



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA Y PROTECTORA DE  
LAS ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS DEL PÉPTIDO BETA  
AMILOIDE EN MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

ROXANNA PEREZ GARMENDIA

TUTOR PRINCIPAL: DRA. GOAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
[INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M.](#)

COMITÉ TUTOR

DRA. ADELA RORIGUEZ ROMERO, INSTITUTO DE QUIMICA U.N.A.M.  
DRA ROCIO SALCEDA SACALLANES, INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR,  
U.N.A.M.

MÉXICO, D. F., 2014



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.

## INDICE

<b>I.RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
DÉFICIT NEUROLÓGICO	4
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	5
EPIDEMIOLOGÍA	7
PATOLOGÍA MACROSCÓPICA	8
PATOLOGÍA MICROSCÓPICA	8
MARAÑAS NEUROFIBRILARES	8
PLACAS AMILÓIDES	10
PÉPTIDO $\beta$ A	10
ANGIOPATÍA AMILÓIDE VASCULAR	13
HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILÓIDEA	15
TOXICIDAD POR $\beta$ A	16
ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS	18
$\beta$ A P(E) 3-42	19
$\beta$ A P(E) 11-42	20
TRATAMIENTO	21
INMUNOTERAPIA	23
MECANISMOS DE ACCIÓN INMUNOTERAPÉUTICA	23
INMUNOTERAPIA ACTIVA	24
ENSAYOS CLINICOS ACTUALES	25
MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	26
COLESTEROL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	27
<b>II.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>29</b>
<b>IV.HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>V.OBJETIVO GENERAL</b>	<b>29</b>
<b>VI.OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>29</b>
<b>VII.METODOLOGÍA</b>	
MODELO DEL CONEJO CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER	
DIETA 2% COLESTEROL	30

PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS DE CEREBRO_____	30
INMUNOHISTOQUÍMICA _____	30
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS_____	31
DOT BLOT_____	31

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DEL PÉPTIDO  $\beta$ A pE  
11-42 Y BA 11-42 EN CONEJOS.

GENERACIÓN DEL SUERO ANTI -BA 11-42 _____	32
EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS PÉPTIDOS BA POR EL SUERO ANTI BA 11-42 MEDIANTE ELISA_____	32
WESTERN BLOT _____	33
DOT BLOT_____	33
MAPEO DE EPÍTOPOS_____	33
AMPLIFICACIÓN_____	34
PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO_____	34
TITULACIÓN DEL ELUIDO_____	35
EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA_____	35
OBTENCIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA_____	36

EVALUACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO COMO  
INMUNOMODULADOR.

DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS MEDIANTE ELISA_____	37
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR._____	37
PÉRFIL DE CITOCINAS_____	38
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA_____	38
DOT BLOT_____	39

EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES EN EL  
MODELO DEL CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL MEDIANTE LA  
INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO  $\beta$ A P(E) 11-42\_\_\_\_\_
 39 |

DETECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE $\beta$ A MEDIANTE ELISA_____	39
--	----

## VIII.RESULTADOS

1	EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS DEL PÉPTIDO BA EN EL MODELO DE CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL	41
2	COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DEL PÉPTIDO BA P(E) 11-42 Y BA 11-42 EN CONEJOS.	47
	EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL SUERO ANTI BA P(E) 11-42 VS BA 11-42	47
	EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE AGREGACIÓN DE LOS PÉPTIDOS $\beta$ a 1-42, p(E) 3-42 Y p(E)11-42 POR EL SUERO ANTI $\beta$ a 11-42	48
	EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES CON EL SUERO ANTI $\beta$ a 11-42	50
	SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS SELECCIONADAS	53
3	EVALUACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO COMO INMUNOMODULAD	55
	PERFIL DE CITOCINAS	57
	ESPECIES AMINOTRUNCADAS RESPUESTA HUMORAL	59
	ESPECIES AMINOTRUNCADAS: PÉRFIL DE CITO	60
4	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA	63
	RESULTADOS DE LA DENSITOMETRIA DEL DOT BLOT	63
5	EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES EN EL MODELO DEL CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN ACTIVA CON EL PÉPTIDO $\beta$ A P(E) 11-42	65

<b>IX.DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>X.CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>XI.REFERENCIAS</b>	<b>72</b>

## **RESUMEN**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores. La EA es un trastorno neurodegenerativo y progresivo caracterizado por la pérdida de memoria, aprendizaje, percepción espacio temporal y pérdida de la autovalía. El principal factor de riesgo de la EA es el grupo etario, donde el riesgo se duplica cada 5 años tras haber cumplido los 65 años de edad.

La EA se clasifica en 2 grupos: enfermedad Familiar y la enfermedad Esporádica. La primera se caracteriza por tener un patrón de herencia mendeliana y por manifestarse a edades tempranas (<60 años). Mutaciones en tres genes se implican en la fisiopatología de la enfermedad familiar: en el gen de la proteína precursora amiloidea (APP) y en los genes de las presenilinas (PS1) (Gatz, et al., 2006). La enfermedad esporádica representa al 95% de los pacientes con EA y se manifiesta en individuos de >65 años de edad. En la actualidad solo el gen de la APOE se ha implicado como factor de riesgo. Otros factores de riesgo pueden ser: diabetes, obesidad, hipertensión, traumatismos craneoencefálicos, el tabaquismo y enfermedades vasculares (Reitz, et al., 2011).

Se han descrito dos lesiones histopatológicas características de la EA. La primera consiste en neurofibras intracelulares conformadas por agregados de la proteína asociada a microtúbulos tau hiperfosforilada (LaFerla, et al ,2007). La segunda lesión, es la presencia de depósitos extracelulares del péptido beta-amiloide ( $\beta$ A) en regiones cerebrales específicas, los cuales referimos como placas amiloides. En la actualidad sabemos que los agregados del péptido  $\beta$ A también se encuentran de forma intracelular así como adheridos a los vasos sanguíneos donde promueven el desarrollo de la angiopatía amilóide cerebral (Selkoe, et al ,2010)

Existen una gran cantidad de teorías para explicar la causa de la EA: la hipótesis de la cascada amiloide, la degeneración de los microtúbulos, la hipótesis colinérgica, el daño oxidativo, la inflamación y los iones metálicos; estas teorías no son excluyentes entre si, ya que la EA es una enfermedad multifactorial.

En la actualidad la teoría de la hipótesis amiloidea es la más estudiada. Ésta hipótesis fue propuesta en 1992 por Hardy y Higinis. Ellos propusieron que es la deposición del péptido  $\beta$ a, principal componente de las placas seniles, es la causa principal de la EA y que las marañas neurofibrilares, la pérdida neuronal, daño vascular y demencia son resultado directo de su acumulación (Hardy and Higgins, 1992). Esta teoría ha sufrido modificaciones a través del tiempo. Una de las modificaciones más relevantes es la "Hipótesis oligomérica", la cual propone que son los oligómeros del péptido  $\beta$ A los efectores tóxicos de la enfermedad. La segunda modificación propone que es requerida la presencia de iones metálicos en los agregados amiloides para que se produzca

el estrés oxidativo asociado con el efecto neurotóxico (Bush, et al ,2003:Huang et al., 1999:Huang et al., 2004 and Smith et al., 1997).

El péptido  $\beta$ A es un péptido de entre 38 y 43 aminoácidos de longitud con gran heterogeneidad en sus extremos amino y carboxilo terminal. Este péptido es el resultado del corte endoproteolítico de la proteína precursora del amilóide o APP por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas (Selkoe,2002). En individuos sanos la principal especie del péptido liberado a circulación es de 40 aminoácidos de longitud ( $\beta$ A 40), mientras que una pequeña proporción, 10%, corresponde a la variante de 42 residuos,  $\beta$ A 42. La variante  $\beta$ A 42 es más hidrofóbica, más tóxica y posee una mayor capacidad de fibrilación. El  $\beta$ A 42 es la isoforma más abundante en las placas amiloides encontradas en los cerebros de los pacientes con la EA (LaFerla, et al, 2007). Históricamente los péptidos  $\beta$ A 1-42/1-40 han sido el foco de interés para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, se ha reconocido la presencia de especies amino-truncadas en cerebros de dichos pacientes (Liu, et al ,2006)

### **ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS**

A través del análisis de cerebros humanos con placas seniles y marañas neurofibrilares, se demostró que los agregados de amiloide en estadios tempranos están conformados por especies aminotruncadas de  $\beta$ A1-42, incluyendo péptidos con inicio en el residuo 3, 4, 5, 8, 9 y 11. Con base en esto se propuso la implicación de las especies aminotruncadas en los procesos amiloidogénicos tempranos en el desarrollo de la EA (Seargent, et al ,2003). En cerebros de pacientes con EA se observó que las placas neuríticas están conformadas en un 50% por las especies aminotruncadas 3-42 y 11-42 (He, et al, 1999). Estas especies truncadas presentan una modificación postraduccional, la ciclización del glutamato en la posición amino terminal, formando así p(E)3-42 y p(E)11-42. Esta modificación es mediada por la enzima glutamil ciclasa, enzima localizada en el aparato de Golgi (Schilling, et al,2008). Estudios anteriores demuestran que esta modificación promueve resistencia contra la actividad de aminopeptidasas extracelulares.

En estudios in vitro se ha demostrado que las variantes  $\beta$ A x-42 son mas fibrilogénicas por lo que se agregan más rápidamente que las variantes x-40. Se observó que  $\beta$ A 42 se deposita primero en placas difusas en el cerebro de pacientes con la EA y el  $\beta$ A 40 contribuye posteriormente al crecimiento de las placas amiloideas para generar las placas neuríticas densas. Sin embargo, la severidad de la enfermedad correlaciona con los depósitos de placas difusas compuestas principalmente por especies amino truncadas, mientras que la especie completa se encuentra solo en placas densas. Estudios in vitro han demostrado que es mayor la agregación de los péptidos con deleciones en el extremo amino terminal, lo cual sugiere que son estas especies las iniciadoras de la



formación de las placas neuríticas, donde fungen como centros de nucleación (Pike, et al., 1995).

Debido al rápido incremento en la incidencia de pacientes con la EA, se espera que en las próximas décadas se agrave el problema social, económico y humano que este padecimiento implica. Por ello la importancia de trabajar en el desarrollo de terapias eficientes. A través de una amplia gama de estudios in vitro y del estudio de inmunoterapia en modelos animales se demostró que la inmunoterapia es una estrategia efectiva para reducir los niveles del péptido  $\beta$ a así como para promover mejoría en el área cognitiva (Lemere, et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42 induce anticuerpos dirigidos hacia la porción aminoterminal del péptido, los cuales son capaces de incrementar la frecuencia y severidad de microhemorragias además de que no reconocen a las especies aminotruncadas del péptido  $\beta$ a.

En el presente trabajo identificamos la presencia de especies amino truncadas/ modificadas del péptido beta amiloide en cerebro de conejo alimentado con una dieta alta en colesterol lo que es un hallazgo nuevo descrito por primera vez por nuestro grupo (Perez-Garmendía, et al., 2013).

Identificamos que la modificación del ácido glutámico a piroglutamato en la especie aminotruncada/modificada  $\beta$ a 11-42 cambia su propiedades antigénicas e inmunogénicas. Aunque las dos especies,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 inducen anticuerpos que se unen a las tres mayores especies patogénicas presentes en cerebros humanos ( $\beta$ a 1-42,  $\beta$ a p(E) 3-42 y  $\beta$ a p(E) 11-42), estos anticuerpos reconocen diferentes epitopos y diferentes estados de agregación de beta amiloide.

Evaluamos el papel inmunomodulador del ácido retinoico (ATRA), identificamos que éste es capaz de favorecer un cambio hacia un perfil anti-inflamatorio Th2 en protocolos de inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42 en presencia de saponina en ratones. Sin embargo, este cambio no se observó en protocolos de inmunización con los péptidos aminotruncados/modificados  $\beta$ a p(E) 3-42 o  $\beta$ a p(E) 11-42 .

Reconocimos que la inmunización con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 no induce células T autoreactivas. Esta observación es muy importante para la inmunoterapia de la EA debido a que uno de los efectos secundarios importantes descritos anteriormente es la infiltración de células T autoreactivas en cerebros de pacientes en ensayos clínicos.

Finalmente evaluamos el efecto protector de la inmunización con la especie aminotruncada/modificada  $\beta$ a p(E) 11-42 . Encontramos que los anticuerpos producidos son capaces de reducir la carga amiloide tanto en conejos con dieta alta en colesterol así como en ratones transgénicos 3xTg- AD. En conjunto, estos resultados y la observación de la ausencia de células T autoreactivas indican que el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 puede ser una herramienta inmunoterapéutica prometedora para la EA.

# **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA Y PROTECTORA DE LAS ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE EN MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores. Es un trastorno neurodegenerativo y progresivo caracterizado por la pérdida de memoria, aprendizaje, percepción espacio temporal. El principal factor de riesgo de la EA es el envejecimiento, donde el riesgo se duplica cada 5 años tras haber cumplido los 65 años de edad.

La EA se clasifica en 2 grupos: enfermedad Familiar y la enfermedad Esporádica. La primera se caracteriza por tener un patrón de herencia mendeliana y por manifestarse a edades tempranas (<60 años). Mutaciones en tres genes se implican en la fisiopatología de la enfermedad familiar: en el gen de la proteína precursora amiloidea (APP) y en los genes de las presenilinas (PS1 y PS2) (Gatz et al., 2006). La enfermedad esporádica representa al 95% de los pacientes con EA y se manifiesta en individuos de >65 años de edad. En la actualidad solo la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la Apolipoproteína E, APOE, se ha implicado como factor de riesgo. Otros factores de riesgo pueden ser: diabetes, obesidad, hipertensión, traumatismos craneoencefálicos, el tabaquismo y enfermedades vasculares (Reitz et al., 2011). La enfermedades familiar y esporádica no sólo se distinguen por la edad de su manifestación, sino también por algunas de sus manifestaciones clínicas. Los pacientes con EA familiar desarrollan un mayor déficit de atención, lenguaje, funciones ejecutivas así como percepción espacio-visual. Así mismo, presentan un mayor decremento en los niveles de norepinefrina y acetilcolina y una mayor atrofia cortical. Por otro lado, los pacientes que manifiestan la enfermedad esporádica desarrollan un mayor déficit en memoria episódica y un mayor grado de lesión en la corteza temporal media (Rabinovicini, et al, 2010)

## **DEFICIT NEUROPSICOLOGICO**

La EA es una enfermedad progresiva cuyo desarrollo es de aproximadamente 10 años (McGeer, et al .,2013) . En las etapas iniciales, la patología afecta selectivamente al sistema límbico, lo cual, resulta en la manifestación clínica característica de la enfermedad, la pérdida de la memoria (Toledo-Morrell, 2000). Conforme progresa la enfermedad la región cortical se ve afectada, promoviendo la aparición del resto de los síntomas cognitivos que caracterizan a la demencia ( Jack, et al., 2010).

Los cambios neurofibrilares que ocurren en etapas tempranas de la EA, afectan a la región media del lóbulo temporal: hipocampo y corteza entorrinal. Esto lleva a la disrupción en la comunicación neuronal necesaria para la memoria episódica, mediante la cual se recuerdan acontecimientos y experiencias personales (revisado en: Martínez-Castillo, 2001). Esta disrupción resulta en un déficit progresivo en la capacidad de aprender y retener nueva información así como la incapacidad de recordar eventos de memoria a corto plazo y

posteriormente también en la memoria a largo plazo tales como actividades autobiográficas (Feldman, et al., 2007). Los pacientes con EA presentan dificultad para almacenar la información nueva, es por ello que tienden a olvidar rápidamente la información recientemente adquirida. Otro de los síntomas de estos pacientes es la aparición de intrusiones, es decir errores en los cuales la información previamente aprendida se evoca cuando el sujeto intenta aprender nuevo material. Es por ello que la amnesia anterógrada es el signo característico de la patología de la EA ( DeMeyer, et al., 2010).

Durante el curso de la enfermedad los pacientes desarrollan déficit en la memoria semántica, es decir, pérdida de conocimiento relativo a hechos históricos, geográficos, aritméticos y de acceso al léxico.

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La EA es una patológica compleja con múltiples manifestaciones clínicas. Debido a su gran complejidad, la EA ha sido reconocida como un espectro de enfermedades, no como una sola enfermedad. La complejidad de la enfermedad aumenta con la edad y las morbilidades concomitantes, lo que resulta en una enfermedad con un amplio rango de manifestaciones clínicas (Ferreira, et al., 2011). En función a sus características clínicas y neuropatológicas, la enfermedad se ha clasificado en 4 grupos: Pre-EA ( déficit cognitivo moderado), EA temprana, EA moderada y EA severa. En la tabla 1 se muestran las diferencias clínicas y neurológicas de las etapas de la EA:

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y neuropatológicas de la EA (Ferreira, 2011)

<b>Clínicas</b>	<b>Neuropatológicas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>PRE EA</u></li> <li>• Alteración en las funciones ejecutivas</li> <li>• Deterioro de la memoria a corto plazo y episódica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acumulación y agregación del péptido <math>\beta</math>A</li> <li>• Aumento en la expresión de las proteínas del ciclo celular</li> <li>• Aumento en la expresión de proteínas de adhesión</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>EA TEMPRANA</u></li> <li>• Desorientación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuroinflamación y astrogliosis</li> <li>• Hiperfosforilación de Tau y formación de marañas neurofibrilares</li> <li>• Atrofia sináptica</li> <li>• Degeneración granovacuolar</li> <li>• Placas amilóides</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agnosia</li> <li>• Apraxia</li> <li>• Decremento en la fluencia y vocabulario</li> <li>• Decremento en la capacidad analítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daño a las neuronas colinérgicas</li> <li>• Disfunción de la insulina en sistema nervioso central</li> <li>• Estrés oxidativo</li> <li>• Atrofia hipocampal</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>EA MODERADA</u></li> <li>• Cambios en el comportamiento y estado de ánimo:</li> <li>• Irritabilidad</li> <li>• Agresividad</li> <li>• Delirio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daño neuronal extensivo</li> <li>• Pérdida del volumen cerebral</li> <li>• Aumento del volumen ventricular</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>EA SEVERA</u></li> <li>• Deterioro de la memoria a largo plazo</li> <li>• Confinamiento</li> <li>• Pérdida de identidad</li> <li>• Desregulación en las proteínas del ciclo celular</li> <li>• Desregulación en las proteínas de adhesión celular</li> <li>• Neuroinflamación y astrogliosis</li> <li>• Atrofia Sináptica</li> <li>• Degeneración granovacuolar</li> <li>• Daño neuronal prominente (Neuronas</li> </ul>	

colinérgicas)

- Disfunción de la insulina cerebral y de factores tróficos
- Daño oxidativo
- Distrofia hipocampal
- Daño neural severo
- Pérdida en el volumen cerebral
- Aumento en el tamaño de los ventrículos

## **EPIDEMIOLOGÍA**

La EA es la principal causa de demencia en los países Occidentales. Se estima que alrededor de 24 millones de personas en el mundo presentan EA, con una incidencia de 4.6 millones de casos por año (Ferri, et al., 2006). Debido a que las sociedades están aumentando la proporción de personas de edad avanzada, se prevee que esta cifra se duplique cada 20 años (Mayeux, et al., 2012).

La prevalencia de la EA incrementa exponencialmente con la edad, incrementando marcadamente a partir de los 65 años. En Estados Unidos 1 de cada 9 (11%) personas mayores de 65 años (11%) presenta EA y 1 de cada 3 (32%) personas mayores de 85 años. De los pacientes diagnosticados con EA se estima que el 4% tienen edad menor de 65 años, 13% entre 65 y 75 años, 44% entre 75 y 84 años y el 30% más de 85 años (Herbert, et al., 2013).

Una gran cantidad de factores han sido correlacionados con el riesgo de desarrollar EA, siendo la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, obesidad y dislipemia algunos de los más relevantes (Rastas, et al., 2010).

En nuestro país se ha estimado que existen 350,000 personas afectadas con la EA, de las cuales, mueren alrededor de 2.030 anualmente. En Estados Unidos mueren aproximadamente 100,000 personas por dicha enfermedad siendo así la cuarta causa de muerte en ese país (INNN).

## **PATOLOGIA MACROSCÓPICA**

A pesar de que la examinación visual del cerebro no es una herramienta diagnóstica, se ha observado que en los cerebros de los pacientes con EA avanzado se presenta una atrofia cortical simétrica en el lóbulo temporal. En dichos pacientes la corteza visual, motora y sensitiva no se ven afectadas. Como consecuencia de la atrofia cerebral, los ventrículos laterales se encuentran dilatados (ex vacuo hydrocefalus) y los surcos de los lóbulos parietal, temporal y frontal reducidos (Riga, et al., 2011). Usualmente estas manifestaciones vienen acompañadas de enfermedad oclusiva de pequeños vasos, por lo que es común encontrar microinfartos corticales, infartos lagunares en el ganglio basal, y desmielinización de la sustancia blanca periventricular (Serrano-Pozo, et al., 2011)

## **PATOLOGÍA MICROSCÓPICA**

Se han descrito dos lesiones histopatológicas características de la EA. La primera consiste en marañas neurofibrilares intracelulares, conformadas por agregados de la proteína asociada a microtúbulos Tau hiperfosforilada (Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986). La segunda lesión, es la presencia de depósitos extracelulares del péptido beta-Amiloide ( $\beta$ A) en regiones cerebrales específicas, los cuales referimos como placas amiloides. En la actualidad sabemos que los agregados del péptido  $\beta$ A también se encuentran de forma intracelular así como adheridos a los vasos sanguíneos donde promueven el desarrollo de la angiopatía amiloide cerebral (revisado en: Selkoe, 2010).

Otras alteraciones observadas en las regiones cerebrales afectadas en los pacientes con EA son la activación de la microglía, reactivación de la gliosis, degeneración granovacuolar, así como muerte neuronal. Esta última varía aproximadamente de un 60% en la capa de células piramidales del hipocampo hasta menos del 50% en núcleos basales, corteza frontal y temporal (Feldman, et al., 2007). También se ha observado, por medio de microscopía electrónica, la reducción en el número de sinapsis así como en la inmunoreactividad de las proteínas sinápticas (Almeida, et al., 2005). Esta pérdida se correlaciona con la disfunción cognitiva en pacientes con EA (Masliah, et al., 2005). Sin embargo los cambios más característicos observados en los cerebros de los pacientes con la EA son la presencia de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares.

## **MARAÑAS NEUROFIBRILARES**

Las marañas neurofibrilares son fibrillas intracelulares resultantes de la fosforilación anormal y

plegamiento de la proteína asociada a microtúbulos Tau. En las etapas tempranas de la enfermedad las marañas neurofibrilares se localizan en las regiones del sistema límbico, conforme progresa la enfermedad estas se presentan en la corteza cerebral, núcleo subcortical y tallo encefálico ( Braak, et al., 2011).

La evaluación de las marañas neurofibrilares en cerebros de pacientes con EA demostró que están conformadas por filamentos helicoidales pareados, es decir, fibrillas de 1 nm en diámetro que forman pares con una conformación tridimensional. Asociadas a las marañas neurofibrilares se encuentran neuritas distróficas, esto es el resultado de la degeneración de las dendritas y axones de las neuronas portadoras de marañas.

En función de la distribución de Tau, han sido descritas 3 etapas morfológicas (Braak, Braak, 1997):

- 1.-Marañas neurofibrilares difusas. Se caracteriza por la presencia de Tau en el citoplasma, de neuronas no degeneradas con dendritas preservadas y un núcleo central.
- 2.- Marañas neurofibrilares intraneuronales . Compuestas por agregados filamentosos de Tau que se extienden hacia las dendritas distorsionadas y hacia la región proximal del axón. Este reacomodo resulta en el desplazamiento del núcleo hacia la periferia del soma.
- 3.- Marañas neurofibrilares extracelulares “fantasma”. Resultan de la muerte de la neurona portadora de la maraña. Se identifican por la ausencia del núcleo dentro del citoplasma.

El criterio de diagnóstico de Braak y Braak propone 4 etapas de progresión de la enfermedad en función de la presencia y distribución de las marañas neurofibrilares. En las etapas Braak I y II se localizan las marañas neurofibrilares en la corteza entorrinal y áreas adyacentes. En las etapas III y IV las marañas son mas frecuentes en hipocampo y amígdala. Finalmente en las etapas V y VI, las marañas se localizan a lo largo de la corteza involucrando las áreas motoras y sensitivas ( Alafuzoff, 2008).

A pesar de que las marañas neurofibrilares son una característica histopatológica para el diagnóstico de la EA, estas lesiones se presentan también en otras enfermedades neurodegenerativas.

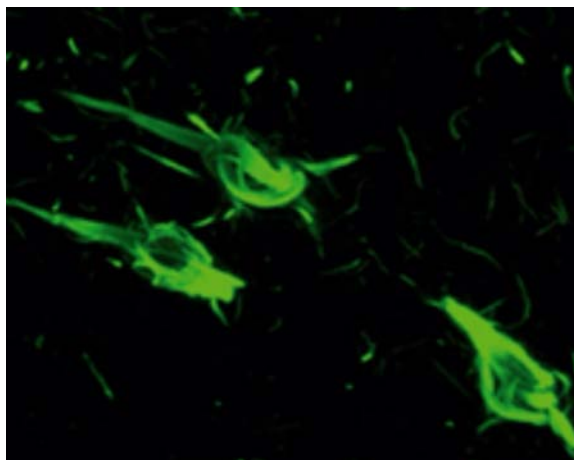


Figura 1. Marañas neurofibrilares presentes en el cerebro de un paciente con EA (Helbecque, et.al., 2003)

## **PLACAS AMILOIDES**

La segunda lesión histopatológica característica de la EA son las placas amiloides. Estas son el resultado de la acumulación extracelular del péptido  $\beta$ A.

Con base en su morfología las placas amiloides son clasificadas en dos grupos principales: las placas difusas y las placas seniles compactas.

Las placas seniles están conformadas por una masa central de filamentos extracelulares fibrilares que radian hacia la periferia donde se asocian con procesos neuronales, astrocíticos y microgliales. Los procesos neuronales o neuritas distróficas contienen filamentos helicoidales pareados, mitocondrias y cuerpos densos de origen lisosomal (revisado en: Fiala, et al.,2007). Las placas seniles se asocian con efectos deletéreos en la superficie del neuropilo, tales como aumento en la curvatura de la neurita, pérdida sináptica, reclutamiento y activación de la astrogliá y microglía (Vehmas, et al.,2003).

Las placas difusas están conformadas por agregados amiloides no fibrilares y carecen de neuritas distróficas, reacción de la glía y de una arquitectura interna organizada (Andrea, et al.,2010). Las placas difusas pueden encontrarse en los cerebros de adultos mayores sanos.

Se ha propuesto que las etapas de desarrollo de las placas amiloides y el daño neuronal resultante comienza con la formación de placas difusas.

Las placas amiloides se acumulan inicialmente en la corteza cerebral. Posteriormente se desarrollan en corteza entorrinal, hipocampo, ganglio basal, tallo cerebral, cerebelo y finalmente en la corteza asociativa (Serrano, et al.,2011).

