



FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EN RATONES DEL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE 1-42 EN PRESENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO COMO INMUNOMODULADOR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

RAFAEL GONZÁLEZ CASTRO

TUTOR

DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN

MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Bernardo Pérez Zamorano

VOCAL: Dra. Leonor Huerta Hernández

SECRETARIO: Dra. Gohar Gevorgyan

SUPLENTE: M. en B. María Elena Munguía Zamudio

SUPLENTE: Biól. Patricia Espinosa Cueto

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Investigación para la enfermedad de Alzheimer, Departamento de Inmunología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Gohar Gevorgyan _____

SUSTENTANTE: Rafael González Castro (408019033) _____

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no hubiera podido ser realizado sin el apoyo de mi tutora, la **Dra. Gohar Gevorgyan**. Gracias Dra. por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ser parte de su equipo durante estos casi 3 años.

Agradezco también la participación y las atenciones recibidas por los miembros de mi jurado:

Dr. Bernardo Pérez Zamorano

Dra. Leonor Huerta Hernández

M. en B. María Elena Munguía Zamudio

Biól. Patricia Espinosa Cueto

Agradezco la valiosa colaboración del Técnico Académico **Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo** por su invaluable y constante apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

Agradezco la colaboración de la **MVZ. Georgina Díaz Herrera** y del **MVZ. Jorge García Rebollar** pertenecientes al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su valioso apoyo en el manejo de los animales utilizados durante la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio y grandes amigos; a **Anlly** por sus comentarios y sarcasmo que siempre me dibujaban una sonrisa, a **Adri** por toda su amabilidad brindada, a **Dulce** por su humor negro que siempre me terminaba haciendo reír, a **Yess** y a **Pau** por contarme tantas historias descabelladas y divertidas. También agradezco a **Miriam, Paco, Susana** y **Melissa** por su compañía. A **César** por enseñarme tantas y tantas cosas y trucos dentro del lab pero sobre todo por haber depositado en mí su confianza. A ti **Luis**, tú que siempre me diste buenos consejos y me ayudaste en todo lo que podías y cuando te necesite, tú que siempre escuchabas mis problemas y que me dibujaste tantas sonrisas y sacaste tantas carcajadas con tus comentarios, además de tantas cosas que nos tocó vivir fuera del lab. **Gonzalo**, tú que siempre me ayudaste en todo lo que te pedí, muchas veces inclusive a costo de darme el tiempo que era para tu familia, por contagiarme tu eterna alegría hacia la vida y por enseñarme a siempre ver el lado positivo de las cosas, muchas gracias Dr. Por último a ti que fuiste mi “ángel de la guarda”, tú que siempre me ayudaste absolutamente en todo, que me alegrabas los días con tu presencia y bromas. Tú siempre tenías palabras de aliento cuando las cosas no salían o se ponían pesadas, siempre me diste consejos y tips para sacar todo adelante, siempre estuviste al pie del cañón y a veces hasta diste la cara por mí. Tú que me diste

una constante amistad durante 3 años y también me regañaste y pegaste uno que otro grito cuando yo lo necesitaba.....simplemente no tengo como pagarte todo ello.....simplemente no me queda nada más que decirte que eres una constante fuente de inspiración, admiración y respeto y que por eso tienes mi amistad de por vida, por todo ello y mucho mucho más te doy las gracias **Rox**.

Quiero agradecer a mis eternos pilares, a aquellos que han estado conmigo en las buenas y en las malas y que me han dado tanto en la vida: **Alex, Pepé, Demián, Migue, Yan, Tito, Gernia y Sophie**. Sin ustedes simplemente soy nada.

Quiero dedicarles este trabajo a mis papás y mi hermana, por todos los sacrificios que hicieron para que pudiera sacar adelante y terminar una carrera y por todo el amor y cariño que me han dado durante toda mi vida, porque en realidad el mérito de este título es suyo y no mío. **Mami**, tú que siempre me has dado un ejemplo de rectitud y lucha constante en todo aspecto posible de la vida no tengo palabras para expresarte cuanto te amo y solo espero que con el tiempo sea digno de merecer todo lo que me has dado en esta vida. A mi **papá** por su dedicación y constante esfuerzo para proveerme de todo lo que necesité durante estos 5 años. A mi **hermana** quién espero que con el tiempo se convierta en una persona de bien y triunfe en la vida.

Por último quiero agradecer a **mi tía** y a **mi viejo**. Ustedes que durante toda mi vida me han dado un buen ejemplo, invaluable consejos y tanta ayuda en todos los sentidos posibles. Es por ello que este título es para ustedes esperando algún día ser digno a sus ojos de todo el cariño que me han dado a lo largo de todos estos años. Sin ustedes nada de esto hubiera podido ser posible. Mi gratitud y cariño eternos, los quiero.

PROVEHITO IN ALTUM

RESUMEN:

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central manifestado por deficiencias conductuales y de memoria, demencia progresiva y finalmente la muerte. La EA es el tipo de demencia más común en personas de edad avanzada y se caracteriza por dos marcadores principales: la presencia en el cerebro de placas amiloides formadas por el péptido beta amiloide así como agregados intracelulares de neurofibrillas de la proteína tau en su forma hiperfosforilada.

Debido al papel central del péptido beta-amiloide en la patogénesis de la EA, se ha propuesto la hipótesis de la cascada amiloide la cual describe una serie de eventos que son consecuencia del desequilibrio entre la producción y degradación del péptido amiloide. Con base en esta hipótesis se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas con el objetivo de reducir la acumulación y agregación del péptido beta amiloide. Las estrategias terapéuticas tanto de inmunización activa como de inmunización pasiva han demostrado ser alentadoras en la disminución de agregados amiloides y mejoras cognitivas en modelos murino, canino y primates.

La inmunización activa en el modelo murino demostró una disminución de las placas amiloides y una mejora significativa de la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris (Janus y Morgan et al, 2000). Debido a estos avances, entre otros, se realizaron ensayos clínicos en humanos, a los que se inmunizó con el péptido 1-42 usando saponina como adyuvante. Los resultados mostraron que hubo una disminución en la carga amiloide en el cerebro, aunque algunos de los pacientes inmunizados sufrieron microhemorragias e inflamación en el cerebro (Munch y Robinson et al, 2002). Los estudios posteriores demostraron la presencia de células T autorreactivas infiltradas en los cerebros.

Se sabe que diferentes estrategias de inmunoterapia pueden producir diferentes tipos de respuesta inmune en un organismo: una respuesta inmune de tipo Th1 (pro-inflamatoria) o de tipo Th2 (anti-inflamatoria). Es por ello que se utilizan sustancias llamadas inmunomoduladoras que tienen la capacidad de polarizar una respuesta inmune hacia Th1 o Th2.

Para el presente trabajo se evaluó a través de la técnica de ELISA la capacidad del ácido retinoico (ATRA) como inmunomodulador en protocolos de inmunización con el péptido beta-amiloide debido a que ha sido reportado que ATRA posee la capacidad de promover una respuesta de tipo Th2 al mismo tiempo que suprime una respuesta tipo Th1. El ATRA es un retinoide derivado de la vitamina A que tiene propiedades anti-inflamatorias, esto se debe muy probablemente al hecho de que ATRA reduce la producción de citocinas relacionadas con una respuesta tipo Th1 (Koji K. et al, 2010).

Con los resultados obtenidos en este trabajo demostramos que los ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y tratados con ácido retinoico, produjeron un mayor nivel anticuerpos IgG1, subclase indicadora de una respuesta anti-inflamatoria. En contraparte, los ratones de la misma cepa que fueron inmunizados con el péptido pero no recibieron el tratamiento de ácido retinoico, produjeron en mayor medida anticuerpos de la

subclase IgG2a. En los ratones transgénicos de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 más saponina, se observó el mismo resultado obtenido en los ratones silvestres de la cepa C57BL/6. Los ratones tratados con ácido retinoico tuvieron un mayor nivel anticuerpos de la subclase IgG1 en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento.

Debido a los resultados obtenidos concluimos que ATRA es un buen candidato para ser utilizado como inmunomodulador hacia una respuesta tipo Th2, lo cual es de especial interés en el desarrollo de una vacuna como parte del tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Figuras	10
1. Introducción	12
1.1 Factores de riesgo	12
1.1.1 Síntomas y patogenia	13
1.1.2 Agregados amiloides	14
1.1.3 Marañas neurofibrilares	15
1.1.4 Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer	16
1.1.5 Mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide (APP)	16
1.2 Péptido beta amiloide	17
1.2.1 Hipótesis de la cascada amiloide	18
1.3 Tratamiento para la enfermedad de Alzheimer	19
1.4 Estrategias inmunoterapéuticas contra la enfermedad de Alzheimer	20
1.4.1 Inmunoterapia en humanos	21
1.4.2 Mecanismos de acción inmunoterapéutica de los anticuerpos contra el péptido beta-amiloide	22
1.5 Ácido retinoico	23
3. Objetivo general	25
4. Objetivos particulares	25
2. Hipótesis	25
5. Material y métodos	25
5.1 Material	25
5.2 Metodología	26
5.2.1 Protocolo de inmunización para ratones de la cepa C57BL/6	26
5.2.2 Protocolo de tratamiento para ratones de la cepa C57BL/6	26
5.2.3 Protocolo de inmunización para ratones de la cepa 3xTg-AD	27
5.2.4 Protocolo de tratamiento para ratones de la cepa 3xTg -AD	27
5.2.5 Obtención de sueros	28
5.2.6 Evaluación de IgG Total de los sueros anti-beta amiloide 1-42 mediante la técnica de ELISA	28
5.2.7 Determinación de las subclases de IgG mediante la técnica de ELISA	28

6. Resultados	29
6.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de IgG Total en suero de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42	29
6.1.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de diferentes subclases de IgG en suero de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42	30
6.2 Evaluación mediante la técnica de ELISA de IgG en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42	33
6.2.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de diferentes subclases de IgG en suero de ratones de la cepa 3x Tg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42	35
7. Discusión	37
8. Conclusiones	39
9. Bibliografía	40

ABREVIATURAS

EA: Enfermedad de Alzheimer

ATRA: Ácido retinoico

Th1: Respuesta inmune pro-inflamatoria

Th2: Respuesta inmune anti-inflamatoria

IL-12: Interleucina 12

IL-4: Interleucina 4

INF- γ : Interferon gamma

CD4+: Cluster de diferenciación 4

FAD: Enfermedad de Alzheimer familiar

apoE: Apolipoproteína E

A β 1-42: Beta amiloide 1-42

A β 1-40: Beta amiloide 1-40

APP: Proteína precursora amiloide

BACE1: Beta secretasa 1

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

ADAM 9: dominio de desintegrina para metaloproteinasa contenedora de proteína 9

ADAM 10: dominio de desintegrina para metaloproteinasa contenedora de proteína 10

ADAM 17: dominio de desintegrina para metaloproteinasa contenedora de proteína 17

sAPP :Proteína precursora amiloide soluble

APH-1: Anterior pharynx-defective 1

kDa: Kilo daltones

AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos

SNC: Sistema nervioso central

RAR: Receptor de ácido retinoico

RXR: Receptor X de retinoides

PBS: Buffer salino de fosfatos

HRP: Horse-radish-peroxidase

ABTS: 2,2'-azino-bi(ácido 3-etilbenzotiasilina-6-sulfónico)

