

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 641**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2012 PCT/CA2012/050488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13010274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2012 E 12814751 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2734221**

54 Título: **Métodos para diagnosticar y tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente angiogénico**

30 Prioridad:

19.07.2011 US 201161509538 P

18.04.2012 US 201261687071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.11.2019

73 Titular/es:

**JEFFERIES, DR., WILFRED (33.3%)
12596 23rd Avenue Surrey
British Columbia, Canada V4A 2C4, CA;
BIRON, KAAAN E. (33.3%) y
DICKSTEIN, DARA L. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**JEFFERIES, DR., WILFRED;
BIRON, KAAAN E. y
DICKSTEIN, DARA L.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 731 641 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para diagnosticar y tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente angiogénico

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al ámbito del diagnóstico y la terapéutica, en particular en lo que se refiere a la enfermedad de Alzheimer.

10 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer es la forma de demencia más común. La causa y progresión de la enfermedad no se comprende bien, pero durante mucho tiempo se consideró a la formación progresiva de placas amiloides y depósitos vasculares del péptido beta-amiloide como el distintivo patológico de la enfermedad de Alzheimer.

15 La disfunción de la barrera hematoencefálica (BBB) se identificó inicialmente en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y precede a la formación de placas seniles en estos modelos animales (Ujiie, et al., (2003), *Microcirculation*, 10: 463-470). Más adelante se confirmó a la disfunción de la BBB como una destacada, aunque inexplicable, característica clínica de la enfermedad de Alzheimer en pacientes (Farrall & Wardlaw, (2009) *Neurobiol Aging* 30: 337-352). El origen de la disfunción de la BBB durante la enfermedad de Alzheimer no se conoce, pero varios modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer en los cuales se sobreexpresan formas de la proteína precursora amiloide (APP) (Ujiie, et al., *ibid.*; Kumar-Singh, et al. (2005) *Am J Pathol* 167: 527-543; Paul, et al., (2007) *J Exp Med* 204: 1999-2008; Dickstein, et al. (2006) *Faseb J*, 20: 426-433) demostraron que el péptido beta-amiloide puede estar directamente involucrado en este proceso a modo de filtraciones en la BBB. Se ha demostrado que la vacunación con péptido abeta revierte la patología de la BBB (Dickstein, et al., *ibid.*).

25 Anderson, et al. (*Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, (2011), Article ID 616829) propuso que la regulación hídrica se altera en la enfermedad de Alzheimer y deriva en una permeabilidad anormal de la BBB y tasas anormales de intercambio a través de las paredes de los vasos.

30 Se ha registrado una alta incidencia de microangiopatía en la enfermedad de Alzheimer (Perlmutter, et al., (1990), *Brain Res.* 508(1):13-19). También se ha registrado angiogénesis continuada en las regiones cerebrales afectadas por la enfermedad de Alzheimer y se ha sugerido que se relaciona con el daño tisular (Desai, et al., (2009), *J Neural Transmission*, 116 (5): 587-597).

35 Se ha visto que el uso crónico de ciertos medicamentos, tales como los antiinflamatorios no esteroideos, las estatinas hipolipemiantes, los bloqueadores de los receptores de histamina H2 y los bloqueadores de los canales de calcio disminuyen el riesgo de enfermedad de Alzheimer en las poblaciones de alto riesgo. Estos agentes también pueden tener propiedades antiangiogénicas que conducen a una hipótesis preliminar de que la enfermedad de Alzheimer está mediada por la angiogénesis patológica y que la activación angiogénica del endotelio cerebral conduce a la deposición de placas beta amiloides y a la secreción de un péptido neurotóxico que mata neuronas fundamentales (Vagnucci & Li, (2003), *Lancet*, 361:605-608).

40 Anteriormente se han descrito métodos para inhibir la angiogénesis empleando un agente antiangiogénico seleccionado de un activador p190RhoGAP, un activador TFII-I, un inhibidor de GATA-2 en una enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis caracterizado por un aumento de la angiogénesis, tales como la degeneración macular; retinopatía diabética; artritis reumatoide; enfermedad de Alzheimer; obesidad; psoriasis; aterosclerosis; malformaciones vasculares; angiomas; y endometriosis (WO 2009/155504).

45 Esta información de antecedentes se proporciona con el fin de dar a conocer información que el solicitante cree que es de posible relevancia para la presente invención. No se pretende necesariamente la admisión, ni debe interpretarse, que cualquiera de la información anterior constituye un estado de la técnica en contra de la presente invención.

50 Resumen de la invención

55 La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquiera de las siguientes realizaciones mencionadas en el presente documento que no están cubiertas por el ámbito de las reivindicaciones no es parte de la invención. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer.

60 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer mediante la inhibición de la angiogénesis en el cerebro de individuos que están en riesgo o tienen la enfermedad de Alzheimer.

65 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente antiangiogénico solo o en combinación con un agente terapéutico.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para restaurar la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico y/o un agente que previene la amiloidogénesis abeta y/o promueve la eliminación del péptido abeta del cerebro.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica en un sujeto comprendiendo administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico y un agente que inhibe la amiloidogénesis abeta y/o promueve la eliminación del péptido abeta del cerebro.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para promover la reversión vascular en el cerebro de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer comprendiendo administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico y un agente que promueve la eliminación del péptido abeta del cerebro.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para prevenir o retrasar la filtración de la barrera hematoencefálica en un sujeto comprendiendo administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico y un agente que inhibe la amiloidogénesis abeta y/o promueve la eliminación de péptido abeta del cerebro.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para identificar sujetos con riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, o de tener un estadio temprano de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo detectar angiogénesis, alteración de TJ y/o alteración de la barrera hematoencefálica en el cerebro de un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para identificar agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer comprendiendo probar la capacidad de un agente candidato para restaurar las uniones estrechas en los vasos sanguíneos cerebrales o para promover la reversión vascular en el cerebro.

Breve descripción de las figuras

Estas y otras características de la invención se harán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos.

Figura 1: Los ratones Tg2576 AD tienen una patología de unión cerebral estrecha. Esta figura presenta micrografías confocales representativas de los vasos sanguíneos cerebrales de ratones Tg2576 envejecidos y ratones de tipo salvaje inmunotiquetados para ocludina o ZO-1 (rojo) y contrateñidos con TOTO-3 para ADN (azul). Los vasos sanguíneos, visualizados en el neocórtex y el hipocampo, que presentaron ocludina marcada, continua y lineal (A y C) o ZO-1 (E y G) se consideraron normales, como se demostró en el tipo salvaje. La tinción anormal de ocludina (B y F) y ZO-1 (D y H) se visualizó punteada (puntas de flecha blancas), discontinua o interrumpida (flechas blancas huecas), como se ve en la vasculatura cerebral de Tg2576. Los resultados son representativos de tres ratones por grupo de tres experimentos separados. La barra de escala representa 20 μ m.