## **PÉPTIDO BETA AMILOIDE**

El péptido  $\beta$ A es un péptido con gran heterogeneidad en sus extremos amino y carboxilo terminal. La secuencia de aminoácidos de dicho péptido fue determinada por Glenner en 1984. El  $\beta$ A se encuentra en bajas concentraciones como un componente normal de los fluidos biológicos, líquido cefalorraquídeo y plasma. El  $\beta$ A, en estado monomérico, participa en algunas funciones biológicas, dentro de las que se encuentran: estimulante de la proliferación celular, promotor de la adhesión celular, antioxidante, neurotrófico, neuroprotector, regulador negativo de la transmisión sináptica excitadora y quelante de iones metálicos tóxicos (Giuffrida, et.al.,2010). En adultos mayores sanos la principal especie del péptido liberado a circulación es de 40 aminoácidos de longitud ( $\beta$ A 40), mientras que una pequeña proporción, 10%, corresponde a la variante de 42 residuos,  $\beta$ A 42. La variante  $\beta$ A 42 es más hidrofóbica, posee una mayor capacidad de fibrilación y sus agregados son más tóxicos. El  $\beta$ A 42 es la forma más abundante en las placas amiloides encontradas en los cerebros de los pacientes con la EA (LaFerla, et al., 2007).



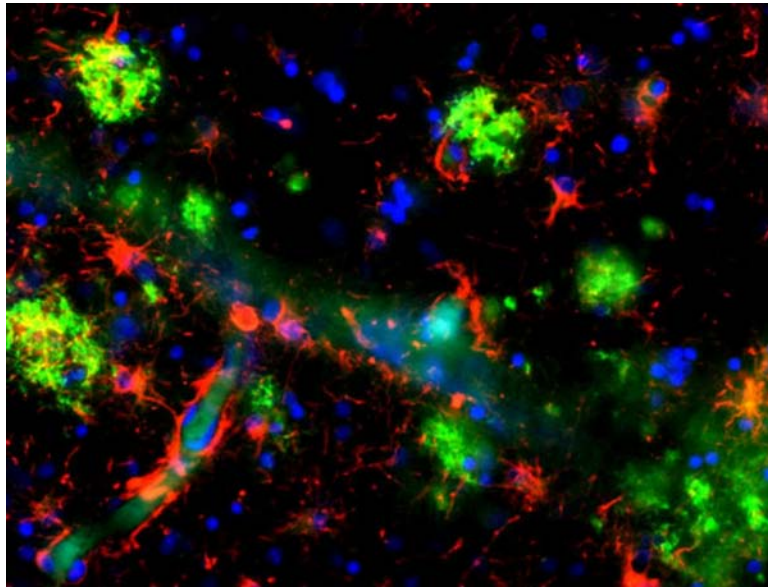


Figura 2. Placa Amiloide en cerebro de paciente con EA ( Purushotuman, 2012)

El  $\beta$ A se forma como resultado del corte endoproteolítico de la proteína precursora del Amiloide o APP por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas (Figura 3).

La APP puede ser procesada por dos principales vías: la no amiloigénica y la amiloigénica. En la primera APP sufre un procesamiento proteolítico por la  $\alpha$ -secretasa, a 83 aminoácidos del residuo carboxilo terminal, produciendo un ectodominio aminoterminal que se secreta al medio (Zhang, et al.,2011). Este dominio es conocido como  $\alpha$ -APP y tiene un papel importante en la neuroprotección contra la toxicidad por glutamato, privación de factores tróficos y de glucosa (Claasen, et al., 2009).El fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos se retiene en la membrana plasmática y se corta por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo un fragmento nombrado P3. Debido a que el corte generado en esta vía se encuentra dentro de la región del  $\beta$ A, el corte por la  $\alpha$ -secretasa evita la producción del mismo (Feldman, et al., 2007). En un inicio se consideraba que el péptido P3 era no amiloigénico, sin embargo, experimentos *in vitro* han demostrado que este fragmento forma fibrillas amiloides. Estudios fisicoquímicos demuestran que la hidrofobicidad del péptido P3 favorece su agregación (Higgins, et al., 1996). Así mismo, se ha demostrado la presencia del péptido p3 en las placas neuríticas de los pacientes con EA (Le, et al.,2001). Por lo que se ha postulado que el péptido P3 participa en el proceso de agregación característico de la enfermedad de Alzheimer.

En la vía amiloigénica, el corte inicial de APP es mediado por la  $\beta$ -secretasa a 99 aminoácidos del residuo carboxilo terminal (Zhang, et al.,2011). Este corte resulta en la liberación de  $\beta$ -APP al espacio extracelular, dejando un fragmento de 99 aminoácidos anclado a la membrana plasmática, donde el extremo aminoterminal será el primer aminoácido del péptido  $\beta$ A. El corte por la  $\gamma$ -secretasa, entre los residuos 38 y 43, libera al  $\beta$ A intacto. La mayoría del péptido  $\beta$ A producido es de 40 aminoácidos de longitud y solo un 10% es de 42 aminoácidos. Los agregados del péptido  $\beta$ A 42 promueven: la disfunción mitocondrial, inducción de genes

apoptóticos, formación de canales iónicos que resultan en pérdida de la homeostásis de calcio, inducción de la Vía JNK/SAPK, activación de microglía y genes proinflamatorios, formación de especies reactivas del oxígeno, toxicidad y muerte celular (Feldman, et al.,2007).

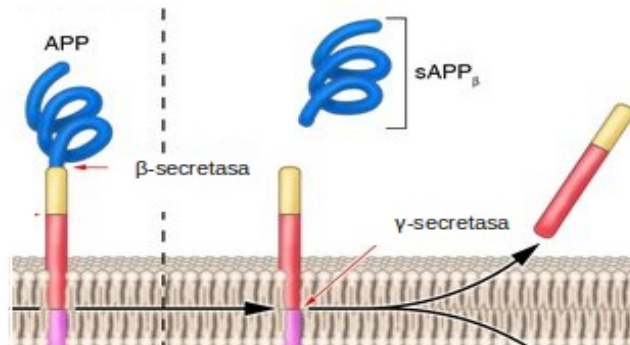


Figura 3. Procesamiento de la proteína precursora amiloidea por la β y γ- secretasa para producir el péptido Ba ( Gandy, et al.;2005)

El péptido βA es un péptido anfifílico debido a que sus primeros 28 residuos son polares y los últimos 12 son no polares. A pH neutro la porción polar contiene 6 aminoácidos cargados positivamente y 6 negativamente, exagerando las diferencias entre las porciones terminales del péptido. Debido a su polaridad es un péptido que fácilmente se agrega (Nagy, et al., 2005). Por otro lado los 12 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal le proveen al péptido estabilidad, lo cual favorece su proceso de oligomerización y polimerización en fibrillas.

El βA, bajo condiciones específicas sufre un desplegamiento. Esta inestabilidad promueve la asociación y formación de los agregados altamente ordenados típicos de la enfermedad (Carlo, et al., 2010). En estudios recientes se ha demostrado que la acumulación de oligómeros es más relevante que la formación de placas en el procesos de deterioro cognitivo, es decir los oligómeros de bajo peso molecular son más tóxicos que las fibrillas (Yanker, et al., 2009). A través de estudios de espectroscopia infrarroja se demostró que los oligómeros poseen una estructura β-plegada antiparalela y sufren una transformación para poseer la estructura β-plegada paralela característica de las fibrillas (Selkoe, 2010). Las moléculas de βA se asocian para formar protofilamentos, resultado de péptidos enlazadas helicoidalmente en torno a su eje. Aquí las moléculas de βA están en una conformación β-asa-β. Los protofilamentos son ensamblajes solubles y curvilíneos de βA con un diámetro de 6-8 nm y longitud de 200nm. Estas protofibrillas se forman lentamente en solución pero desaparecen rápidamente para dar origen a las fibrillas. Es por ello que los protofilamentos son considerados intermediarios en el proceso de fibrilación (Broersen, et al.,2010). Dos protofilamentos se empaquetan cara a cara a través del extremo carboxilo terminal para conformar las fibrillas de βA, las cuales, están formadas por β-plegadas en paralelo, en una forma altamente ordenada (Roychaudhuri, et al.,2008). Finalmente estas fibrillas

se agregan para conformar las placas neuríticas.

El proceso de agregación del  $\beta$ A se resume en 5 pasos: cambios conformacionales, oligomerización, nucleación, elongación y ramificación (Carlo, et al.,2010). En el 2008 se propuso la hipótesis de trampa de desplegamiento, en la cual se postula que los oligómeros del  $\beta$ A interactúan con proteínas transitoriamente desplegadas a partir de hojas beta expuestas, induciendo su unión y permanencia en forma desplegada. Así mismo el  $\beta$ A desregula proteínas chaperonas favoreciendo así el estado desplegado de las proteínas (Gruschus, et al., 2009). Es importante recalcar que la conformación del  $\beta$ A varía en función de su estado de agregación. En estado monomérico, el péptido se caracteriza por presentarse principalmente en conformación random coil, en estado dimérico se favorece la formación tanto de hélices  $\alpha$  como de  $\beta$ -plegadas, y finalmente en las fibrillas las proteínas se encuentran conformadas por  $\beta$ -plegadas (Gruschus, et al.,2009).

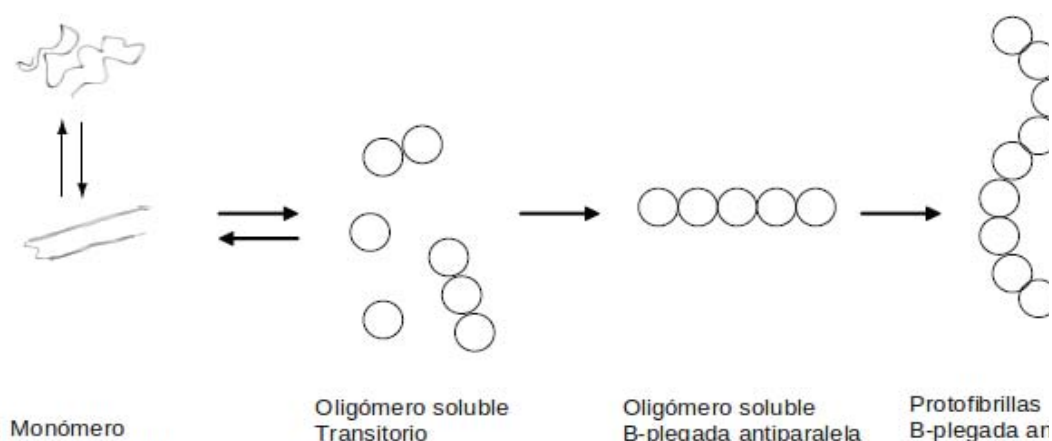


Figura 4. Plegamiento y ensamblaje de los péptidos  $\beta$ A , (Broersen, 2010)

En la actualidad sabemos que el péptido  $\beta$ A no solo se encuentra conformando los agregados difusos y las placas neuríticas previamente descritos, sino que también se encuentra adosado a los vasos sanguíneos donde promueve el desarrollo de la angiopatía Amiloide cerebral.

### **ANGIOPATIA AMILOIDE VASCULAR**

En los cerebros de los pacientes con EA se han observado una serie de cambios morfológicos en los vasos sanguíneos tales como: decremento de la densidad vascular, aumento de la tortuosidad vascular, degeneración de las células del músculo liso, alteraciones en el endotelio, fragmentación de capilares y permeabilidad anormal de la barrera hematoencefálica (BHE) (Dorr, et al., 2012). Estas alteraciones vasculares son resultado de la Angopatía Amiloide Vascul (CAA).

La CAA es la patología resultante de la acumulación de  $\beta$ A en los vasos sanguíneos de las leptomeninges y de la región cortical (Resink, et al., 2003). La deposición de  $\beta$ A en la pared de las arterias

cerebrales resulta en tono vascular alterado, inhibición de la angiogénesis, hipoperfusión en reposo y disminución de la respuesta hemodinámica ante los estímulos (Yamada, et al.,2012). Estos cambios cerebrovasculares preceden a los síntomas clínicos de la enfermedad y empeoran con el curso del proceso neurodegenerativo.

La CAA se encuentra fuertemente relacionada con la EA, ya que alrededor del 80% de dichos pacientes manifiestan CAA, a diferencia del 10-40% que presentan los adultos mayores sanos (Jellinger, et al., 2005). El estudio de envejecimiento Honolulu-Asia demostró que los pacientes con EA que presentan CAA tienen un mayor decaimiento cognitivo ( Pfeifer, et al., 2002). Así mismo se observó que el aumento de la severidad de la CAA exacerba este déficit (Nicolakakis, et al.,2011).

La CAA se manifiesta inicialmente en el lóbulo occipital, seguido del lóbulo frontal, temporal y parietal. El lóbulo occipital es el más afectado, tanto en frecuencia como en severidad (Attems, et al.,2005)

La identificación de  $\beta$ A en sangre, líquido cefalorraquídeo y líquido intersticial hizo pensar que el  $\beta$ A circulante era el responsable de la CAA (Zocklovic, et al.,2002). Sin embargo la falta de lesiones vasculares en modelos de ratón transgénico para la EA, característicos por las concentraciones elevadas de  $\beta$ A en plasma, anuló dicha hipótesis (Burgermeister, et al., 2000). Posteriormente se consideró que las células endoteliales y musculares de los vasos sanguíneos, así como los pericitos asociados, eran la fuente del  $\beta$ A presente en los vasos sanguíneos (Kalanina, et al., 1996). Sin embargo, la concentración de  $\beta$ A producido por dichas células no es suficiente para causar el daño vascular tan severo. Finalmente se planteó la Hipótesis Neuronal, ésta menciona que es el  $\beta$ A de origen neuronal, a través de su drenaje por el líquido intersticial perivascular, el que se acumula y deposita en los vasos sanguíneos ( Weller, et al,1998).

Durante el desarrollo de la CAA el  $\beta$ A fibrilar entra en contacto con las células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Frackowiak, et al.,1994). Debido a que los niveles tisulares de  $\beta$ A 1-40 se relacionan con la severidad de la CAA (Suzuki, et al.,1998), se ha planteado que el proceso de deposición vascular inicia con el péptido  $\beta$ A 1-40 y posteriormente se da una acumulación masiva de  $\beta$ A 1-42 (Shinkai, et al.,1995). En etapas tempranas, el  $\beta$ A se deposita en la porción abluminal de la túnica media del vaso, rodeando las células musculares y la adventia. Conforme progresa la severidad de la patología se afectan todas las regiones del vaso, lo cual, promueve la muerte de las células musculares. Finalmente se disrumpe la estructura vascular, formando "un barril doble", microaneurismas, necrosis fibrilar y hemorragias perivasculares (Revesz, et al.,2003). La vasoconstricción y degeneración vascular resultante de la CAA eleva el riesgo de hemorragias e infartos ( Tian, et al.,2006).

En la CAA se han encontrado proteínas asociadas al  $\beta$ A. Estas proteínas favorecen el proceso de agregación del péptido. En arterias se han encontrado asociadas las proteínas del complemento, proteína amiloide sérica P, APOE, ApoJ, vitronectina y proteínas de la matriz extracelular (Veerbeek, et al.,1998). En capilares, se encontraron Colágeno IV, laminina, fibronectina y perlecan. (Hart, et al., 2001) El perlecan acelera la formación de fibrillas de  $\beta$ A mientras que la laminina se asocia firmemente al péptido en la membrana basal inhibiendo su fibrilación (Castillo, et al., 2000).

Se ha propuesto que el deposito de  $\beta$ A en el espacio vascular es resultado de la deficiencia en la remoción del péptido del parénquima hacia la periferia para su degradación (Weller, et al.,2009). Así mismo, conforme aumenta la edad, la actividad de las enzimas degradadoras del  $\beta$ A, Neprilisina, IDE, ACE,

plásmina y MMP, decremента (Selkoe, 2001). Esto favorece la acumulación del péptido en el parénquima cerebral. Como resultado, se da un aumento en la expulsión del  $\beta$ A del parénquima cerebral a través del drenaje perivascular, lo que incrementa el riesgo de desarrollar CAA. La edad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de CAA, debido a que favorece el endurecimiento de las arterias, lo que resulta en el engrosamiento y acumulación de colágeno en la membrana basal. Esto, interfiere con el drenaje perivascular y crea un ambiente favorecedor para la agregación del  $\beta$ A ( Farkas, et al.,2000).

A partir de todas estas evidencias se propuso un modelo del desarrollo de la CAA. En éste se postuló que la principal fuente de  $\beta$ A en la CAA es el péptido de origen neuronal, el cual, llega a los vasos sanguíneos a través del drenaje del fluido intersticial. Al entrar en contacto con las células musculares de los vasos sanguíneos, el  $\beta$ A es internalizado o depositado de forma extracelular. Esto induce la degradación de las células musculares y endoteliales, lo que resulta en rompimientos en la BHE. La alteración en la permeabilidad de la BHE favorece la acumulación de  $\beta$ A en la periferia, lo cual resulta en la degradación vascular. Finalmente la degradación vascular favorece el depósito y acumulación de  $\beta$ A ( Resink, et al.,2003).

EL depósito de  $\beta$ A en vasos sanguíneos activa la cascada inflamatoria, estrés oxidativo, altera la homeostasis celular a través de la formación de canales e induce la muerte celular (Revesz, et al,2009)

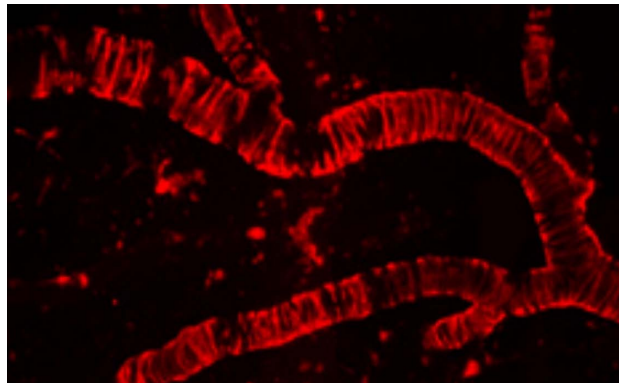


Figura 5. CAA en corteza cerebral de un paciente con EA (Cortes-Cantelli, 2009)

Existe una gran cantidad de teorías para explicar la causa de la EA: la hipótesis de la cascada amiloide, la degeneración neurofibrilar, la hipótesis colinérgica, el daño oxidativo, la inflamación y los iones metálicos; estas teorías no son excluyentes entre sí, ya que la EA es una enfermedad multifactorial, lo que dificulta comprender la totalidad de la patología con base en una sola de ellas.

### **HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.**

En la actualidad la teoría de la hipótesis amiloidea es la más estudiada, la cual fue propuesta en 1992 por Hardy y Higgings. Ellos propusieron que es la deposición del péptido  $\beta$ a, principal componente de las

placas seniles, la causa principal de la EA (Hardy and Higgins, 1992).

Dicha hipótesis marca que cuando existe un desbalance entre la síntesis (aumento) y la degradación (disminución) del péptido  $\beta$ A, se favorece su agregación, principalmente de  $\beta$ A 42, lo cual conlleva al resto de las alteraciones cerebrales incluidas la formación de las marañas neurofibrilares, muerte celular, disminución del número de sinapsis, decremento en la liberación de neurotransmisores y procesos inflamatorios (La Ferla, 2007; Muller, et al., 2008)

La hipótesis de la cascada amiloidea se sustenta en las siguientes evidencias:

- 1.- La presencia de mutaciones en los genes de APP, PS1 Y PS2 induce la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer
- 2- Pacientes con Síndrome de Down manifiestan enfermedad de Alzheimer en edad temprana
- 3.- Mutaciones en el gen que codifica para la proteína Tau promueven demencia frontotemporal con Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por la deposición de Tau en marañas neurofibrilares sin deposición de  $\beta$ A
- 4.- En ratones transgénicos que sobreexpresan APP y Tau, la agregación de  $\beta$ A precede a la hiperfosforilación y agregación de tau
- 5.- Terapias que promueven la remoción de beta Amiloide inducen mejoría cognitiva. (Solomon,2006)
- 6.- Caso de una paciente con Síndrome de Down con trisomía parcial del cromosoma 21 (p12q22.1), que no desarrolló características neuropatológicas ni neuropsicológicas características de EA. La paciente solo posee dos copias del gen de APP (Prasher, 1998).

Esta teoría ha sufrido modificaciones a través del tiempo. Una de las modificaciones más relevantes es la "Hipótesis oligomérica", la cual propone que son los oligómeros del péptido  $\beta$ A los efectores tóxicos de la enfermedad. La segunda modificación propone que es requerida la presencia de iones metálicos en los agregados amiloideos para que se produzca el estrés oxidativo asociado con el efecto neurotóxico (Bush, 2003,Huang et al., 1999,Huang et al., 2004 and Smith et al., 1997).

### **TOXICIDAD POR BETA AMILOIDE**

La acumulación y agregación del péptido  $\beta$ A juega un papel importante en la patogénesis de la EA. Los oligómeros, la principal forma tóxica, se localizan de forma intra y extracelular y poseen la capacidad de moverse entre estos compartimentos. Se ha demostrado la presencia de una gran variedad de estados de agregación de  $\beta$ A en los cerebros de los pacientes con EA, los cuales, difieren no solo en su forma de agregación sino también en su mecanismo de toxicidad (Cizas, et al.,2010).

El  $\beta$ A se une a neuronas pre y postsinápticas. La unión de  $\beta$ A se restringe a 30-50% de las neuronas, lo que sugiere que se da una interacción con un tipo específico de neuronas (Rauk, et al.,2008).

Dentro de las alteraciones neuropatológicas inducidas por  $\beta$ A se observan (Gable, et al.,2009):

- II Aumento de la concentración de calcio intracelular
- III Activación del complemento
- IV Inducción de Apoptosis
- V Formación de canales iónicos
- VI Producción de radicales libres
- VII Aumento en la producción de citocinas
- VIII Fosforilación de TAU
- IX Desensamblaje de microtúbulos ( dependiente de TAU)
- X Modulación de la cascada de traducción de señales
- XI Inhibición de LTP (Potenciación a largo plazo, reflejo de la capacidad de memoria y aprendizaje)
- XII Estimulación de LTD ( Depresión a largo plazo)
- XIII Inhibición de la función sináptica
- XIV Pérdida de la sinapsis excitatoria
- XV Disfunción mitocondrial
- XVI Alteración de la permeabilidad de membrana
- XVII Desregulación de la homeostasis iónica
- XVIII Inhibición del transporte axonal de vesículas y organelos
- XIX Inhibición del proteosoma
- XX Reclutamiento y activación de la astroglia y microglía.

Además del papel tóxico de los oligómeros extracelulares de  $\beta$ A, en los últimos años se ha demostrado el papel patológico del  $\beta$ A intracelular. La formación de oligómeros intracelulares precede la aparición de depósitos amiloides extracelulares, lo cual, se asocia con la disfunción sináptica en etapas preclínicas de la EA ( Gable, et al, 2009).

El  $\beta$ A intracelular es el resultado de los agregados amiloides no secretados, o bien, del  $\beta$ A secretado y reincorporado a la célula (Yang, et al.,1999). Hipotéticamente existen 5 vías que resultan en la producción y acumulación del  $\beta$ A intracelular (Li, et al.,2007):

- 1 .- El péptido  $\beta$ A insoluble formado en el retículo endoplásmico se reconoce como un péptido mal plegado y se trasloca al citoplasma para su degradación. Debido a deficiencias en el proteosoma, resultado de la edad y de la interacción con el  $\beta$ A, se genera una degradación deficiente del péptido lo que resulta en su agregación.
- 2 .- La Internalización del  $\beta$ A extracelular a través de endosomas. Debido a que el péptido aumenta la permeabilidad de la membrana lisosomal, el  $\beta$ A sale desde la vesícula hacia el citoplasma.
- 3 .- La salida pasiva del  $\beta$ A a través de los componentes de la vía secretora.
- 4 .- La difusión pasiva del  $\beta$ A extracelular desde la membrana plasmática hacia el citoplasma.
- 5 .- La entrada del  $\beta$ A a través de la interacción con el receptor  $\alpha$ 7- nicotínico de acetilcolina

El  $\beta$ A intracelular inhibe la actividad del proteosoma, de las enzimas ubiquitinizantes, disminuye la actividad de la cadena respiratoria y disminuye la función autofágica celular (Kayed, 2013)

### **ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS**

A través del análisis de cerebros humanos, con placas seniles y marañas neurofibrilares, se demostró que los agregados amiloides en estadios tempranos están conformados por especies aminotruncadas de  $\beta$  42, incluyendo péptidos con inicio en el residuo 3, 4, 5, 8, 9 y 11. Estas especies se han descrito en 35% de los pacientes con la EA, donde representan más del 60% de las especies del péptido (Vanderstichele, et al., 2005)

Las especies aminotruncadas del péptido  $\beta$  fueron reportadas por primera vez en 1985, cuando Masters publicó que la mayoría de los péptidos presentes en las placas amiloides correspondían a especies aminotruncadas modificadas (Masters, et al., 1985). Una vez reconocida la secuencia del péptido  $\beta$  aislado de vasos sanguíneos, se analizaron las especies amino truncadas reconocidas en las placas seniles. Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas, no se logró obtener la secuencia de dichos péptidos, lo que sugirió, que su porción amino terminal se encontraba bloqueada (Selkoe, 1986). Finalmente en 1992 Mori demostró que el piroglutamato en el extremo aminoterminal del  $\beta$ A era el responsable del bloqueo. El uso de Piroglutaminil aminopeptidasa, reveló que entre el 15-20% de  $\beta$  extraído de cerebros de pacientes con EA contenía Piroglutamato en su porción aminoterminal (Mori, et al., 1992).

Las especies aminotruncadas están presentes en etapas tempranas de la EA y su frecuencia aumenta con la severidad (Russo, et al., 2002). Cuando los pacientes progresan de etapa Braak IV a V las especies aminotruncadas aumentan en un 20% , donde representan el 60% del  $\beta$  depositado (Guntert, 2006). En adultos mayores sanos, los depósitos amiloides están conformados solo por  $\beta$  de longitud completa (Piccini, 2005).

Las especies aminotruncadas de  $\beta$  más abundantes en cerebros de pacientes con EA son  $\beta$  3-42 y 11-42 (He, et al., 1999). Estas especies, también presentan una modificación postraducciona, la ciclación del glutamato en la posición amino terminal, formando así p(E)3-42 y p(E)11-42., Figura 7.

Esta modificación es mediada por la enzima glutamil ciclasa (GC), la cual, se localiza en retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas secretoras. A pesar de que esta enzima puede ser secretada, se ha demostrado que la producción de  $\beta$  se lleva a cabo en compartimentos intracelulares (Cynis, et al., 2008). Sin embargo, la isoforma secretada puede contribuir a la formación de  $\beta$  piroglutamado (pE  $\beta$ a) in vivo (Hartlage-Rubsamen, et al., 2011). Esta enzima se encuentra de forma abundante en los tejidos neuroendocrinos y linfoides (Huang, et al., 2005). La GC se encuentra sobreexpresada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Wirhth, et al., 2010), lo cual sugiere, que ésta enzima está involucrada en la generación de especies aminotruncadas modificadas y que su actividad afecta el proceso de deposición del péptido  $\beta$ A en los cerebros de los pacientes con EA (Schilling, et al., 2008)



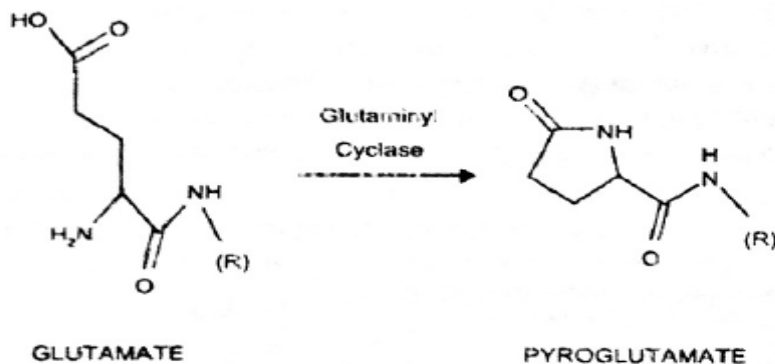


Figura 7. Ciclación de las especies aminotruncadas de  $\beta$ A por la Glutamyl ciclase

Las especies aminotruncadas  $\beta$ a pE se caracterizan por tener una mayor agregación, esto se debe a que la pérdida de residuos en la porción aminoterminal reduce la repulsión entre hebras, estabilizando la estructura  $\beta$ -plegada (Saido, 1996). Esta conformación acelera el proceso de oligomerización y fibrilación de otras especies de  $\beta$ a (McColl, et al.,2009). Así mismo, las especies aminotruncadas pE  $\beta$ a tienen protección ante la degradación por aminopéptidasas extracelulares y endopéptidasas ( TakaKi, et al.,2000). Debido a que dichos péptidos presentan una mayor agregación y un decremento en su degradación, se ha propuesto que funcionan como centros de nucleación que favorecen la formación de los oligómeros tóxicos característicos de la EA (Lee, et al.,2003).