FIGURAS:

1. Imagen de agregados amiloides
2. Imagen de neurofibrillas formadas por la proteína tau hiperfosforilada
3. Procesamiento de la APP a través de la vía amiloidogénica
4. Imagen del péptido beta amiloide 1-42
5. Diagrama de la hipótesis de la cascada amiloide
6. Mecanismos de eliminación del péptido beta-amiloide
7. Vía de síntesis del ácido retinoico
8. Mecanismo de acción de los receptores nucleares de ácido retinoico y su interacción con el ADN
9. Evaluación mediante ELISA de sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42
10. Promedio de la suma de anticuerpos encontrados en el suero de ratones de los diferentes grupos de inmunización
11. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG1 encontrado en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
12. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2a encontrado en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
13. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2b encontrado en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
14. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG3 encontrado en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
15. Promedio de la suma de anticuerpos encontrados en el suero de ratones de los diferentes grupos de inmunización
16. Evaluación mediante ELISA de sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
17. Promedio de la suma de anticuerpos encontrados en el suero de ratones de los diferentes grupos de inmunización
18. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG1 encontrado en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42

- 19.** Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2a encontrado en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
- 20.** Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2b encontrado en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42
- 21.** Promedio de la suma de anticuerpos encontrados en el suero de ratones de los diferentes grupos de inmunización

1. INTRODUCCIÓN:

La EA es la forma de demencia más frecuente en adultos mayores. Fue nombrada así por Emil Kraepelin en honor al neuropatólogo alemán Alois Alzheimer (1864-1915). En 1907 Alzheimer describió por vez primera las manifestaciones a nivel clínico y la patología de la enfermedad en una mujer de 51 años de edad, las cuales en general se pueden resumir como una pérdida paulatina y continua de las habilidades cognitivas.

La EA se manifiesta inicialmente por afectar levemente las funciones cognitivas como pérdida de memoria episódica a corto plazo y la orientación espacio-temporal. Posteriormente sobreviene una pérdida creciente de las funciones motrices, equilibrio y el caminar para finalizar en una demencia particularmente marcada, desorientación e inmovilidad total hasta culminar con la muerte.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en el planeta hay alrededor de 20 millones de enfermos de EA. Actualmente en México se cree hay un aproximado de medio millón de personas afectadas, cifra la cual en 10 años podría triplicarse si se toma en consideración que la población de edad mayor esta en alza. Para el año 2040 se calcula que solo en los Estados Unidos habrá cerca de 14 millones de personas que padezcan la enfermedad mientras que India, China y Latinoamérica experimentarían el mayor crecimiento de enfermos con EA conteniendo un 70% de la población mundial de afectados (www.who.int/es/).

La EA se clasifica de acuerdo a la edad de aparición en 2 tipos diferentes: early onset y late onset.

Early onset o enfermedad de Alzheimer Familiar (FAD): cuando la enfermedad se empieza a presentar antes de los 65 años de edad. Representa menos del 2% de los casos.

Late onset o enfermedad de Alzheimer esporádica: cuando la enfermedad se empieza a presentar después de los 65 años de edad. Es la forma más común de EA representando un 98% de los casos.

La duración media de los pacientes desde el diagnóstico hasta la muerte es de alrededor de unos 10 años, además de que la incidencia de la EA es mayor en mujeres que en hombres, sobre todo a partir de los 85 años de edad.

1.1 FACTORES DE RIESGO:

Edad: la edad es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de la EA, siendo que el número de personas con EA se duplica en intervalos de 5 años después de los 60 años.

Apolipoproteína E: la apolipoproteína E (apoE) es una proteína que se encarga de regular el metabolismo de lípidos. Tiene un peso molecular de 34 kDa y es uno de los principales componentes de las lipoproteínas plasmáticas además de que juega un papel fundamental en el transporte celular de los lípidos mediante la interacción de las lipoproteínas con receptores

específicos. En el cerebro son los astrocitos y la microglía las células productoras de apoE (Xu, 1998).

El mecanismo por el cual apoE4 esta implicada en la patogenia de la EA no es claro aún pero se ha demostrado que la presencia de apoE4 es el mayor factor de riesgo para la aparición de EA. Hay estudios que señalan que apoE3 está implicada como una proteína capaz de capturar al péptido amiloide impidiendo su agregación o al proteger las neuronas del daño oxidante propio del envejecimiento mismo, mientras que apoE4 presenta estas propiedades disminuidas (Poirier, 1994).

Otros posibles factores de riesgo en la aparición de la EA son traumatismos craneoencefálicos, una dieta alta en grasas, falta de ejercicio, exposición a metales pesados como el Cu y el Fe.

1.1.1 SÍNTOMAS Y PATOGENIA:

Al inicio de la enfermedad, los pacientes con EA pueden tener problemas para recordar nombres, caras familiares, actividades recientes, la fecha del día en curso o inclusive lo que desayunaron. Frecuentemente las personas que rodean al enfermo no perciben los síntomas tempranos de la enfermedad ya que comienzan con cambios casi imperceptibles de la conducta y la personalidad que progresan de manera paulatina y continua. Muchas veces la sintomatología es incluso tomada como parte natural del proceso de envejecimiento, sin embargo no es parte natural de dicho proceso ya que el cerebro se ve afectado de manera que se llega a perder toda experiencia adquirida a través de los años como decir la hora, recordar direcciones, fechas, ir al baño, caminar o inclusive hasta recordar el propio nombre (www.alzheimer.org.mx).

Los síntomas clásicos para identificar a los enfermos con EA generalmente son:

- Pérdida de memoria
- Desorientación espacio-temporal
- Perder cosas o colocarlas en lugares equivocados
- No reconocer rostros familiares
- Cambios de comportamiento que pueden ir de la agresividad a la pasividad total
- Incapacidad para realizar las actividades diarias tales como el aseo personal, comer o pérdida del control en los esfínteres
- Angustia, depresión e insomnio
- Dificultad en el habla y actividades motrices de toda índole
- Alucinaciones frecuentes

De manera lamentable la sintomatología determinante solo es perceptible cuando la enfermedad ya se encuentra en una etapa avanzada.

Clínicamente la EA puede ser diagnosticada con base en exámenes neurológicos, pruebas neuropsicológicas e imágenes cerebrales obtenidas por tomografía computacional y/o resonancia magnética. Sin embargo un diagnóstico definitivo de la enfermedad solo puede ser obtenido en un examen histológico del cerebro *post-mortem* ya que la patología característica se presenta en forma de una extensa pérdida de neuronas y por placas amiloides, así como marañas neurofibrilares de la proteína tau en el cerebro (Hendriks et al., 1996).

1.1.2 AGREGADOS AMILOIDES:

En condiciones normales, el péptido beta amiloide se encuentra en cantidades pequeñas en forma de monómero soluble que circula en el líquido cerebro-espinal y en la sangre, sin embargo, en pacientes con EA los niveles de este péptido se ven incrementados y se observa la acumulación en forma de placas fibrilares insolubles.

Las placas amiloides es uno de los dos marcadores inequívocos para el diagnóstico de la EA, se encuentran presentes en el área de la corteza, el hipocampo y amígdala (Hendriks et al., 1996). Estas placas, también llamadas placas neuríticas están formadas por depósitos extracelulares del péptido beta-amiloide fibrilar que se puede observar como una masa de fibrillas con una forma característica de estrella. Dentro de los depósitos amiloides y a su alrededor se encuentran neuritas distróficas así como células de la microglía y astrocitos. La microglía usualmente se encuentra en el centro de la placa amiloide o en la región adyacente a esta, mientras que los astrocitos se agrupan en forma de anillo rodeando el exterior de la placa amiloide. Estos depósitos amiloides son la causa principal de la pérdida sináptica. Hoy día se sabe que la especie dominante del péptido beta-amiloide en agregados es el péptido beta amiloide formado por 42 residuos de aminoácidos (A β 1-42).

Un segundo tipo de agregados amiloides son los agregados difusos. Los agregados difusos son depósitos del péptido beta-amiloide que carecen de su aspecto fibrilar y compacto como en las placas neuríticas. Los agregados difusos se caracterizan por la ausencia de neuritas (Iwatsubo et al, 1994).

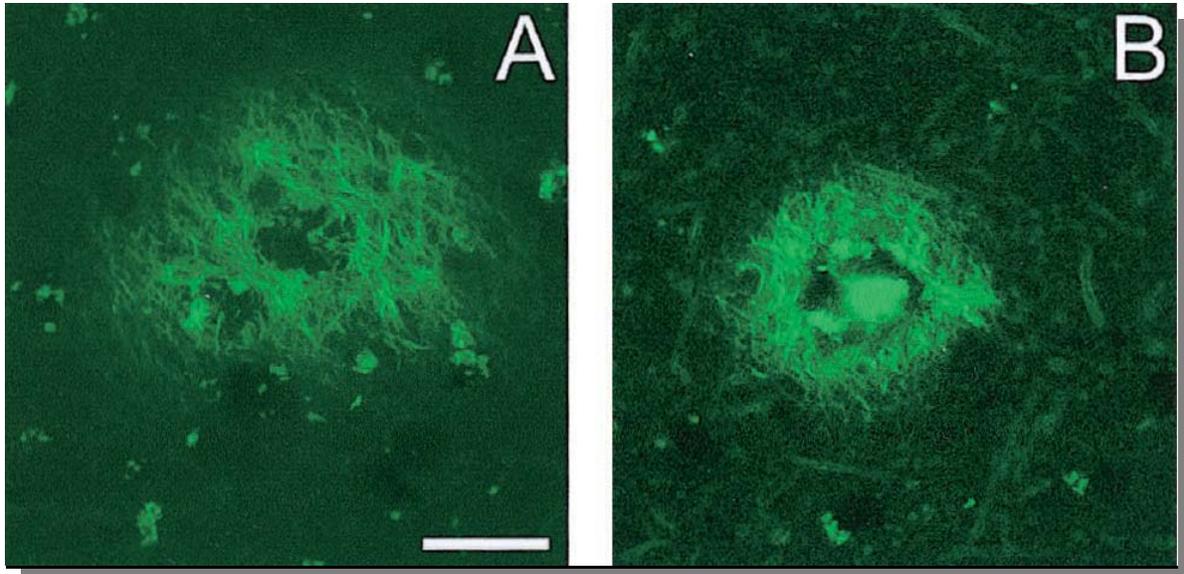


Figura 1. Imagen 100x de placas amiloides teñida con Thio-S. A) Imagen de una placa difusa en la que se observa ausencia de neuritas distróficas. B) Imagen de una placa neurítica en donde se observa su característica forma compacta. (Bussiére et all, 2004).

1.1.3 MARAÑAS NEUROFIBRILARES:

Las marañas neurofibrilares son el otro marcador característico en el diagnóstico de la EA. Están formadas por filamentos de forma helicoidal de la proteína tau hiperfosforilada. Tau es una proteína neuronal localizada en los axones que esta asociada a la membrana plasmática y a los microtúbulos (Ávila et al, 2002). Tau es responsable de facilitar la polimerización de la tubulina y estabilizar a los microtúbulos previamente polimerizados además de suprimir la dinámica microtubular confiriendo así rigidez axonal (Bre y Karsenti, 1990). Por otra parte se ha observado que la proteína tau en su forma hiperfosforilada interviene en varios procesos de carácter neuronal como la respiración mitocondrial y el transporte vesicular entre axones (Ittner y Gotz, 2011).