Figura 2: Los ratones Tg2576 envejecidos tienen una expresión de unión estrecha reducida. La expresión de ocludina o ZO-1 se comparó cuantitativamente entre ratones de tipo salvaje y Tg2576 en el neocórtex (A y B) y en el hipocampo (C y D). (A) El porcentaje de vasos sanguíneos cerebrales corticales con patrones de expresión anormales de ZO-1 fue significativamente mayor en los ratones Tg2576 envejecidos en comparación con el tipo salvaje de la misma edad (** $p < 0,001$). La incidencia de la alteración de ZO-1 en la corteza también fue significativamente mayor en ratones Tg2576 envejecidos en comparación con ratones Tg2576 jóvenes (tipo salvaje joven, $n = 4$; Tg2576 joven, $n = 3$; tipo salvaje envejecido, $n = 5$; Tg2576 envejecido, $n = 4$; * $p < 0,05$). (B) Los ratones Tg2576 envejecidos tuvieron niveles de proteína ocludina significativamente reducidos en el córtex en comparación con el tipo salvaje de la misma edad ($n = 7$, ** $p = 0,0072$). (C) El porcentaje de vasos sanguíneos cerebrales del hipocampo con patrones anormales de expresión de ZO-1 fue significativamente mayor en los ratones Tg2576 envejecidos en comparación con los de tipo salvaje (** $p < 0,001$). De manera similar, la incidencia de la alteración de ZO-1 en el hipocampo también fue significativamente mayor en ratones Tg2576 envejecidos en comparación con los Tg2576 jóvenes (tipo salvaje joven, $n = 4$; Tg2576 joven, $n = 3$; tipo salvaje envejecido, $n = 5$; Tg2576 envejecido $n = 4$; * $p < 0,05$). (D) Los ratones Tg2576 envejecidos tuvieron niveles de proteína ocludina significativamente reducidos en el hipocampo en comparación con los de tipo salvaje de la misma edad ($n = 7$, ** $p = 0,0076$). Los valores representan la media \pm SEM.

Figura 3: la angiogénesis no apoptótica induce alteraciones en la inmunorreactividad de la unión estrecha en ratones Tg2576. Esta figura presenta micrografías confocales representativas de las TJ (ZO-1), teñidas doblemente para marcadores de angiogénesis o apoptosis en ratones Tg2576 de tipo salvaje y envejecidos. Todos los vasos se tiñeron para CD105 independientemente del patrón de expresión de TJ. Las puntas de flecha blancas señalan a regiones de anomalía de TJ en la vasculatura. Tinción doble de los vasos sanguíneos con ZO-1 (rojo) y CD105 (verde) en el tipo salvaje (a) y Tg2576 (b) neocórtex. Tinción doble de los vasos con ZO-1 (rojo) y caspasa 3 (verde)

en el tipo salvaje (c) y Tg2576 (d) neocórtex. La tinción con caspasa-3 no se colocaliza con la tinción con ZO-1, lo que indica una ausencia de apoptosis en la vasculatura. E y F) Análisis mediante electrotransferencia de CD105 y caspasa 3. Los resultados son representativos de tres experimentos separados de tres ratones por grupo de tejidos cerebrales examinados. La barra de escala representa 20 μ m.

5
 10
 15
 20

Figura 4: La densidad microvascular es mayor en los Tg2576 envejecidos y en pacientes humanos con AD. Se cuantificó la MVD y la expresión proteica en ratones Tg2576 envejecidos y de tipo salvaje envejecidos y jóvenes, mediante tinción con CD105, en la vasculatura cerebral. (A) Los ratones Tg2576 envejecidos tuvieron una MVD significativamente mayor en comparación con los de tipo salvaje (** $p < 0,001$). Los Tg2576 envejecidos tuvieron un MVD significativamente mayor en comparación con los Tg2576 jóvenes (tipo salvaje envejecido, $n = 5$; Tg2576 envejecido, $n = 4$; tipo salvaje joven, $n = 4$; Tg2576 joven, $n = 3$; * $p < 0,05$). Aunque no es significativo, los ratones Tg2576 jóvenes mostraron una tendencia a una MVD promedio más alto en comparación con los de tipo salvaje. (B) Los ratones Tg2576 envejecidos tuvieron unos niveles de proteína CD105 significativamente mayores en la corteza en comparación con los de la misma edad del tipo salvaje (tipo salvaje, $n = 5$; Tg2576, $n = 6$; ** $p < 0,001$). (C) Los ratones Tg2576 envejecidos tuvieron unos niveles de proteína CD105 significativamente mayores en el hipocampo en comparación con los de la misma edad del tipo salvaje ($n = 7$, * $p < 0,05$). (D) La corteza del paciente con AD tenía una MVD significativamente mayor, medida por el % de área ocupada por tinción de laminina, en comparación con el paciente ND ($n = 4$, * $p < 0,05$). (E) El hipocampo del paciente con AD tenía una MVD significativamente mayor, medida por el % de área ocupada por tinción con laminina, en comparación con el paciente ND ($n = 4$, ** $p < 0,001$). Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica para laminina en la corteza del paciente ND (F) y el paciente con AD (G). La barra de escala representa 95 μ m. Los valores representan la media \pm SEM.

25
 30
 35

Figura 5: los ratones Tg2576 inmunizados con abeta y PBS exhiben una expresión de TJ normal y anormal según lo evaluado por microscopía confocal. Micrografías confocales representativas de los vasos sanguíneos cerebrales de ratones Tg2576 inmunizados (previamente o terapéuticamente) con abeta inmunoetiquetados para ocludina o ZO-1 (rojo) y contrateñidos con TOTO-3 para ADN (azul). La expresión normal de unión estrecha tenía ocludina marcada, continua y lineal o expresión de ZO-1 en los vasos sanguíneos. (a) Expresión de ocludina normal en los microvasos del hipocampo de un ratón Tg2576 inmunizado terapéuticamente con abeta. (b) Expresión normal de ZO-1 en los microvasos de la corteza de un ratón Tg2576 inmunizado preventivamente con abeta. La expresión anormal de la unión estrecha en los vasos sanguíneos de la corteza y el hipocampo mostró una morfología débil, punteada y discontinua (puntas de flecha blancas). (c) Expresión anormal de ZO-1 en la corteza de un ratón Tg2576 inmunizado terapéuticamente. (d) Expresión anormal de ocludina en el hipocampo de un ratón Tg2576 inmunizado preventivamente. (e) Sección transversal de vasos grandes que muestran una expresión anormal de ocludina en un ratón Tg2576 inmunizado terapéuticamente. (f) Sección transversal de vasos grandes que muestran una expresión anormal de ZO-1 en un ratón Tg2576 inmunizado preventivamente. Los resultados son representativos de tres ratones por grupo de tres experimentos separados. La barra de escala representa 20 μ m.

40
 45
 50

Figura 6: los ratones Tg2576 inmunizados de forma preventiva durante un año con abeta tuvieron una reducción de las anomalías de unión estrecha en comparación con los controles inmunizados con PBS. Se comparó cuantitativamente la incidencia de la anomalía de TJ en la corteza (a) e hipocampo (b) de ratones Tg2576 (Tg / +) y ratones de tipo salvaje (+/+) inmunizados preventivamente con PBS o abeta. Las gráficas representan el porcentaje de vasos sanguíneos que expresan la anomalía de TJ, mediante los patrones de expresión de ZO-1. En la corteza (a) los ratones Tg/+ inmunizados con PBS tuvieron una mayor incidencia de alteraciones de TJ en comparación con los PBS +/+ (** $p = 0,0080$). La incidencia de alteración de TJ también fue significativamente mayor en los PBS Tg/+ en comparación con ratones Tg/+ inmunizados con abeta (* $p = 0,0188$). En el hipocampo (b) los ratones Tg/+ inmunizados con PBS tuvieron una incidencia significativamente mayor de alteraciones TJ en comparación con los PBS +/+ (**** $p = 0,0006$). La incidencia de alteración de TJ también fue significativamente mayor en los ratones PBS Tg/+ en comparación con ratones Tg/+ inmunizados con abeta (** $p = 0,0009$). Los valores representan la media \pm SEM. PBS +/+, $n = 3$; PBS Tg/+, $n = 4$; abeta +/+, $n = 3$; abeta Tg/+, $n = 3$.