Las especies aminotruncadas  $\beta$ a pE representan alrededor del 25% del  $\beta$ a presente en cerebros de pacientes con EA (Harigaya, et al.,2000). En otro estudio se demostró que las especies  $\beta$ a11-42 y  $\beta$ a pE 11-42 representan el 10 y 15% del  $\beta$ a total respectivamente. La especie  $\beta$ a pE 3-42 representa el 25% y el péptido de longitud completa  $\beta$ a 1-42 el 20 % . El 30% restante corresponde al péptido  $\beta$ a 1-40 ( Liu, et al., 2006).

### $\beta$ a pE 3-42

La primera descripción de la especie  $\beta$ a pE 3-42 fue dada por Mori en 1992. Inicialmente se consideró que el péptido  $\beta$ a pE3-42 resultaba del corte del péptido de longitud completa previo a su deposición (Saido, 1996). Sin embargo, se reportó que las mutaciones presentes en pacientes con Enfermedad Familiar incrementaban la producción de  $\beta$ a pE 3-42, lo cual sugiere que la producción de dicha especie es resultado del procesamiento de APP (Russo, et al.,2000). Sevalle demostró que la aminopeptidasa A es la responsable de remover el Aspartato en la posición 1 del  $\beta$ a (Sevalle, et al, 2009). Sin embargo, aún no se ha descrito como se lleva a cabo la remoción de la Alanina en la posición 2. Una teoría propone que el Cu puede remover los dos residuos mediante la hidrólisis amida (Drew, et al, 2010). La ciclación del Glutamato protege al péptido  $\beta$ a pE 3-42 de la degradación, lo cual resulta en su acumulación.

El péptido  $\beta$ a pE 3-42 se deposita en etapas tempranas de la EA (Saido, 1995). En pacientes con Síndrome de Down, se demostró que la deposición de  $\beta$ a pE 3-42 precede la deposición del péptido de longitud completa (Saido, 1996).

El péptido  $\beta$ a pE 3-42 tiene mayor toxicidad que el péptido  $\beta$ a 1-42 (Wirhth, et al.,2009). En estudios in vitro se demostró que se requieren 2.5 veces mayor concentración de  $\beta$ a 1-42 para formar oligómeros que de  $\beta$ a pE 3-42 (Harigaya, et al.,2000). Modelos de ratones transgénicos para la EA muestran que la acumulación intracelular de  $\beta$ a pE 3-42 se relaciona con incremento en la muerte celular de neuronas de corteza e hipocampo. Así mismo, se demostró que la remoción de agregados de  $\beta$ a pE 3-42, tras la inmunización con anticuerpos específicos, promovió una mejora cognitiva (Wirhth, et al.,2010). También se observó que la disminución en la concentración de  $\beta$ a pE 3-42 reduce la formación de placas y la activación de la glía (Schilling, et al.,2008)

### **$\beta$ A pE 11-42**

Las especies aminotruncadas  $\beta$ A 11-42 y  $\beta$ A pE11 -42 representan en conjunto el 25% del  $\beta$ A total presente en cerebros de pacientes con EA. Estas especies son el resultado del corte alternativo de APP por la  $\beta$  secretasa (BACE) en las posiciones designadas como  $\beta$  y  $\beta'$ . Este último es llevado a cabo entre la tirosina en la posición 10 y el Glutamato en la posición 11 (Benjannet, et al.,2004), Figura 8. BACE se ha encontrado principalmente en la red trans-Golgi y en el sistema endosomal, sin embargo, también se encuentra en el retículo endoplásmico. La actividad de BACE en el Retículo endoplásmico promueve el corte  $\beta$ , mientras que el corte generado en la red trans Golgi se da en la posición  $\beta'$  (Takeda, et al., 2009). Por otro lado se ha propuesto que la variante 11-42 es el resultado del corte de APP por BACE en la posición 1 para generar el péptido  $\beta$ A 1-42 y posteriormente en la posición 11 para generar  $\beta$ A 11-42 (Schilling, et al., 2008). Esta especie amino truncada se encuentra en las placas difusas en forma piroglutamada (Miravalle, et al.,2005) .

Es importante resaltar las propiedades estructurales de dicha especie amino truncada, por un lado, en dicha especie se encuentra ausente la tirosina en la posición 10, la cual es muy importante para el entrecruzamiento de radicales (Bitain,et al.,2003). El proceso de agregación del péptido  $\beta$ A 11-42 se encuentra favorecido debido a la pérdida de 6 aminoácidos cargados, lo cual, favorece la formación de hojas  $\beta$ -plegadas (He, et al.,1999). Por otro lado, se ha observado que los entrecruzamientos intercatenarios entre moléculas de  $\beta$ A se dan frecuentemente entre los residuos Glu11-Glu11, Glu11-Asp23, dichos contactos están involucrados en la formación de dímeros antiparalelos (Liu, et al.,2006)

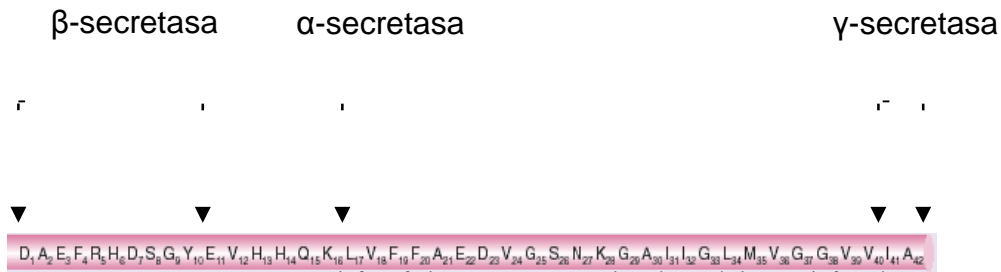


Figura 8. Sitios de corte por la B secretasa (Posición 1 y 11), a- secretasa y Y secretasa en la APP.

En las placas seniles encontradas en cerebros de pacientes con EA se observó que el  $\beta$ A pE 3-42 y pE 11-42 colocalizan entre si y con el péptido  $\beta$ A1-42. La especie  $\beta$ A pE 11-42 se encuentra conformando los núcleos densos. Esto sugiere que el  $\beta$ A pE 11-42 se agrega dentro de las neuronas. Posteriormente, estos agregados son liberados al espacio extracelular, a través de vesículas de secreción o tras la muerte neuronal, donde fungen como semillas para la formación de las placas seniles ( Sullivan, 2011).

## TRATAMIENTO

La EA se caracteriza por el decaimiento progresivo de la memoria y de las funciones ejecutivas de los pacientes, lo cual repercute en su calidad de vida. Además esta enfermedad se caracteriza por tener un impacto en la sociedad al disminuir la proporción de personas en la clase trabajadora y debido al alto costo de sus tratamientos ( Revisado por Rogers, 1998)

En la actualidad existen tratamientos sintomáticos para la EA: los inhibidores de la acetilcolinesterasa y los antagonistas del receptor NMDA. Sin embargo, estos tratamientos no atacan a la etiología de la enfermedad ni detienen su progresión, por lo que a pesar de que los pacientes reciban el tratamiento ideal disponible, el efecto será por corto tiempo y los pacientes regresarán a su estado basal en un cierto periodo de tiempo (Lang, et al.,2010).

En la actualidad solo existen 5 fármacos aprobados por la FDA como tratamiento de la EA. La tacrina, donepezil, revastigmina y galantamina son inhibidores de la acetilcolinesterasa y la memantina es un antagonista del receptor NMDA ( Aisen, et al.,2012)

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son ampliamente utilizados debido a que uno de los efectos de la agregación del  $\beta$ A es la alteración del sistema colinérgico. La acetilcolina es sintetizada y liberada al espacio sináptico por la célula presináptica. Una vez liberada interactúa con su receptor en la célula postsináptica induciendo la salida de potasio y la entrada de sodio. Esta actividad es terminada por la degradación de la acetilcolina por la acetilcolinesterasa. Una manera de modificar las alteraciones generadas en este sistema en pacientes con la EA, es inhibir la degradación de dicho neurotransmisor para que su efecto sea prolongado.

Estos medicamentos ejercen un efecto en el mejoramiento de la función cognitiva en un periodo de 6 a 18 meses seguidos de un decaimiento cognitivo semejante a los pacientes sin tratamiento (AD 2000 collaborative group, 2004)

La memantina solo está aprobada para enfermedad moderada y severa. Este medicamento protege a las células de la citotoxicidad mediada por glutamato. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el Sistema nervioso central, donde tiene un papel importante en la potenciación a largo plazo y la plasticidad sináptica. El incremento en los niveles de glutamato lleva a una actividad excesiva del receptor de NMDA y a un incremento en el calcio intracelular, lo cual puede llevar al daño y muerte celular.

Debido a que estos fármacos tienen una eficacia moderada en la estabilidad de los síntomas por un periodo corto, la demanda de medicamentos que modifiquen la progresión de la enfermedad ha aumentado. Se busca que las nuevas estrategias terapéuticas alteren la biología de la enfermedad cambiando su desarrollo clínico y retrasando la progresión de los síntomas (Lang, et al,2010). A pesar de que se han realizado varios intentos por desarrollar nuevos candidatos terapéuticos, ninguno ha pasado de fase de investigación clínica III.

Las estrategias terapéuticas experimentales son dirigidas hacia ( Anand, et al., 2014):

- Modulación de la neurotransmisión : A través de la inhibición de la acetilcolinesterasa, bloqueo de los receptores NMDA, modulación GABAérgica, histaminérgica y serotoninérgica y modulación de los receptores de adenosina.
- Tau: Inhibición de la fosforilación de Tau, estabilización de microtúbulos, bloqueo de la oligomerización de Tau, aumento en la degradación de Tau e inmunoterapia
- $\beta$ a: Modulación de las secretasas ( Aumento la actividad de  $\alpha$ - secretasa y decremento de la  $\beta$ -secretasa), aumento del transporte del  $\beta$ a, inhibición de la oligomerización de  $\beta$ a, aumento en la remoción de  $\beta$ a e inmunoterapia.
- Modulación de las cascadas de señalización intracelular
- Disminución del estrés oxidativo : antioxidantes
- Actividad mitocondrial
- Regulación de la homeostasis de calcio
- Inflamación

102 fármacos se encuentran en estudios de investigación clínica. De ellos 43 se encuentran en fase I (biodisponibilidad), 52 en fase II (Dosis) y 7 en fase III (Eficacia). De estos 102, 19 buscan modular el metabolismo de APP ( moduladores de las secretasas), 36, modular la señalización neuronal, 6 son neurotrópicos, 4 estabilizadores de microtúbulos, 3 moduladores de la respuesta inmune y 22 inhibidores de la agregación / acumulación de  $\beta$ a. 19 de los 22 inhibidores de la agregación de  $\beta$ a son inmunoterapéuticos.

## INMUNOTERAPIA

Inmunoterapia es el término médico utilizado para referirse al tratamiento de enfermedades mediante la inducción, estimulación o supresión de la respuesta inmune. En la actualidad la inmunoterapia ha sido utilizada para tratar enfermedades infecciosas así como crónicas como cáncer y enfermedades autoinmunes.

En diversos estudios preclínicos se ha observado que la inmunoterapia activa y pasiva ofrece resultados prometedores como estrategia terapéutica para prevenir y tratar la EA. En la inmunoterapia activa, el  $\beta$ A o fragmentos de éste conjugados a una proteína acarreadora (la cual contiene un epítipo para las células T) son utilizados como inmunógenos en presencia de adyuvantes para inducir la producción de anticuerpos. La inmunoterapia pasiva consiste en la administración directa de los anticuerpos, por lo que, el paciente no requiere de montar una respuesta inmune para producir los anticuerpos específicos contra el  $\beta$ A. En resumen, la base de la inmunoterapia activa como en la pasiva es que los anticuerpos anti- $\beta$ A se asocian al  $\beta$ A para favorecer su eliminación (Lemere, et al,2010).

### MECANISMOS DE ACCION INMUNOTERAPEUTICA

Se ha propuesto que los anticuerpos pueden actuar mediante tres mecanismos.

1 .- Fagocitosis por la microglía. Mecanismo basado en la activación de la microglía, la cual fagocita a los agregados del péptido  $\beta$ A opsonizados con los anticuerpos anti- $\beta$ A. En este escenario el 0.1% de los anticuerpos presentes en torrente sanguíneo llegan al sistema nervioso central donde se unen a los depósitos amiloides e inducen la fagocitosis de los agregados a través del reconocimiento de los anticuerpos por el receptor FcR. Este mecanismo requiere que los anticuerpos lleguen al parénquima cerebral donde activan a la microglía residente, que es incapaz de eliminar los agregados por si sola (Racke, et al,2005). Este mecanismo fue corroborado al observar que los anticuerpos con isotipo IgG2, los cuales poseen la mayor afinidad por los receptores Fc, son los que promueven la mayor eliminación de los agregados amiloideos (Burbach, et al,2007).

2 .- Disgregación Catalítica. El anticuerpo inhibe la fibrillogénesis y la formación de agregados citotóxicos de  $\beta$ A. En este mecanismo el anticuerpo desagrega directamente los agregados de  $\beta$ A, cambiando el equilibrio entre agregados y monómeros hacia los monómeros, los cuales son degradados o eliminados. Este postulado está sustentado por estudios *in vitro* donde la adición de anticuerpos anti-  $\beta$ A impide la agregación del péptido  $\beta$ A o bien revierte la agregación de fibrillas. (Brody,et al., 2008)

3 .- Mecanismo de Consumo Periférico.- Se observó que después de la administración del anticuerpo dirigido contra la porción central del péptido  $\beta$ A m266, la carga Amiloíde disminuyó en cerebros de ratones transgénicos, sin embargo los autores no detectaron la presencia del anticuerpo en el cerebro (DeMattos, et al., 2001) . Esto llevó a sugerir que el anticuerpo m266 es capaz de capturar al monómero del péptido  $\beta$ A en torrente sanguíneo favoreciendo así la salida del  $\beta$ A del parénquima cerebral a la periferia, lo cual con

un periodo de tiempo extendido puede llevar a la disminución del  $\beta$ A en parénquima cerebral. Este mecanismo ha sido designado como consumo periférico. En dicho mecanismo el anticuerpo es capaz de secuestrar el  $\beta$ A plasmático lo que resulta en un cambio en el equilibrio entre los niveles de  $\beta$ A del parénquima cerebral y el plasma, resultando en un incremento en la salida de  $\beta$ A hacia la periferia donde es degradado.

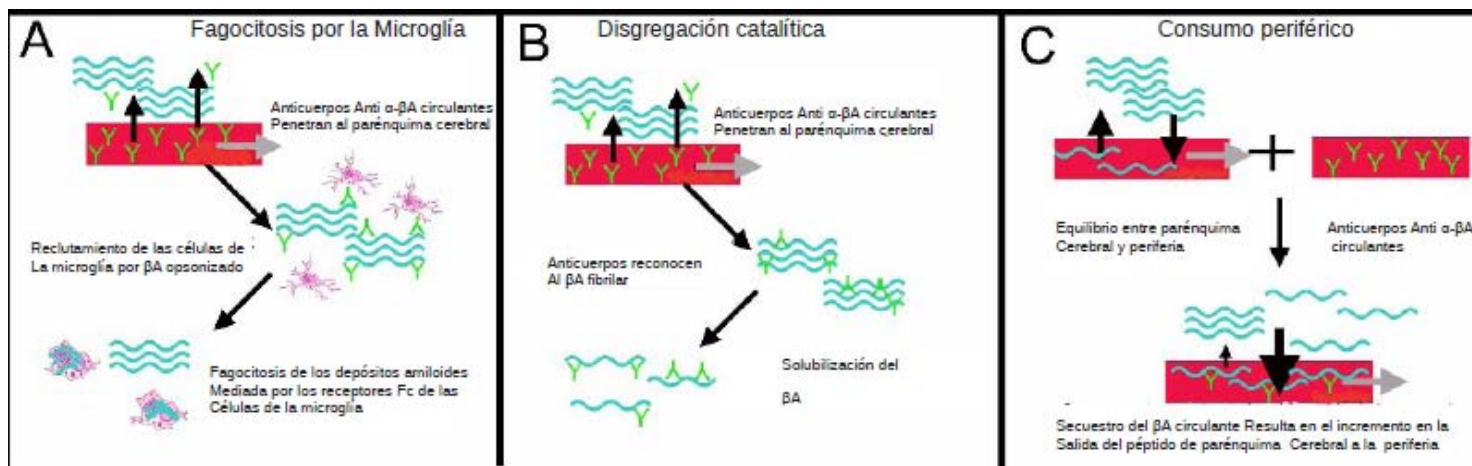


Figura 7. Mecanismo de acción inmunoterapéutica (Brody, et al.,2008).

## INMUNOTERAPIA ACTIVA

EL primer reporte de inmunización activa contra la EA fue publicado en 1999 (Schrenk,et al.,1999). En este estudio se inmunizaron ratones transgénicos PDAPP con el péptido  $\beta$ a 1-42 con adyuvante de Freund ,y se observó un decremento en la patología considerada “ tipo Alzheimer”. La inmunización decrementó la formación de nuevas lesiones y la progresión de la amiloidosis así como la neuropatología asociada. En este estudio también se observó que la inmunización con el  $\beta$ A resultó en la generación de anticuerpos anti-  $\beta$ A y que células reactivas de la microglía se localizaban en las zonas con placas amilóides, por lo cual se propone que un posible mecanismo mediante el cual esta terapia favorece la remoción de los agregados de  $\beta$ A es mediante la activación de la microglía a partir de sus receptores Fc (Ferrer, et al., 2004). En estudios posteriores se reportó que la inmunización activa con  $\beta$ A reduce la disfunción cognitiva en ratones transgénicos al observar que los ratones inmunizados presentaron una mejora en su capacidad de aprendizaje y memoria con respecto a los controles no tratados (Buttini,et al., 2005; Schenk, et al.,1999). Debido a la eficacia lograda en los estudios preclínicos en ratones transgénicos se decidió trasladar este enfoque hacia estudios clínicos en humanos. Un estudio en fase I en 80 pacientes con enfermedad de Alzheimer moderada fue desarrollado en el 2000 (Gilman,et al.,2005). En dicho estudio los pacientes fueron distribuidos

azarosamente en 4 grupos con diferentes dosis de  $\beta$ A preagregado (denominado AN1792) más saponina como adyuvante. Se realizaron 4 inyecciones intramusculares en un periodo de 6 meses, 4 pacientes fallecieron pero ninguna muerte fue atribuida a la inmunización. Algunos pacientes desarrollaron efectos secundarios tales como alucinaciones, hostilidad y convulsiones, sin embargo estos efectos han sido descritos en pacientes con la EA no tratada. Este estudio mostró una tendencia a la reducción en la velocidad de progresión del deterioro cognitivo de los pacientes con la enfermedad, sin embargo, no se logró que los pacientes regresaran a un estado cognitivo normal. Este efecto ha sido atribuido a que solo un 60% de los pacientes inmunizados desarrollaron anticuerpos y el título de ellos fue 10 veces menor a lo alcanzado en los estudios preclínicos. Debido a que se consideró que la inmunización en dichos pacientes fue bien tolerada se decidió seguir al estudio de fase II. En esta fase se reclutaron 372 pacientes de los cuales 300 recibirían  $\beta$ A preagregado en un esquema de 6 inyecciones. Para este estudio se utilizó nuevamente saponina como adyuvante. Este último favorece la respuesta celular proinflamatoria lo que resultó en que un 6% de los pacientes desarrollaran meningoencefalitis aguda. El estudio fue terminado tras solo 1-3 inmunizaciones. Doce de los pacientes que desarrollaron meningoencefalitis se recuperaron a las pocas semanas de terminar el estudio, sin embargo, 6 de ellos desarrollaron secuelas cognitivas y neurológicas. Las autopsias de los pacientes demostraron remoción de los agregados de  $\beta$ A, de manera semejante a lo observado en los estudios preclínicos. Grandes áreas de la corteza cerebral se encontraban libres de agregados amiloideos y los remanentes de los agregados mostraron una estructura denominada como “parcheada” caracterizada por poseer núcleos densos desnudos. Con respecto a la respuesta cognitiva de dichos pacientes se observó, en un subgrupo de 30 pacientes seguidos durante un año, que los pacientes que desarrollaron un alto título de anticuerpos tuvieron una estabilización en el decaimiento cognitivo característico de la enfermedad, mientras que aquellos que no desarrollaron anticuerpos tuvieron un desempeño aún peor que los pacientes no tratados. Es importante recalcar que solo un 20% de los pacientes inmunizados desarrollaron anticuerpos y que el epítipo reconocido por dichos anticuerpos corresponde a la porción amino terminal del  $\beta$ A (Schenk, et al.,1999; Morgan, et al.,2000). Debido a que la inmunoterapia activa parece promover una respuesta prometedora en estudios preclínicos, actualmente nos encontramos en la búsqueda de estrategias que eviten la respuesta adversa generada, por ello algunos grupos buscan inmunizar con péptidos truncados que no desencadenen una respuesta pro inflamatoria, o bien buscan utilizar adyuvantes que no la induzcan.

### **ENSAYOS CLINICOS ACTUALES**

Actualmente se están realizando 6 estudios clínicos con inmunoterapia activa, los cuales están buscando nuevas estrategias tales como diferentes adyuvantes, vacunas de DNA, epitopos de células B o fragmentos de anticuerpos para evitar una respuesta inflamatoria o autoinmune. Sin embargo la mayoría de los estudios de inmunoterapia activa están enfocados en el la porción aminoterminal del péptido  $\beta$ A bajo diferentes contextos. Por ejemplo:

La vacuna CAD-106 utiliza el fragmento  $\beta$ A 1-16 acoplado a una partícula viral QB (Wiessner,2011).

ACC-001 Usa el fragmento aminoterminal  $\beta$ A 1-16 conjugado con la proteína CRM19 de la bacteria diftérica (Ryan, et al., 2009).

V950- Usa el fragmento amino terminal  $\beta$ A 1-16 conjugado a isomatrix (saponina, colesterol y lípidos) (Hawkes, et al., 2008).

ACI-24 Usa el fragmento  $\beta$ A 1-15 conjugado a una estructura liposomal (Hawkes, et al., 2008).

AFFITOME . Usa mimotopos de la porción aminoterminal del péptido  $\beta$ A 1-42 (Schneeberger, et al., 2009)

AFFITOME AD02.- Usa mimótopos de la porción aminoterminal del péptido  $\beta$ A pE 3-42 (Schneeberger, et al., 2009)

### **MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Para poder enlazar los estudios de biología molecular desarrollados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer con el desarrollo de estrategias terapéuticas es necesario contar con modelos no humanos válidos para investigar los mecanismos, tratamientos, estrategias preventivas y curas.

En la actualidad los estudios sobre la EA se basan en modelos de ratones transgénicos que portan transgénos con mutaciones asociadas con la EA familiar. Estos modelos animales han sido utilizados para determinar el mecanismo molecular de la patología así como para probar las estrategias terapéuticas propuestas. Sin embargo ningún modelo de ratón transgénico recapitula en su totalidad la enfermedad ( La Ferla, et al., 2012). Una crítica al uso de estos modelos es que al basarse en la genética de la enfermedad familiar, podrían representar solo aun pequeño porcentaje de la población. Es por ello que actualmente se busca utilizar modelos animales no transgénicos.

Un modelo prometedor ha sido el conejo alimentado con dieta rica en colesterol. Este modelo fue postulado por el Dr. Larry Sparks en la década de los 80s cuando observó que pacientes que morían por enfermedad coronaria crítica o hipertensión desarrollaban agregados de  $\beta$ a en el cerebro. Estas observaciones llevaron al doctor Sparks a utilizar el modelo animal clásico para enfermedades cardíacas, el conejo alimentado con colesterol, para los estudios de la EA.

Los conejos alimentados con colesterol desarrollan patología indicativa de EA, dicha patología se ve acelerada cuando se agrega cobre en el agua de beber. (Spark, et al., 2007).

La principal ventaja del modelo del conejo es que la secuencia de aminoácidos del péptido  $\beta$ A tiene una homología del 97% con la secuencia humana. Este modelo tiene validez en una gran cantidad en parámetros. A nivel molecular el cerebro del conejo alimentado con colesterol tiene varias características similares a las observadas en pacientes con la EA incluyendo un incremento en la concentración de  $\beta$ A, acumulación neuronal de agregados amiloides, presencia de agregados extracelulares de  $\beta$ A, aumento en la inmunoreactividad para la APOE, niveles reducidos de acetilcolina, rompimiento de la barrera hematoencefálica, microgliosis y muerte neuronal. Alimentar conejos con una dieta 2% de colesterol durante dos meses y medio induce un incremento en el contenido neuronal de colesterol, lo cual, promueve un incremento en los niveles de BACE. El incremento en los niveles de BACE y de  $\beta$ A inducen la fosforilación de Tau (Sparks, et al., 2008). Se



ha sugerido que la acumulación de  $\beta$ A resultante de la ingesta de una dieta alta en colesterol induce la fosforilación de tau a través de una vía MAPK, la cual se encuentra localizada en las marañas neurofibrilares de los cerebros en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Sparks, et al.,2008 )

El doctor Sparks también descubrió que el incremento en los niveles de  $\beta$ A dependía de la calidad del agua administrada para beber. EL observó que los conejos que consumían agua con trazas de cobre acumulaban mayores niveles de  $\beta$ A con respecto a los que consumían agua destilada. El postula que el colesterol promueve el incremento en los niveles de  $\beta$ A mientras que el cobre reduce la tasa de eliminación (Spark, et al., 2008)

### COLESTEROL y EA

Datos epidemiológicos señalan la correlación entre la hipercolesterolemia y el riesgo de desarrollar EA. Se ha reportado que los niveles elevados de colesterol total, en adultos jóvenes, se relacionan con un incremento de 300% de riesgo de desarrollar la enfermedad (Shepardson,et al.,2012). Estas evidencias llevaron a realizar estudios neuropatológicos donde se demostró que la patología amiloidea aumenta en función de los niveles de colesterol en la sangre. A partir de ello, una gran cantidad de estudios han tratado de explicar el efecto del colesterol en la patología Amiloide, sin embargo, sigue siendo no concluyente. A partir de estos estudios se han propuesto dos teorías. La primera propone que el colesterol interviene en el procesamiento de la APP por la  $\beta$ -secretasa (Maulik, et al.,2013). La hipótesis propone que la APP sufre procesamiento endoproteolítico por la  $\beta$ -secretasa en regiones específicas de la membrana conocidas como balsas lipídicas, dichas regiones se caracterizan por un alto contenido de colesterol. El aumento en los niveles de colesterol favorece la formación de balsas lipídicas, lo que resulta en un aumento en la frecuencia de colocalización de la APP y la  $\beta$ -secretasa. Esta interacción resulta en un incremento en la producción de  $\beta$ A. Así mismo, el colesterol se asocia con los aminoácidos 10-20 de la secuencia de  $\beta$ A en la APP, bloqueando su reconocimiento por la  $\alpha$  secretasa favoreciendo el procesamiento amiloidogénico (Barret, et al.,2012). La disminución en los niveles de colesterol, resulta en la disminución de microdominios membranales donde se colocalizan APP y  $\beta$ -secretasa y en consecuencia disminuye la producción de  $\beta$ A. Además, se favorece la disponibilidad de APP para su corte por la  $\alpha$ -secretasa (Wahkle, et al.,2002). Otro mecanismo propuesto mediante el cual el colesterol puede favorecer la patología amiloide es mediante la formación de oligómeros tóxicos del  $\beta$ A (Fillit, et al.,2010). Se ha propuesto que el proceso fibriloidogénico se da en las balsas lipídicas membranales, por lo que el aumento en el colesterol de la membrana facilita la unión de  $\beta$ A a la membrana promoviendo un cambio conformacional que favorece el proceso de oligomerización (Mathews, et al.,2011). Esto se comprobó con la administración de estatinas, ya que al decrementar los niveles de colesterol las concentraciones de oligómeros de  $\beta$ A en hipocampo se vieron decrementados (Schneider, et al.,2006) . A su vez, se observó que el aumento de colesterol en las membranas facilita la formación de barriles  $\beta$  de  $\beta$ A, los cuales forman poros en las membranas, alterando la homeostasis iónica ( Papassotiropoulos, et al.,2003).