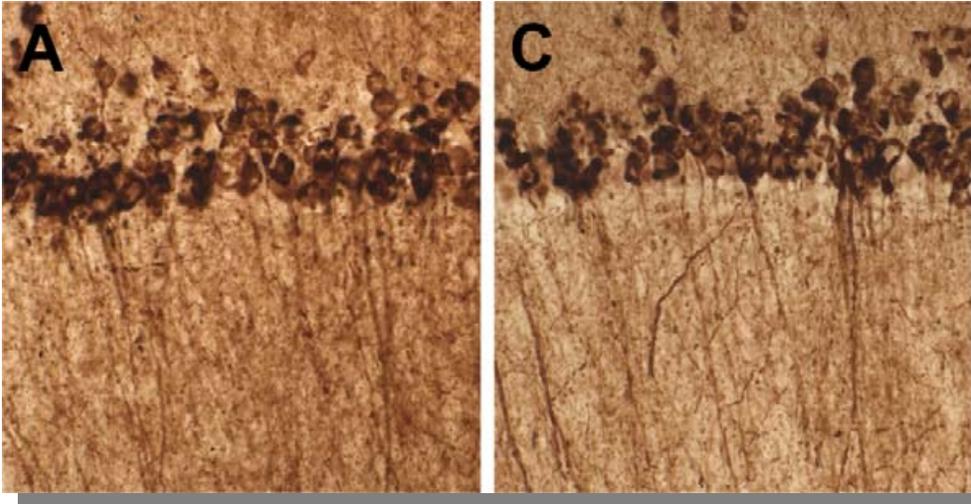


Figura 2. A y C) Imágenes del cerebro post mortem de un paciente que padeció la enfermedad de Alzheimer y en donde se pueden observar neurofibrillas de la proteína tau en su forma hiperfosforilada (Majumder S. et al, 2011).

1.1.4 BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Hoy día se sabe que hay familias que presentan la EA debido a genes autosómicos dominantes. Las mutaciones de 3 genes, el de la proteína precursora amiloide (APP) en el cromosoma 21, el de presenilina 1 (PS1) en el cromosoma número 14 y el de la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1, en conjunto determinan una forma autosómica para la EA capaz de empezar en edades tan tempranas como los 30 años de edad. Aunque esta forma autosómica de la enfermedad no supone más de un 1% de los casos totales de enfermos con EA, su descubrimiento ha sido muy importante ya que ha permitido conocer más acerca de los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Huse y Doms, 2000).

1.1.5 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE (APP)

La APP es una glicoproteína transmembranal que se encuentra codificada en el cromosoma 21. La APP tiene un dominio intramembranal, un largo dominio amino terminal extracelular y una pequeña región citoplasmática en el lado carboxilo terminal (Van Gassen et al, 2003). Debido a diferencias en el corte y pegado (splicing alternativo) existen diferentes isóformas de la APP que tienen una longitud de 695 a 770 aminoácidos, tales isóformas son conocidas como APP695, APP751 Y APP770, de las cuales la APP695 es la forma más común encontrada en la región cerebral (Hendriks et al, 1996; Van Gassen et al, 2003).

El procesamiento de la APP puede llevarse a cabo de dos diferentes rutas: no amiloidogénica y amiloidogénica. La ruta no amiloidogénica incluye el procesamiento proteolítico de la APP por la actividad de la α -secretasa (formada por ADAM17, ADAM9 y ADAM10) en la superficie de la célula la cual genera una proteína soluble de 612 aminoácidos (sAPP α). El fragmento carboxilo terminal de la APP permanece anclado a la membrana y es procesado proteolíticamente por la actividad de la γ -secretasa (formada por presenilina 1, APH-1, PEN-2 y nicastrina) generando el fragmento p3. Por definición se podría decir que p3 es un péptido truncado del péptido beta amiloide que consta de los residuos del 17 al 42 (A β 17-42). También es sabido que p3 esta presente en extractos de cerebro de pacientes con EA y que tiene un efecto tóxico para las neuronas(Hass et al, 1992).

En la ruta amiloidogénica la β -secretasa (formada por BACE1) corta a la APP en la región amino terminal del péptido beta amiloide, lo que da como producto el péptido soluble sAPP β . El fragmento carboxilo terminal permanece anclado por la membrana y es procesado por actividad de la γ -secretasa (formada por nicastrina, APH1, PEN-2 y presenilina) dando como resultado el péptido A β 40-42 (Leissring, 2002).

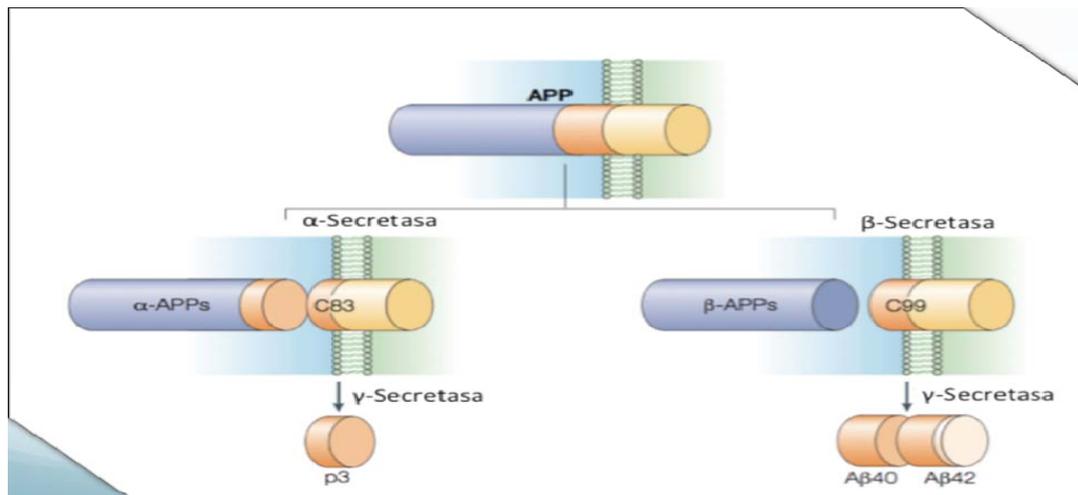


Figura 3. Procesamiento proteolítico de la APP (Citron, 2004).

1.2 PÉPTIDO BETA AMILOIDE

El péptido beta amiloide tiene un peso molecular de alrededor de 4 kDa. Existen diferentes formas del péptido que van de 40 a 43 aminoácidos de longitud. Este péptido se deriva del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP)(Van Gassen et al, 2003). El péptido adopta una conformación de β plegada antiparalela y tiende a formar fibrillas que al momento de agregarse forman depósitos de tipo amiloide. Se ha encontrado que las dos formas predominantes del péptido beta amiloide en la EA son el fragmento A β 40, que es el más abundante en circulación y de mayor solubilidad, y el fragmento A β 42 que se encuentra en mayor cantidad en las placas amiloides (Kumar et al, 2002). El péptido beta amiloide juega un papel muy importante en la

patogénesis de la enfermedad y desde mediados de la década de los 80 se planteó la hipótesis de la cascada amiloide para explicar el desarrollo de la patología.

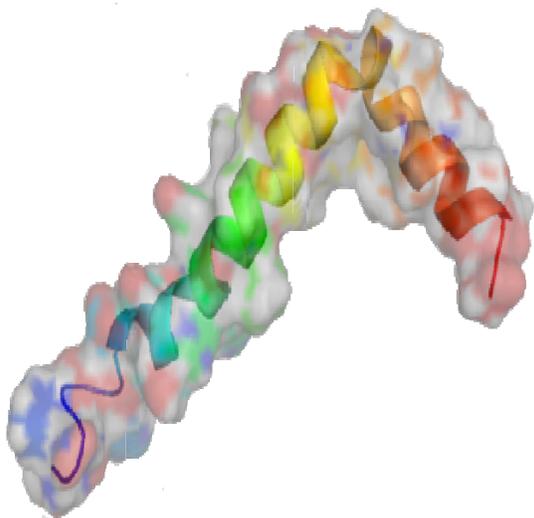


Figura 4. Imagen del péptido beta amiloide 1-42 en su conformación de β - plegada. (www.pymol.org)

1.2.1 HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

La hipótesis de la cascada amiloide explica que la EA es producto de diversos factores que dan como resultado un desequilibrio entre la producción y la degradación del péptido beta amiloide. El aumento del péptido A β 42 pone en marcha una cascada compleja de eventos con activación local de la microglia y astrocitos, lo cual provoca la liberación de citocinas (McGeer et al, 1995). A través de estos cambios pro-inflamatorios o a través de la misma neurotoxicidad del péptido beta amiloide se producen lesiones en neuronas que experimentan profundos cambios metabólicos, incluyendo la fosforilación de tau. Asimismo el péptido beta amiloide en su forma agregada es capaz de producir alteraciones en la homeostasis de calcio y daño oxidante a través de la formación de radicales libres en neuronas y glía. El resultado de estos acontecimientos es una pérdida de neuronas y la sinapsis entre estas, dando como producto la aparición de los síntomas clínicos de demencia característicos para la EA (Selkoe, 1997).

Uno de los argumentos que tiene a favor la hipótesis de la cascada amiloide es que todos los genes que han sido identificados y que tienen implicación en la EA son capaces de interferir con el metabolismo de APP, dando lugar a un aumento en la producción y depósito del péptido beta amiloide. Por otro lado, las mutaciones en el gen que codifica a tau son causa de demencia causada por otras taupatías. Estas enfermedades se caracterizan por el depósito anómalo de tau hiperfosforilada en forma de marañas neurofibrilares que de forma típica no se acompañan de depósitos del péptido beta amiloide como es en el caso de la EA (Hardy y Selkoe, 2002).

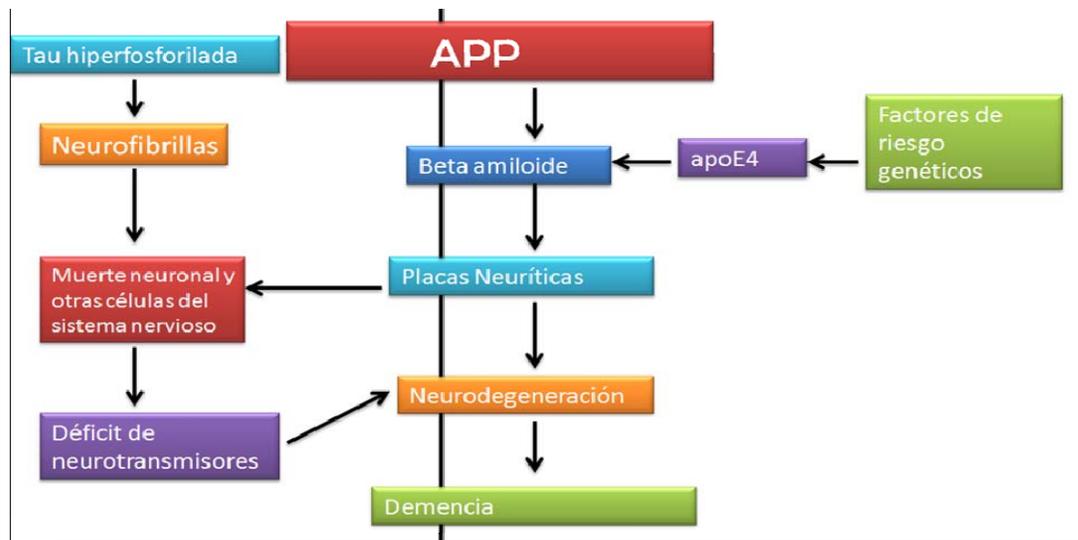


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra la hipótesis de la cascada amiloide.