55
 60
 65

Figura 7: los ratones Tg2576 inmunizados terapéuticamente durante cuatro meses con abeta tuvieron anomalías de unión estrecha reducidas en comparación con los controles inmunizados con PBS. Se comparó cuantitativamente la incidencia de la anomalía de TJ en la corteza (a) y del hipocampo (b) de ratones Tg2576 (Tg/+) y de tipo salvaje (+/+) inmunizados terapéuticamente con PBS o abeta. Las gráficas representan el porcentaje de vasos sanguíneos que expresan la anomalía TJ, mediante los patrones de expresión de ZO-1. En la corteza (a), los Tg/+ inmunizados con PBS tuvieron una incidencia de alteraciones de TJ significativamente mayor en comparación con los +/+ inmunizados con PBS (** $p = 0,0046$). La incidencia de alteración de TJ también fue significativamente mayor en los Tg/+ inmunizados con PBS en comparación con los ratos Tg/+ inmunizados con abeta (* $p = 0,0028$). En el hipocampo (b), los Tg/+ inmunizados con PBS tuvieron una incidencia significativamente mayor de alteraciones de TJ en comparación con los +/+ inmunizados con PBS (**** $p = 0,0115$). La incidencia de alteración de TJ también fue significativamente mayor en los Tg/+ inmunizados con PBS en comparación con los ratones Tg/+ inmunizados con abeta (** $p = 0,0083$). PBS +/+, $n = 4$; PBS Tg/+, $n = 3$; abeta +/+, $n = 4$; abeta Tg/+, $n = 5$. Los valores representan la media \pm SEM.

Figura 8: Los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tienen una pérdida vascular generalizada. Micrografías confocales representativas de los vasos sanguíneos cerebrales de ratones Tg2576 inmunizados preventivamente con abeta inmunoetiquetados para ZO-1 (rojo), albúmina de ratón (mAlb, verde) o abeta (verde). (a) Los microvasos tuvieron típicamente una expresión normal de ZO-1 y no mostraron pérdidas de albúmina. Las flechas blancas señalan a dos microvasos normales y separados que expresan ZO-1. La pérdida de albúmina se asoció típicamente con vasos más grandes (b), que mostraron anomalías de TJ. La filtración (punta de flecha blanca) se representó como un gradiente difuso similar a la tinción que emana lejos de los vasos. (c) Un vaso grande con expresión anormal de la TJ (flechas blancas huecas) que contiene deposición vascular de abeta. Los resultados son representativos de tres ratones por grupo de tres experimentos separados. La barra de escala representa 20 μm .

Figura 9: los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tienen una tinción de caspasa-3 activada reducida. Micrografías confocales representativas (tomadas a 20x) representan la tinción de caspasa-3 activada (casp3, verde) los TJ con ocludina (oclu, rojo). (a) Tinción de caspasa-3 activada en la corteza de los ratones Tg2576 inmunizados con PBS alrededor de halos de TJ. (b) Tinción de caspasa-3 activada en el hipocampo de un ratón de tipo salvaje inmunizado preventivamente con abeta. Las estructuras de tipo filamentosas que probablemente corresponden a las neuronas se pueden ver en verde. No se observaron superposiciones ni tinciones conjuntas con los vasos sanguíneos marcados con ocludina o ZO-1. (c) Tinción con caspasa-3 activada en la corteza de un ratón Tg2576 inmunizado terapéuticamente con abeta. La tinción limitada de caspasa-3 se puede ver en esta región del cerebro. Los resultados son representativos de tres ratones por grupo de tres experimentos separados. La barra de escala representa 20 μm .

Figura 10: los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tienen una densidad microvascular reducida en comparación con los controles. La MVD en la vasculatura cerebral de ratones Tg2576 (Tg/+) inmunizados preventivamente y terapéuticamente con PBS y de ratones de tipo salvaje (+/+) se cuantificó mediante tinción con CD105. (a) Los Tg/+ inmunizados preventivamente con PBS tuvieron un aumento significativo de la MVD en comparación con los ratones +/+ inmunizados con PBS (* $p < 0,0001$, prueba t). Los Tg/+ inmunizados con abeta tuvieron una MVD significativamente reducida en comparación con los Tg/+ inmunizados con PBS (** $p < 0,0001$, prueba t). PBS +/+, $n = 4$; PBS Tg/+, $n = 4$; abeta +/+, $n = 4$; abeta Tg/+, $n = 4$. (b) Los Tg/+ inmunizados terapéuticamente con PBS tuvieron un aumento significativo de la MVD en comparación con los +/+ inmunizados con PBS (***) $p = 0,0001$, prueba t). Los Tg/+ inmunizados con abeta tuvieron una MVD significativamente reducida en comparación con los Tg/+ inmunizados con PBS (**** $p < 0,0001$, prueba t). PBS +/+, $n = 5$; PBS Tg/+, $n = 4$; abeta +/+, $n = 4$; abeta Tg/+, $n = 3$. Los valores representan la media \pm SEM.

Figura 11: los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tienen una morfología de TJ normal. Imágenes representativas de la vasculatura cerebral de ratones +/+ y ratones Tg/+ inmunizados (preventivamente y terapéuticamente) con abeta o PBS inmunoetiquetados para ZO-1 (rojo) y contrateñidos para ADN (azul). La expresión normal de ZO-1 tuvo patrones de tinción marcados, continuos y lineales como se ve en los +/+, PBS (A y B), +/+, A β (C y D) y Tg/+, A β (G y H). La ZO-1 normal en vasos de sección transversal (H) produjo líneas casi paralelas. Los patrones de tinción anormales de ZO-1 aparecieron punteados, interrumpidos o discontinuos (puntas de flecha blancas) como se ve en los vasos pequeños de los Tg/+, PBS (E y F) y los vasos más grandes de los Tg/+, A β (I y J). La barra de escala representa 20 μm .

Figura 12: los ratones Tg2576 inmunizados con A β tuvieron anomalías de unión estrecha reducidas. El porcentaje de vasos sanguíneos con patrones de expresión anormales de ZO-1 aumentó significativamente en los Tg/+, PBS en comparación con los ratones inmunizados con PBS Tg/+, A β y +/+. Estos hallazgos se mantuvieron entre las estrategias de inmunización preventivas (a y b) y terapéuticas (c y d), y las regiones del cerebro, (a y c) corteza o (b y d) hipocampo. En la estrategia preventiva: +/+, PBS, $n = 3$; Tg/+, PBS, $n = 4$; A β , +/+, $n = 3$; Tg/+, A β , $n = 3$. En la estrategia terapéutica: +/+, PBS, $n = 4$; Tg/+, PBS, $n = 3$; +/+, A β , $n = 4$; Tg/+, A β , $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 13: Los ratones Tg2576 inmunizados con A β tienen una densidad microvascular reducida. Imágenes representativas de la tinción ubicua de CD105 (verde) de la vasculatura cerebral independientemente de (a) la ausencia o (b) presencia (puntas de flecha blancas) de anomalías de ZO-1 (rojo). La barra de escala representa 20 μm . Se observó un aumento significativo de MVD en los Tg/+, PBS en comparación con los ratones Tg/+, A β y +/+ inmunizados con PBS. Estos hallazgos se mantuvieron entre las estrategias de inmunización (c) preventiva ($n = 4$ para todos los grupos) y (d) terapéutica (+/+, PBS, $n = 4$; Tg/+, PBS, $n = 3$; +/+, A β , $n = 4$; Tg/+, A β , $n = 4$). La relación de peso promedio entre el cerebro y el cuerpo en ratones inmunizados (e) inmunizados preventivamente (+/+, PBS, $n = 5$; Tg/+, PBS, $n = 4$; +/+, A β , $n = 5$; Tg/+, A β , $n = 3$) o (f) inmunizados terapéuticamente (+/+, PBS, $n = 4$; Tg/+, PBS, $n = 4$; +/+, A β , $n = 5$; Tg/+, A β , $n = 5$) no alcanzó significación. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Figura 14: la precipitación de A β en ratones Tg2576 inmunizados está alterada. Imágenes representativas muestran una reducción general de los depósitos de A β (verde) en Tg/+ (b y d), en comparación con A β (a y c), ratones Tg/+ inmunizados con PBS, ya sea (a y b) terapéuticamente o (c y d) preventivamente.