Todas estas evidencias muestran el riesgo de desarrollar EA en función a los niveles totales de

colesterol, sin embargo, se ha postulado que el riesgo es debido a la proporción de los derivados esterificados 24-OH colesterol y 27-OH colesterol.

El sistema nervioso central produce el colesterol que es requerido para su funcionamiento, es por ello que el colesterol en cerebro es independiente del colesterol obtenido en la ingesta. El cerebro es eficiente para reciclar el colesterol, debido a su continua síntesis es necesario eliminarlo. Debido a que solo una pequeña fracción del colesterol libre es capaz de atravesar la BHE otros mecanismos de remoción son necesarios (Sjogren, et al.,2006). Uno de los principales mecanismos de eliminación del colesterol de parénquima cerebral es mediante la oxidación a 24-OH colesterol. Este derivado es altamente lipofílico por lo que atraviesa fácilmente la BHE. La concentración de 24-OH colesterol en parénquima cerebral es 30 veces mayor que en plasma, lo que indica su origen en sistema nervioso central (Shabab, et al.,2005). El 27-OH colesterol es otro derivado de colesterol de origen extracerebral. Su concentración en cerebro es 10 veces menor al 24-OH colesterol. A pesar de su origen extracerebral, el 27-OH colesterol atraviesa BHE de circulación a parénquima cerebral ( Cechetto, et al.,2008).

En pacientes con EA se observó una disminución en los niveles de 24-OH colesterol y aumento en los niveles de 27-OH colesterol. El 24-OH colesterol inhibe la formación de fibrillas de  $\beta$ A, mientras que el 27-OH colesterol favorece su oligomerización (Prasanhti, et al.,2009), es por ello que en dichos pacientes se encuentra incrementado el proceso de agregación Amiloide. EL 24-OH colesterol regula el procesamiento de la proteína APP por diferentes mecanismos. Por un lado favorece la degradación de APP en el retículo endoplásmico, por otro, favorece su procesamiento por la  $\alpha$ -secretasa, esto resulta en la disminución en las concentraciones de  $\beta$ A. Finalmente se demostró que el 27-OH colesterol aumenta la expresión de APP y  $\beta$ -secretasa lo que resulta en el aumento en las concentraciones de  $\beta$ A (Prasanhti, et al.,2009).

La otra teoría se basa en los estudios que demuestran que el riesgo de desarrollar EA se ve incrementado en pacientes con arterosclerosis ( Hoffman, et al.,1997). Observaciones postmortem demostraron que las lesiones ateroscleróticas son mas severas en pacientes con EA que en adultos mayores sanos (Beach, et al.,2007). La hipercolesterolemia es causante de enfermedades cardiovasculares, diabetes y arterosclerosis (Grammas, et al.,2011). Se ha propuesto que la relación entre la hipercolesterolemia y la deposición de  $\beta$ A está en función del daño vascular (Cechetto, et al.,2008), ya que el aumento en los niveles sistémicos de colesterol favorece el desarrollo de CAA (Harris, et al., 2010) Así mismo se ha demostrado que la disfunción cerebrovascular antecede al déficit cognitivo y a la aparición de la neuropatología característica de la enfermedad ( De la Torre, et al., 2004). El daño neurodegenerativo y cognitivo asociado con la arterosclerosis se debe a la hipoperfusión cerebral (Oijen,et al., 2007). Esto se corroboró al observar que las placas amiloides se localizan yuxtapuestas a vasos sanguíneos. La hipoperfusión inicia o acelera la cascada neurodegenerativa que favorece la acumulación de  $\beta$ A ( Kalaria,et al., 2000).

La teoría “doble hit” postula que en el desarrollo de la patología de la EA el daño vascular es el factor inicial, y las lesiones neuropatológicas de la enfermedad son secundarias, incrementando el daño vascular. Es a partir de esta teoría que se puede explicar el papel del colesterol en el riesgo de desarrollar EA (Zlokovick, et al., 2010).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha demostrado que la inmunoterapia es una estrategia efectiva para promover mejoría cognitiva en los modelos animales para la EA, sin embargo, es necesario desarrollar inmunógenos y protocolos de inmunización adecuados. Los estudios anteriores utilizaron al péptido  $\beta$  1-42 sin considerar a las especies aminotruncadas-modificadas. Debido al papel importante de dichas especies en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer éstas se posicionan como eficientes blancos terapéuticos y es necesario considerarlos en los protocolos de inmunización.

## **HIPOTESIS**

El uso de inmunógenos basados en el péptido  $\beta$  p(E)11-42 en diferentes protocolos de inmunización puede promover la inducción de anticuerpos dirigidos contra las 3 especies patogénicas del péptido  $\beta$  encontrados en los cerebros de los pacientes con la EA y la consecuente protección disminución de la carga amiloide.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseñar estrategias de inmunoterapia basadas en el péptido  $\beta$  p(E)11-42.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Evaluar la presencia de especies aminotruncadas modificadas del péptido  $\beta$  en el modelo de conejo con dieta alta en colesterol.
- 2.- Comparar la respuesta inmunológica del péptido  $\beta$  p(E) 11-42 y  $\beta$  11-42 en conejos.
- 3.- Evaluar el efecto inmunomodulador del ácido retinóico ( ATRA) en ratones silvestres y 3xTg-AD

## METODOLOGÍA

### I. MODELO DEL CONEJO CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER

- DIETA 2% COLESTEROL

28 conejos blancos de Nueva Zelanda se alimentaron con una dieta del 2% de colesterol. Esta dieta se elaboró mediante la disolución de 18 g Colesterol, Grado  $\geq 99$  (Sigma- Aldrich, USA), en 500ml Etanol absoluto a 37° C (JT. BAKER). El colesterol disuelto se adicionó a 900g de conejina (Purina). El etanol se dejó evaporar 24h en campana de extracción. La dieta se administró a 20 de los 28 conejos durante 10 semanas. Los conejos control (8) recibieron conejina adicionada con etanol. Al agua de beber se le adicionó Sulfato de Cobre (0.12ppm)

Al término de las 10 semanas, los conejos se anestesiaron, se obtuvo la sangre y se eutanzaron. Se realizó la extracción del cerebro. El hemisferio derecho se fijó en formaldehído ( J.T. BAKER ) al 2% a 4°C durante 24 h. El hipocampo y corteza temporal del hemisferio izquierdo fueron aislados y congelados a – 80°C para ser usados en extracción de proteínas.

- PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS DE CEREBRO

Una vez fijado el hemisferio derecho de los conejos, se preparó el tejido para la generación de cortes de 50  $\mu\text{m}$  de grosor. Para ello, los tejidos fueron deshidratados mediante un gradiente de sacarosa ( 10%, 20% y 30%). Los tejidos se mantuvieron en las concentraciones crecientes de sacarosa (Sigma-Allrich) durante 24h a 4°C. Una vez deshidratados , los tejidos se incluyeron en TissueTek (Sakura) y se realizaron los cortes en criostato ( LEICA). Los cortes de 50  $\mu\text{m}$  obtenidos se mantuvieron en solución de mantenimiento (glicerol 30%, etilen glicol 30% en Buffer de fosfatos (0.1M pH7.5)), a -20°C hasta ser utilizados para la inmunodetección.

- INMUNOHISTOQUÍMICA

Los tejido se lavaron 4 veces con TBS. La exposición de epítomos se realizó mediante la incubación en ácido Fórmico ( JT. Baker) al 70% durante 10 minutos seguido de la incubación en Buffer de Citratos ( 0.1M ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6.0) durante 30 min a 70°C. Los tejidos se lavaron 4 veces con TBS para remover la solución y se bloquearon con TBS- 0.2% Albumina (SIGMA-ALDRICH) durante 30 minutos . Los tejidos se permeabilizaron 15 minutos con TBS- 0.2% Tritón. Y se incubaron con los anticuerpos primarios en TBS- 0.2% tritón a 4° C toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron, suero de ratón anti-  $\beta\text{apE 3-30}$

42 (1:350), Bam 10 (1:500) y Conejo anti- colagena IV (1:250). Los tejidos se lavaron 4 veces con TBS-0.2% tritón y se incubaron 1.5 horas a temperatura ambiente con Anticuerpo anti-IgG de ratón ALEXA fluor 594 (1:500) y con Anticuerpo anti -IgG de conejo Alexa fluor 488 (1:500).

Los tejidos se lavaron 4 veces con PBS-0.2% tritón y se montaron con VECTASHIELD con DAPI (Vector Laboratories Inc., EUA) para su análisis por microscopio confocal (Olympus Ix51 con cámara DP71, Nikon, USA).

- **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

El hipocampo y corteza cerebral asilados del cerebro de los conejos fueron homogenizados en buffer RIPA con inhibidores de proteasas (Roche, USA). El homogenado se centrifugó a 16,000g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado mediante el ensayo de Bradford (BIORAD). El  $\beta$ a se inmunoprecipitó a partir de 500  $\mu$ g de proteína total utilizando el kit de inmunoprecipitación ImmunoCruz Optima (SantaCruz, USA). Para ello en un tubo de microcentrifuga se adicionaron 50  $\mu$ l de la matriz de inmunoprecipitación resuspendida en 500  $\mu$ l de PBS, y 5  $\mu$ g del anticuerpo BAM 10 (mouse anti- $\beta$ a). La incubación se realizó a 4°C toda la noche en un rotor. La matriz se centrifugó a 16000 g a 4°C por 30 segundos. Se aspiró el sobrenadante y se lavó con PBS 4 veces. El complejo matriz-Bam 10 se incubó con 500 $\mu$ g de proteína total a 4°C toda la noche. Se realizaron 4 lavados con PBS y el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de PBS.

- **DOT BLOT**

Se absorbieron 10 $\mu$ l del innumoprecipitado o 0.5  $\mu$ g de oligómeros ( $\beta$ A 1-42,  $\beta$ ApE 3-42 y  $\beta$ ApE 11-42) a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con suero anti -  $\beta$ ApE 3-42 y  $\beta$ ApE 11-42 toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa(1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia (Thermo).

Para el ensayo de inhibición el suero anti-  $\beta$ ApE 3-42 fue preincubado con una preparación de 5  $\mu$ M de oligómeros del péptido  $\beta$ ApE 3-42 a temperatura ambiente durante una hora. Como control el suero se preincubo con un péptido no relacionado.

## II. **COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DEL PÉPTIDO $\beta$ A pE 11-42 Y BA 11-42 EN CONEJOS.**

- **GENERACIÓN DEL SUERO ANTI -BA 11-42**

Para la obtención del suero anti-  $\beta$ A 11-42 , se realizó la inmunización subcutánea de conejos Nueva Zelanda Albino con el péptido Beta amiloide fibrilar 11-42 . Primero se realizó la monomerización del péptido a través de su dilución en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol a una concentración de 1 mM a temperatura ambiente durante una hora. Se transfirió a 4 °C por 15 minutos y se permitió su evaporación a temperatura ambiente toda la noche. Los restos de isopropanol fueron evaporados en el SpeedVac ( 30 min a 43°C). Para obtener las fibrillas, el pellet monomérico se resuspendió en DMSO a una concentración de 5 mM y se llevó a una concentración final de 1 mg/ml mediante la adición de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). El pellet se incubó a 37°C durante 7 días.

El conejo se inmunizó con 200  $\mu$ g de péptido emulsionado con Adyuvante de Freud Completo (Sigma-Aldrich) vol 1:1. Se inyectaron 200  $\mu$ g de péptido fibrilar en dos sitios. Después se realizaron 3 refuerzos. El primer y segundo refuerzo se realizaron a los 15 y 30 días y el tercer refuerzo a los 75 días. Una semana después se realizó la sangría. Los conejos control fueron inmunizados únicamente con PBS y adyuvante de Freud. Previó a la sangría se verificó la existencia de anticuerpos específicos contra  $\beta$ A 11-42 mediante ELISA.

- **EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS PÉPTIDOS BA POR EL SUERO ANTI BA 11-42 MEDIANTE ELISA**

En una placa de microtitulación se inmovilizaron los siguientes péptidos preagregados  $\beta$ A 1-42,  $\beta$ A pE 3-42 y  $\beta$ A pE 11-42 , en una concentración de 0.2  $\mu$ g/ pozo en 100  $\mu$ l de buffer de carbonatos. La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween se incubó con los sueros anti-  $\beta$ A pE 11-42 y  $\beta$ A 11-42 por una hora a 37°C. Se lavó 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-0.2% Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS-0.2% Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

- **WESTERN BLOT**

Se realizó el corrimiento de 0.5 µg de proteína en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 40 minutos a 25V. La membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con el suero βApE 11-42, βA 11-42 y antiadyuvante durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo cabra anti IgG conejo acoplado a peroxidasa (1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia ( Thermo).

- **DOT BLOT**

Se absorbieron 0.5 µg de monómeros (1-42, βApE 3-42 ) a una membrana de PVDF. a membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con los sueros βA pE 11-42 y βA 11-42 toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Para bam 10 se utilizó un Anticuerpo de conejo anti -IgG de ratón (1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia ( Thermo).

- **MAPEO DE EPITOPOS**

Para la identificación de epítomos/mimótopos del péptido βA 11-42 se utilizó una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en fagos filamentosos M13. El proceso de bioselección se realizó en 3 rondas para un formato de fase sólida. EN 4 pozos de una placa de microtitulación se inmovilizó un

anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón a una concentración de 0.5 µg/ pozo a 37°C por una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2 % Tween, y se bloqueó con PBS-2% leche una hora a 37°C. Después de realizaron los lavados con PBS-0.2% Tween se incubó con 1:100 de suero anti βA 11-42 durante una hora a 37°C. Después de lavados los pozos se añadieron 100µl/pozo de la biblioteca comercial a una concentración de 10 E 11 pfu/ en PBS 2% Leche y se incubó a 4° C toda la noche. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2% Tween y se incubó 30 minutos con 100µl /pozo de trietilamina 1M a temperatura ambiente. Se recolectó el contenido de los 4 pozos y se les adicionaron 200 µl de Tris-HCL pH 7.4.

- **AMPLIFICACIÓN**

En un matraz de 250 ml se infectaron 50 ml de medio 2YT con 500 ul de un cultivo de toda la noche de E. coli TG1 . Se dejó incubar a 37°C medio ahora y se le agregó 500 µl del eluido obtenido. Posteriormente se incubó durante 4.5 h a 37° C. Se centrifugó a 10000 rpm a 4°durante 10 minutos y el sobrenadante recuperado se precipitó con Polietilenglicol/ NaCL ( PEG/NaCL), esto con la finalidad de recuperar los fagos. Esta reacción se mantuvo a 4°C toda la noche.

- **PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO**

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 10000 rpm a 4°C 10 minutos. EL pellet fue resuspendido en 1ml de TBS pH 7.5. La suspensión se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos y el sobrenadante se resuspendió en 150ul de PEG/NaCL. Se incubó en hielo por una hora y se centrifugo a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos. EL pellet se resuspendió en 200 ul de TBS, se volvió a centrifugar para obtener el sobrenadante y ser titulado.



- **TITULACIÓN DEL ELUIDO**

Se sembró una colonia de TG1 en 10 ml de 2YT y se incubó en agitación hasta obtener una concentración aproximada de  $10^8$  células por mililitro (O.D= 0.5) En tubos de 1.5 ml se infectaron 200 ul de bacterias con 5 y 50 ul del eluido amplificado. Estos se incubaron por 30 minutos. A cada tubo se le adicionaron 15 ul de Xgal/PTG y se mezcló el volumen completo con 4ml de TOP AGAR a 45°C, la mezcla se agitó en un vortex y se vació en cajas de Petri con 10 ml de LB. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche. EL título del eluido y del amplificado se obtuvieron a partir del conteo del número de placas presentes en las cajas de cada dilución, el cual se expresa como unidades formadoras de placas por mililitro pfu/ml.

Se llevaron a cabo 3 rondas de bioselección utilizando el amplificado de la primera y segunda ronda para reiniciar el proceso. Después de la tercer ronda se obtuvieron 21 clonas individuales, las cuales fueron amplificadas y tituladas para obtener suficiente fago  $10^{11}$  pfu/ml para evaluar su reactividad en ELISA y analizar sus secuencias.

El amplificado obtenido de las clonas individuales se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 4000 rpm. EL sobrenadante recuperado se dividió en dos: 1.2 ml se utilizó para la precipitación de fagos para evaluación en ELISA, y 1ml se utilizó para aislar DNA de cadena sencilla.

- **EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES POR ELISA**

Los fagos obtenidos se precipitaron con PEG/NaCl, como previamente se ha detallado. Los Fagos aislados de las 21 clonas seleccionadas fueron evaluados por ELISA con al finalidad de determinar su reconocimiento por el suero anti  $\beta$ A 11-42. Para ello se sensibilizó una placa de microtitulación con un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón a una concentración de 0.5 ug/ pozo a 37°C por una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2 % Tween, y se bloqueo con PBS-2% leche una hora a 37°C. Después de realizaron los lavados con PBS-0.2% Tween se incubó con 1:200 de suero anti  $\beta$ A 11-42 durante una hora a

37°C. Después de lavados los pozos se añadieron 100ul/pozo de las clonas seleccionadas a una concentración de  $7 \times 10^6$  pfu/ml en PBS 2% Leche y se incubó a 4° C toda la noche. Después de 4 lavados con PBS-0.2% Tween, se incubó una hora a 37°C con anticuerpo anti M13 diluido 1:4000. Se lavo 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo monoclonal anti IgG acoplado a peroxidasa conejo anti ratón diluido 1:5000 en PBS-leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

- **OBTENCIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA**

A los sobrenandates obtenidos tras la amplificación de las clonas se les añadió 400 ul de PEG/NaCl y se incubó a 4°C toda la noche. Se centrifugaron a 14,000 rpm 10 minutos a 4°C. EL pellet se resuspendió en 200 ul de buffer de ioduro de sodio/ EDTA. EL DNA se precipitó con etanol absoluto y se centrifugó a 13 000 rpm 10 minutos. El pellet se lavó con etanol al 70% y se centrifugo bajo las mismas condiciones. Finalmente el DNA se resuspendió en 15 µl de agua milli Q. La integridad y cantidad de DNA fue evaluada mediante el corrimiento electroforético de 1µl de DNA en un gel de 0.8% de agarosa. EL gel se tiño 10 minutos con Bromuro de Etidio 0.02% y se observó en un transiluminador. La obtención de las secuencias de las clonas se obtuvo a través del kit de secuenciación Quick Denature Plasmid Sequencing Kit con dATP a-S 35, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Se cargaron 7 ul de la mezcla de secuenciación obtenida en un gel de poliacrilamida al 8% y se corrió por 2.5 horas a 1500V. AL término del tiempo se recuperó el gel y se permitió su secado en el secador apropiado, el secado se realizo durante 60 minutos a 80°C. Una vez seco el gel se introdujo en un cassette de exposición con una placa de rayos X, donde se guardó para su revelado después de 72 horas de exposición.

### **III. EVALUACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO COMO INMUNOMODULADOR.**

Ratones 3x-Tg de 6 meses de edad y ratones C57/BL6 de 2 meses de edad, se inmunizaron con 20

$\mu\text{g}$  de  $\beta\text{a}$  1-42,  $\beta\text{apE}$  3-42,  $\beta\text{ApE}$  11-42 y  $\beta\text{a}$  11-42 usando 10  $\mu\text{g}$  Saponina como adyuvante. La inmunización se realizó cada 10 días hasta que los ratones desarrollaran anticuerpos, La detección de anticuerpos anti  $\beta\text{a}$  se realizó mediante ELISA. Los ratones con tratamiento de ácido Retinóico ( ATRA) recibieron 40  $\mu\text{g}$  cada 3 día hasta el final del experimento. El ATRA ( stock de 6mg/ml en DMSO) se administro en una dilución 1:20 en PBS.

- **DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS MEDIANTE ELISA**

En una placa de microtitulación se inmovilizaron los siguientes péptidos preagregados  $\beta\text{A}$  1-42,  $\beta\text{A}$  pE 3-42,  $\beta\text{A}$  pE 11-42 y  $\beta\text{A}$  11-42 , en una concentración de 0.2  $\mu\text{g}$ / pozo en 100 $\mu\text{l}$  de buffer de carbonatos. La placa se dejó sensibilizar a 4°C toda la noche. Después de 4 lavados con TBS-0.2% Tween, se bloqueó la placa con leche al 2% en TBS-0.2% Tween durante una hora a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con TBS-0.2% Tween se incubó con los sueros anti-  $\beta\text{A}$ 1-42,  $\beta\text{A}$  pE 3-42 ,  $\beta\text{A}$  pE11-42 y  $\beta\text{A}$  11-42 por una hora a 37°C. Se lavó 4 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpos conejo anti IgG1, Anti IgG2a y anti IgG2b de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:1500 en PBS- leche 2%-0.2% Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2% Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

- **ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Una vez obtenido la distribución de IgG en los sueros de los ratones inmunizados, se prosiguió con la obtención de esplenocitos. Para ello, los ratones se eutanizaron y se aisló el bazo. Los bazos se perfundieron con 5ml de medio de cultivo RPMI 1640 ( Gibco, USA). Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en solución de lisis de eritrocitos ( NH<sub>4</sub> Cl al 0.05%, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.0). Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se lavaron 2 veces en PBS. El pellet se resuspendió en 5 ml de RPMI suplementado ( 10% suero bovino fetal (Gibco), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% piruvato de sodio (Gibco) y 1% antimicótico ( Gibco). La densidad celular se contó con Cámara de Neubauer. 50,000 de células se tiñeron con 1 $\mu\text{g}$  de CFSE (5--Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) durante 10 min en PBS-5% SBF en oscuridad. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizaron 2 lavados con PBS-5%SBF . 10,000 células se sembraron en RPM1 1640 durante 5 días en presencia de 10  $\mu\text{g}$  de péptido  $\beta\text{a}$  ( 1-42, pE 3-42, pE 11-42 y 11-42). Como control los esplenocitos se incubaron con 1  $\mu\text{g}$  de ConA.

A los 5 días las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recolecto y

mantuvo a -20°C hasta su uso para detección de citocinas.

Las Células se lavaron con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (Attune, LifeTechnologies)

- **PÉRFIL DE CITOCINAS**

La detección de interleucinas se realizó mediante los kit BDOptEIA, Mouse- Il-4 , Il-10, IIFN-Y y TNF- $\alpha$  ELISA SET. Para ello placas de ELISA se incubaron con 100 $\mu$ l de anticuerpo de captura diluido en buffer de Carbonatos ( 7.13 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9.5 ) toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-0.05%Tween 20 y se bloquearon una hora a temperatura ambiente con PBS-10%SBF. Se realizaron 3 lavados y 200  $\mu$ l de las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados y se incubó una hora con solución de detección ( anticuerpo de detección y estreptoavidina peroxidasa 1:200) a temperatura ambiente en oscuridad. Se incubó durante 15 minutos con TBE (sustrato para la peroxidasa) para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 530 nm en un lector automático de microplacas.

- **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA**

Para la evaluación de la capacidad protectora, los ratones 3xTg inmunizados con los protocolos previamente reportados, se eutanizaron a los 18 meses de edad. Se realizó la extracción del cerebro. El hemisferio derecho se fijó en Formaldehido (JT. Baker) al 2% a 4°C durante 24 h. El hipocampo y corteza temporal del hemisferio izquierdo fueron aislados y congelados a – 80°C para ser usados en extracción de proteínas.

- **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

El hipocampo y corteza cerebral aislados del cerebro de los conejos fueron homogenizados en buffer RIPA con inhibidores de proteasas (Roche, USA). El homogenado se centrifugó a 16,000g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado mediante el ensayo de BRADFORD ( BIORAD)

- **DOT BLOT**

Se adsorbieron 50 µg de proteína a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con PBS-2% Leche a 4°C toda la noche. Después de realizar 4 lavados de 5 minutos con PBS-0.2% Tween, se incubó la membrana con suero de conejo anti –  $\beta$ ApE 11-42 toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 4 veces con PBS-0.2% Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti IgG cabra anticonejo acoplado a peroxidasa(1:2500). Tras 4 lavado con PBS-0.2% Tween, se realizó la inmunodetección con quimiofluorescencia ( Thermo). La normalización se realizó en base a la cantidad de proteína estimada a partir de la tinción con rojo de Ponceau.

**IV. EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES EN EL MODELO DEL CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO  $\beta$  A P(E) 11-42**

16 conejos blancos de nueva Zelanda se alimentaron con una dieta del 2% de colesterol con 0.12 ppm de Cu en el agua. Al mes de haber iniciado la dieta, 11 conejos se inmunizaron con  $\beta$ ApE 11-42 en adyuvante de Freund. Los conejos controles se inmunizaron solo con adyuvante. Se dieron 3 refuerzos en periodos de 10 días.

Al término de las 10 semanas, los conejos se anestesiaron, se obtuvo la sangre y se eutanzaron. Se realizó la extracción del cerebro. El hemisferio derecho se fijó en Formaldehido (J.T. BAKER ) al 2% a 4°C durante 24 h. El hipocampo y corteza temporal del hemisferio izquierdo fueron aislados y congelados a – 80°C para ser usados en extracción de proteínas. La extracción de proteínas se realizó como detallado anteriormente. ( Modelo de Conejo con dieta alta en colesterol en el desarrollo de la patología tipo Alzheimer)

- **DETECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE  $\beta$  A MEDIANTE ELISA**

Se sensibilizó una placa de microtitulación con un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón a una concentración de 0.5 µg/ pozo a 37°C por una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS-0.2 % Tween, y se bloqueo con PBS-2% leche una hora a 37°C. Después de realizaron los lavados con PBS-0.2% Tween se incubó con 1:200 de Bam 10 durante una hora a 37°C. Después de lavados los pozos se añadieron 10 µl/pozo del inmunoprecipitado obtenido de las proteínas totales aisladas del hipocampo de los conejos inmunizados en

PBS 2% Leche y se incubó a 4° C toda la noche. Después de 4 lavados con PBS-0.2% Tween, se incubó a 37°C con anticuerpo anti  $\beta$ a 11-42 durante 1 hora a 37° C. Se realizaron 4 lavados con PBS-0.2% Tween y se incubó con anti IgG de Conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS- leche 2%-Tween 0.2% durante una hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados nuevamente con PBS- 0.2%Tween y se incubó durante 15 minutos con ABTS para finalmente tomar la lectura a una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de microplacas.