1.3 TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente varios fármacos con efectos en la sintomatología de la enfermedad han sido aprobados en diferentes países, sin embargo el efecto de dichos fármacos solamente se limita a retrasar la evolución natural de la enfermedad, lo que solo permite una mejora de carácter temporal no mayor a 18 meses, más no una cura definitiva (Standaert y Young, 2001).

A través de cerebros examinados *post mortem* se ha descubierto que los pacientes con EA presentan una disminución del neurotransmisor acetilcolina debido a la muerte de células nerviosas productoras de dicho neurotransmisor. La acetilcolina es un neurotransmisor implicado en procesos de memoria y aprendizaje. El bajo nivel de acetilcolina encontrado en pacientes con EA parece indicar que el déficit de este neurotransmisor desempeña un papel importante en el deterioro cognitivo. En la actualidad los fármacos encaminados a aumentar los niveles de acetilcolina en pacientes con EA (donepezilo, tacrina, rivastigmina o galantamina)son la única estrategia farmacológica que ha demostrado cierta eficacia para mejorar los síntomas propios de la enfermedad por cortos períodos de tiempo (Standaert y Young, 2001).

Para el tratamiento de síntomas conductuales tales como agresividad, ansiedad, agitación, insomnio o alucinaciones se recomienda el uso de ansiolíticos. En caso de presencia depresiva el tratamiento a seguir es el uso de antidepresivos como la trazodona.

Debido a que la EA esta ligada a procesos inflamatorios en la zona cerebral se utiliza anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) para tratar dicho problema. Se sabe que administraciones

constantes de altas dosis de AINES inician una reducción en la carga amiloide y de la activación de la microglia *in vivo* en ratones transgénicos que sobre expresan APP (Citron,2004).

El incremento en la producción de colesterol en plasma es un factor de alto riesgo para el padecimiento de la EA. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el procesamiento de la APP es dependiente del colesterol y que una disminución en los niveles de este también reduce la producción de beta amiloide. Es por ello que una de las medidas preventivas contra la EA es el consumo de una dieta sana baja en grasas y el ejercitarse regularmente.

Otra medida implicada en el tratamiento contra la EA es el uso de antioxidantes, como la vitamina E, para la inhibición de la agregación del péptido beta amiloide, esto se logra al disminuir los niveles de zinc; ya que el zinc y el cobre pueden formar complejos con el péptido beta amiloide e inducir su agregación. El cobre por su parte, al estar en presencia del péptido beta amiloide, se ve reducido y forma especies oxidantes reactivas como el peróxido de hidrógeno, el cual se ha reportado es capaz de causar daño a nivel neuronal (Wolfe, 2002; Atwood, 2003).

1.4 ESTRATEGIAS INMUNOTERAPEÚTICAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La hipótesis amiloide señala que el incremento en la producción y la acumulación del péptido A β 1-42 es la causa principal de la patogénesis en la EA, es por ello que se han diseñado varias estrategias terapéuticas que consideran al péptido A β 1-42 como el blanco principal. En diversos estudios se ha observado que tanto la inmunoterapia activa como pasiva son prometedoras estrategias para tratar la EA ya que ambas están basadas en anticuerpos específicos contra el péptido beta amiloide: la inmunoterapia pasiva consiste en administrar de manera directa los anticuerpos específicos, mientras que en la inmunoterapia activa el péptido beta amiloide es administrado junto con un adyuvante para desarrollar una respuesta inmune contra el péptido beta amiloide (Lemere, 2004).

INMUNIZACIÓN PASIVA: en el caso de la EA se han llevado a cabo estudios en ratones transgénicos a los que se administraron anticuerpos monoclonales y policlonales contra el péptido beta amiloide. Estos anticuerpos, administrados de manera periférica, entran al sistema nervioso central (SNC) y logran reducir las placas en un 93% y 81% respectivamente (Bard et al, 2000). Esto indica que los anticuerpos por sí solos son capaces de disminuir la acumulación de agregados amiloides en la zona cerebral.

Aunque la disminución de carga amiloide a través de la inmunización pasiva probó tener buenos resultados en la mejora cognitiva de los ratones a los que se les administró los anticuerpos, la inmunización pasiva tiene ciertas desventajas. Una de las desventajas consiste en tener que administrar constantemente al paciente una dosis de anticuerpo ya que la inmunización pasiva no produce memoria inmunológica. Por otro lado la mayor de las desventajas es el hecho del

desarrollo de microhemorragias intracerebrales, hecho demostrado en 2002 en un estudio con ratones transgénicos (Pfeifer, 2002).

INMUNIZACIÓN ACTIVA: en la última década se han efectuado diversos estudios en ratones transgénicos a los que se les administró el péptido A β 1-42 en conjunto con algún adyuvante (adyuvante de Freund en la mayoría de los casos). Estos estudios demostraron un decremento en la patología característica de la EA como la formación de nuevas lesiones en la zona cerebral, disminución de la carga amiloide así como la generación de anticuerpos anti-beta amiloide y una activación de células de microglía en zonas con carga amiloide en forma de placas (Ferrer, 2004). Por otra parte los ratones a los que se les sometió a tratamiento experimentaron una mejora en las funciones cognitivas y es por ello que se decidió dar el siguiente paso y llevar las pruebas clínicas.

1.4.1 INMUNOTERAPIA EN HUMANOS

En base al éxito logrado con la inmunización activa en ratones transgénicos con el péptido beta amiloide, se llevaron a cabo pruebas clínicas con una forma sintética del péptido A β 1-42 al que se denominó AN1792. En este estudio se administraron 4 inyecciones a los pacientes con EA en un período de 6 meses, aunque 4 pacientes fallecieron en este lapso de tiempo ninguna de las muertes fue atribuida a causa de la inmunización. El estudio arrojó como resultado una reducción en la velocidad de deterioro cognitivo, aunque no se logró recuperar el nivel cognitivo normal como en el caso de los estudios hechos en ratones transgénicos (Munch y Robinson, 2002).

El estudio fue llevado a la Fase II, en donde 300 pacientes recibieron el tratamiento con AN1792. Para medir la eficacia del tratamiento se hicieron evaluaciones de la función cognitiva, volumen cerebral, concentración de biomarcadores y el funcionamiento y desempeño personal día a día. De manera desafortunada fueron reportados 17 casos de encefalitis entre los pacientes, después de recibir entre una y tres dosis de AN1792, por lo que todo el estudio fue cancelado.

Los pocos resultados obtenidos a partir de este estudio mostraron que la vacuna AN1792 es capaz de promover la producción de anticuerpos anti- beta amiloide, sin embargo se debe mencionar que esta vacuna no disminuyó el declive cognitivo (Senior, 2002).

1.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN INMUNOTERAPÉUTICA DE LOS ANTICUERPOS CONTRA EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE

Actualmente, gracias a los ensayos clínicos realizados en pacientes con EA y a diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos animales, se sabe que hay 3 posibles mecanismos a través de los cuales los anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de disgregar y disminuir los depósitos del péptido beta amiloide en el área cerebral.

1.- Disgregación de forma directa: por medio de este mecanismo los anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de disolver y neutralizar la forma oligomérica del péptido beta-amiloide. Esto también se ha demostrado en estudios *in vitro* en donde anticuerpos anti-beta amiloide son capaces de impedir la agregación del péptido beta amiloide (Frenkel et al, 2002).

2.- Fagocitosis por acción de microglía: en este mecanismo los anticuerpos anti-beta amiloide se unen a través de su fracción cristalizable (Fc) al receptor FcR localizado en las células de microglía en el cerebro. La unión Fc al receptor FcR media la fagocitosis por medio de la microglía del complejo beta amiloide-anticuerpo. Estudios *in vivo* han demostrado que al administrar de forma periférica anticuerpos anti-beta amiloide se puede detectar la presencia de microglía activada rodeando las placas amiloides en la zona cerebral (Wilcock et al, 2004).

3.- Peripheral sink: a través de este mecanismo se lleva a cabo un “secuestro” del péptido beta amiloide periférico, causando con esto una migración del péptido beta amiloide encontrado en cerebro al plasma. Estudios *in vivo* demuestran que algunos anticuerpos monoclonales contra el péptido beta amiloide no atraviesan la barrera hematoencefálica sin embargo hay una disminución en la formación de placas amiloides e incluso de daño cognitivo (Sigursson et al, 2001).

Aunque la inmunización activa ha probado tener una cierta eficacia en el tratamiento contra la EA, su principal problema radica en la activación de linfocitos T autorreactivos capaces de producir neuroinflamación a través de una respuesta inmune tipo Th1. Es por ello que se ha propuesto al ácido retinoico como un posible inmunomodulador capaz de cambiar una respuesta inmune Th1 hacia una respuesta inmune de tipo Th2.

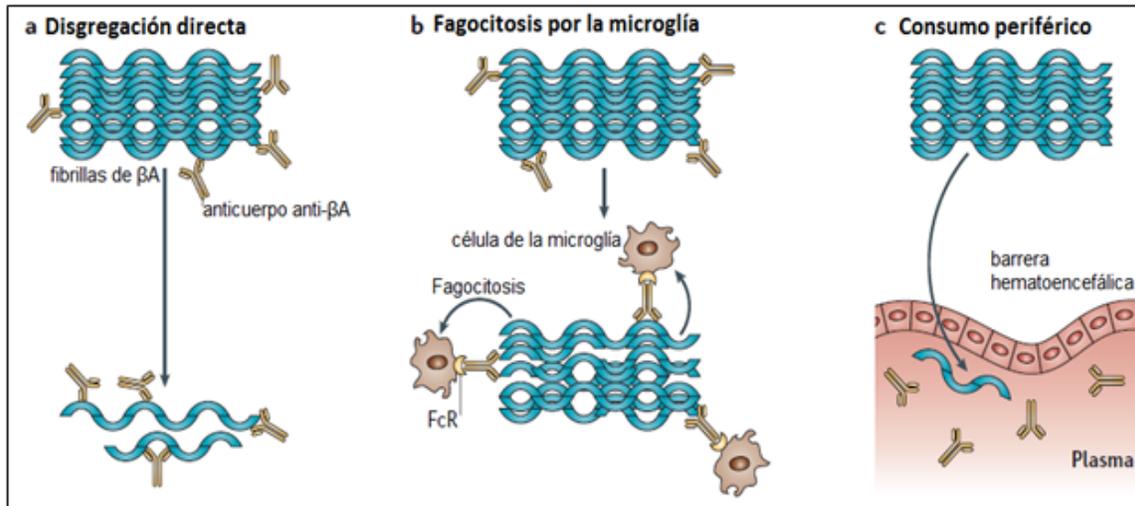


Figura 6. Mecanismos de eliminación del péptido beta amiloide a través de anticuerpos anti-beta amiloide. **a)** desagregación de oligómeros y fibrillas por medio de anticuerpos anti-beta amiloide. **b)** fagocitosis de agregados del péptido beta amiloide a través de la microglía. **c)** anticuerpos anti-beta amiloide se unen a monómeros de beta amiloide en el plasma y promueven la salida del beta amiloide del parénquima cerebral (Weiner y Frenkel, 2006).