Descripción detallada de la invención

La integridad reducida de la BBB precede a otras patologías de la enfermedad de Alzheimer como las placas amiloides y, por lo tanto, mantener o restablecer la integridad de la BBB puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer. La presente invención se refiere al hallazgo, descrito en el presente documento, de que esta integridad reducida de la BBB se debe a la angiogénesis en el cerebro. En particular, la angiogénesis en el cerebro da como resultado la interrupción de las uniones estrechas que mantienen la BBB. La inhibición de la angiogénesis permite la restauración de las uniones estrechas, lo que a su vez disminuirá la "filtración" de la BBB. Además, se ha demostrado que la vacunación con péptido abeta produce reversión vascular y restauración de las uniones estrechas.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar y/o retrasar la aparición de patologías de la enfermedad de Alzheimer mediante la inhibición de la angiogénesis en el cerebro. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para mantener y/o restaurar la integridad de la BBB en una persona mediante la inhibición de la angiogénesis en el cerebro y/o la restauración de las uniones estrechas en los vasos cerebrales. En ciertas realizaciones, estos métodos comprenden administrar uno o más agentes antiangiogénicos; uno o más agentes que promueven la eliminación del péptido abeta del cerebro; uno o más agentes que inhiben la amiloidogénesis; uno o más agentes que restauran las uniones estrechas en los vasos cerebrales; o combinaciones de los mismos. Algunas realizaciones proporcionan métodos para promover la reversión vascular en el cerebro de un sujeto con enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un péptido abeta solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, uno o más agentes antiangiogénicos.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para identificar agentes para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprenden probar la capacidad de un agente candidato para inhibir la angiogénesis en el cerebro; mantener o restaurar la integridad de la BBB y/o restaurar las uniones estrechas en los vasos sanguíneos cerebrales.

Ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan métodos de diagnóstico para identificar sujetos con riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, o de tener un estadio temprano de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dichos métodos detección de angiogénesis en el cerebro, alteración de la unión estrecha (TJ) y/o alteración de la barrera hematoencefálica en el cerebro de un sujeto.

Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia al cual pertenece la presente invención.

Los términos "terapia" y "tratamiento", como se usan indistintamente en este documento, se refieren a una intervención realizada con la intención de mejorar el estado de un sujeto. La mejora puede ser subjetiva u objetiva y está relacionada con mitigar los síntomas asociados, la prevención del desarrollo o alteración de la patología de una enfermedad que se está tratando. Por lo tanto, los términos terapia y tratamiento se usan en el sentido más amplio, e incluyen la prevención (profilaxis), moderación, reducción y curación de una enfermedad en varias etapas. El término también engloba la prevención del deterioro del estado de un sujeto. Los sujetos que necesitan terapia/tratamiento incluyen a aquellos que ya tienen la enfermedad, así como aquellos propensos o en riesgo de desarrollar la enfermedad y aquellos en quienes se debe prevenir la enfermedad.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, tal como un mamífero o un humano, que necesite tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de aproximadamente +/-10% de un valor dado. Debe entenderse que dicha variación siempre se incluye en cualquier valor dado que se proporciona en este documento, aunque no se haga referencia específicamente.

MÉTODOS TERAPÉUTICOS

Un aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer mediante el uso de agentes antiangiogénicos y/o agentes que previenen la amiloidogénesis abeta y/o promueven la eliminación del péptido abeta solo o en combinación con agentes terapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer manteniendo y/o restaurando la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) y/o restaurando la integridad de la unión estrecha (TJ) mediante el uso de agentes antiangiogénicos y/o de agentes capaces de restaurar la integridad de la TJ y/o agentes que previenen la amiloidogénesis y/o promueven la eliminación del péptido abeta. De acuerdo con la presente invención, tales agentes incluyen fármacos tradicionales de moléculas pequeñas, así como productos biológicos, tales como moléculas de ácido nucleico, vectores recombinantes, inhibidores de oligonucleótidos (aptámeros, antisentido y ARNip), péptidos, proteínas, anticuerpos y similares.

Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de HDAC, ácido valproico; quimioquinas antiangiogénicas (como IP-10, PF-4 y MIP), cetuximab, panitumumab, inhibidores de la ruta de

PI3K/AKT/mTOR, inhibidores de la MAPK-farnesiltransferasa Rho y Ras, erlotinib, bezaroteno, pazopanib (Votrient®); everolimus (Afinitor®); bevacizumab (Avastin®), imatinib, sorafenib, inhibidores de receptores de la tirosina quinasa, 2 metoxiestradiol, sunitinib, leflunomida (SU101), midostaurina (PKC412), vatalinib (PTK787/ZK222584), AG013736, AZD2171, CP547,632, CP673,451, RPI.4610, VEGF Trap, ZD6474, YM359445, SU5416, temsirolimus (Torisel®),

5 batimastat, marimastat, neovastat, prinomastat, carboxiamidotriazol, fumagilina, TIMPs, TNP-470, CM101, IFN- α , IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, trombospondina, angiostatina, endostatina, talidomida, tetratiomolibdato, tecogalan, razoxano; isthmin; el inhibidor doble del receptor Met/VEGF E7050 de la quinasa 2; clorhidrato de licorina y resveratrol.

10 Los ejemplos de péptidos que inhiben la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, péptidos SPARC; péptidos derivados de proteínas de la matriz extracelular (como Cilengitide (EMD 121974); RGD dirigido; ATN-161; Péptido de tumstamina; Fragmento de tumstamina; Pentostatina-1; Péptido de endostatina; Fragmento de endostatina IV, IVox; Fragmento I del péptido de la endostatina (180-199); C16Y; C16S); péptidos derivados de factores de crecimiento o sus receptores (como el péptido D derivado de VEGF β (LPR) o KSVRGKGGKQKRKRKKSRYK; péptido Ac-ARPCA

15 derivado de FGF; P144 TSLDASIIWAMMQNN); péptidos derivados de proteínas involucradas en la cascada de coagulación (como B9870; derivado de HPRG ((HHPHG)₄); A-779; KV11; KPSSPPE; ARPAKAAATQK KVERKAPDA)) derivado de fibrinógeno; péptidos derivados de quimiocinas (tales como derivados de PF4 (NGRKISLDLAPLYKKIIEKLLLES); Quemoquinostatina-1; Anginex); Péptidos derivados de las proteínas que contienen el dominio TSP1 (tales como DITSPa; ABT-510; ABT-526; Properdistatina); Péptidos derivados de las