## RESULTADOS

### 1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS DEL PÉPTIDO BA EN EL MODELO DE CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL.

Conejos blancos de Nueva Zelanda fueron alimentados con una dieta de 2% de colesterol y sulfato de cobre en el agua durante 10 semanas. Al terminar el tratamiento los cerebros de los conejos fueron extraídos y fueron divididos en dos hemisferios simétricos. Uno de los hemisferios fue homogenizado en TBS (en presencia de inhibidores de proteasas) para la extracción de proteínas y el hemisferio restante fue utilizado para inmunohistoquímica. Para la inmunohistoquímica se realizaron cortes de 50  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar la eficacia del modelo para desarrollar patología tipo Alzheimer evaluamos la presencia del péptido  $\beta\text{a}$  presente en el tejido mediante inmunofluorescencia. La detección se realizó mediante el uso del anticuerpo BAM10 (anticuerpo monoclonal dirigido hacia la porción aminoterminal del péptido  $\beta\text{a}$ ). Utilizamos un anticuerpo anti-colágena IV para detectar los agregados amilóides en vasos. En la figura 8 se muestran las dobles inmunofluorescencias en los cortes de cerebros de conejo. Tanto en corteza (A) como en hipocampo (B) encontramos  $\beta\text{a}$  1-42 asociado a vasos sanguíneos. Para descartar que no hubiera reconocimiento cruzado con la proteína precursora amiloidea, realizamos inmunofluorescencia con anticuerpo anti-APP, observando un patrón totalmente diferente (C). Como control realizamos marcaje en ausencia de anticuerpo primario para descartar marcaje inespecífico.

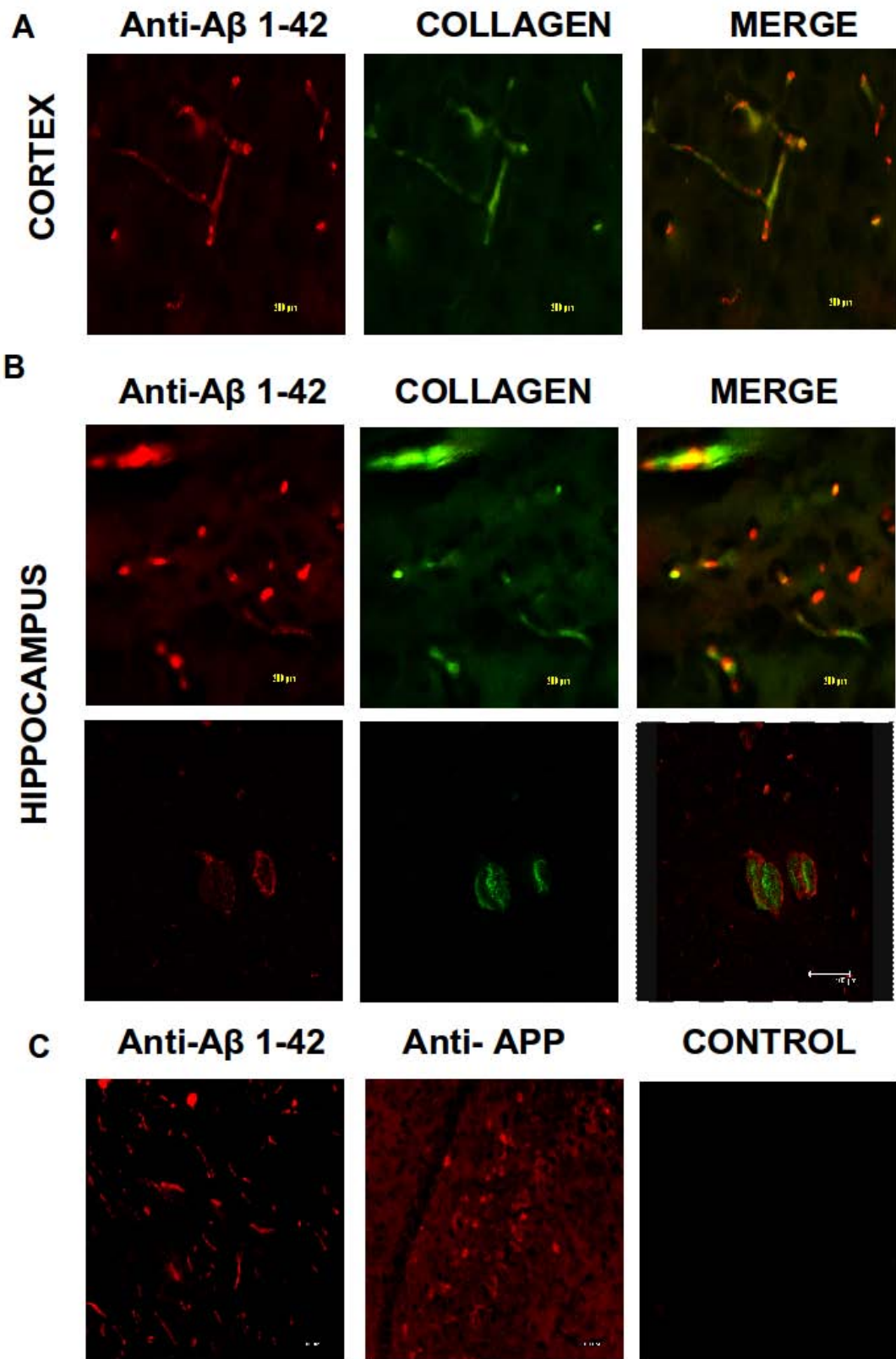


Figura 8. Detección de  $\beta$  1-42 en cerebros de conejos con dieta alta en colesterol. Se muestran secciones representativas de corteza e hipocampo teñidas con anti- $\beta$  y anti -Colageno IV



Una vez detectada la presencia de agregados amiloides en los cerebros de los conejos alimentados con dieta alta en colesterol, evaluamos la presencia de especies aminotruncadas modificadas. Previamente en el laboratorio se caracterizó el suero anti- $\beta$ a p(E) 3-42. Este suero reconoce específicamente al péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 (monómero y oligómeros), sin reconocer a los péptidos  $\beta$ a 1-42 y  $\beta$ a p(E) 11-42. Debido a la especificidad de este suero decidimos utilizarlo para evaluar la presencia del péptido aminotruncado  $\beta$ a p(E) 3-42. En la figura 9 se muestra la inmunofluorescencia de cerebros de conejos alimentados con dieta alta en colesterol. Se encontró que los conejos experimentales presentan  $\beta$ a p(E) 3-42 en vasos sanguíneos, evaluado mediante la colocalización con anti-Colágeno IV. En el conejo control no se observó la presencia de  $\beta$ a p(E) 3-42,

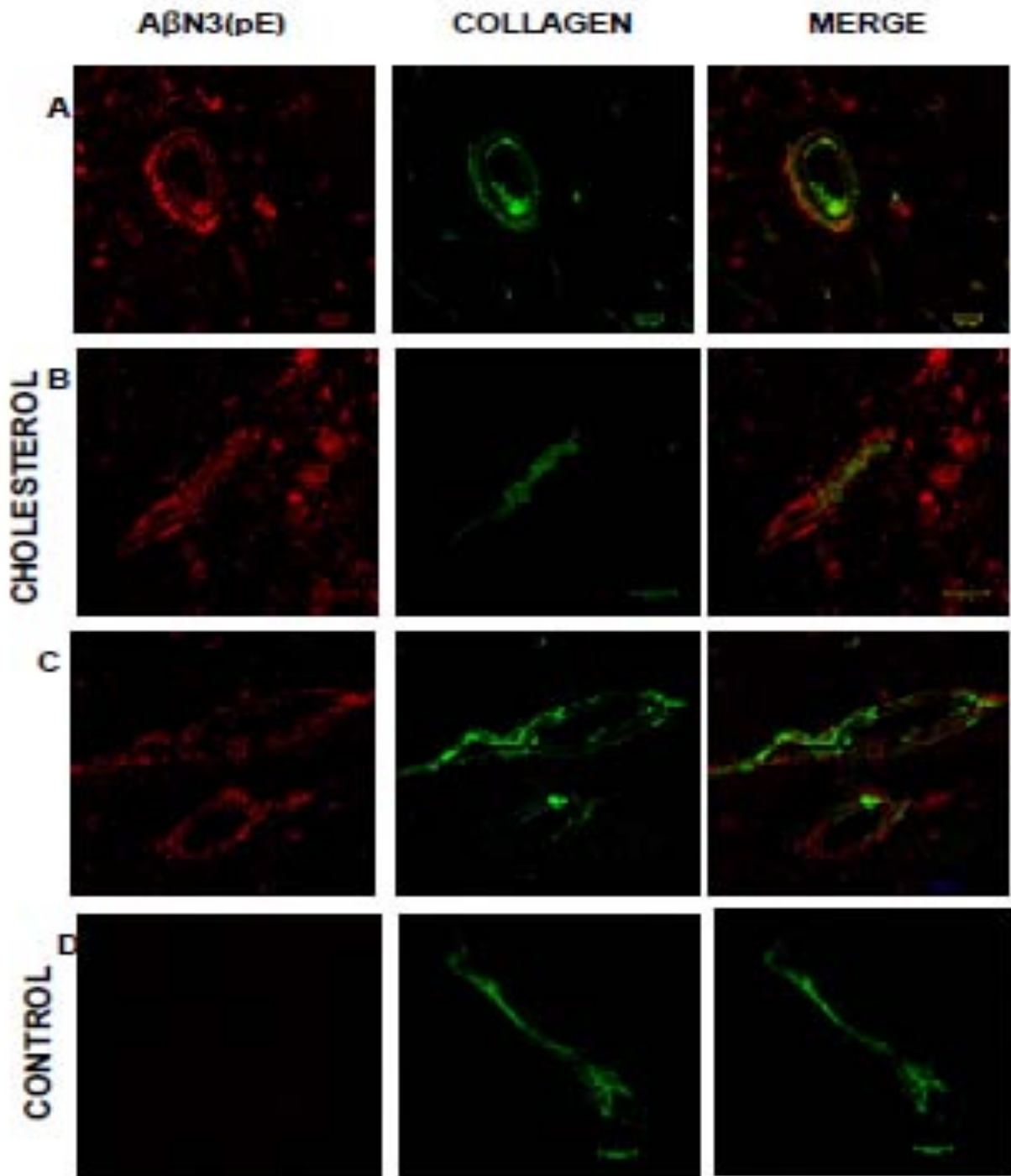


Figura 9 . Detección del péptido  $\beta$  p(E)3-42 en cerebros de conejos con dieta alta en colesterol. Secciones hipocámpales teñidas con suero anti- $\beta$  p(E) 3-42 y con anti-Colágeno IV. Escala A, B y C = 20  $\mu$ m; D = 10  $\mu$ m.

Para confirmar la presencia de  $\beta$  p(E) 3-42 en los cerebros de los conejos alimentados con dieta alta

en colesterol realizamos DOT BLOT con los extractos de proteínas obtenidos. Para ello se inmunoprecipitó el  $\beta$ a total a partir de 500 ug de proteína. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo monoclonal BAM 90 dirigido hacia la porción central del péptido  $\beta$ a y capaz de reconocer a las 3 especies de  $\beta$ a: 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42. 10 ul de la proteína adquirida se absorbieron en membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó con el suero anti- $\beta$ a p(E) 3-42. En la figura 10 se muestra el DOT BLOT. En Fig.10A se observan las proteínas inmunoprecipitadas. Encontramos que 7 de 10 conejos con dieta alta en colesterol tienen  $\beta$ a p(E) 3-42. Con la finalidad de verificar que los conejos que no presentaran  $\beta$ a p(E) 3-42 si tuvieran  $\beta$ a total, revelamos la misma membrana con suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42, anticuerpo que reconoce a las 3 especies de  $\beta$ a.

En Fig.10B se observa el reconocimiento de péptidos sintéticos. Como previamente habíamos descrito, el suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42 reconoce específicamente a su antígeno. Para verificar la presencia de  $\beta$ a 1-42 y  $\beta$ a p(E) 11-42 en la membrana revelamos con el suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 . Adicionalmente, para confirmar la presencia del péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 en las proteínas de los cerebros de los conejos, realizamos ensayo de inhibición (Fig.10C). En Fig.10C 1) se muestra la interacción directa del suero anti- $\beta$ a p(E) 3-42. En 2) se muestra la detección después de la preincubación del suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42 con 5  $\mu$ M de péptido  $\beta$ a p(E) 3-42. En 3) se muestra la detección tras la pre-incubación del suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42 con 5  $\mu$ M de péptido no relacionado.

Encontramos que la preincubación del suero  $\beta$ a p(E) 3-42 con péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 inhibió el reconocimiento de las proteínas de los cerebros de conejo y redujo el reconocimiento del péptido sintético  $\beta$ a p(E) 3-42. La preincubación del suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42 con péptido no relacionado no inhibió el reconocimiento de la proteína de los cerebros de conejo, lo que nos denota especificidad y confirma la presencia de  $\beta$ a p(E) 3-42 en los cerebros de los conejos alimentados con una dieta alta en colesterol.

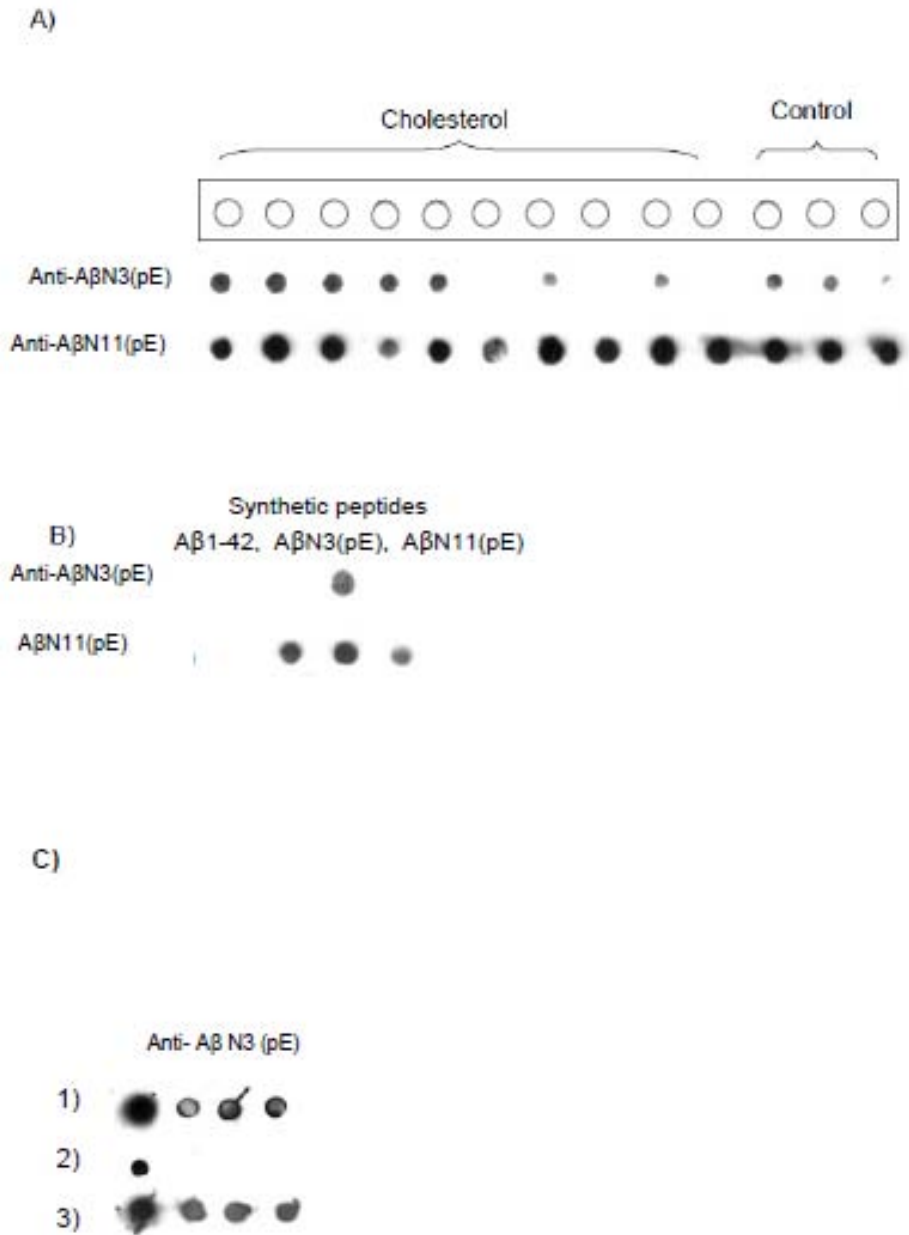


Figura 10. Dot Blot de A) proteínas de los cerebros de conejo, con dieta alta en colesterol y controles, inmunoprecipitadas con el anticuerpo BAM 90 , revelados con suero anti - $\beta$ a p(E) 3-42 y suero anti  $\beta$ a- p(E) 11-42. B) péptidos sintéticos  $\beta$ a 1-42, p(E)3-42 y p(E) 11-42 revelado con suero anti- $\beta$ a p(E) 3-42 y suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 . C) Inhibición de reconocimiento del péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 y proteínas inmunoprecipitadas de los cerebros de conejos con dieta alta en colesterol . 1) Suero anti -  $\beta$ a p(E) 3-42, 2) Suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42

preincubado con péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 3) Suero anti-  $\beta$ a p(E) 3-42, preincubado con péptido no relacionado.

## II. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DEL PÉPTIDO BA P(E) 11-42 Y BA 11-42 EN CONEJOS.

### EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL SUERO ANTI BA P(E) 11-42 VS BA 11-42

Para la generación de anticuerpos anti- $\beta$ a p(E) 11-42 y anti- $\beta$ a 11-42 se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con el péptido oligomérico  $\beta$ a p(E)11-42 y con el péptido oligomérico  $\beta$ a 11-42 en presencia de adyuvante de Freund. Diez días después del tercer boost se realizó la sangría blanca y se aisló el suero. La reactividad de los sueros fue evaluada mediante ELISA con los péptidos  $\beta$ a 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42. Como control utilizamos el suero de los conejos a los cuales solo se les administró adyuvante.

En la figura 11 se muestra el resultado del ELISA en el cual, se observa que el suero de los conejos inmunizados con el péptido  $\beta$ a 11-42 reconoce a los 3 péptidos  $\beta$ a: 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 .

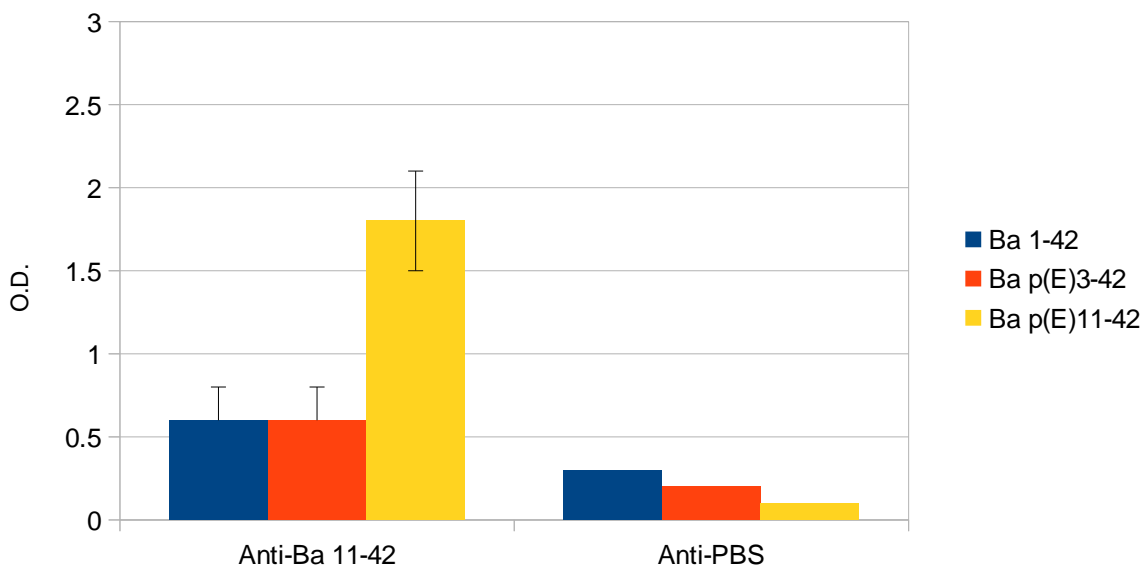


Fig. 11. Reactividad en ELISA de los sueros de los conejos inmunizados con  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42. Los sueros fueron evaluados con los péptidos  $\beta$ a 1-42, p(E) 3-42 y p(E)11-42. El suero del conejo que recibió solo adyuvante fue utilizado como control. La dilución utilizada fue 1:200

**EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE AGREGACIÓN DE LOS  
PÉPTIDOS  $\beta$ a 1-42, p(E) 3-42 Y p(E)11-42 POR EL SUERO ANTI  $\beta$ a 11-42**

Con la finalidad de evaluar que estados de agregación de los péptidos  $\beta$ a 1-42, p(E)3-42 y p(E) 11-42 son reconocidos por el suero anti-  $\beta$ a 11-42, se realizó un Western blot con los oligómeros de los 3 péptidos.

En la figura 12 se muestra el Western Blot de los péptidos  $\beta$ a p(E)3-42 , p(E) 11-42 y 1-42 revelados con el suero anti  $\beta$ a p(E)11-42 (A) y con el suero anti - $\beta$ a 11-42 (B). Nosotros previamente encontramos que el suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 reconoce todos los estados de agregación de los péptidos  $\beta$ a p(E) 3-42 y p(E) 11-42, sin embargo solo reconoce a los oligómeros del péptido  $\beta$ a 1-42 (Perez-garmendia et al.,2010). Los monómeros del péptido  $\beta$ a 1-42 no son reconocidos por los anticuerpos anti- $\beta$ a p(E)11-42. El suero anti-  $\beta$ a 11-42 reconoce a los monómeros, trímeros y tetrámeros de los tres péptidos , $\beta$ a 1-42, p(E) 3-42 y p(E) 11-42, sin reconocer a los oligómeros de alto peso molecular.

Mediante este experimento demostramos que los sueros anti-  $\beta$ a p(E) 11-42 y anti-  $\beta$ a 11-42 reconocen diferentes estados de agregación de las 3 principales especies patológicas de  $\beta$ a presentes en cerebros humanos. Mientras que el suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 reconoce principalmente estados de agregación de alto peso molecular, el suero anti  $\beta$ a 11-42 reconoce estados de agregación de bajo peso molecular.

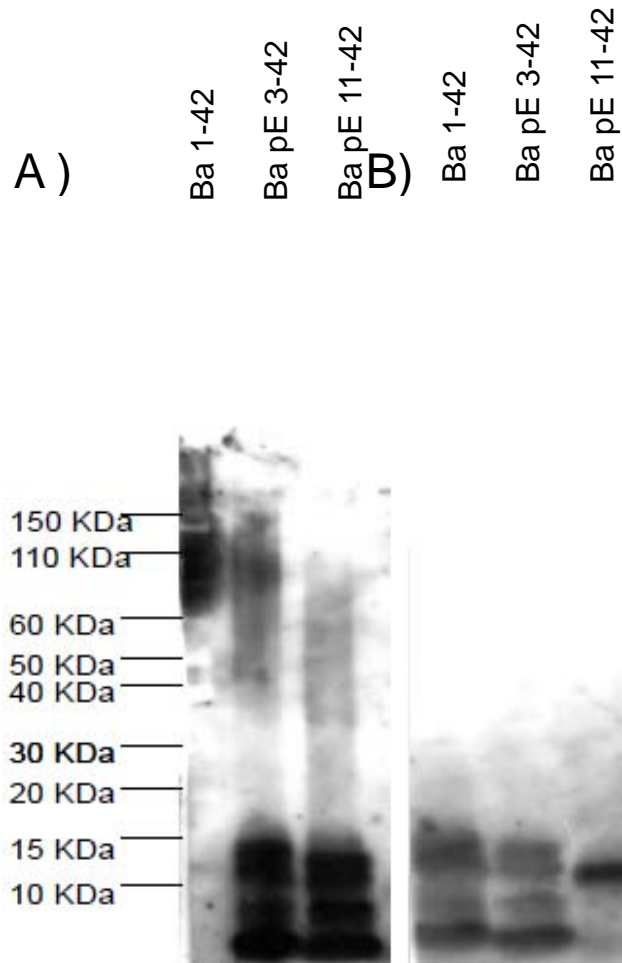


Figura 12. Western Blot de los péptidos  $\beta$ a 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42, revelados con suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 (A) y anti- $\beta$ a 11-42 (B).

### DOT BLOT

Para corroborar el reconocimiento de los monómeros del péptido  $\beta$ a 1-42 por los anticuerpos anti-  $\beta$ a 11-42 realizamos dot blot. Para ello realizamos preparaciones de monómeros de los péptidos  $\beta$ a 1-42 y p(E) 11-42 mediante la resuspensión de los péptidos sintéticos en DMSO.

En la figura 13 se muestra el Dot Blot de los monómeros de los péptidos  $\beta$ a 1-42 y p(E) 11-42. Como

previamente reportamos (Pérez- Garmendia, 2010), el suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 reconoce a los monómeros del péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 sin reconocer al monómero de  $\beta$ a 1-42 (A). Encontramos que el suero anti- $\beta$ a 11-42 reconoce a los monómeros del péptido  $\beta$ a 1-42 y p(E) 11-42 (B) .

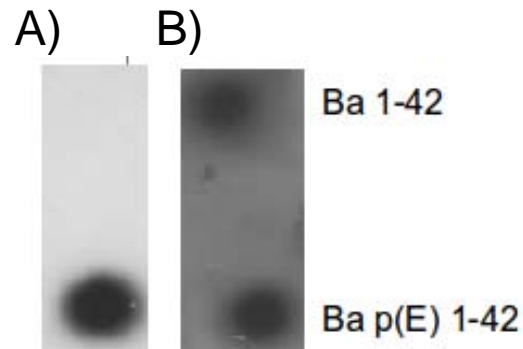


Figura 13. DOT Blot de los Monómeros del péptido  $\beta$ a 1-42 y p(E)11-42 revelados con A) suero anti  $\beta$ a p(E) 11-42, B) suero anti  $\beta$ a 11-42

### MAPEO DE EPITOPOS.

#### BIOPANNING

Para identificar la región inmunodominante del péptido  $\beta$ a 11-42 se realizaron 3 rondas de bioselección con una biblioteca comercial de péptidos de siete aminoácidos expresados en el fago filamentososo M13. De la tercera ronda del proceso de bioselección con el suero anti  $\beta$ a 11-42, se seleccionaron al azar 21 clonas, las cuales se amplificaron y se caracterizaron.

### EVALUACIÓN DE LAS CLONAS INDIVIDUALES CON EL SUERO

#### ANTI $\beta$ a 11-42

Para determinar el reconocimiento de las clonas seleccionadas por el suero anti-  $\beta$ a 11-42, se realizó ELISA. De las 21 clonas seleccionadas 10 fueron reconocidas por el anticuerpo anti - $\beta$ a 11-42. Las clonas



positivas fueron: 1,3,4,5,9,10,13,14,16,17. En la figura 14 se muestra la reactividad de las clonas seleccionadas por medio de ELISA.