1.5 ÁCIDO RETINOICO

El ácido retinoico es un derivado de la vitamina A, el cual tiene funciones en el desarrollo y diferenciación celular. El ácido retinoico se obtiene a través de la vitamina A al incorporarse en el organismo por la ingesta tanto de productos de origen animal (en forma de retinol y de ésteres de retinol) como de origen vegetal (en forma de carotenoides). Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen del intestino delgado a retinol. Por otro lado los carotenoides se absorben por difusión pasiva en el interior del enterocito donde son convertidos también en retinol.

Parte de este retinol o vitamina A es destinado hacia la síntesis de ácido retinoico. La formación de este compuesto, a partir de retinol, implica dos etapas de oxidación. La primera oxidación, de retinol a retinal, es reversible y está catalizada por la retinol deshidrogenasas. El retinal por su parte, a través de la aldehído deshidrogenasa es transformado en ácido retinoico. El ácido retinoico, es capaz de interactuar con receptores nucleares (RAR y RXR) para activar la expresión de genes de respuesta a ácido retinoico (M. Obulesu et al, 2011).

Como resultado de esta activación se observa la regulación de las funciones de las células presentadoras de antígeno, la inducción de células T reguladoras, la supresión de la expresión de $INF-\gamma$, entre otros procesos biológicos (Manicassamy and Pulendran, 2009, Seminars in Immunology).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el ácido retinoico es un candidato adecuado para su uso como inmunomodulador en el desarrollo de una vacuna para el tratamiento de la EA.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- La inmunización de ratones C57BL/6 y 3xTg-AD con beta amiloide 1-42 en presencia de ácido retinoico como inmunomodulador.

-Análisis de la respuesta inmune humoral.

4. HIPÓTESIS

Ratones de las cepas C57BL/6 y 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y saponina como adyuvante en presencia de ácido retinoico, producirán anticuerpos relacionados con una respuesta inmune de tipo anti-inflamatoria (Th2) debido al efecto inmunomodulador del ácido retinoico.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material:

.Ratones de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad: la cepa de ratón C57BL/6 es la cepa más utilizada en investigación de la EA ya que la mayoría de las cepas transgénicas desarrolladas para el estudio de la EA están basadas en C57BL/6. Además de su tendencia a desarrollar una respuesta inmune de tipo pro-inflamatoria (Th1), lo cual es adecuado para evaluar los efectos de un inmunomodulador capaz de desviar una respuesta inmune hacia Th2.

.Ratones de la cepa 3xTg-AD de 6 meses de edad (obtenidos de los laboratorios Jackson, EUA): la cepa de ratón 3xTg-AD es una cepa con un background genético de ratón C57BL/6, se caracteriza por expresar tau, APP y presenilina (PS1) humanos. Debido a esto desarrolla agregados amiloides intra y extracelulares así como neurofibrillas de tau hiperfosforilada.

5.2 Metodología:

5.2.1 Protocolo de inmunización de ratones de la cepa C57BL/6.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal 5 ratones por grupo de la cepa C57BL/6 (ver diseño de grupos en la tabla 1). En cada inmunización se administraron 20 µg de péptido beta amiloide 1-42 fibrilar en presencia de 40 µg de saponina como adyuvante y 40 µl de PBS (amortiguador salino de fosfatos) para completar un total de 100 µl por ratón. Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada 10 días y se realizaron un total de 5 inmunizaciones a lo largo del experimento.

5.2.2 Protocolo de tratamiento para ratones de la cepa C57BL/6.

El tratamiento efectuado en 5 ratones de uno de los grupos (ver tabla 1) consistió en 100 µg de ácido retinoico administrados por vía intraperitoneal cada tercer día, durante un período de tiempo de 8 semanas.

Grupo	Inmunógeno	Dosis	Tratamiento	Vía
PBS	-	100 µL PBS	-	i.p.
Saponina + Aβ 1-42	Aβ 1-42	20 µg Aβ 1-42 + 40 µg saponina	-	i.p.
Saponina + Aβ 1-42 (tratamiento con ácido retinoico)	Aβ 1-42	20 µg Aβ 1-42 + 40 µg saponina + 40 µg PBS	100 µg ácido retinoico	i.p.

Tabla 1. Esquema de inmunización y tratamiento para los 3 diferentes grupos de ratones de la cepa C57BL/6.

5.2.3 Protocolo de inmunización de ratones de la cepa 3xTg-AD.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal 5 ratones por grupo de la cepa 3xTg-AD (ver la composición de los grupos en la tabla 2). En cada inmunización se administraron 20 µg de péptido beta amiloide 1-42 en presencia de 40 µg de saponina como adyuvante y 40 µl de PBS para completar un total de 100 µl por ratón. Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada 10 días y se realizaron 5 inmunizaciones a lo largo del experimento.

5.2.4 Protocolo de tratamiento para ratones de la cepa 3xTg-AD.

El tratamiento fue efectuado en ratones de la cepa 3xTg-AD. El tratamiento consistió en 100 µg de ácido retinoico administrados por vía intraperitoneal cada tercer día, durante un período de tiempo de 8 semanas. El ácido retinoico se administró a 2 diferentes grupos de ratones, los inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y saponina como adyuvante, y un segundo grupo al que no se le inmunizó y solamente recibió tratamiento.

Grupo	Inmunógeno	Dosis	Tratamiento	Vía
PBS	-	100 µL PBS	-	i.p.
Saponina + Aβ 1-42	Aβ 1-42	20 µg Aβ 1-42 + 40 µg saponina	-	i.p.
Saponina + Aβ 1-42 (tratamiento con ácido retinoico)	Aβ 1-42	20 µg Aβ 1-42 + 40 µg saponina + 40 µg PBS	100 µg ácido retinoico	i.p.
Tratamiento con ácido retinoico	-	-	100 µg de ácido retinoico	i.p.

Tabla 2. Esquema de inmunización y tratamiento para los 4 diferentes grupos de ratones de la cepa 3xTg-AD.

5.2.5 Obtención de sueros.

La obtención del suero correspondiente a cada ratón se efectuó bajo los principios bioéticos correspondientes al protocolo aprobado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas. La sangre extraída fue depositada en tubos eppendorf de 1.5 mL y puesta a incubar durante 1hr a 37°C. Posteriormente fue centrifugada a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvieron los sobrenadantes y fueron depositados en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL para ser nuevamente centrifugados a 5,000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se extrajo el sobrenadante y fue depositado en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL para ser almacenados a 20°C.

5.2.6 Evaluación en sueros de IgG mediante la técnica de ELISA.

Se realizó la sensibilización de una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, MaxiSorp) durante toda la noche a una temperatura de 4°C con 0.2 µg de péptido beta-amiloide 1-42 por cada 100 µL de buffer de carbonatos (pH 9.6). La sensibilización se efectuó durante toda la noche a una temperatura de 4°C. En el día posterior se efectuaron 4 lavados de la placa con PBS-tween 0.2%. Se bloquearon los pozos de la placa con PBS-albúmina al 2% (200 µL por pozo) durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS-tween 0.2%, se agregaron los sueros obtenidos de cada ratón en una dilución 1:100 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se agregó un anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo) y se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se reveló con ABTS (100 µL por pozo). Las lecturas de densidades ópticas se realizaron a 405 nm en un lector automático de placa.

5.2.7 Determinación de subclases de IgG mediante la técnica de ELISA.

Se realizó la sensibilización de una placa de microtitulación de 96 pozos durante toda la noche a una temperatura de 4°C con 0.2 µg de péptido beta- amiloide 1-42 por cada 100 µL de buffer de carbonatos (100 µL por pozo). En el día posterior se efectuaron 4 lavados de la placa con PBS-tween 0.2%. Se bloquearon los pozos de la placa con PBS-albúmina al 2% (200 µL por pozo) durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS-tween 0.2%, se agregaron los sueros obtenidos de cada ratón en una dilución 1:100 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se agregaron los siguientes anticuerpos: un anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 µL por pozo), un anticuerpo de conejo anti-IgG1 de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-

tween 0.2% (100 μ L por pozo) un anticuerpo de ratón (BALB/c) anti IgG2a de ratón (C57BL/6) acoplado a biotina (BD Biosciences Pharmigen, USA) en una dilución de 1: 10,000 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 μ L por pozo) y un anticuerpo de conejo anti-IgG2b de ratón acoplado a HRP (ZYMED, USA) en una dilución de 1: 2500 en PBS-albúmina 2%-tween 0.2% (100 μ L por pozo). Después de la incubación y lavados, a los pozos correspondientes a IgG2a se agregó estreptavidina acoplada a HRP (BD Biosciences Pharmigen, USA) en una dilución de 1: 2000 y se incubo 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados de placa con PBS-tween 0.2% y se reveló con ABTS (100 μ L por pozo). Las lecturas de densidades ópticas se realizaron a 405 nm en un lector automático de placa.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de IgG total en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta-amiloide 1-42.

Los resultados obtenidos muestran que todos los ratones inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 produjeron anticuerpos anti-beta amiloide 1-42, al compararlos con el suero de ratón de la cepa C57BL/6 inmunizados con PBS utilizado como control negativo (Fig. 7).

