lazo N.D., Jiang L., Das P., Jauns C., Lemere C.A. Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26:4717-28.
93. Manton K.G., Volovik S., Kulminski A. ROS effects on neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders: on environmental stresses of ionizing radiation. *Current Alzheimer Research*. 2004; 1:277-293.
94. Marr RA., Rockenstein E., Mukherjee A., Kindy MS., Hersh LB., Gage FH., Verma IM., Masliah E. Nepriylisin gene reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 2003; 23(6):1992–1996.
95. Meziane H., Dodart J.C., Mathis C., Little S., Clemens J., Paul S.M., Ungerer A. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings fo the National Academy of Sciences of USA*. 1998; 95:(21):12683-8.
96. McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W., Fuller S.J., Smith M.J., Beyreuther K., Bush A.I., Masters C.L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 1999; 46:860–866.
97. McLaurin J., Cecal R., Kierstead M.E., Tian X., Phinney A.L., Manea M., French J.E., Lambermon M.H., Darabie A.A., Brown M.E., Janus C., Chishti M.A., Horne P., Westaway D., Fraser P.E. Mount H.T. Przybylski M., St.George-Hyslop P. Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Medicine*. 2002; 8(11):1263-9.
98. McMenemey W.H., Worster-Drought C., Flind J., Williams H.G. Familial presenile dementia: report of case with clinical and pathological features of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1939; 2(4):293-302.
99. Morgan D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine*. 2011; 269:54-63.
100. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW.. Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 408(6815):982-5.
101. Movsesyan N., Ghochikyan A., Mkrtychyan M., Petrushina I., Davtyan H., Olkhanud P.B. Head E., Biragyn A., Cribbs D.H. and Agadjanyan M.G. Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine-a novel immunotherapeutic strategy. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2124.
102. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L.. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the *APP* gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature Genetics*. 1992; 1(5):345–347.

103. Näslund J., Haraoutunian V., Mohs R., Davis KL., et al. Correlation between elevated levels of amyloid β peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 2000; 283:(12):1571-1577.
104. Necula M, Kaye R, Milton S, Glabe CG. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(14):10311-24.
105. OMS (Organización Mundial de la Salud). Departamento de salud mental y toxicomanías. 2001; http://www.who.int/mental_health/media/en/391.pdf
106. OMS (Organización Mundial de la Salud) Departamento de salud mental y abuso de sustancias. Invertir en salud mental. 2004; http://www.who.int/mental_health/advocacy/en/spanish_final.pdf
107. Orgogozo J.M., Gilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F. Boada M., Frank A., Hock C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003; 8(61):1:46-54.
108. Perez-Garmendia R., Ibarra-Bracamontes V., Vasilevko V., Luna-Muñoz J., Mena R., Govezensky T., Acero G., Manoutcharian K., Cribbs D.H. and Gevorkian G. Anti-11[E]-pyroglutamate-modified amyloid β antibodies cross-react with other pathological A β species: Relevance for immunotherapy. *Journal of Neuroimmunology*. 2010; 229:248-255.
109. Petrushina I, Ghochikyan A, Mktrichyan M, Mamikonyan G, Movsesyan N, Davtyan H, Patel A, Head E, Cribbs DH, Agadjanyan MG. Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric Abeta species in amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(46):12721-31.
110. Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo C, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torrassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P, Tabaton M. β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(40):34186-34192.
111. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009; 41:1261-1268.
112. Pini A. and Bracci L. Phage display of antibody fragments. *Current Protein and Peptide Science*. 2000; 1:155-169.
113. Podtelezchnikov AA, Tanis KQ, Nebozhyn M, Ray WJ, Stone DJ, Loboda AP. Molecular insights into pathogenesis of Alzheimer's disease and its relationship to normal aging. *PLoS One*. 2011; 6(12):e29610.
114. Potter P.E. Investigational medications for Alzheimer disease. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2010; 110(9 suppl 8):S27-36.
115. Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretschmar HA. And Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26(27):7212-7221.

116. Reyes Sandoval A. y Pinto A.R. Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2002) pp. 327-342.
117. Ringheim G.E. and Conant K. Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections). *Journal of Neuroimmunology*. 2004; 147:43-49.
118. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zürcher-Neely HA, Heinrikson RL, Ball MJ, Greenberg BD. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(5):3072-3083.
119. Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 405(6786):531-2.
120. Sanders HM., Lust R., Teller JK. Amyloid-beta peptide A β 3-42 affects early aggregation of full-length A β 1-42. *Peptides*. 2009; 30:849-854.
121. Shankar G., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J. and Sabatini B.L. Oligomers induce spine and synapse loss. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(11):2866-2875.
122. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer disease like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999; 400(6740):173-177.
123. Schenk D. Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nature reviews. Neuroscience*. 2002; 3(10):824-8.
124. Seabrook T.J., Thomas K., Jiang L., Bloom J., Spooner E., Maier M., Bitan G. and Lemere C.A. Dendrimeric Abeta1-15 is an effective immunogen in wildtype and APP-tg mice. *Neurobiology of Aging*. 2007; 28(6):813-823.
125. Sigurdsson E. M., Wisniewski, T., Frangione, B. A safer vaccine for Alzheimer's disease?. *Neurobiology of Aging*. 2002; 23:1001-1008.
126. Skovronsky, D.M., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J.Q. Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology*. 2006; 1:151-70.
127. Smith D.G., Cappai R., Barnham K.J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1768(8): 1976-1990.
128. Solomon B., Koppel R., Hanan E. and Katzav T. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1999; 93(1):452-5.
129. Solomon B., Koppel R., Frankel D., Hanan-Aharon E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1997; 94(8):4109-12.