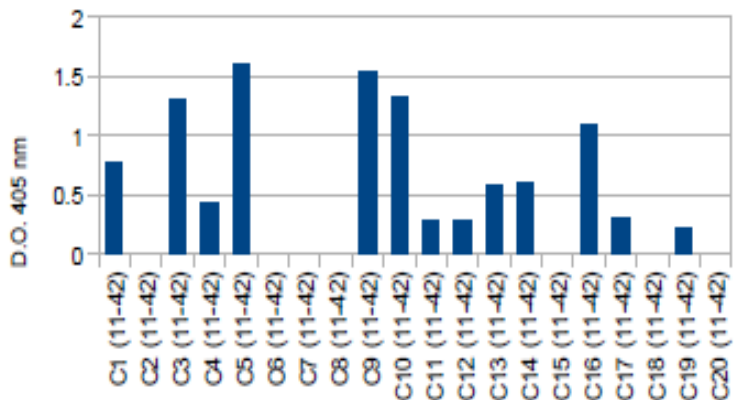


Figura 14. Reconocimiento de las Clonas seleccionadas por los anticuerpos anti  $\beta$ a 11-42 mediante ensayo de ELISA. Se realizaron 3 experimentos independientes. Se muestran resultados de un experimento representativo.

Debido a las diferencias encontradas en el reconocimiento de los diferentes estados de agregación de los péptidos  $\beta$ a entre los sueros anti-  $\beta$ a p(E) 11-42 y anti-  $\beta$ a 11-42, evaluamos si el suero anti - $\beta$ a p(E) 11-42 reconocía a las clonas seleccionadas con el suero anti -  $\beta$ a 11-42. En la Figura 15 se muestra la reactividad del suero anti - $\beta$ a p(E) 11-42 con las clonas seleccionadas por el suero anti-  $\beta$ a 11-42. Como control positivo utilizamos el suero anti-  $\beta$ a-11-42. Encontramos que el suero anti- $\beta$ a p(E) 11-42 no reconoce a las clonas seleccionadas con el suero anti-  $\beta$ a 11-42.

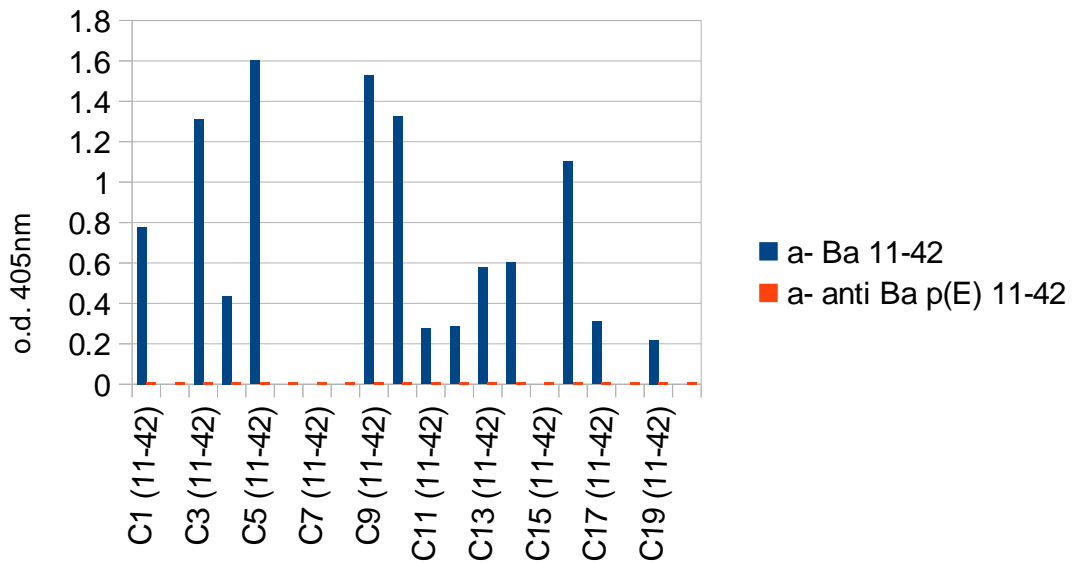


Figura 15. Reconocimiento de las clonas seleccionadas con el suero anti-βa 11-42 por los sueros anti-βa p(E)11-42 y anti-βa 11-42 mediante ELISA.

De igual manera evaluamos si el suero anti-βa 11-42 reconocía a las clonas seleccionadas con el suero anti-βa p(E) 11-42. En la figura 16 se muestra la reactividad mediante ELISA del suero anti-βa 11-42 con las clonas seleccionadas con el suero anti-βa p(E) 11-42. Encontramos que el suero anti-βa 11-42 reconoce a las clonas seleccionadas con el suero anti-βa p(E) 11-42. Como control utilizamos el suero anti-βa p(E) 11-42 con el cual fueron seleccionadas.

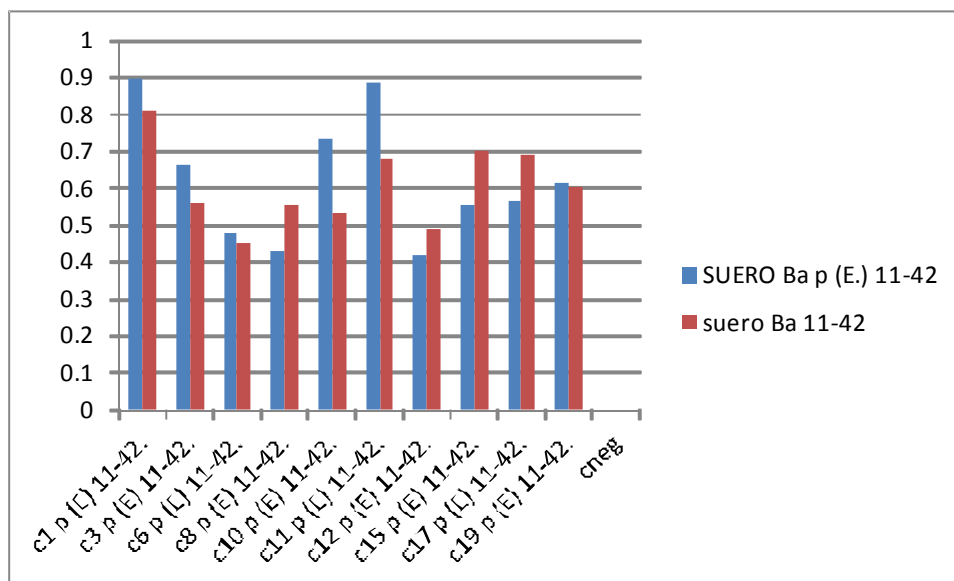


Figura 16. Reconocimiento de las clonas seleccionadas con el suero anti-  $\beta$  p(E) 11-42 por los sueros anti  $\beta$  p(E)11-42 y anti  $\beta$  11-42 mediante ELISA.

### SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS SELECCIONADAS

Una vez purificado el DNA de las 10 clonas positivas realizamos la secuenciación del inserto codificante del heptapéptido expresado en el fago M13 y su secuencia de aminoácidos fue determinada. En la tabla 2 se muestra la secuencia del péptido de los insertos encontrados en las clonas reconocidas por el suero anti  $\beta$  11-42.

Tabla 2. Secuencias y densidad óptica en ELISA de las clonas positivas seleccionadas con el suero anti  $\beta$ a 11-42.

CLONA	SECUENCIA	O.D.
C1	EVYRHPS	0.8
C2	YFWSSSL	1.3
C3	EVYAFGT	0.471
C4	HPRYYTK	1.611
C5	EVYMLRL	1.529
C9	EVLQHPW	1.5
C13	EVRMPQT	0.6
C14	WASYVWD	1.1

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT secuencia péptido  $\beta$ a.

Las secuencias encontradas en las clonas seleccionadas con el suero anti -  $\beta$ a 11-42 no comparten homología con las clonas seleccionadas con el suero anti - $\beta$ a p(E) 11-42. En el caso de las clonas seleccionadas con el suero anti-  $\beta$ a p(E) 11-42, en función de la presencia de una secuencia consenso, las clonas fueron clasificadas en 3 grupos (Tabla 3).

El primer grupo está conformado por las clonas 6, 12 y 15, las cuales contienen una secuencia rica en histidinas (H). Estas clonas comparten el motivo (Q,R,E)HHH(Q,E)H(L,P).

Esta secuencia consenso presenta homología con la porción aminoterminal del péptido  $\beta$ a p(E)11-42. Lo que sugiere que estas clonas corresponden a mimotopos del epítipo presente en la porción aminoterminal del péptido  $\beta$ a p(E) 11-42.

El segundo grupo esta compuesto por las clonas 7,11,17 y 19, las cuales comparten el motivo K(E,G)AEA(G,D)L(S,P)F(R,Y). Este motivo presenta homología con la porción central del péptido  $\beta$ a p(E) 11-42, lo que sugiere que esta región corresponde a otro epítipo para las células B. Nuevamente las secuencias

de heptapéptidos de estas clonas corresponden a mimotopos del péptido  $\beta$ a p(E) 11-42.

El tercer grupo corresponde a las clonas que no presentan una secuencia con homología al péptido beta amiloide.

Tabla 3. Secuencias y densidad óptica en ELISA de las clonas positivas para el suero anti  $\beta$ a p(E) 11-42.

Clona	Secuencia	OD		
1	FIDPDRM	0.3775	±	0.0403361
3	SHKDDTM	0.78425	±	0.1100678
6	QH <sup>H</sup> H <sup>H</sup> QHL	0.9495	±	0.1058001
7	KIAE <sup>A</sup> APF	0.39	±	0.1206842
8	LPKTDDV	0.322	±	0.2311089
10	DLLMGHP	0.7705	±	0.1748018
11	EVAEGSR	0.589	±	0.0540432
12	R <sup>H</sup> H <sup>H</sup> H <sup>H</sup> QHP	0.84575	±	0.0508617
15	E <sup>H</sup> H <sup>H</sup> EHL	0.898	±	0.1269514
17	KIAE <sup>A</sup> ALF	0.2555	±	0.0860717

### III. EVALUACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO COMO INMUNOMODULADOR.

Debido a la capacidad inmunomoduladora reportada para el ATRA decidimos evaluar si es capaz de favorecer una respuesta antiinflamatoria en presencia de saponina como adyuvante.

Para ello se inmunizaron de forma intraperitoneal ratones silvestres (C57BL/6) y transgénicos 3xTg-AD con 10 ug del péptido  $\beta$ a 1-42, en presencia de saponina como adyuvante. Al grupo de tratamiento se le administraron 100 ug de ATRA de forma intraperitoneal cada tercer día. Diez días después del tercer boost se realizó la sangría blanca y se aisló el suero. La reactividad de los sueros fue evaluada mediante ELISA

En el caso de los ratones transgénicos una vez obtenidos los anticuerpos se realizaron refuerzos cada mes, hasta que los ratones alcanzaran los 16 meses de edad con el fin de evaluar la patología en los cerebros.

En la figura 17 se muestra la proporción IgG1/IgG2a para reportar el cambio del perfil pro-inflamatorio a anti-inflamatorio tras el tratamiento con ATRA.

### Relación IgG1/ IgG2a de las inmunoglobulinas presentes en el suero de los ratones 3xTg-AD

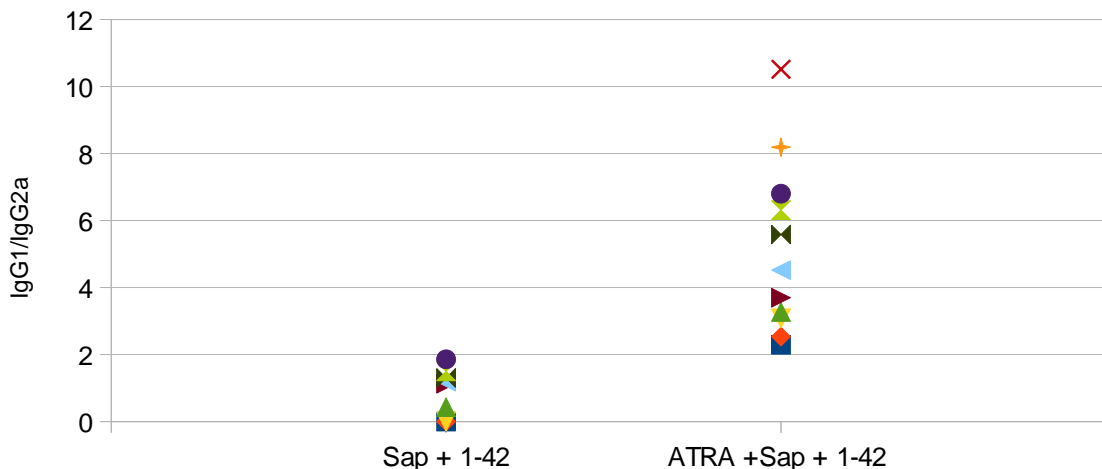


Figura 17. Relación IgG1/ IgG2a de las inmunoglobulinas específicas presentes en el suero de los ratones 3xTg-AD inmunizados con  $\beta$ a 1-42 utilizando saponina como adyuvante y ATRA como inmunomodulador. Se muestran los resultados por ratón de 3 experimentos independientes. (P=0.01)

La relación IgG1/IgG2a se utiliza para determinar el perfil desarrollado. La inmunoglobulina IgG1 es una inmunoglobulina clásica de la respuesta antiinflamatoria mientras que la IgG2a es característica de la respuesta inflamatoria. Encontramos que el tratamiento con ATRA aumenta la relación IgG1 / IgG2a , lo que indica que hubo un incremento en los niveles de la inmunoglobulina antiinflamatoria IgG1. Esto sugiere que el ATRA es capaz de promover un shift del perfil pro- inflamatorio y/o mixto característico de la Saponina en ratones con el fondo genético C57BL propenso a una respuesta pro-inflamatoria hacia un perfil anti-inflamatorio.

### Relación IgG1/ IgG2a de las inmunoglobulinas presentes en el suero de los ratones silvestres

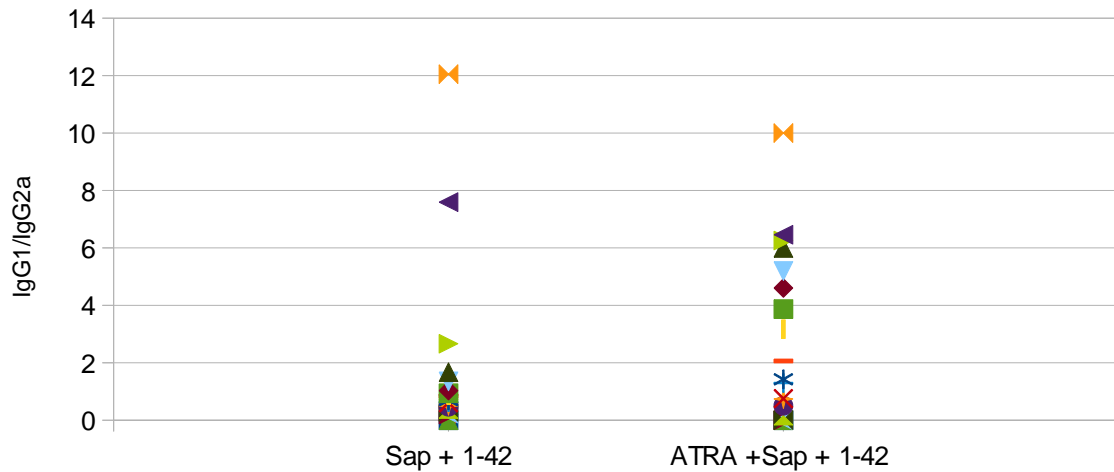


Figura 18. Relación IgG1/ IgG2<sup>a</sup> de las inmunoglobulinas específicas presentes en el suero de los ratones silvestres inmunizados con  $\beta$ a 1-42 utilizando saponina como adyuvante y ATRA como inmunomodulador. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes.

En los experimentos realizados en ratones silvestres, figura 18, encontramos que 3 de los 21 ratones inmunizados con saponina y  $\beta$ a 1-42 presentaron una respuesta antiinflamatoria. Se sabe que la saponina se caracteriza por generar una respuesta mixta pero favorecida hacia perfil inflamatorio. El tratamiento con ATRA promovió un cambio al perfil antiinflamatorio en un 43.47 % (10 /23 ratones) de los ratones tratados.

### **PERFIL DE CITOCINAS** **CITOCINAS ANTI- y PRO-INFLAMATORIAS**

Con la finalidad de corroborar la capacidad inmunomoduladora del ATRA en los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 en presencia de saponina como adyuvante, evaluamos adicionalmente la concentración de las citocinas presentes en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados con  $\beta$ a. Para ello  $1 \times 10^6$  esplenocitos fueron cultivados por 5 días en presencia de 10 ug del péptido  $\beta$ a 1-42. Los niveles de IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se evaluaron mediante ELISA.

En la figura 19 se muestra la concentración de IL-10 encontrada en el sobrenadante de los esplenocitos de ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42/saponina en presencia o ausencia de ATRA, estimulados con  $\beta$ a 1-42 in vitro. La concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados pero sin tratamiento con ATRA fue de  $283 \pm 76$  pg/ml , mientras que la concentración de IL-10 en los ratones inmunizados con tratamiento con ATRA fue de  $1514 \pm 181$  pg/ml.

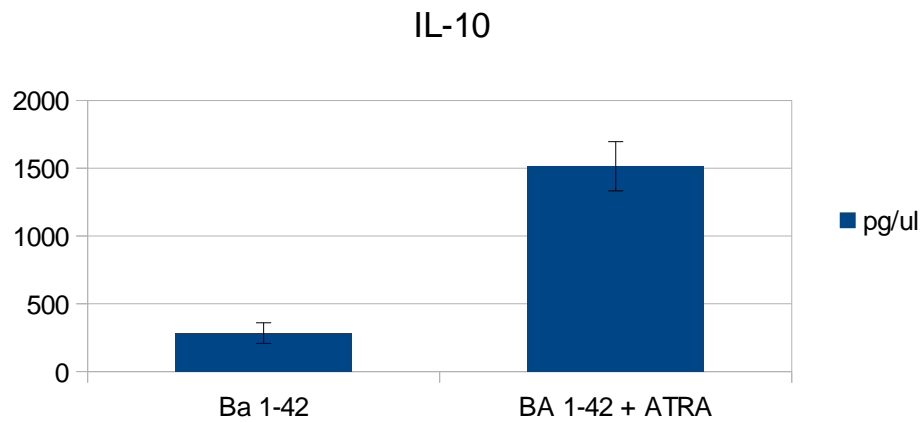


Figura 19 . Evaluación mediante ELISA de los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 en presencia y ausencia de ATRA ( $p= 0.06$ ).

En la figura 20 se muestra la concentración de IL-4 encontrada en el sobrenadante de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 y  $\beta$ a 1-42 con ATRA . La concentración de IL-4 en los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 fue de  $31 \pm 1$ , la concentración de IL-4 en los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 tratados con ATRA fue de  $63 \pm 1.5$  pg/ml. Encontramos que en los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42, el tratamiento con ATRA aumenta los niveles de IL-4 .



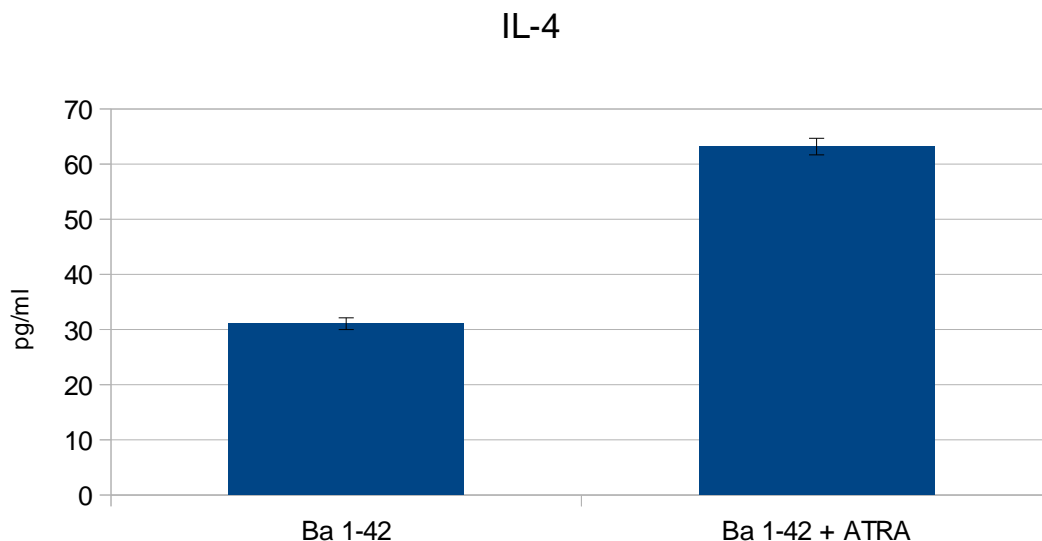


Figura 20. Evaluación mediante ELISA de los niveles de IL-4 en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 en presencia y ausencia de ATRA ( $p=0.102$ )

En conclusión, el tratamiento con ATRA favorece un aumento en los niveles de IL-10 e IL-4, interleucinas características de la respuesta antiinflamatoria, en los ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ a 1-42.

Para las citocinas proinflamatorias encontramos que la concentración de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  no se modifica con el tratamiento con ATRA. La concentración de IFN- $\gamma$  fue de  $288 \pm 40.48$  pg / ml en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 y de  $390.53 \pm 285$  pg/ml en los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 y tratados con ATRA

La concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 1-42 fue de  $34.32 \pm 12.44$  pg/ml y de  $34.32 \pm 6.10$  pg/ml. en los sobrenadantes de los ratones inmunizados en presencia de ATRA .

### **ESPECIES AMINOTRUNCADAS**

#### **RESPUESTA HUMORAL**

Se inmunizaron de forma intraperitoneal ratones silvestres (C57BL/6) y transgénicos 3xTg-AD con 10  $\mu$ g del péptido  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42, en presencia de saponina como adyuvante..Al grupo de

tratamiento se le administraron 100 ug de ATRA de forma intraperitoneal cada tercer día. Diez días después del tercer boost se realizó la sangría blanca y se aisló el suero. La reactividad de los sueros fue evaluada mediante el ensayo de ELISA

En la tabla 4 se muestra la proporción IgG1/IgG2a de los ratones inmunizados con  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42. Con las especies  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 solo se realizaron los experimentos en ratones transgénicos. En 3 experimentos independientes 54 ratones Tg fueron inmunizados con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42. En un experimento 10 ratones Tg fueron inmunizados con  $\beta$ a 11-42 Para el péptido  $\beta$ a p(E)3-42 se realizaron 2 experimentos independientes con ratones silvestres (n= 20) y un experimento (n= 10) con ratones 3xTG-AD.

Tabla 4. Relación IgG1/ IgG2a de las inmunoglobulinas presentes en el suero de los ratones 3xTg-AD inmunizados con  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 utilizando saponina como adyuvante y ATRA como inmunomodulador.

	Relación IgG1/IgG2a	
	Sin ATRA	Con ATRA
p(E) 3-42 (Wt)	1.42 ± 1.91	0.87 ± 0.98
p(E) 3-42 (3xTg)	3.51 ± 1.10	0.24 ± 0.38
p(E) 11-42 (3xTg)	1.059 ± 1.20	0.56 ± 0.56
P 11-42 ( 3xtg)	1.321 ± 2.25	1.61 ± 2.26

Encontramos que el ATRA no cambia la relación IgG1/ IgG2a al inmunizar con las especies aminotruncadas del péptido  $\beta$ a en presencia de saponina como adyuvante.

### **PÉRFIL DE CITOCINAS**

En la tabla 5 se muestran las concentraciones de las citocinas anti-inflamatorias (Il-4 e Il-10) y pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) encontradas en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 en presencia y ausencia de ATRA.  $1 \times 10^6$  células fueron cultivadas y estimuladas con los péptidos  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 respectivamente durante 5 días.

Tabla 5. Concentración de IL-4, IL -10, IFN-Y y TNF-a encontradas en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos  $\beta$ a p(E)3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42.

	IL-4		IL-10		IFN-y		TNF-a	
	Sin ATRA	Con ATRA	Sin ATRA	Con ATRA	Sin ATRA	Con ATRA	Sin ATRA	Con ATRA
p(E) 3-42 (3xTg)	158 ± 50	0	449 ± 244	744 ± 106	101 ± 25	1818 ± 661	0	0
p(E) 11-42 (3xTg)	no hay proliferación celular							
11-42 ( 3xtg)								

Encontramos que el ATRA en los ratones inmunizados con  $\beta$ a p(E) 3-42 promueve un aumento en la concentración de IFN-Y y una disminución en la concentración de IL-4. Sabemos que el mecanismo mediante el cual el ATRA favorece un perfil anti-inflamatorio es mediante la inducción del incremento de IL-4. El aumento de esta citocina induce el decremento de IFN- $\gamma$ . Estos resultados sugieren que en el caso del péptido aminotruncado/piroglutamado el ATRA no es capaz de modular la respuesta inmune y promover el cambio hacia Th2

Las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos  $\beta$ a p(E) 11-42 y 11-42 no fueron determinados debido a que no hubo proliferación de células T en los ensayos de proliferación celular.

### **Ba p(E) 11-42**

En la figura 21, se muestran los resultados de la proliferación celular de los ratones 3xTg-AD inmunizados con  $\beta$ a p(E) 11-42 en presencia y ausencia de ATRA. Encontramos que los esplenocitos de los ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 no son estimulados in vitro por su antígeno.

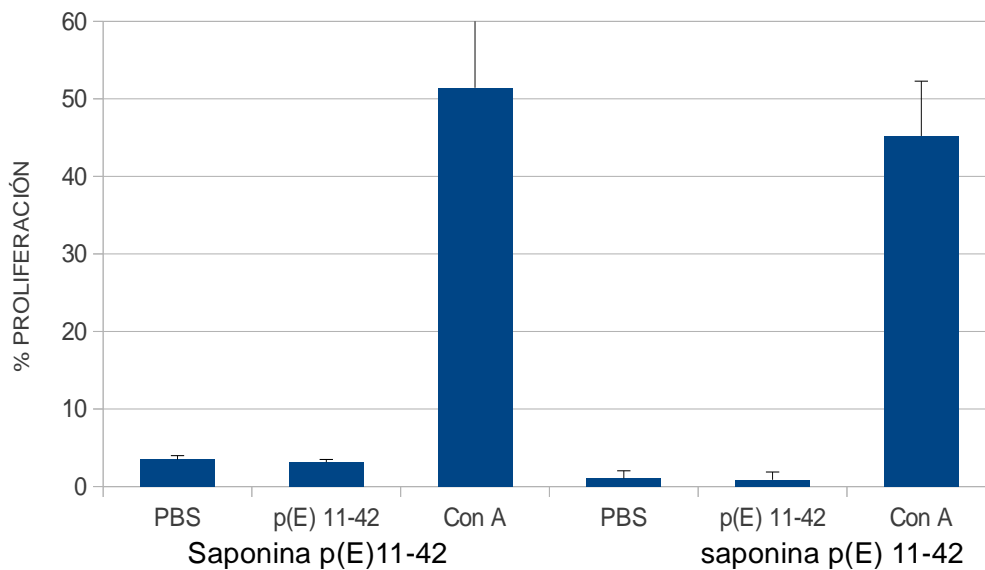


Figura 21 . Evaluación de la proliferación celular de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a p(E)11-42 en presencia y ausencia de ATRA. La evaluación se realizó mediante citometría de flujo mediante la detección de CFSE.

Para evaluar si el piroglutamato de la especie amino truncada  $\beta$ a p(E) 11-42 interfería en el procesamiento y presentación del antígeno decidimos evaluar la proliferación celular en los esplenocitos de los ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ a 11-42.