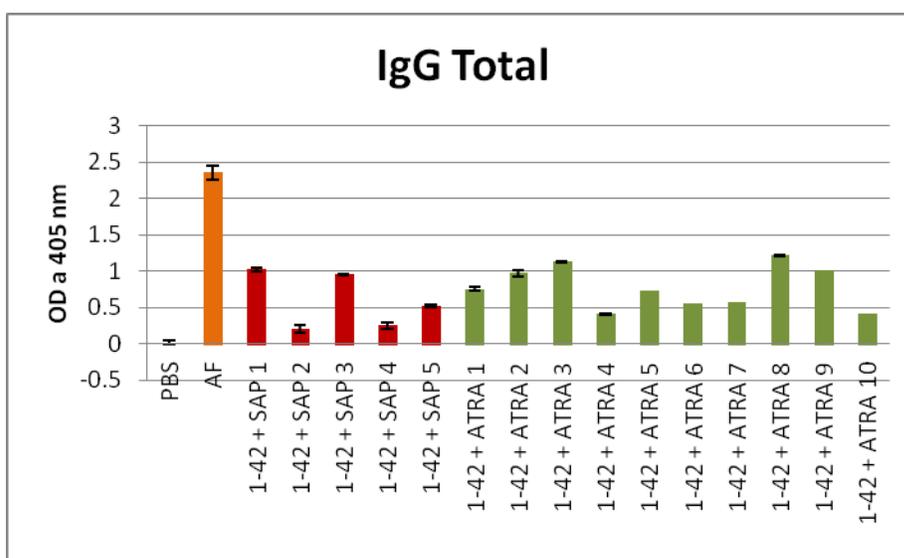


Figura 9. Evaluación mediante ELISA de sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

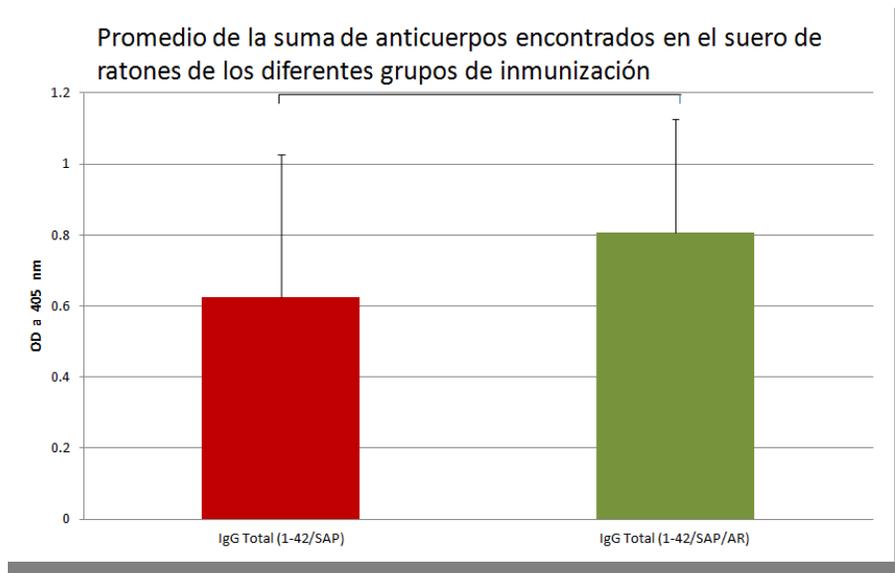


Figura 10. Promedio de la cantidad de IgG total obtenida de los sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 bajo diferentes esquemas de tratamiento. Los grupos de inmunización constaron de 5 y 10 ratones respectivamente. ($P > 0.05$).

6.1.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de subclases de IgG en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42.

Mediante ensayos de ELISA se realizó la determinación de las subclases de IgG presentes en los sueros de los ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los resultados obtenidos (Fig. 8-11) muestran que los ratones inmunizados y tratados con ácido retinoico produjeron anticuerpos anti-beta amiloide de las subclases IgG1 e IgG2b, dos subclases relacionadas con una respuesta inmune anti-inflamatoria (Th2). Por su parte los ratones inmunizados con el péptido sin recibir tratamiento alguno, produjeron anticuerpos de la subclase IgG2a, indicando una respuesta pro-inflamatoria de tipo Th1.

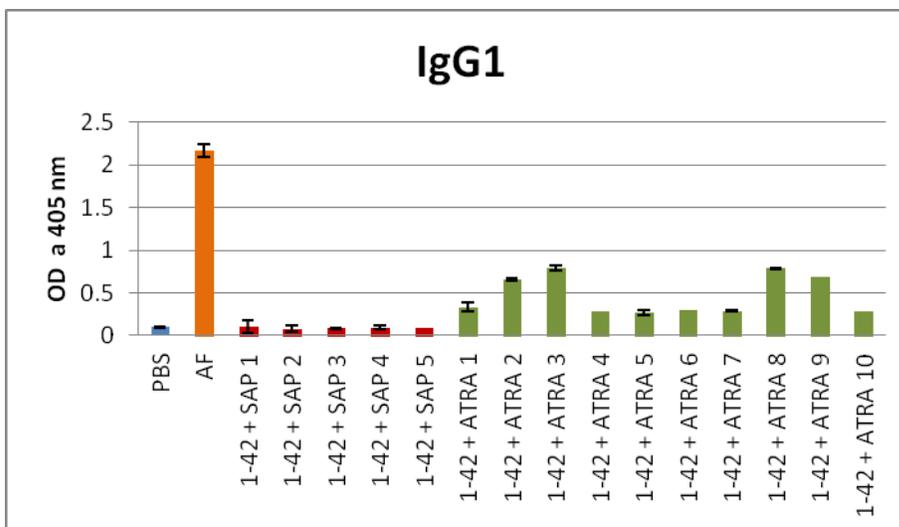


Figura 11. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG1 en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

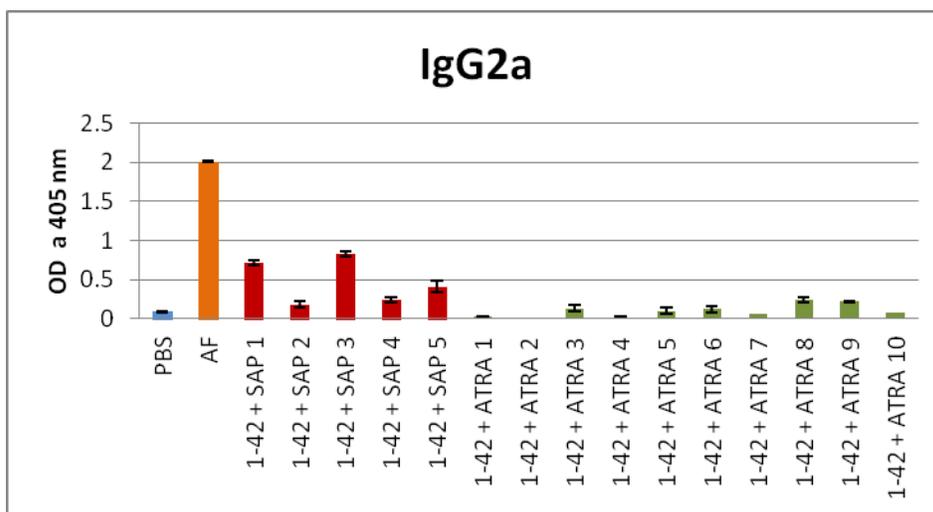


Figura 12. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2a en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

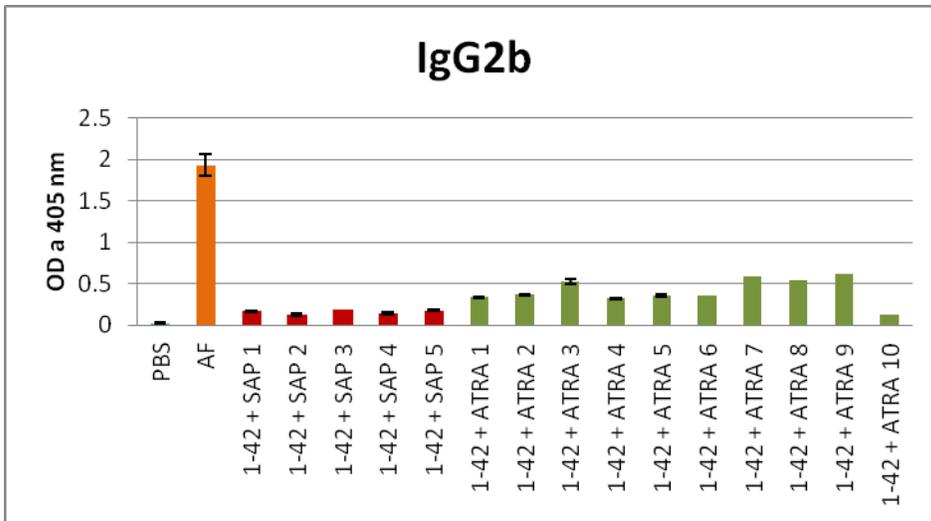


Figura 13. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2b en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

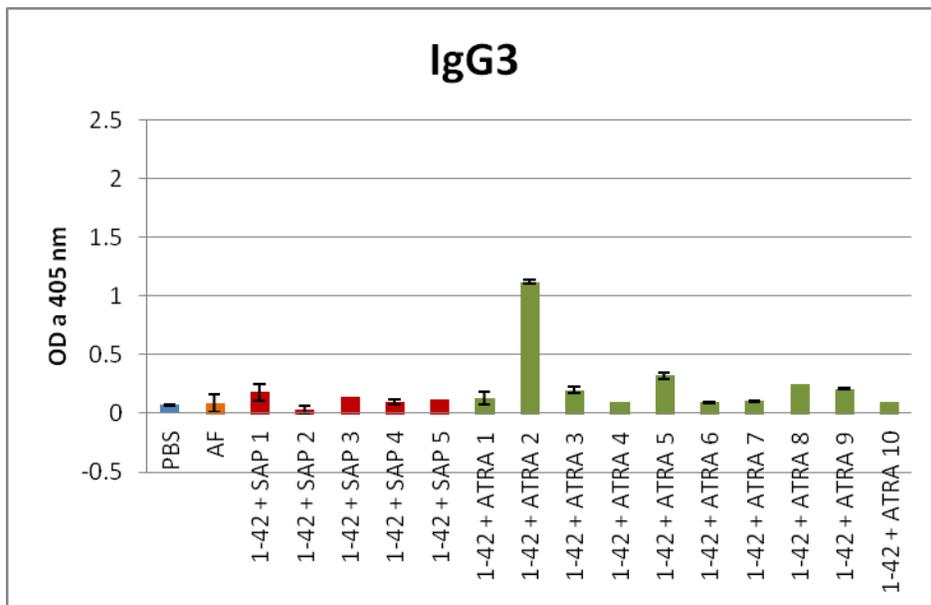


Figura 14. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG3 en sueros de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

Promedio de la suma de anticuerpos encontrados en el suero de ratones de los diferentes grupos de inmunización

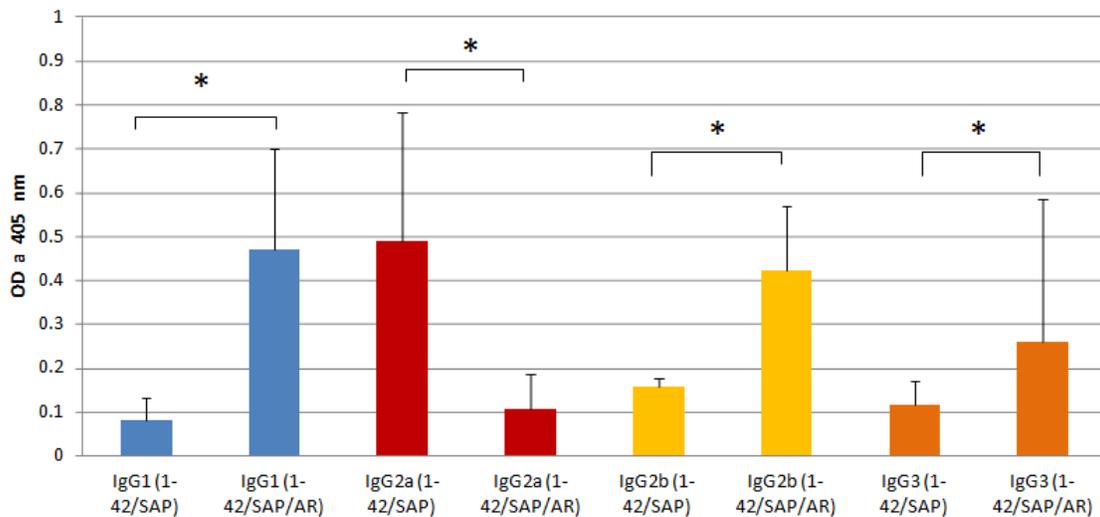


Figura 15. Promedio de la cantidad de las diferentes subclases de IgG obtenidas del suero de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y puestos bajo diferentes esquemas de tratamiento. ($P > 0.005$).