20 proteínas serpinas (como el fragmento PEDF-TGA; fragmento PEDF 34-mer PEDF P18; SvOrth-2); pTnl; RC3940-II; PAMP12-20; IM862; A β ; Tetrastatina-1 (LPVFSTLFPAYCNIHQVCHY); Tetrastatina-3 (AAPFLECQGRQGTCHFFAN); Pentostatina-3 (SAPFIECHGRGTCNYYANS); Trombostatina con-3 (SPWSPCSGNCSTGKQQRTR); Quemoquinostatina-7 (DGRKICLDPDAPRIKKIVQKKL); Quemoquinostatina-8 (DGRELCLDPKENWVQRVVEKFLK); Semastatina-5A.1 (GPWERCTAQC GGGIQRARR); Semastatina-5B (TSWSPCSASC GGGHYQRTR); Properdistatina

25 (GPWEPCSVTCSKGRTRRRR); Escospondistatina (GPWEDCSVSCGGGEQLRSR); Quemoquinostatina-1 (NGRKACLNPASPIVKIIEKMLNS); Quemoquinostatina-3 (NGKKAACLNPASPMVQKIIEKIL); Quemoquinostatina-5 (NGKEICLDPEAPFLKKVIQKILD); Quemoquinostatina-6 (NGKQVCLDPEAPFLKKVIQKILDS); Semastatina-5A.2 (SPWTKCSATCGGGHYMRTR); Nefroblastostatina (TEWTACSKSCGMGFSTRV); Wispostatina-1 (SPWSPCSTSCGLGVSTRI); Trombostatina con-1 (QPWSQCSATCGDGVRRRR); Netrinostatina-5C (TEWSVCNSRCGRGYQKRTR); Trombostatina con-6, Cys4 cíclica y Cys8 (WTRCSSSCGRGVSVRSR); Wispostatina-2 (TAWGPCSTTCGLGMATRV); Wispostatina-3 (TKWTPCSRTC GGMGISNRV); Papilostatina-1 (GPWAPSASC GGGQSRS); Papilostatina-2 (SQWSPCSRTC GGGVSRFRER); Hexastatina-2 (YCNINEVCHYARRNDKSYWL); Espondinostatina-1 (SEWSDCSVT CGKGMRTQR); Connectostatin (TEWSACSKTC GGMGISTRV); Crostatina (TSWSQCSKTC GGTGISTRV); Netrinostatina5D (TEWSACNVRCGRGWQKRSR); Fibulostatina-6.1 (SAWRACSVTC GKGKIQKRSR); Fibulostatina-6.2 (ASWSACSVSCGGGARQTR); Fibulostatina-6.3 (QPWGTCESECGKGTQRAR); Cartilostatina-1 (SPWSKCSAACGQTGVQTRTR); Cartilostatina-2 (GPWGPCSGSCGPGRRLRRR); Adamtsostatina-4 (GPWGDCSRTC GGGVQFSSR); Adamtsostatina-16 (SPWSQCTASC GGGVQTR); Adamtsostatina-18 (SKWSECSRTC GGGVKFQER); derivado de la Adamtsostatina-4 (SPWSQCSVRCGRGQRSRQVR); Complestatina-C6 (TQWTSCSKTCNSGTQSRHR); Tetrastatina-2 (YCNHQVCHYAQRNDRSYWL); Hexastatina-3 (LPRFSTMPFIYC NINEVCHY); (para revisión; véase Rosca et al. Curr Pharm Biotechnol. 2011 August 1; 12(8): 1101-1116).

45 Ciertas realizaciones proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente que inhibe VEGF, FGF, un receptor de FGF, EGF, un receptor de EGF, TGF β (incluyendo pero no limitado a TGF β 1), un receptor de VEGF, PDGF, un receptor de PDGF, sintasa de óxido nítrico, interleucina-6, interleucina-8, interleucina-1 β , MMPs, TNF α o angiopoyetina-2. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, bevacizumab (Avastin®), imatinib, sorafenib, sunitinib, leflunomida (SU101), midostaurina (PKC412), vatalinib (PTK787/ZK222584), AG013736, AZD2171, CP547,632, CP673,451, RPI.4610, VEGF Trap, ZD6474, YM359445, infliximab y resveratrol. Ciertas realizaciones proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente que estimula la actividad de la γ -secretasa y/o estimula la expresión de los genes diana Notch.

55 También se contempla la inhibición de la expresión de moléculas angiogénicas mediante métodos genéticos, incluido el uso de ARNs o tecnologías antisentido. También se contempla, la inhibición de la actividad de las moléculas angiogénicas usando péptidos, anticuerpos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla expresados por un vector.

60 Algunas realizaciones proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente que inhibe a la neuropilina-1 o a la nestina, y se ha demostrado que ambas desempeñan un papel en la angiogénesis. Se sabe que la neuropilina-1 soluble, por ejemplo, disminuye la angiogénesis.

65 Como se demuestra en este documento, la eliminación del péptido abeta de la microvasculatura cerebral da como resultado la reversión vascular y la restauración de las TJ. Por consiguiente, en una realización, los métodos para promover la reversión vascular comprenden administrar un agente que elimina el péptido abeta, por ejemplo, un anticuerpo u otro compuesto que se una de forma selectiva al abeta, o el abeta por si mismo. Algunas realizaciones de la invención proporcionan métodos para estimular la producción de un anticuerpo endógeno para el péptido abeta.

Algunas realizaciones proporcionan métodos para promover la reversión vascular en el cerebro de un sujeto con enfermedad de Alzheimer o con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un péptido abeta solo o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente antiangiogénico.

5 Se sabe que la alteración de la BBB precede a otras patologías en la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos para retrasar el inicio o prevenir una o más patologías asociadas con la enfermedad de Alzheimer mediante el restablecimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica en un paciente a través de la administración de agentes antiangiogénicos o agentes que restauran las uniones estrechas en vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para modificar el efecto de la enfermedad mediante la administración de tales agentes.

15 En la materia se conocen ciertos agentes que intervienen en la restauración de la BBB y/o en la integridad de la TJ. Algunas realizaciones de la invención proporcionan métodos terapéuticos que incluyen el uso de estos agentes. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, briostatina-1, butirato de sodio, resveratrol, quercetina, decursina y clusterina. También se ha demostrado que los glucocorticosteroides restauran la integridad de la BBB (Marchi, et al., 2011, Cardiovascular Psychiatry and Neurology, Vol. 201, Article ID 482415).

20 La alteración de la BBB y de las TJ en la enfermedad de Alzheimer se muestra paralela a la alteración de la barrera hemato-retiniana (BRB) que se produce en la degeneración macular húmeda. Por consiguiente, una realización de la invención proporciona el uso de agentes utilizados en, o en desarrollo, para el tratamiento de la degeneración macular húmeda para tratar la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, por ejemplo, inhibidores de VEGF y antioxidantes. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, Ranibizumab (Lucentis®), bevacizumab (Avastin®), Pegaptanib (Macugen®), VEGF Trap, Bevasiranib, Pazopanib (Votrient™), RTP801 i-14//PF-655, AGN-745/SIRNA-02, Fenretinida, iSONEP™ y Evizon™.