En la figura 22, se muestran los resultados de la proliferación celular de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 11-42 en presencia y ausencia de ATRA. Encontramos que los esplenocitos de los ratones inmunizados con el péptido  $\beta$ a 11-42 tampoco son estimulados in vitro por su antígeno.

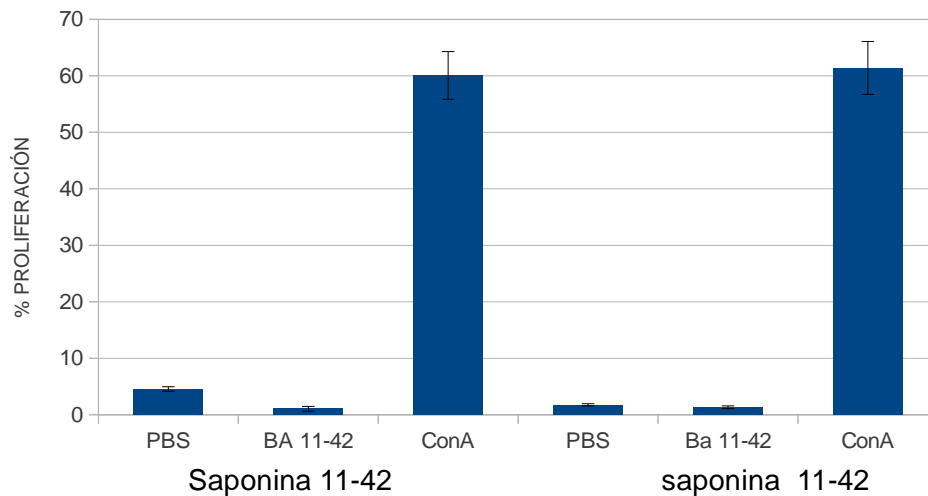


Figura 22 . Evaluación de la proliferación celular de los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a 11-42 en presencia y ausencia de ATRA. La evaluación se realizó mediante citometría de flujo mediante la detección de CFSE.

### **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA**

Una vez que los ratones 3xTg-AD inmunizados con los péptidos  $\beta$ a 1-42, pE 3-42 y pE 11-42 desarrollaron anticuerpos específicos contra su antígeno, se inmunizaron mensualmente hasta alcanzar los 16 meses de edad. Al terminar el tratamiento los cerebros de los ratones fueron extraídos y fueron divididos en dos hemisferios simétricos. Uno de los hemisferios fue homogenizado en TBS (en presencia de inhibidores de proteasas) para la extracción de proteínas. El otro hemisferio fue utilizado para realizar inmunofluorescencias. Los niveles de  $\beta$ a presentes en los extractos totales de proteína se analizaron mediante DOT BLOT.

A partir del análisis de los tejidos por inmunofluorescencia encontramos que los ratones 3xTG-AD no desarrollan las placas amiloideas características de la EA; sin embargo, si se observaron agregados intracelulares.

### **RESULTADOS DE LA DENSITOMETRIA DEL DOT BLOT**

En la figura 23 se muestra el resultado de la densitometría de los niveles de  $\beta$ a presentes en los extractos de los cerebros de los ratones transgénicos control, tratados con ATRA solo e inmunizados con  $\beta$ a 1-42, p(E) 3-42

y p(E) 11-42 en presencia y ausencia de ATRA. Estos resultados se encuentran normalizados con los niveles totales de proteína visualizados con Rojo de Ponceau.

Encontramos una gran variabilidad en los ratones controles. En la literatura se ha reportado por una parte de laboratorios que el modelo del ratones transgénico 3xTg-AD desarrolla placas amiloides desde los 12 meses de edad, sin embargo, nosotros evaluamos los ratones a los 18 meses y aun no había presencia de ellas. A esta edad solo detectamos  $\beta$ a intracelular.

Encontramos que la inmunización con  $\beta$ a 1-42 en presencia de ATRA, redujo los niveles de  $\beta$ a en un 50%. En ausencia de ATRA los niveles de  $\beta$ a fueron semejantes al control. La inmunización con  $\beta$ a p(E) 3-42 en presencia y ausencia de ATRA no alteró los niveles del péptido. Esto sirvió como control ya que los anticuerpos anti- $\beta$ a p(E) 3-42 reconocen específicamente esta especie aminotruncada, la cual no esta presente en el modelo transgénico utilizado.

densitometria ratones 3xtg inmunizados

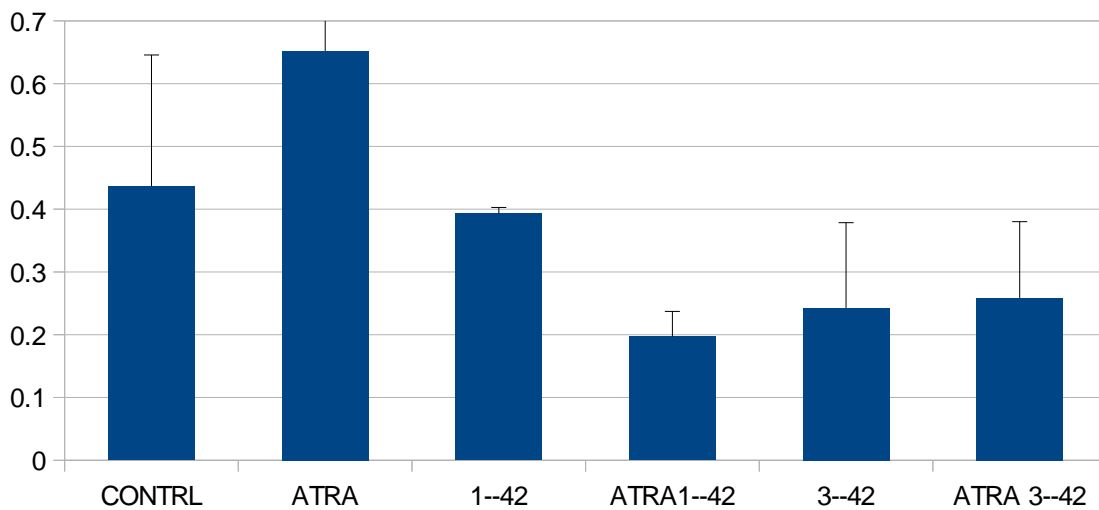


Figura 23. Resultado de dot Blot de los extractos de proteínas de los ratones inmunizados con  $\beta$ a1-42 y  $\beta$ a p(E) 3-42 con ATRA como inmunomodulador.

## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES EN EL MODELO DEL CONEJO CON DIETA ALTA EN COLESTEROL MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN ACTIVA CON EL PÉPTIDO $\beta$ A P(E) 11-42

16 Conejos fueron alimentados durante 2 meses y medio con una dieta alta en colesterol. Al mes de administrar la dieta alta en colesterol, 11 conejos se inmunizaron de forma subcutánea con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 en Adyuvante de Freund. Se realizaron 3 refuerzos a los 10, 20 y 30 días. Al terminar el tratamiento los cerebros de los conejos fueron extraídos y fueron divididos en dos hemisferios simétricos. Uno de los hemisferios fue homogenizado en TBS (en presencia de inhibidores de proteasas) para la extracción de proteínas. Se inmunoprecipitó el  $\beta$ a total a partir de 500 ug de proteína con el anticuerpo monoclonal BAM 90 (dirigido hacia la porción central del péptido Ba). La detección de  $\beta$ a total se realizó mediante ELISA SANDWICH.

En la figura 24 se muestran el promedio de la densidad óptica obtenida mediante ELISA. Encontramos que la inmunización con  $\beta$ a p(E) 11-42 reduce los niveles de péptido  $\beta$ a presente en los cerebros de los conejos alimentados con dieta alta en colesterol. Conejo colesterol=  $0.8 \pm 0.2$  D.O , conejo inmunizado con  $\beta$ a p(E) 11-42 =  $0.25 \pm 0.23$  D.O.

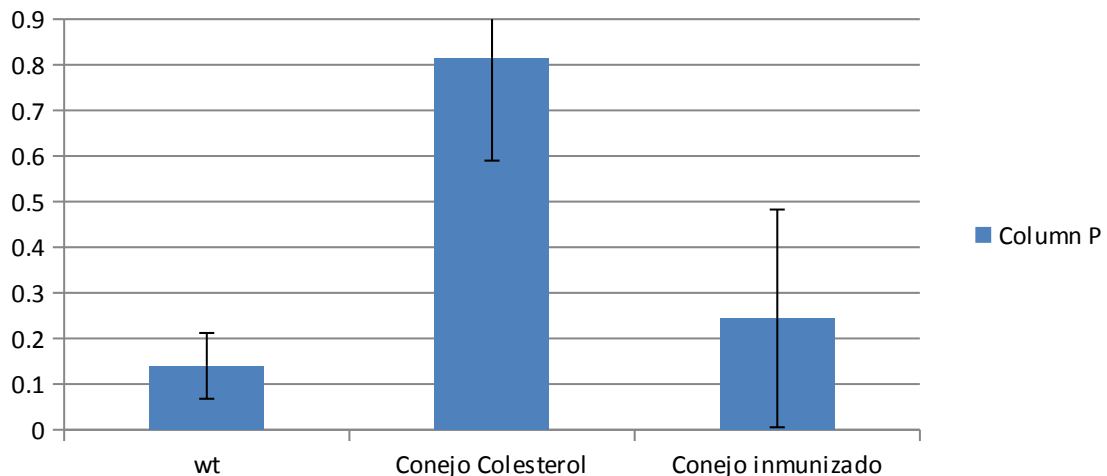


Figura 24. Evaluación mediante ELISA de los niveles de  $\beta$ a en conejos alimentados con dieta alta en colesterol tras la inmunización con  $\beta$ a p(E) 11-42

## DISCUSIÓN

La EA es la principal causa de demencia en los adultos mayores de 65 años de edad. En la actualidad se estima que hay alrededor de 20- 30 millones de pacientes con EA a nivel mundial y se espera que esta cifra se triplique para el año 2050, en caso de no desarrollar estrategias terapéuticas efectivas que limiten el avance de la enfermedad (Iqbal, et al.,2013).

Es necesario contar con modelos animales representativos de la EA con la finalidad de desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas efectivas. Un gran número de cepas de ratones transgénicos para el estudio de la EA han sido desarrollados en las últimas décadas, su uso ha sido altamente explotado debido a la capacidad que tienen dichos modelos de replicar algunas fases de la enfermedad, sin embargo, todos ellos se basan en mutaciones asociadas con la enfermedad familiar, trayendo por consecuencia la falta de reproducción de todos los aspectos de la patología en humanos (Casadesus, et al.,2010). Los modelos transgénicos para el estudio de la EA han sido ampliamente criticados para el desarrollo de estrategias terapéuticas, principalmente debido a que las mutaciones asociadas con la enfermedad familiar solamente representan al 10 % de todos los casos (Newman, et al.,2007). Se ha establecido que en humanos el desarrollo de la enfermedad familiar difiere de la enfermedad esporádica, lo cual ha despertado preocupación, ya que es probable que solo nos estemos enfocando en tratar a un grupo mínimo de pacientes con EA.

“ Los modelos actuales de la Enfermedad de Alzheimer están principalmente diseñados para expresar ciertos elementos de la enfermedad y .....representan incompletamente el desarrollo y el progreso de la enfermedad es humanos”

Dr. William Thies , Jefe Médico de la Asociación de Alzheimer, E.U.A

Un modelo efectivo para el estudio de la EA es el modelo de conejo, ya que su secuencia de  $\beta$ a tiene homología 97% a la del humano. A pesar de que el conejo no desarrolla la patología de forma espontánea, una dieta alta en colesterol y la presencia de cobre en el agua favorecen el desarrollo de los agregados amiloides característicos de la EA ( Philipson, et al, 2010 ). Este modelo también desarrolla agregados amiloides intracelulares, tau hiperfosforilada, muerte neuronal, inflamación, astrogliosis y microgliosis, que son características de la EA.

Una de las características importantes de la EA es la presencia de especies aminotruncadas modificadas del péptido  $\beta$ a Debido a su aparición en estadios tempranos se ha propuesto que estas especies fungan como centros de nucleación, los cuales favorecen la formación de los oligómeros tóxicos del péptido  $\beta$ a. Es por ello que la falta de especies aminotruncadas modificadas del péptido  $\beta$ a o su aparición en etapas muy avanzadas de la enfermedad, es considerada una desventaja de los modelos transgénicos para el estudio de la EA.

En este trabajo encontramos agregados amiloides del péptido  $\beta$ a p(E) 3-42 asociado a los vasos sanguíneos en los cerebros de los conejos alimentados con dieta alta en colesterol. Se ha demostrado que



esta especie aminotruncada modificada se encuentra en los agregados amiloides presentes en los cerebros de pacientes con EA. Así mismo este péptido posee una mayor capacidad de agregación, lo cual, le brinda una mayor toxicidad.

Debido a la importancia de las especies aminotruncadas modificadas en el desarrollo de la EA es necesario considerar las especies en los protocolos de inmunización. El modelo de conejo con dieta alta en colesterol puede ser un modelo altamente efectivo para estudios de inmunoterapia, ya que al poseer especies aminotruncadas modificadas,  $\beta$  p(E) 3-42, el desarrollo de la patología es más cercano al desarrollo de la patología en humanos, por lo cual, los efectos protectores logrados con los inmunógenos seleccionados podrían representar con mayor seguridad los efectos esperados en pacientes con la EA.

Previamente caracterizamos al péptido  $\beta$  p(E) 11-42, el cual reconoce a las 3 principales especies de péptido  $\beta$  presente en cerebros humanos: el péptido de longitud completa  $\beta$  1-42 y las especies aminotruncadas modificadas  $\beta$  p(E) 3-42 y  $\beta$  p(E) 11-42. Es decir, la inmunización con un solo inmunógeno podría ser capaz de proteger contra las 3 principales especies tóxicas de  $\beta$  presentes en los cerebros de los pacientes con EA.

Hay reportes en la literatura que sugieren que las especies piroglutamadas, de todos los péptidos, tienen una menor capacidad inmunogénica con respecto a sus versiones no ciclizadas. En función de ello decidimos caracterizar la especie no piroglutamada  $\beta$  11-42.

De la misma forma que para el péptido  $\beta$  p(E) 11-42, los anticuerpos dirigidos hacia la especie no piroglutamada se caracterizan por reconocer a los péptidos  $\beta$  1-42,  $\beta$  p(E) 3-42 y  $\beta$  p(E) 11-42. Sin embargo, los estados de agregación reconocidos por dichos anticuerpos son monómeros, trímeros y tetrameros. Los anticuerpos anti  $\beta$  11-42 no reconocen oligómeros de alto peso molecular. Esto difiere de lo previamente reportado para los anticuerpos anti  $\beta$  p(E) 11-42 (Pérez-Garmendia, et al., 2010) donde encontramos que los anticuerpos reconocen preferencialmente oligómeros de alto peso molecular de las 3 especies de  $\beta$ , y no reconocen al monómero del péptido  $\beta$  1-42.

Sabemos que los anticuerpos dirigidos contra el péptido  $\beta$  funcionan mediante 3 mecanismos no excluyentes. El primero favorece la opsonización de los agregados amiloides para su reconocimiento y degradación por la microglía. El segundo propone la neutralización de los oligómeros tóxicos. Y finalmente el tercero propone que los anticuerpos favorecen la remoción del  $\beta$  presente en circulación favoreciendo así la salida de  $\beta$  del parénquima cerebral para restablecer el equilibrio (sink periférico).

Los anticuerpos anti- $\beta$  p(E) 11-42 podrían ser más efectivos como estrategia inmunoterapéutica para el tratamiento de la EA ya que son capaces de reconocer mayores estados de agregación de los péptidos  $\beta$ . Pueden reconocer, de igual manera que los anticuerpos anti  $\beta$  11-42, dímeros y tetrameros, neutralizándolos y bloquear su toxicidad. Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos anti- $\beta$  11-42, los anticuerpos anti- $\beta$  p(E) 11-42 pueden neutralizar la toxicidad inducida por oligómeros de alto peso molecular, promoviendo así la protección contra una mayor cantidad de estados oligómeros del péptido  $\beta$ .

Los anticuerpos anti  $\beta$  11-42 reconocen al monómero del péptido  $\beta$  1-42, no reconocido por los anticuerpos anti- $\beta$  p(E) 11-42. Esto parecería una ventaja, ya que hay quienes proponen que el monómero al ser una especie con función fisiológica, no debería ser eliminada, sin embargo, si los anticuerpos funcionan mediante el mecanismo del sink periférico, es necesario que posean la capacidad de remover al monómero

presente en circulación.

Las diferencias en el reconocimiento de los anticuerpos anti- $\beta$  11-42 respecto a lo previamente reportado para los anticuerpos anti- $\beta$  p(E) 11-42 se deben a que los dos péptidos presentan diferentes regiones inmunodominantes. Para el péptido  $\beta$  11-42 encontramos mimotopos que contienen a los aminoácidos EV, presentes en la región aminoterminal del péptido. El péptido  $\beta$  p(E) 11-42 se caracteriza por presentar dos regiones inmunodominantes siendo una en la porción aminoterminal y otra en la porción central del péptido  $\beta$  p(E) 11-42 (Pérez-Garmendía, et al.,2010).

### **ACIDO RETINOICO COMO INMUNOMODULADOR**

Los retinoides son derivados de la vitamina A que presentan actividad neoplásica e inmunomoduladora. Han sido utilizados para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades como psoriasis, acné, leucemia y artritis reumatoide (Nozaki, et al.,2005).

El ATRA es el principal metabolito de la vitamina A. Su capacidad inmunomoduladora ha sido evaluada en dos modelos. En el primero se observó que la deficiencia de vitamina A promovía una deficiencia inmune debido a la disminución en la producción de anticuerpos. El tratamiento con ATRA restableció la respuesta de las células B y la producción de anticuerpos protectores. En el segundo modelo se evaluó la capacidad del ATRA de favorecer un shift hacia un perfil antiinflamatorio en el modelo de nefritis lúpica. En dicho modelo el ATRA evita la degeneración de los glomérulos al evitar la infiltración de células T autoreactivas. El título de anticuerpos contra DNA se ve incrementado, pero el daño tisular se ve reducido.

Sin embargo el papel del ATRA como inmunomodulador en protocolos de inmunización no ha sido evaluado.

En el presente trabajo evaluamos la capacidad del ATRA como inmunomodulador para favorecer un perfil anti-inflamatorio en los protocolos de inmunización del péptido  $\beta$  en presencia de saponina como adyuvante.

Encontramos que el ATRA posee un efecto inmunomodulador en los protocolos de inmunización con  $\beta$  1-42. Esto se ve reflejado en la relación IgG1/ IgG2a y en los niveles de citocinas anti-inflamatorias IL-4, y IL-10. Es importante que encontramos que el tratamiento con ATRA favorece un aumento en las concentraciones de citocinas antiinflamatorias en los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$  1-42. Sin embargo los niveles de citocinas proinflamatorias no se modificaron.

La IL-4 promueve la diferenciación de células T a perfil TH2, esto protege de la inducción de linfocitos

Th1 que favorezcan el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que la capacidad del ATRA de favorecer un perfil anti-inflamatorio esta en función de estimular la producción de IL-4, lo cual trae como consecuencia la reducción en los niveles de IFN- $\gamma$ . En el modelo experimental de Encefalitis infecciosa se observó que el aumento en los niveles de IL-4 se correlacionaba con una mejoría en la patología debido a la disminución de inflamación asociada a la infiltración de células autoreactivas al parénquima cerebral ( Racke, 1995).

Es por ello que proponemos al ATRA como inmunomodulador es los protocolos de inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42 en presencia de saponina como adyuvante.

### **ESPECIES AMINOTRUNCADAS MODIFICADAS**

Una vez evaluado el efecto del ATRA como inmunomodulador en la inmunización con  $\beta$ a 1-42, evaluamos su efecto en protocolos de inmunización con las especies aminotruncadas modificadas  $\beta$ a p(E) 3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42, encontrando que este compuesto no tiene efecto inmunomodulador en los protocolos de inmunización con especies aminotruncadas modificadas ( $\beta$ a p(E) 3-42,  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 ). Esto se ve reflejado en la falta de modificación de la relación IgG1/IgG2a.

Al evaluar las concentraciones de citocinas encontramos que el ATRA promovió una disminución en la concentración de IL-4, y un aumento en los niveles de IL-10 e IFN- $\gamma$ , en los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a p(E) 3-42. Es decir se observa un perfil mixto. Se sabe que las concentraciones de IFN- $\gamma$  están en función de las concentraciones de IL-4. De manera tal que la disminución en las concentraciones de IL-4 favorece aumento de las concentraciones de IFN- $\gamma$  y por consecuencia aumento de un perfil inflamatorio.

Es interesante que en caso de inmunización con los péptidos  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42, las células T no se activan in vitro en presencia de su propio antígeno, pero sí proliferan en presencia de ConA. Esto nos indica que aunque son células capaces de proliferar, no son células autoreactivas. Para corroborar que la falta de activación no se debiera a que el epítipo de Células T se encontrara enmascarado, estimulamos los esplenocitos de los ratones inmunizados con  $\beta$ a p(E) 11-42 con el péptido de longitud completa  $\beta$ a 1-42 donde sí está presente el epítipo de células T y los fragmentos del péptido  $\beta$ a 12-28 y 17-42. No se observó proliferación celular en ningún caso. Estos resultados son importantes para la inmunoterapia porque se puede evitar la infiltración al cerebro de células T autoreactivas que resulten en efectos secundarios tales como meningoencefalitis, efecto observado en ensayos clínicos tras la inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42.

En estudios recientes se observó que las diferencias en los haplotipos para el MHC promueven una respuesta diferencial ante los epítopos del péptido  $\beta$ a . En un modelo de ratones con base C57BL/6, misma base que tienen los ratones 3x-Tg utilizados en el presente trabajo, se encontró que la activación de células T se observa con la estimulación con el péptido de longitud completa  $\beta$ a 1-42 y con el fragmento  $\beta$ a 1-16. La estimulación con los fragmentos 11-28 y 35-42 no estimuló la proliferación de células T. Es decir, el epítipo

para activación de células T en estos ratones, con haplotipo H2b, se localiza en la región 1-16 (Das 2003). Debido a que el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 carece de esta región, la inmunización con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 no va a promover la activación de células T autoreactivas en esos ratones. Ratones con haplotipo H-2Q y H-2k reconocen como sitio de activación de células T la región 10-24 (Toly- Ndour, et al.,2011).

En humanos se encontró que el alelo DRB1\*1101 reconoce como epítipo T el fragmento  $\beta$ a 1-28, de forma semejante a lo observado en los ratones C57BL. Sin embargo el alelo DRB1\* 1501 se asocia con una mayor activación de células T (30%), encontrándose su epítipo en la región 12-25 del péptido  $\beta$ a (Zota, et al.,2009). La capacidad de estimular la proliferación de células T con especies aminotruncadas modificadas no ha sido evaluada .

Finalmente evaluamos la capacidad protectora del péptido  $\beta$ a p(E) 11-42. Encontramos que la inmunización con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 promovió una reducción en la concentración del péptido beta amiloide presente en los cerebros. Debido a que solamente el 0.1% de los anticuerpos presentes en circulación entran a parénquima cerebral, la producción de anticuerpos que reconozcan a las 3 principales especies de péptido  $\beta$ a presentes en cerebro, podría aumentar la eficacia de la inmunización.

## CONCLUSIONES

- Identificamos a la especie amino truncada/ modificada  $\beta$ a p(E) 3-42 en los cerebros de conejos con dieta alta en colesterol, hallazgo descrito por primera vez por nuestro grupo (Perez-Garmendía,2014).
- Los anticuerpos policlonales de conejo anti-  $\beta$ a p(E) 11-42 y  $\beta$ a 11-42 reconocen a las tres principales especies del péptido  $\beta$ a presentes en cerebros humanos ( $\beta$ a 1-42,  $\beta$ a p(E) 3-42 y  $\beta$ a p(E) 11-42), sin embargo estos anticuerpos reconocen diferentes epitopos y diferentes estados de agregación.
- La inmunización con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 no induce la activación de células T. Esto es de gran importancia ya que uno de los principales efectos secundarios de la inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42 es la infiltración de células T autoreactivas hacia meninges.
- El ácido retinóico (ATRA) funciona como inmunomodulador en los protocolos de inmunización con el péptido  $\beta$ a 1-42 al evitar la respuesta inflamatoria inducida por la saponina. Este efecto inmunomodulador no se observó en los protocolos de inmunización con las especies aminotruncadas modificadas  $\beta$ a p(E) 3-42 y  $\beta$ a p(E) 11-42.
- Los anticuerpos policlonales anti -  $\beta$ a p(E) 11-42 reducen la carga amiloide en el modelo conejos con dieta alta en colesterol.
- Los protocolos de inmunización con el péptido  $\beta$ a p(E) 11-42 pueden promover la reducción de la patología amiloidea sin el riesgo de desarrollar microhemorragias y meningoencefalitis, lo que sugiere que este péptido es un inmunógeno seguro.