6.2 Evaluación mediante la técnica de ELISA de IgG en suero de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42.

Los resultados de los sueros de ratones analizados por medio de ELISA muestran que 9 de los 10 ratones transgénicos inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 (5 ratones que no recibieron el tratamiento de ácido retinoico y 4 que ratones que sí recibieron el tratamiento) produjeron anticuerpos específicos. Un ratón del grupo al que se administró tratamiento de ácido retinoico, no desarrollo anticuerpos específicos. El grupo control de ratones que no recibió el péptido y se le administró el ácido retinoico no produjo anticuerpos anti-beta amiloide.

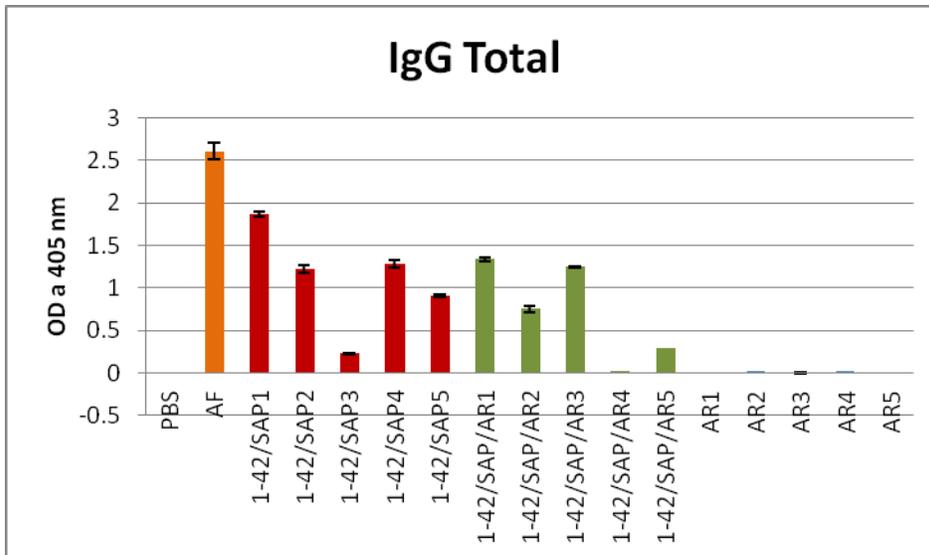


Figura 16. Evaluación mediante ELISA de sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42; 9 de los 10 ratones transgénicos inmunizados con el péptido produjeron anticuerpos específicos. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

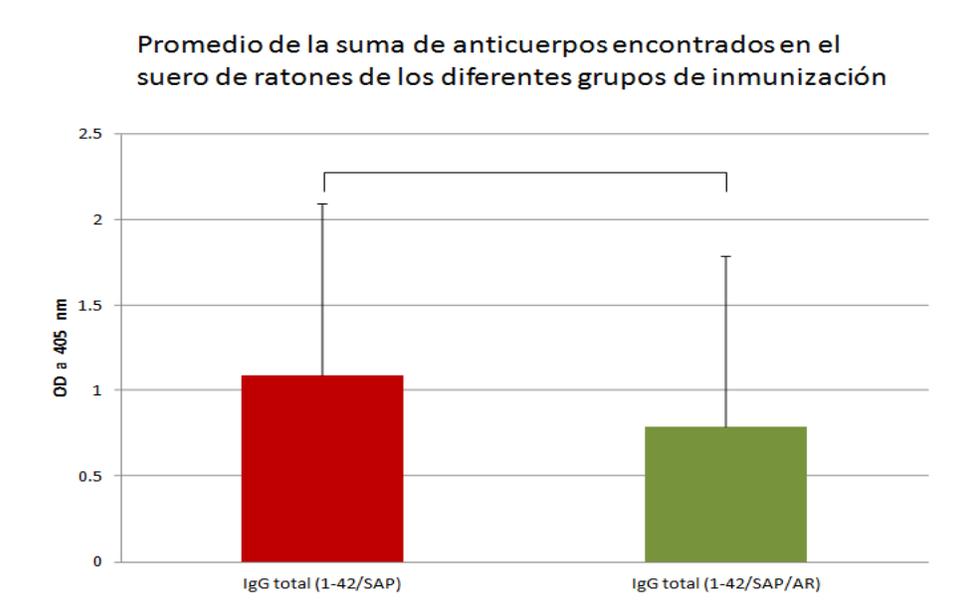


Figura 17. Promedio de la cantidad de IgG total obtenida de los sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 bajo diferentes esquemas de tratamiento. Cada grupo de inmunización constó de 5 ratones ($P > 0.005$).

6.2.1 Evaluación mediante la técnica de ELISA de las subclases de IgG en sueros de ratones de la cepa 3x Tg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42.

Los resultados obtenidos de los sueros de ratones transgénicos analizados por medio de pruebas de ELISA muestran que los anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2b están presentes en mayor cantidad en el grupo de ratones inmunizados con beta- amiloide 1-42 + saponina + ácido retinoico. Por su parte, los anticuerpos de la subclase IgG2a se encuentran en mayor cantidad en los sueros de ratones inmunizados con beta-amiloide 1-42 + saponina en ausencia de ácido retinoico como tratamiento (en las Fig. 1-17 los resultados mostrados son un promedio de 2 diferentes ensayos de ELISA así como la desviación estándar).

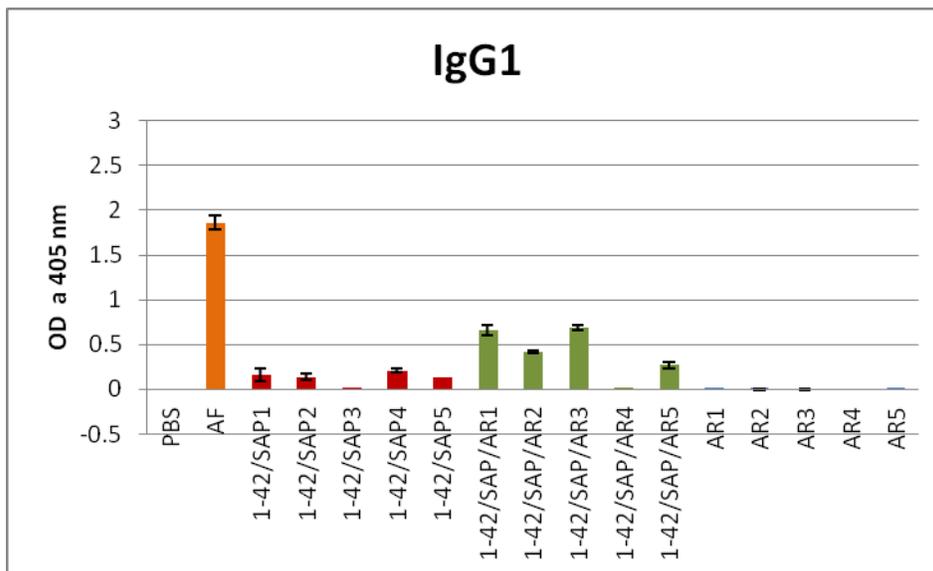


Figura 18. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG1 en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

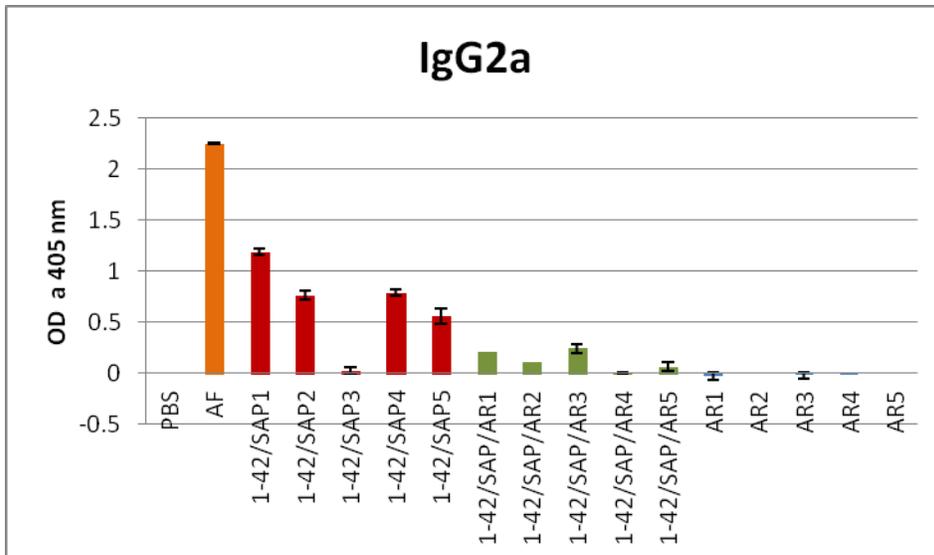


Figura 19. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2a en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

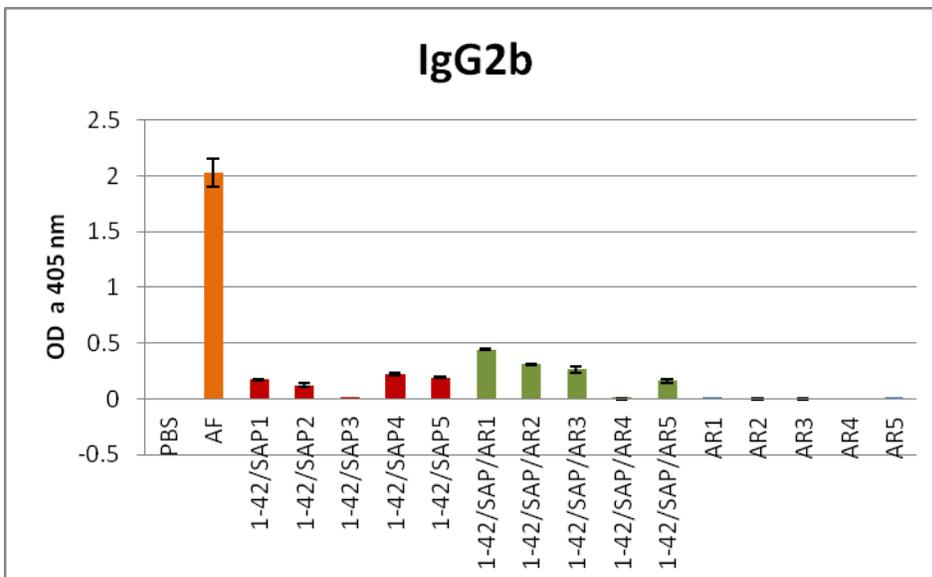


Figura 20. Evaluación mediante ELISA de la subclase IgG2b en sueros de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en 3 diferentes experimentos de ELISA así como su desviación estándar. AF-adyuvante Freund, SAP-saponina y ATRA-ácido retinoico.