25 Se sabe que en la esclerosis múltiple (EM) se produce una alteración de la barrera hematoencefálica y de las uniones estrechas, y se han desarrollado varios agentes para el tratamiento de la EM que mejoran la integridad de la BBB. Por consiguiente, una realización de la invención proporciona el uso de agentes usados en, o en desarrollo, para el tratamiento de la EM para tratar la enfermedad de Alzheimer. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los interferones de tipo beta, como el interferón beta-1a (por ejemplo, Avonex®, Rebif®, CinnoVex®) y el interferón beta-1b (por ejemplo, Betaferon®, Betaseron®, Extavia®, Ziferon®). En ciertas realizaciones, el uso de otros tratamientos para la EM, como el acetato de glatiramer (Copaxone®), natalizumab (Tysabri®) y/o fingolimod (Gilenya®), también se contempla en los métodos terapéuticos de la invención, aunque los efectos de estos compuestos en la integridad de la BBB están menos documentados.

35 El uso de combinaciones de agentes antiangiogénicos también se contempla en ciertas realizaciones de la invención, al igual que combinaciones de agentes antiangiogénicos con otras modalidades de tratamiento, tales como glucocorticosteroides, antioxidantes, antiinflamatorios, inmunoterapias y similares. Algunas realizaciones de la invención proporcionan el uso de una combinación de agentes antiangiogénicos con inmunización con péptido abeta.

40 En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto no tiene factores de riesgo conocidos asociados con la enfermedad de Alzheimer o no se ha identificado que tenga un factor de riesgo asociado con la enfermedad de Alzheimer. En otras realizaciones, se ha identificado al paciente o al sujeto por tener uno o más factores de riesgo asociados con la enfermedad de Alzheimer. Estos factores de riesgo incluyen, entre otros, el estilo de vida sedentario, aterosclerosis, diabetes, degeneración macular de húmeda, derrame, hipercolesterolemia, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad vascular cerebral, hipertensión, presión arterial baja, conmoción cerebral, cirugía, quimioterapia, exposición a anestesia, trastorno o síndrome metabólico, síndrome de Down, cataratas, pérdida del olfato y del gusto, cambios en el andar, cambios en el rendimiento cognitivo/memoria y en el volumen cerebral determinado por MRI (menor tamaño o cambio en el tamaño).

50 *MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO*

Un aspecto de la divulgación proporciona métodos de diagnóstico para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, o de tener una enfermedad de Alzheimer en un estadio temprano, que comprenden detectar la angiogénesis, la alteración de las TJ y/o la alteración de la BBB en el cerebro de un sujeto. La angiogénesis, la alteración de las TJ y/o la alteración de BBB se pueden detectar, por ejemplo, mediante el análisis de una muestra biológica de un sujeto para un biomarcador indicativo de angiogénesis, alteración de las TJ y/o alteración de la BBB, o mediante el análisis de la neoangiogénesis, la alteración de las TJ y/o la alteración de la BBB utilizando técnicas de diagnóstico por imágenes que se conocen en la materia.

60 En el contexto de la presente invención, una muestra biológica es una muestra que incluye un material biológico. Ejemplos no limitativos específicos incluyen sangre, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo. Las muestras biológicas también incluyen biopsias, por ejemplo, tejido cerebral.

65 Los ejemplos de biomarcadores que podrían usarse para detectar la angiogénesis incluyen, por ejemplo, factores angiogénicos circulantes, tales como VEGF, FGF-2, MMP-9, IL-8, IL-6 y HGF; moléculas derivadas de células

endoteliales, tales como sVEGFR1, sVEGFR2, sVEGFR3, sTie-2 y VCAM-1; y otras proteínas o péptidos circulantes, tales como endostatina y tumstatina.

5 Los ejemplos de biomarcadores que podrían usarse para detectar la alteración de las TJ incluyen, por ejemplo, IL-8, cingulina, ZO-1, ZO-2, ocludina, claudina-6, Lfc y E-cadherinas, incluidas formas solubles o fragmentos de estas proteínas.

10 Los biomarcadores que pueden detectarse en la sangre como un indicador de la alteración de la BBB son generalmente proteínas que normalmente se encuentran en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Los ejemplos de dichos biomarcadores incluyen, por ejemplo, transtiretina (véase Marchi, et al., 2003, J. Neuroscience, 23(5): 1949-1955), S-100 β y molécula de adhesión de unión soluble-3 (sJAM-3) (véase Zrabquer, et al., 2010, J. Immunol., 185(3):1777-1785).

15 Los métodos para detectar dichos biomarcadores en una muestra a nivel de proteína o ADN/ARN se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, electrotransferencia, proteómica, varias técnicas basadas en PCR y diversas tecnologías de chips (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1994 & updates) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York, NY, and Current Protocols in Protein Science, ed. Coligan, J.E., et al., Wiley & Sons, New York, NY).

20 Las técnicas de diagnóstico por imagen adecuadas generalmente implican la administración (por ejemplo, por inyección intravenosa o intratecal) de un agente de contraste o marcador que acentúa las estructuras vasculares. Las imágenes se adquieren antes y en un intervalo de tiempo apropiado o intervalos después de la administración del agente de contraste utilizando el método de imagen seleccionado, por ejemplo, imagen de resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada (TC) o ecografía. Los ejemplos de
25 agentes de contraste y trazadores incluyen, pero no se limitan a, trazadores de quelatos de gadolinio, trazadores basados en yodo, trazadores H₂¹⁵O y microburbujas, así como trazadores acoplados a un anticuerpo monoclonal o péptido contra una objetivo vascular.

30 En una realización de la invención también se proporcionan métodos para monitorizar la eficacia de un tratamiento dado. La eficacia se puede evaluar, por ejemplo, tomando muestras de un sujeto antes del tratamiento y en diversos momentos después del tratamiento y analizando las muestras en busca de un biomarcador indicativo de angiogénesis, alteración de TJ y/o alteración de la BBB, como se describe anteriormente, con el fin de evaluar el efecto del tratamiento en la angiogénesis, la alteración de TJ y/o la alteración de la BBB. El sujeto puede someterse de forma alternativa, a técnicas de diagnóstico por imagen para analizar la angiogénesis, la alteración de la TJ y/o la alteración de la barrera
35 hematoencefálica, como se describió anteriormente, antes del tratamiento y en varios momentos después del tratamiento para evaluar el efecto del tratamiento en cuanto a angiogénesis, alteración de TJ y/o alteración de la barrera hematoencefálica.

MÉTODOS DE DETECCIÓN

40 Un aspecto de la divulgación proporciona métodos para identificar agentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer probando la capacidad de un agente candidato para restablecer las uniones estrechas en los vasos sanguíneos cerebrales y/o promover la reversión vascular. En algunas realizaciones, los métodos se emplean para distinguir agentes antiangiogénicos conocidos de aquellos capaces de restaurar las uniones estrechas en los vasos
45 sanguíneos cerebrales y/o promover la reversión vascular.

Los métodos de selección se pueden llevar a cabo *in vitro* en un cultivo celular apropiado o *in vivo* en un modelo animal apropiado.

50 Para pruebas *in vitro*, un cultivo de una línea celular apropiada, tales como, células endoteliales capilares cerebrales, línea celular endotelial inmortalizada de cerebro humano HCMEC/D3, vena umbilical humana (HUVEC), línea celular endotelial microvascular humana inmortalizada HMEC-1, la cual puede proporcionar un modelo funcional *in vitro* de la BBB, puede tratarse con un agente que altera las TJ, por ejemplo, el suero o factores derivados del suero (como el ácido lisofosfatídico (LPA) y VEGF), IL-2 o interferón gamma. El cultivo se pone en contacto posteriormente con el agente candidato y se mide el alcance de la restauración de la TJ después de un intervalo o intervalos de tiempo apropiados. La restauración de la TJ se puede evaluar, por ejemplo, mediante métodos inmunohistoquímicos para
55 determinar la localización de proteínas TJ tales como ZO-1, ocludina y claudinas, mediante inspección visual bajo un microscopio o mediante resistencia eléctrica transendotelial (TER).