130. Streit Wolfgang J., Mrak Robert E. and Griffin W Sue T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 2004; 1:14.
131. Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*. 2005; 86(3):139-45.
132. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2010; 220(2):95-106.
133. Tabner B.J., El-Agnaf O.M., Turnbull S., German M.J., Paleologou K.E., Hayashi Y., Cooper L.J., Fullwood N.J. and Allsop D. Hydrogen peroxide is generated during the very stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(43):35789-92.
134. Takamura A., Okamoto Y., Kawarabayashi T., Yokoseki T., Shibata M., Mouri A., Nabeshima T., Sun H., et al. Extracellular and intraneuronal HMW-AβOs represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Molecular Neurodegeneration*. 2011; 6(1):20.
135. Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, Tolksdorf K, Heneka MT, Lütjohann D, Wunderlich P, Walter J. Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(48):37405-14.
136. Thinakaran, G, H. Koo E. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(44):29615-29619.
137. Tomita T., Maruyama K., Saido TC., Kume Hideaki, Shinozaki K, Tokuhiko S., Capell A., Walter J., Grünberg J., Haas C., Iwatsubo T. and Obata K. The presenilin 2 mutation (N1411) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1997; 94(5):2025-2030.
138. Town T. Alternative Aβ immunotherapy approaches for Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2009; 8(2):114-127.
139. Tsubuki Satoshi, Takaki Yoshie and Saldo Takaomi C. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Aβ to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet*. 2003; 361(9373):1957-58.
140. Turner A.J. Fisk L. Nalivaeva N.N. Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1035:1-20.
141. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature Medicine*. 2005; 11(5):551-5.
142. Vanderstichele H., De Meyer G., Andreasen N., Kostanjevecki V., Wallin A., Olsson A., Blennow K., Vanmechelen E. Amino-Truncated β-Amyloid₄₂ Peptides in Cerebrospinal

- Fluid and Prediction of Progression of Mild Cognitive Impairment. *Clinical Chemistry*. 2005; 51(9):1650-1660.
143. Varvel HN., Bhaskar K., Patil AR., Pimplikar SW., Herrup K., Lamb B. A β Oligomers Induce Neuronal Cell Cycle Events in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 2008; 28(43):10786-10793.
 144. Vasilevko V., Passos G., Quiring D., Head E., Fisher M. and Cribbs D. Aging and cerebrovascular dysfunction: contribution of hypertension, cerebral amyloid angiopathy, and immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Science*. 2010; 1207:58-70.
 145. Villa-Mancera A., Quiroz-Romero H., Correa D., Alonso RA. Proteolytic activity in *Fasciola hepática* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *Journal of Helminthology*. 2011; 85:51-55.
 146. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416(6880):535-9.
 147. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994; 344(8925):769-72.
 148. Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. Intracranially administered anti-A β antibodies reduce β -amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *Journal of Neurosciences*. 2003; 23(9):3745-51.
 149. Wiltfang J., Esselmann H., Cupers P., Neumann M., Kretschmar H., Beyermann M., Schleuder D., Jahn H. R  ther E., Kornhuber J., Annaert W., De Strooper B., Saftig P. Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(46):42645-57.
 150. Wirh  ts O., Breyhan H., Cynis H., Schilling S., Demuth HU., Bayer TA. Intraneuronal pyroglutamate-A β 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol*. 2009; 118:487-496.
 151. Wolfe MS. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews*. 2002 1:859-865.
 152. Yamin G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*. 2009; 87(8):1729-36.
 153. Youssef I., Florent-B  chard S., Malaplate-Armand C., Koziel V., Bihain B., Olivier JL., Leininger-Muller B., Kriem B., Oster T., Pillot T. N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiology of Aging*. 2008; 29:1319-1333.
 154. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Atwal J, Elliott JM, Prabhu S, Watts RJ, Dennis MS. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Science Translational Medicine*. 2011; 3:84ra44.

155. Zamora E., Handisurya A., Shati-Keramat S., Borchelt D., Rudow G., Conant K., Cox C., Troncoso J.C. and Kirnbauer R. Papillomavirus-like particle are an effective platform for amyloid- β immunization in rabbits and transgenic mice. *The Journal of Immunology*. 2006; 177:2662-2670.
156. Zhang Yan and Lee Daniel H.S. Synk hypothesis and therapeutic strategies for attenuating A β levels. *The Neuroscientist*. 2011; 17(2):163-173.
157. Zheng H., Jiang M., Trumbauer ME., Sirinathsinghji DJ., Hopkins R., Smith DW., Heavens RP., Dawson GR., Boyce S., Conner MW, Stevens KA, et al. Beta-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 1995; 81(4):525-31.
158. Zou J., Yao Z., Zhang G., Wang H., Xu J., Yew D.T. Forster E.L. Vaccination of Alzheimer's model mice with adenovirus vector containing quadrivalent foldable Abeta(1-15) reduces Abeta burden and behavioral impairment without Abeta-specific T cell response. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008; 272(1-2):87-98.