## REFERENCIAS

1. Aisen P, et. al., 2010, Clinical Core Of The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Progress And Plans, *Alzheimer's & Dementia* 6, (3), 239–246
2. Alameida C, 2011 Beta-Amyloid Accumulation In App Mutant Neurons Reduces Psd-95 And Glur1 In Synapses, *Neurobiology Of Disease* (20), 2: 187–198
3. Alafuzzof I, 2008, Staging Of Neurofibrillary Pathology In Alzheimer's Disease: A Study Of The Brainnet Europe Consortium, *Brain Pathology* 18, 4, 484–496
4. Anand R, et. al., 2014, Therapeutics Of Alzheimer's Disease: Past, Present And Future, *Neuropharmacology* 76, 27–50
5. Andrea M, et. al., 2010, Morphologically Distinct Types Of Amyloid Plaques Point The Way To A Better Understanding Of Alzheimers Disease Pathogenesis, *Biotechnic And Histochemistry* 85(2) 133-147
6. Attems J, 2005, Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathology, Clinical Implications, And Possible Pathomechanisms, *Acta Neuropathologica* 110,(4): 345-359
7. Barret P, et. al., 2012, The Amyloid Precursor Protein Has A Flexible Transmembrane Domain And Binds Cholesterol, *Science* 336(6085): 1168-71
8. Beach T, et. al., 2007, Circle Of Willis Atherosclerosis: Association With Alzheimer's Disease, Neuritic Plaques And Neurofibrillary Tangles, *Acta Neuropathologica* 13(1):13.21
9. Benjannet A, et. al., 2004, The Metabolism Of B-Amyloid Converting Enzyme And B-Amyloid Precursor Protein Processing, *Biochemical And Biophysical Research Communications* 325 (1), 235–242
10. Bitain G., Vollers, S, Teplow D, (2003) Elucidation Of Primary Structure Elements Controlling Early Amyloid B Protein Oligomerization, *278(37): 34882-34889*
11. Braak H, Braak E. frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 351–7
12. Brody D, Et. Al , '2008, Active And Passive Immunotherapy For Nuerodegeerative Diosrders, *Annu Rev Neuroscience* 31, 175-193

13. Brody D, Holtzman D, ( 2008) Active And Passive Immunotherapy For Nuerodegeerative Diosrders, Annu Rev Neuroscience 31:175-193
14. Broersen K, Et Al, 2010, The Culprit Behind Amyloid Beta Peptide Related Neurotoxicity In Alzheimer's Disease: Oligomer Size Or Conformation?, Alzheimer's Research & Therapy 2010, 2:12.
15. Burbach G, Vlachos A, et. al., (vessel Ultrastrucutre In App23 Transgenic Mice After Passive Anti Ab Immunotherapy And Subsequent Intracerebral Hemorrhage, Neurobiology Of Aging 28:202-212
16. Burgermeister P, et. al., 2000, Mechanisms Of Cerebrovascular Amyloid Deposition: Lessons From Mouse Models, Anyas 903: 307-316
17. Bush A. Et. Al.. 2003, Copper, Zinc, And The Metallobiology Of Alzheimer Disease., Alzheimer Dis Assoc Disord 17 3(), 147-150
18. Buttini M, Masliah E, et. al., ( 2005) B Amyloid Immunotherapy Prevents Synaptic Degeneration In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease, The Journal Of Neuroscience 25(40): 9096-91018
19. Casadesus G, Et. Al, 2010, Animal Models Of Alzheimer's Disease International, Jad
20. Carlo M, (2009) Beta Amyloid Peptide From Diffente Agregation Forms To The Activation Of Different Biochemical Pathways Eur Biophysical Journal
21. Castillo G, et. al., Laminin Inhibition Of Ba Protein Fibrillogenesis And Identification Of An Ab Binding Site Localized To The Glomerular Domain Repeats On The Laminin Chain, J Neurosc Res 62:451-462
22. Cehetto D, et. al., 2008, Vascular Risk Factors For Alzheimers Disease, Expert Review Of Neurotherapeutics 8 (5) : 743-750
23. Cizas P, et. al., 2010, Size-Dependent Neurotoxicity Of B-Amyloid Oligomers, Archives Of Biochemistry And Biophysics 496, 2, 84–92
24. Claasen A, et. al., 2009, Secreted Amyloid Precursor Protein-A Upregulates Synaptic Protein Synthesis By A Protein Kinase G-Dependent Mechanism, Neuroscience Letters 460 (1), 2 92–96
25. Cynis H , et. al., 2008, Amyloidogenic Processing Of Amyloid Precursor Protein: Evidence Of A Pivotal Role Of Glutaminyl Cyclase In Generation Of Pyroglutamate-Modified Amyloid-B, 47 (28), 7405–7413
26. De La Torre J, et. al., 2004, Is Alzheimer's Disease A Neurodegenerative Or A Vascular Disorder? Data,

Dogma, And Dialectics, *The Lancet Neurology* 3(3): 184-190

27. Demattos R, et. al., 2001, Peripheral Anti-A $\beta$  Antibody Alters Cns And Plasma A $\beta$  Clearance And Decreases Brain A $\beta$  Burden In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease, 98(15)
28. Demeyer G, 2010, Diagnosis-Independent alzheimer disease Biomarker Signature In Cognitively Normal Elderly People, *Jama*, 67(8), 949-956.
29. Dorr A, et. al., 2012, Amyloid-B-Dependent Compromise Of Microvascular Structure And Function In A Model Of Alzheimer's Disease, *Brain*135(10):3039-3050.
30. Drew S et. al., 2010, Alzheimer's A $\beta$  Peptides With Disease-Associated N-Terminal Modifications: Influence Of Isomerisation, Truncation And Mutation On Cu<sup>2+</sup> coordination, *Plos One*
31. Farkas E, et. al., 2000, Pathological Features Of Cerebral Cortical Capillaries Are Doubled In Alzheimer's Disease And Parkinson's Disease, *Acta Neuropathologica* 100, 4,395-402
32. Gable C, 2009, Amyloid Oligomer Structures And Toxicity, 222 *The Open Biology Journal*, 2009, 2, 222-227
33. Feldmann H, et. al., 2007, Diagnosis And Treatment Of Dementia: 2. Diagnosis, *Cmaj*, 178, 825-836
34. Ferreira, 2011, The Ab Oligomer Hypothesis For Synapse Failure And Memory Loss In Alzheimer's Disease , *Neurobiology Of Learning And Memory* 96:529–543
35. Ferrer I, Rovira M, Sanches MI,et. al., (2004) Neuropathology And Pathogenesis Of Encephalitis Following Amyloid B Immunization In Alzheimer 's Disease, 14:11-20
36. Fiala C, 2007, Mechanisms Of Amyloid Plaque Pathogenesis, *Acta Neuropathologica* 114(6) 551-571
37. Fillit, H, 2010, Atorvastatin doesnt slow cognitive decline in patients with mild to moderate probable Alzheimers disease who are taking donepezil, *LEADe Neurology* 74: 956-964
38. Frackowiak J, et. al. , 1994, Non-Fibrillar [beta]-amyloid Protein Is Associated With Smooth Muscle Cells Of Vessel Walls In Alzheimer Disease, *Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology*:53(6):
39. Gatz M, Et. Al., 2006, Role Of Genes And Environments For Explaining Alzheimer Disease, *Arch Gen Psychiatry*, 63, 2: 168-174



40. Gandy S, 2005, The Role Of Cerebral Amyloid B Accumulation In Common Forms Of Alzheimer Disease, *J Clin Invest.*;115(5):1121–1129
41. Giuffrida M, et. al., 2010, The Monomer State Of Beta-Amyloid: Where The Alzheimer's Disease Protein Meets Physiology, *Reviews In The Neurosciences.* 21, 2: 83–94,
42. Gilman S, et. al., 2005, Clinical Effects Of Ab Immunization (an1792) In Patients With Ad In An Interrupted Trial, *Neurology* 64(9): 1553-1562
43. Guntert A, et. al., 2006, High Sensitivity Analysis Of Amyloid-Beta Peptide Composition In Amyloid Deposits From Human And Ps2app Mouse Brain, *Neuroscience* 143(2): 461–475
44. Grammas P, 2011, Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Journal of neuroinflammation* 8 (26):
45. Gruschus (2008) Do Amyloid Oligomers Act As Traps For Misfolded Proteins? A Hypothesis, *Amyloid* 15(3) 160-165
46. Hardy J, Higgs G, 1992, Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis , *Science* 256(5054): 184-185
47. Harigaya Y, et. al., 2000, Amyloid B Protein Starting Pyroglutamate At Position 3 Is A Major Component Of The Amyloid Deposits In The Alzheimer's Disease Brain, *Biochemical And Biophysical Research Communications* 276, 422–427
48. Hart M, et. al., 2001, Overproduction Of Perlecan Core Protein In Cultured Cells And Transgenic Mice , *The Journal Of Pathology* 194,(2,) 262–269
49. Hartlage-Rubsamen M, et. al., 2011, Glutaminyl Cyclase Contributes To The Formation Of Focal And Diffuse Pyroglutamate (pGlu)-a $\beta$  Deposits In Hippocampus Via Distinct Cellular Mechanisms, *Acta Neuropathologica* 121( 6) 705-719
50. Harris J., 2010, Cholesterol in Alzheimer's disease and other amyloidogenic disorders, cholesterol binding and cholesterol transport, chap2, 47-65
51. Hawkes C, et. al., 2008, Clinical Immunotherapy Trials In Alzheimer's Disease, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 5(3): 177–183

52. He W, Et,Al, 1999, The A $\beta$  3-Pyroglutanyl And 11-Pyroglutanyl Peptides Found In Senile Plaque Have Greater B-Sheet Forming And Aggregation Propensities In Vitro Than Full-Length A $\beta$ , *Biochemistry* 38(33), 10871–10877
53. Helbecque N, Abderrhamani A, Meylan L, Riederer B, Mooser V, Miklossy J, Delplanque J, Boutin P, Nicod P, Haefliger JA, Cottel D, Amouyel P, Froguel P and Waeber G, ( 2013) Islet-brain1/C-Jun N-terminal kinase interacting protein-1 (IB1/JIP-1) promoter variant is associated with Alzheimer's disease, *Molecular Psychiatry* 8, 413–422
54. Herbert L,Et.L., 2013, Alzheimer Disease In The United States (2010–2050) Estimated Using The 2010 Census, *Neurology* 7, (80):1778-1783
55. Higgings Ls, et. al., 1996, P3 -amyloid Peptide Has A Unique And Potentially Pathogenic Immunohistochemical Profile In Alzheimer's Disease Brain, *American Journal Ofpathology*, 149, (2): :585-596
56. Hoffman A et. al., , 1997, Atherosclerosis. Apolipoprotein E, And Prevalence Of Dementia And Alzheimers Disease In The Rotterdam Study, *The Lancet* 349(9046): 151-154
57. Huang, Et. Al, 1999, The Ab Peptide Of Alzheimers Disease Directly Produes Hydrogen Peroxide Through Metal Ion Reduction, *Biochemistry*, 38 \_7609-7616
58. Huang, Et. Al., 2004, Redox-Active Metals, Oxidative Stress, And Alzheimer's Disease Pathology, *Annyas*: 1012, 153-163
59. Huang, Et. Al, 2005, Crystal Structures Of Human Glutaminyl Cyclase, An Enzyme Responsible For Protein N-Terminal Pyroglutamate Formation, *Pnas* 102(37)
60. Iqbal Khalid, Et. Al., 2013, Animal Models Of The Sporadic Form Of Alzheimer's Disease: Focus On The Disease And Not Just The Lesions, *Jad*: 37: 469-474
61. J. A. Hardy And G. A. Higgins, Et. Al., 1992 , Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis., *Science*, 256: 184-185
62. Jack C, Et.A., 2000, Aproximación Diagnóstica A La Enfermedad De Alzheimer Temprana. ¿de Qué Hablamos? Aspectos Conceptuales , *Revista Española De Geriatria Y Gerontología*, 46,33-38
63. Jellinger K, et. al., 2005, Prevalence And Pathogenic Role Of Cerebrovascular Lesions In Alzheimer

Disease, Journal Of The Neurological Sciences 229–230,37–41

64. Kalaria R, 1996, Does Vascular Pathology Contribute To Alzheimer Changes?, Journal Of The Neurological Sciences 322 141–147
65. Kaye R, et. al.. (2013) Molecular Mechanisms Of Amyloid Oligomers Toxicity , Journal Of Alzheimer's Disease 33:S67–S78
66. Laferla F, Et. Al., 2007, Intracellular Amyloid B In Alzheimers Disease, Nature Reviews, 8:499-509
67. Laferla F, Et. Al.2012, Animal Models Of Alzheimer Disease, Cold Spring Harb Perspect Med 2012
68. Lang A, Et. Al, 2010, Clinical Trials Of Disease-Modifying Therapies For Neurodegenerative Diseases: The Challenges And The Future, *Nature Medicine* 16, 1223–1226
69. Le T, et. al., 2001, Cotton Wool Plaques In Non Familial Late Onset Alzheimer Disease, Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology: 60 (11): 1051–1061
70. Lee E.,Skrovonsky D., et. al.. (2003) Secretion And Intracellular Generation Of Truncated Ab In B Site Amyloid B Precursor Protein Cleaving Enzyme Expressing Human Neurons Jbc 278(14:4458-4466
71. Lemere C., Et. Al. 2010, Can Alzheimer Disease Be Prevented By Amyloid-B Immunotherapy?, Nature Reviews Neurology
72. 6, 108-199
73. Li M, et. al., 2007, The Role Of Intracellular Amyloid B In Alzheimer's Disease, Progress In Neurobiology, 83, (3), 131–139
74. Liu K, Solano I,Et Al. 2006, Characterization Of Ab11-40/1142 Peptide Deposition In Alzheimer's Disease And Young Down's Syndrome Brains: Implication Of N-Terminally Truncated Ab Species In The Pathogenesis Of Alzheimer's Disease , *Acta Neuropathol* 112: 163-174
75. Martinez-Castillo, E, et. al., 2001, Neuropsicología De La Memoria: Aplicaciones Al Estudio De La Enfermedad De alzheimer, *Rev De Psi Gral Y Apli*, 51(1) 17-29
76. Masliah E, 2005, A $\beta$  Vaccination Effects On Plaque Pathology In The Absence Of Encephalitis In Alzheimer Disease,
77. Masters C, et. al., 1985, Amyloid Plaque Core Protein In Alzheimer Disease And Down Syndrome,

78. Mathews A, et. al., 2011, Alzheimers disease: Cholesterol a menace? Brain Research Bulletin 86: 1-12
79. Maulik M, et. al., 2013, Role Of Cholesterol In App Metabolism And Its Significance In Alzheimers Disease Pathogenesis, Molecular Neurobiology, 47(1): 37-63
80. Mayeux R, et. al., 2012, Epidemiology Of Alzheimer Disease, Csh Perspectives, 4 (3)
81. Mccoll G, et. al., 2009, The caenorhabditis Elegans  $\alpha\beta 1-42$  model Of Alzheimer Disease Predominantly Expresses  $A\beta 3-42$ , Jbc 284, 22697-22702.
82. Mcgeer, et. al., 2013, The Amyloid Cascade-Inflammatory Hypothesis Of Alzheimer Disease: Implications For Therapy, Acta Neuropathologica: 126(4) 479-497
83. Miravalle L, et. al., 2005, Amino-Terminally Truncated  $A\beta$  Peptide Species Are The Main Component Of Cotton Wool Plaques, *Biochemistry* 44, 10810-10821
84. Mori H, et. al., 1992, Mass Spectrometry Of Purified Amyloid Beta Protein In Alzheimer's Disease. Jbc 267,17082-17086.
85. Morgan D, Diamond D, et. al., (2000) Ab Peptides Vaccination Preventsd Memory Loss In An Animal Model Of Alzheimer Disease, Nature 408:982-984
86. Muller T, Meyer H, Egensperger R, Marcus K, (2008) The Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain As Modulator Of Gene Expression, Apoptosis And Cytoskeletal Dynamics, Relevance For Alzheimer, Progress In Neurobiology 85: 393-406
87. Nagy Z, et. al., 2005, The last neuronal division: a unifying hypothesis for the patogenesis of alzheimers disease, Wiley online library 9, 8378-82
88. Newman M, Et. Al, 2007, Alzheimer Disease: Amyloidogenesis, The Presenilins And Animal Models. *Biochim Biophys Acta*.3:258-97
89. Nicolakakis N , Et,Al, 2011, Neurovascular Function In Alzheimer's Disease Patients And Experimental Models, *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31,1354–1370
90. Nostrand, V, et. al., Enhanced Capillary Amyloid Angiopathy Associated Pathology In Tg-Swdi Mice With Deleted Nitric Oxid Synthase 2, Stroke 1, 5135/38

91. Oijen M, et. al., 2007, Atherosclerosis And Risk For Dementia, 61(5): 403-410
92. Papassotiropoulos A, et. al., 2013, Increased Brain Beta Amyloid Load, Phosphorylated Tau, And Risk Of Alzheimer Disease Associated With An Intronic Cyp 46 Polymorphism, Arch Neurol 60(1) 29-35
93. Perez De La Lema, Et. Al., 2004, Retinoic Acid Treatment Protects Mrl/Lpr Lupus Mice From The development Of Glomerular Disease, Kidney International, 66: 1018-1028
94. Perri C, 2006, Global Prevalence Of Dementia: A Delphi Consensus Study, The Lancet, 366 (9503), 2112 - 2117
95. Pfaifer La, et. al., 2002, Cerebral Amyloid Angiopathy And Cognitive Function the Haas Autopsy Study, Neurology, . 58( 11)1629-1634
96. Philipson O, Et. Al., 2010, Review Animal Models Of Amyloid-Beta-Related Pathologies In Alzheimer's Disease. Feb S J.. 277 :1389-409
97. Piccinni A, et. al., 2005, B-Amyloid Is Different In Normal Aging And In Alzheimer Disease, Jbc 280,34186-34192.
98. Pike C., Et. Al., 1995, Amino Terminal Deletions Enhance Aggregation Of B Amyloid Peptides In Vitro, Jbc 270(41):23895-239898
99. Pritam Das ,et. Al. 2003, Immune Responses Against A 1–42 In Hla Class Ii Transgenic Mice: Implications For Ab 1–42 Immune-Mediated Neurobiology Of Aging, 24 969-976 Therapies
100. Perez-Garmendia R, Et. Al., 2010, Anti-11[E]-Pyroglutamate-Modified Amyloid B Antibodies Cross-React With Other Pathological A $\beta$  Journal Of Neuroimmunology: 229: 248-255 Species: Relevance For Immunotherapy
101. Prashanti D, et. al., 2008, Regulation Of B-Amyloid Levels In The Brain Of Cholesterol-Fed Rabbit, A Model System For Sporadic Alzheimer's Disease, Mechanisms Of Ageing And Development 129(11): 649–655
102. Prasher D, et. al., 1998, Molecular Mapping Of Alzheimer-Type Dementia In Down's Syndrome , Annals Of Neurology 43,3, 380–383
103. Racke M Et. Al. 2005, Retinoid Treatment Of Experimental Allergic Encephalomyelitis 11-4

104. Rauk A, 2008, Why Is The Amyloid Beta Of Alzheimers Disease Neurotoxic?, Dalton Trans, 1273-1282
105. Rabinovicini G, et. al., 2010, Increased Metabolic Vulnerability In Early-Onset Alzheimer's Disease Is Not Related To Amyloid Burden, Brain, 133 (2): 512-528.
106. Rastas S, et. al., 2010, Vascular Risk Factors And Dementia In The General Population Aged >85 Years, Neurobiology Of Aging: 31(1) 1-7,
107. Reitz C, Et. Al.,2011, Epidemiology Of Alzheimer Disease., Jad 7 :137-152
108. Y. Nozaki, Et. Al.2005, The Beneficial Effects Of Treatment With All-Trans-Retinoic Acid Pluscorticosteroid On Autoimmune Nephritis In Clinical And Experimental Immunology 139: 74-83 Nzb/Wf1 Mice
109. Rensink A, Et. Al, 2003, Pathogenesis Of Cerebral Amyloid Angiopathy, Brain Research Reviews 43 (2003) 207– 223
110. Revesz T, et. al., 2003, Cerebral Amyloid Angiopathies: A Pathologic, Biochemical, And Genetic View, Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology 62 (9):885–898
111. Riga D, 2011, Neuropathology Of Alzheimer Disease. Connections With Cerebral Senescence, Studia Universitatis “vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții, 21,(2), 2011, 251-262
112. Rogers J, 1998, Inflammatory Mechanisms Of Alzheimer's Disease, Neuroinflammation Contemporary Neuroscience, 177-193
113. Roychaudhuri R., Yang D, Hoshi M., Teplow D.,(2008) Amyloid B Protein Assembly And Alzheimer Disease, Jbc Online Manuscript
114. Russo C Et,Al. 2000, Neurotoxic And Fibrillogenic Properties Of Amino-Terminally Modified amyloid  $\beta$ -Peptides, *Neurobiology Of Aging*, 2000, Vol. 21, P. 263.
115. Russo C Et,Al. 2002, Pyroglutamate-Modified Amyloid B-Peptides – A $\beta$ n3(Pe) – Strongly Affect Cultured Neuron And Astrocyte Survival , Journal Of Neurochemistry 82(6): 1480–1489
116. Ryan J, et. al., 2009, Anti-Amyloid-B Immunotherapy In Alzheimer's Disease: Acc-001 Clinical

Trials Are Ongoing, *Jad* 17 (2)

117. Saido T, et. al., 1995, Dominant And Differential Deposition Of Distinct I -amyloid Peptide Species, Ab N3(Pe), In Senile Plaques, *Neuron*, Vol. 14, 457-466,
118. Saido T, et. al., 1996, Amino- And Carboxyl-Terminal Heterogeneity Of B-Amyloid Peptides Deposited In Human Brain, *Neuroscience Letters*, 215 (3), 173–176
119. Schenk D, Barbour R, et. al., (1999) Immunization With Amyloid B Attenuates Alzheimer Disease Like Pathology In The Pdapp Mouse, *Nature* 400:173-177
120. Schneider A, 2006, Cholesterol Depletion Reduces Aggregation Of Amyloid Beta Peptide In Hippocampal Neurons, *Neurobiol Disease* 23(3): 573-577
121. Skinkai Y, et. al., 1995, Amyloid B Proteins 1-40 And 1-42 In The Soluble Fraction Of Extra And Intracranial Blood Vessels, *Ann Neurol* 38: 421-8
122. Schilling S, Zeitschel UI, et. al., 2008, Glutaminy Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate Ab And Alzheimer's Disease Like Pathology, *Nature Medicine*, 14: 1106-1111
123. Selkoe D, Et. Al., 1986, Isolation Of Low-Molecular-Weight Proteins From Amyloid Plaque Fibers In Alzheimer's Disease , *Journal Of Neurochemistry* 46(6)1820–1834
124. Selkoe, Et. Al., 2001, Alzheimer's Disease Results From The Cerebral Accumulation And Cytotoxicity Of Amyloid \beta-protein, *Jad* 3: 75-80
125. Selkoe, Et. Al., 2002, Alzheimer's Disease Is A Synaptic Failure *Science*, 598: 789-791
126. Selkoe D, Et. Al., 2010, Resolving Controversies On The Path To Alzheimer's Therapeutics, *Nature Medicine* 17, 1060–1065
127. Selkoe D, Et. Al., 2011, Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3:
128. Serrano-Pozo, 2011, Neuropathological Alterations In Alzheimer Disease, *Cold Spring Harb Perspect Med*.1(1):
129. Sergeant N, Bombois S, et. al., 2007, Truncated Beta Amyloid Peptide Species In Preclinical Alzheimer's Disease As New Targets For The Vaccination Approach, *Journal Of Neurochemistry*, 85: 1581-1591

130. Sevalle J, et. al., 2009, Aminopeptidase A Contributes To The N-Terminal Truncation Of Amyloid B-Peptide , *Journal Of Neurochemistry* 19(1):248–256
131. Shababl, et. al., , 2005, Cholesterol In Alzheimer´S Disease, *Lancet Neurol* ; 4: 841–52
132. Shepardson Ne, et. al., 2012, Cholesterol Level And Statin Use In Alzheimer Disease: li. Review Of Human Trials And Recommendations. *Arch Neurol*;68(11):1385-1392.
133. Schneeberger A, et. al., 2009, Development Of Affitope Vaccines For Alzheimer’s Disease (ad) — From Concept To Clinical Testing, *Jnha* 13(3) 264-267
134. Sjogren M, et. al., 2006, Cholesterol And Alzheimer’s Disease—Is There A Relation?, *Mechanisms Of Ageing And Development* 127 : 138–147
135. Smith, Et. Al. 197, Iron Accumulation In Alzheimer Disease Is A Source Of Redox-Generated Free Radicals, *Pnas*, 94: 9866-9868
136. Solomon B, 2006, Alzheimer's Disease Immunotherapy: From In Vitro Amyloid Immunomodulation To In Vivo Vaccination, *Jad*, 9(3); 433-438
137. Sparks L., Et. Al., 2007,Cholesterol Metabolism And Brain Amyloidosis: Evidence For A Role Of Copper In The Clearance Of A B Through The Liver, *Current Alzheimer Research*,4(2):165-169
138. Sparks L., Et. Al., 2008, Hippocampal Volume Change In The Alzheimer Disease Cholesterol-Lowering Treatment Trial., *Cleveland Clinic Journal Of Medicine* 75 (2);s87-
139. Sullivan C et. al., 2011, Pyroglutamate-A 3 And 11 Colocalize In Amyloid Plaques In Alzheimer’s Disease Cerebral Cortex With Pyroglutamate-A 11 Forming The Central Core, *Neuroscience Letters* 505 , 109– 112
140. Suzuki, N, et. al., 1994, High Tissue Content Of Soluble Beta 1-40 Is Linked To Cerebral Amyloid Angiopathy., *Am J Pathol*.145(2): 452–460.
141. Takaki Y, et. al., 2000, Biochemical Identification Of The Neutral Endopeptidase Family Member Responsible For The Catabolism Of Amyloid B Peptide In The Brain, *J Biochem*28(6):897-902.
142. Tian J, et. al., 2006, Relationships In Alzheimer's Disease Between The Extent Of A $\beta$  Deposition In Cerebral Blood Vessel Walls, As Cerebral Amyloid Angiopathy, And The Amount Of



Cerebrovascular Smooth Muscle Cells And Collagen , *Neuropathology And Applied Neurobiology* (32),3, 332–340

143. Toledo-Morell, 2000, From Healthy Aging To Early Alzheimer's Disease: In Vivo Detection Of Entorhinal Cortex Atrophy, *Annals Of The Ny Acad Of Sciences*, 911 240–253,
144. Toly-Ndour C, Et. Al. 2011, Mhc-Independent Genetic Factors Control The Magnitude Of cd4+ T Cell Responses To Amyloid-B Peptide In Mice Through Regulatory T Cell-Mediated Inhibition, *The Journal Of Immunology*, 187:
145. Vanderstichele H, De Meyer G, et. al.. ( 2005) Amino Truncated B Amyloid Peptides In Cerebrospinal Fluid And Prediction Of Progression Of Mild Cognitive Impairment *Clinical Chemistry* 51 (9): 1650-1660
146. Vehmas A, et. al., 2003, Immune Reactive Cells In Senile Plaques And Cognitive Decline In Alzheimer's Disease, *Neurobiology Of Aging* 24, (2): 321-331
147. Veerbeek M, Et. Al. , 1998, Amyloid Formation In Senile Plaques And Congoophil-Ic Angiopathy, *Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology*: 57 (1): 97-98
148. Weissner C, et. al., The Second-Generation Active A $\beta$  Immunotherapy Cad106 Reduces Amyloid Accumulation In App Transgenic Mice While Minimizing Potential Side Effects, *Journal Of Neuroscience* 31(25):9323-9331;
149. Weller R, et. al., 1998, Cerebral Amyloid Angiopathy : Amyloid B Accumulates In Putative Interstitial Fluid Drainage Pathways In Alzheimer's Disease, *The American Journal Of Pathology*, 153, (3); 725–733
150. Weller R, et. al., 2009, Microvasculature Changes And Cerebral Amyloid Angiopathy In Alzheimer's Disease And Their Potential Impact On Therapy, *Acta Neuropathologica* 118(1): 87-102
151. Wirts O, et. al., 2009, Intraneuronal Pyroglutamate-Abeta 3–42 Triggers Neurodegeneration And Lethal Neurological Deficits In A Transgenic Mouse Model, *Acta Neuropathologica* 118, (4): 487-496,
152. Whirts O, et. al., 2010, Pyroglutamate Abeta Pathology In App/Ps1ki Mice, Sporadic And Familial Alzheimer's Disease Cases, *Journal Of Neural Transmission* 117( 1) :85-96,
153. Ya Hui Hung, Et. Al. 2013, Links Between Copper And Cholesterol In Alzheimer's Disease, *Front*

Physiol. 4: 1-18

154. Yamada M, et. al., 2012, Cerebral Amyloid Angiopathy, Progress In Molecular Biology And Traslational Science, 107: 41-67
155. Yanker B, Lou T., (2009) Amyloid B Protein Toxicity And The Pathogenesis Of Alzheimer Disease, Jbc 284 (8): 4755-4759
156. Yang Aj, et. al., 1999, Intracellular Accumulation Of Insoluble, Newly Synthesized A $\beta$ <sub>n</sub>-42 In Amyloid Precursor Protein-Transfected Cells That Have Been Treated With A $\beta$ <sub>1-42</sub>, The Journal Of Biological Chemistry, 274, 20650-20656.
157. Zahid Iqbal Rajput, Et. Al., 2007, Adjuvant Effects Of Saponins On Animal Immune Responses Journal Of Zhejiang University Science, 8: 153-161
158. Zhang D, et. al., 2011, Multimodal Classification Of Alzheimer's Disease And Mild Cognitive Impairment, Neuroimage 55 (3), 856-867
159. Zlokovic B, et. al., 2000, Vascular Transport Of Alzheimers Amyloid B Peptides And Apolipoproteins In Caa In Alzheimers Dsease And Related Disorders, Kluwer Academic Publishers> 325-346
160. Zota V, Et. Al., 2009, Hla-Dr Alleles In Amyloid -peptide Autoimmunity: A Highly Immunogenic Role For The Drb1\*1501 Allele1 The Journal Of Immunology, 183: 3522-3530