60 Para pruebas *in vivo* se usa un modelo animal apropiado. En la materia se conocen varios modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease, Ed. G. Casadesus, 2011, IOS Press, Inc., Fairfax, VA). Los ejemplos de modelos de ratón adecuados incluyen el modelo de ratón Tg2576 descrito en los ejemplos proporcionados en el presente documento, así como Briwt-Abeta1-42A, PDAPP, APP-London, APP^{NLh/NLh}, C3-3, R.1.40, APP23, Tg-CRDN8, APPDutch, Tg-SweD1, Tg-ArcSwe, APParc, PSAPP, 3xTg-AD, 5x
65 FAD, APP/PS1 K1 and TBA2.

En general, para pruebas *in vivo*, los animales de prueba se dividen en grupos, que incluyen un grupo de prueba y un grupo control, que no recibe el agente candidato. Si se desea, se puede incluir un grupo de control positivo que recibe un agente conocido para restaurar la integridad de las TJ. El agente candidato se administra al grupo de prueba y los animales se examinan regularmente, por ejemplo, para verificar cualquier cambio manifestado externamente como resultado del tratamiento. Después de un período de tiempo apropiado, los animales se sacrifican y se evalúa la integridad de las TJ en los vasos sanguíneos cerebrales mediante técnicas estándar. Por ejemplo, se pueden usar métodos inmunohistoquímicos para determinar la localización de proteínas TJ como ZO-1, ocludina y claudinas, o se pueden inspeccionar visualmente muestras de biopsias bajo un microscopio. También se puede evaluar la medida de la permeabilidad de la BBB al colorante azul de Evans, al igual que el efecto de los agentes candidatos en los biomarcadores para la integridad de la BBB o las TJ, como se describió anteriormente.

En ciertas realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para identificar agentes que pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer probando la capacidad de un agente candidato para inhibir la angiogénesis. Por ejemplo, los agentes pueden analizarse para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de células endoteliales o la formación de tubos capilares. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para identificar agentes que pueden ser útiles para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer probando la capacidad de un agente candidato para inhibir la expresión de genes que codifican proteínas angiogénicas o potencian la expresión de genes que codifican inhibidores de angiogénesis. En la materia se conocen ensayos de genes reporteros que se unen a los promotores de genes de interés para marcar genes (tales como proteínas fluorescentes). En ciertas realizaciones, también se proporcionan métodos para probar la capacidad de un agente candidato para inhibir la angiogénesis. En realizaciones específicas los métodos de análisis, analizan la capacidad de un agente candidato para inhibir la angiogénesis inducida por abeta o amiloide. En la materia se conocen métodos para inhibir la angiogénesis e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de proliferación de células endoteliales, ensayos de formación de tubos capilares, ensayos CAM y ensayos de cavidad corneal.

Para una mejor comprensión de la invención descrita en el presente documento, se exponen los siguientes ejemplos. Se entenderá que estos ejemplos pretenden describir realizaciones ilustrativas de la invención, en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Angiogénesis concurrente y alteración de la unión estrecha de la barrera hematoencefálica en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

Resumen:

El estudio descrito en el Ejemplo 1 se llevó a cabo para caracterizar la integridad vascular cerebral mediante examinación de la expresión de proteínas de unión estrecha (TJ), ocludina y ZO-1, junto con marcadores de apoptosis y angiogénesis en ratones modelo Tg2576 AD que sobreexpresan la proteína precursora amiloide humana (APP) que contiene las mutaciones de cambio de sentido que causan la AD de aparición temprana, encontradas en una familia sueca. En ratones AD envejecidos, un aumento significativo en la incidencia de TJ alteradas, en comparación con compañeros de camada de tipo salvaje y ratones jóvenes de ambos genotipos, se vinculó directamente a un aumento de la densidad microvascular pero no a la apoptosis, lo que apoya fuertemente a la hipervascularidad activada por abeta (péptido beta-amiloide), como la base de la alteración de la BBB. La hipervascularidad en pacientes humanos se corroboró en una comparación de tejidos cerebrales post mortem de pacientes AD y controles. Los resultados aquí descritos demuestran que el abeta media la alteración de la BBB debido a la neoangiogénesis, lo que resulta en la redistribución de las TJ que mantienen la barrera.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la relación entre el abeta y la integridad de la BBB a través de la morfología de las TJ en el ratón Tg2576 AD y encontrar un mecanismo que pueda explicar la alteración de la BBB en la AD. Los resultados de este estudio indican que los ratones Tg2576 tienen una alteración significativa de las TJ, que está directamente relacionada con un aumento de la densidad vascular relacionado con una angiogénesis aumentada.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Ratones

En este estudio se usaron ratones transgénicos Tg2576 (Tg/+). Estos ratones expresan la APP695 humana que contiene las mutaciones de cambio de sentido suecas (K670N/M671L) [Hsiao et al. (1996) Science 274: 99-102], bajo el control del promotor de la proteína priónica de hámster (Taconic). Los ratones se mantuvieron en un entorno mixto C57B16/SJL mediante el apareamiento de machos Tg2576 heterocigotos con hembras C57B16/SJL F1. Los compañeros de camada de tipo salvaje (+/+) se utilizaron como controles. Los ratones envejecidos tenían entre 18 y 24 meses de edad, mientras que los ratones jóvenes tenían cinco meses de edad. Los ratones se alimentaron con comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Clasificación de los tejidos de cerebro humano

Los estándares de referencia tisulares bien caracterizados de los tejidos cerebrales de la corteza medial y del hipocampo se obtuvieron del banco cerebral del laboratorio Kinsmen en la Universidad de Columbia Británica (Vancouver, BC, Canadá). Se utilizaron estándares de referencia de cerebros de no enfermos (ND) y de pacientes con AD. La clasificación de las historias clínicas y patológicas de los pacientes respectivos fue la que se describe en [Jantaratnotai et al. (2010) Curr Alzheimer Res 7: 625-636].

Preparación de los tejidos

Los ratones se anestesiaron de forma terminal con Avertin (0,02 ml/1 g). Los cerebros se extirparon rápidamente, se extrajeron los bulbos olfativos y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4% durante cuatro días a 4 °C. Luego, los cerebros se embebieron en parafina y se seccionaron en serie a 5 µm. La inclusión, el corte y el desparafinado de parafina fueron realizados por Wax-it Histology Services Inc. (Vancouver, BC, Canada). Para la inmunotransferencia, los cerebros se extirparon rápidamente y el hipocampo y el neocórtex se aislaron de ambos hemisferios cerebrales utilizando métodos demostrados por Hagihara *et al.* [Hagihara et al. (2009) J Vis Exp. 33: pii 1543].