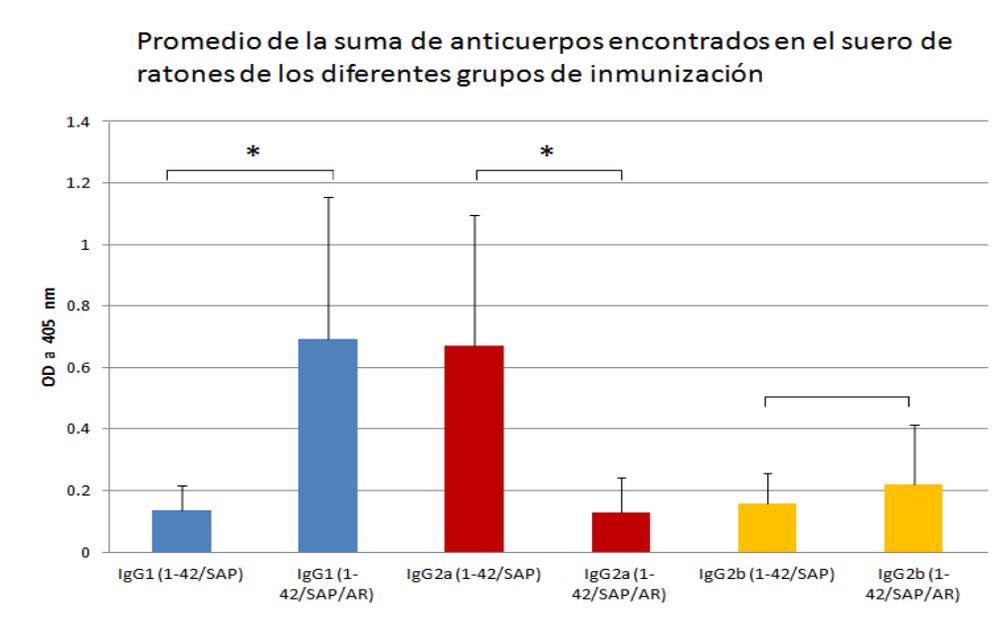


Figura 21. Promedio de la cantidad de las diferentes subclases de IgG obtenidas del suero de ratones de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y puestos bajo diferentes esquemas de tratamiento. ($P > 0.05$).

7. DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la principal forma de demencia en adultos mayores de 65 años. Esta enfermedad está caracterizada generalmente por la presencia de agregados intra y extracelulares del péptido beta amiloide, así como marañas intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada, además de presentarse activación de microglia y muerte neuronal. (Masliah, 2005 y Feldman et al, 2007).

Hoy día diversos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer están en investigación, siendo la inmunoterapia activa uno de los más prometedores.

La evidencia recabada en los estudios de inmunoterapia en modelos animales así como en humanos indica que el péptido beta amiloide es capaz de inducir anticuerpos específicos y disminuir la patología asociada. Sin embargo, en ensayos clínicos hubo ciertos fallos en el diseño de la vacuna que indujeron una respuesta inflamatoria en el cerebro. El péptido beta- amiloide 1-42 es una molécula que contiene epítomos de células B y T. La presencia de epítomos de células T conlleva a la activación e infiltración al cerebro de células T y a una posterior inflamación en el cerebro. Por otro lado, la utilización de saponina como adyuvante promovió también una

respuesta inflamatoria ya que esta reportado la tendencia de la saponina a favorecer respuestas de tipo Th1 (F. Silveira et al, 2011).

Por todo lo anterior es de vital importancia el desarrollo de una vacuna que no sea capaz de producir una respuesta inmune inflamatoria, pero debido a los pocos adyuvantes permitidos en vacunas para humanos, un nuevo enfoque podría ser la aplicación de un inmunomodulador capaz de modular la respuesta inmune producida por la saponina, más allá de encontrar un nuevo adyuvante que produzca la respuesta anti-inflamatoria deseada.

En años recientes se ha propuesto al ácido retinoico como un buen candidato en el tratamiento contra la EA, esto debido a que la vitamina A y la mayor parte de los retinoides juegan un papel muy importante en regular la transcripción de genes asociados a la EA a través de receptores nucleares para retinoides (M. A. Lane et al, 2005 y M. Obulesu et al, 2011). Por otro lado, se ha reportado que el uso del ácido retinoico como inmunomodulador tiende a promover una respuesta inmune anti-inflamatoria (Nimmerjahn et al, 2005 y Makoto I. et al, 2003).

En el presente trabajo demostramos que los ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 y tratados con ácido retinoico, produjeron un mayor nivel anticuerpos IgG1, subclase indicadora de una respuesta anti-inflamatoria (figura 11). En contraparte, los ratones de la misma cepa que fueron inmunizados con el péptido pero no recibieron el tratamiento de ácido retinoico, produjeron en mayor medida anticuerpos de la subclase IgG2a (figura 12). La producción de anticuerpos de la subclase IgG2a indica una respuesta inmune pro-inflamatoria. Es por ello que al ser encontrado en bajas cantidades en el grupo de ratones que recibió tratamiento de ácido retinoico en comparación con el grupo de ratones que no recibió tratamiento alguno (figura 10), podemos suponer que el ácido retinoico efectivamente actuó como inmunomodulador. Sin embargo, se necesitan más estudios detallados en el futuro.

En los ratones transgénicos de la cepa 3xTg-AD inmunizados con el péptido beta amiloide 1-42 más saponina, se observó el mismo resultado obtenido en los ratones silvestres de la cepa C57BL/6. Los ratones tratados con ácido retinoico tuvieron un mayor nivel anticuerpos de la subclase IgG1 en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento (figura 18). Inversamente, los ratones que no recibieron tratamiento de ácido retinoico, produjeron un mayor nivel de IgG2a en comparación con los ratones que sí fueron tratados (figura 19). Es interesante mencionar, que no observamos diferencias en los anticuerpos de la subclase IgG2b (figuras 13 y 20) entre dos grupos de ratones (tratados con el ácido retinoico y no tratados). Estos resultados ameritan más estudios.

8. CONCLUSIONES

- 1.** La inmunización con el péptido beta amiloide 1-42 en ratones de las cepas C57BL/6 y 3xTg-AD induce anticuerpos capaces de reconocer al péptido beta amiloide.
- 2.** El ácido retinoico promueve la producción anticuerpos de la subclase IgG1 relacionados con una respuesta inmune de tipo anti-inflamatoria.
- 3.** El ácido retinoico disminuye los niveles de anticuerpos IgG2a, relacionados con una respuesta inmune pro-inflamatoria.
- 4.** El ácido retinoico puede ser un eficaz inmunomodulador capaz de convertir una respuesta inmune pro-inflamatoria en una respuesta anti-inflamatoria en los futuros protocolos de inmunoterapia de la EA.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Janus C. et al, 2000. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408:979-982.
- Munch G. y Robinson R. 2002. Potential neurotoxic inflammatory responses to Ab vaccination in humans. *J. Neural Transmission*. 149: 1081-1087.
- Koji K. et al, 2003. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *The Journal of Immunology*. 170: 5793-5798.
- Makoto I. et al, 2003. Retinoic acid exert direct effect on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *International Immunology*. 15: 1017-1025.
- Poirier J., 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 17: 525-530.
- Hendriks L. et al, 1996. The β A42 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur. J Biochem*. 273: 6-15.
- Iwatsubo T. et al, 1994. Visualization of A beta 42 (43) precedes A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron*. 13: 45-53.
- Bussi re et al, 2004. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in Alzheimer mice and affect of passive A β immunotherapy and their clearance. *American Journal of Pathology*. 165.
-  vila et al, 2002. Tau function and dysfunction in neurons: it's role in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 25: 213-231
- Bre MH. y Karsenti E. 1990. Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes. *Cell Model Cytoskeleton*. 15: 88-98.
- Ittner LM. y Gotz J., 2011. Amyloid beta and tau- a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 12: 65-72.
- Madjumber S. et al, 2011. Inducing autophagy by rampamicyn, before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficit. *PLoS ONE*. 9:2541.
- Huse JT. y Doms RW., 2000. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 22: 81-98.
- Van Gassen G. et al, 2003. Amyloid, presenilins and Alzheimer's disease. *The neuroscientist*. 2: 117-126.

- Hass C. et al, 1992. Targeting of cell-surfaces β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. 359: 322-325.
- Leissring MA. et al, 2002. A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 4697-4702.
- Zhang et al, 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. in press.
- Kumar-singh et al, 2002. In vitro studies of Flemish, Dutch and wild type β -amyloid provides evidence for two-staged neurotoxicity. *Neurobiology of Disease*. 11: 330-340.
- McGeer PL., 1995. The inflammatory response system of brain: omplications for therapy in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*. 21: 195-218.
- Selkoe DJ., 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*. 275: 630-631.
- Hardy JA. y Selkoe DJ., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297: 353-356.
- Standaert DG. y Young AB., 2001. Treatment of central nervous system degenerative disorders. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10a ed. McGraw-Hill, Madrid. 549-568.
- Citron Martin, 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 5: 677-685.
- Wolfoe M., 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews*. 1: 859-866.
- Atwood C. et al, 2003. β -amyloid: a chameleon walking in two worlds: a review of the tropic and toxic properties of amyloid- β . *Brain research reviews*. 43: 1-16.
- Lemere CA. et al, 2004 Alzheimer's disease A β vaccine reduces central nervous system A β levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am J. Pathol*. 165: 283-297.
- Bard F. et al, 2000. Peripherally administrated antibodies against amyloid-peptide enter the nervous central system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 6: 916-919.
- Pfeifer M., et al 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science*. 298: 1379.
- Ferrer I. et al, 2004. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 14: 11-20.
- Frenkel D. et al, 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 5675-5679.

- Wilcock DM. et al, 2004. Microglial activation facilitates A β plaque removal following intracranial anti-A β antibody administration. *Neurobiol.* 15: 11-20.
- Sigurdsson EM. et al, 2001. Immunization with non-toxic/non-fibrillar amyloid- β homologous peptide reduce Alzheimer's disease –associated pathology in transgenic mice. *Amm. J. Pathol.* 159: 439-447.
- Weiner HL. y Frenkel D., 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunology.* 6: 404-416.
- Obulesu M. et al, 2011. Carotenoids and Alzheimer's disease: an insight into a therapeutic role of retinoids in animal models. *Neurochemistry International.* 59: 535-541
- Etchamendy N. et al, 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of retinoid signaling. *J. Neurosci.* 21: 6423-6429.
- Goodman B., 2006. Retinoid receptors, transporters and metabolizers as therapeutic targets in late onset in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular Physiology.* 209: 598-603.
- Masliah E., 2005. Remembering in Alzheimer's disease: the "Bobs" at the turn of the new century. *Alzheimer Dement.* 1: 82.
- Feldman H., 2007. Atlas of Alzheimer disease. Informa Healthcare.
- Silveira F. et al, 2011. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine.* 29: 9177-9182.
- Nimmerjahn F. et al, 2005. Divergent Immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 1510-2.