Inmunotinción

Las secciones desparafinadas de parafina se sometieron a recuperación antigénica utilizando una olla a presión convencional utilizando Tris 20 mM con tampón EDTA 0,7 mM (pH 9,0) a todo vapor durante 2 minutos. Luego se incubaron los portaobjetos refrigerados en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 25%; BSA al 3%; Triton X-100 al 0,3%, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron anti-ZO-1 de conejo (1:200, Invitrogen), anti-ZO-1 de ratón (1:200, Invitrogen), anti-occludina de conejo (1:200, Invitrogen), anti-caspasa 3 activada de conejo (1:1000, Imgenex) y CD105 anti-humano de ratón (1:20, DAKO). La tinción con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4 °C en tampón de tinción (suero de cabra normal al 10%; BSA al 3%; Triton X-100 al 0,3%). Cuando se tiñó con anticuerpos primarios de cabra se usó suero de burro normal. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron complementarios a las especies del primario conjugado con colorantes Alexa Fluor 488 o 568 (1:500, Invitrogen). La tinción con anticuerpos secundarios se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en tampón de tinción. Se utilizó TOTO-3 (1:10000, Invitrogen) para la contratinción nuclear. Las secciones se lavaron en PBS con Tween-20 al 0,1% (Sigma) tres veces durante 5 minutos cada una entre las etapas de tinción. Las secciones teñidas se cubrieron con un cubreobjetos usando Fluoromount-G (Southern Biotech) y se dejaron secar al aire en la oscuridad durante la noche.

Los tejidos de cerebro humano se tiñeron usando los métodos descritos por [Ujii (2003) et al. Microcirculation 10: 463-470]. Brevemente, las secciones de 30 µm de espesor que flotaban libremente se inmunotiquetaron con un anticuerpo primario anti-laminina (1:100, conejo, Sigma). Luego se trataron las secciones con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (1:1000; DAKO) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubación en el complejo de peroxidasa de rábano picante biotinilado con avidina (1:1000; ABC Elite, Vector Labs). El marcado de la peroxidasa se visualizó mediante incubación en una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB; Sigma) al 0,01%. Cuando se formó un color púrpura oscuro/negro, se lavaron las secciones, se montaron en portaobjetos de vidrio, se secaron al aire y se cubrieron con Entellan (EMD Biosciences).

Análisis confocal y cuantitativo de la morfología de unión estrecha

Las secciones del cerebro se analizaron cada quinta sección a partir de bloques de parafina. Las imágenes, tomadas en un Zeiss LSM510 Meta (Zeiss, Germany), se adquirieron con 16 cortes, se promediaron cuatro veces, a través del plano Z utilizando un objetivo 40x/1,3 de inmersión en aceite Plan-Neoflaur. La imagen compuesta proyectada se importó a Adobe Photoshop a 600 dpi y se optimizó para el contraste y el brillo. El análisis cuantitativo de la morfología de la unión estrecha se analizó de acuerdo con la metodología desarrollada por Plumb et al. [Brain Pathol 12: 154-169]. Los conjuntos de datos confocales representaron aproximadamente 100 vasos sanguíneos cerebrales en la corteza frontal y el hipocampo de ambos compañeros de camada controles Tg2576 jóvenes y envejecidos. Los vasos individuales se calificaron como normales (1) o anormales (0) para la expresión de ZO-1. La expresión normal de ZO-1 se valoró como tinción marcada, continua, intensa y lineal. Por contra, la expresión anormal de ZO-1 se valoró como tinción débil, punteada y/o discontinua. La expresión anormal de ZO-1 en los vasos sanguíneos se comparó con los vasos sanguíneos normales que se encuentran en el control normal o en los vasos normales en los cerebros enfermos. Para minimizar el registro de vasos incompletos u ondulados como anormales debido a los "huecos" observados en la tinción con ZO-1, se buscó evidencia de continuidad del vaso en las imágenes. Por ejemplo, la presencia de núcleos teñidos (con TOTO-3) o remanentes punteados o difusos de ZO-1 se usó para localizar la posición de brechas anormales a lo largo del tracto vascular. La incidencia de alteraciones de la unión estrecha se definió como el porcentaje promedio de vasos sanguíneos en una región dada del cerebro que mostraba una morfología de unión estrecha anormal.

Cuantificación de la densidad de microvasos en tejidos de ratón

La densidad de microvasos (MVD) se cuantificó mediante microscopía confocal utilizando los métodos desarrollados por Guo et al. [Angiogenesis 4: 187-191] con pequeñas modificaciones. Se adquirieron y analizaron imágenes de la

intensidad de fluorescencia óptima, utilizando CD105 como marcador de la vasculatura cerebral angiogénica [Holley et al. (2010) *Neurosci Lett* 470: 65-70], utilizando el software Zeiss LSM510 Meta. Las áreas dentro de la sección del cerebro que contienen alta densidad ("puntos calientes") [Weidner et al. (1991) *N Engl J Med* 324: 1-8] se tiñieron con CD105 y se visualizaron mediante el uso del objetivo 20x/0,45 N-Achroplan utilizando los parámetros de imagenología confocal mencionados anteriormente. El área de fluorescencia total (TFA) en μm^2 se integró sobre el fondo, por el software, para cada punto caliente. Se cuantificó el TFA promedio de cuatro puntos calientes diferentes por ratón. El TFA se usó como una representación numérica de los microvasos totales teñidos por el anticuerpo CD105. La MVD del campo visualizado se expresó como una relación del TFA con respecto al área total de la imagen.

10 Cuantificación de la densidad de microvasos en tejidos humanos

La MVD se cuantificó utilizando el método de puntos calientes, similar a la forma en que se cuantificó la MVD en los ratones. De forma breve, se visualizaron las áreas dentro de una sección del cerebro que contienen alta densidad ("puntos calientes") [Holley (2010) et al. *Neurosci Lett* 470: 65-70] teñidas con laminina mediante un objetivo Olympus LCPlanFL 20x/0,40 en un microscopio de luz Zeiss Axioplan-2 equipado con una cámara DVC (instrumentos de diagnóstico). La cuantificación de la MVD se realizó con ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ v1.44p, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2011). Inicialmente se determinó un nivel umbral para el fondo a partir de una escala de grises de 8 bits, derivada de una imagen original en blanco y negro, en diapositivas de control procesadas sin anticuerpo primario. El porcentaje de píxeles que tenían una intensidad de tinción mayor que el umbral correspondiente se usó para integrar el área porcentual ocupada por la tinción de laminina para cada punto caliente. Se cuantificó el área de porcentaje promedio ocupada por la tinción de laminina de cuatro puntos calientes diferentes por región cerebral y por paciente. La MVD del campo visualizado se expresó como un área porcentual ocupada por la tinción de laminina en el área total de la imagen.

25 Análisis de electrotransferencia cuantitativo

El neocórtex aislado y los tejidos del hipocampo se homogeneizaron en tampón de lisis NP-40 al 1% (20 mM Tris-base (pH 8,8), 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40 con inhibidores de proteasa (Roche)) utilizando un QIAGEN TissueLyser II ajustado a 19 Hz durante 20 minutos. Para cortar ADN genómico, las muestras homogeneizadas se pasaron diez veces a través de una aguja de calibre 21 y luego se incubaron en hielo durante 30 minutos. El homogeneizado se centrifugó a 4 °C a 14000xg durante 30 minutos. Las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se determinaron mediante el ensayo BCA (Pierce) y las muestras se ajustaron a una concentración final de 30 μg por carril. Las proteínas se revelaron en geles SDS-PAGE al 10% de acuerdo con las prácticas estándar. La inmunotransferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa (Pall) utilizando anti-occludina de conejo (1:1000, Invitrogen), CD105 anti-humano de ratón (1:1000, DAKO) y anti-beta actina de ratón (1:1000, Santa Cruz). Como anticuerpos secundarios se utilizaron IgG 680 conjugada anti-conejo (Invitrogen) e IgG IRDye800 conjugada anti-ratón. Todas las diluciones de anticuerpos se realizaron en soluciones de proteína de leche. Las intensidades de señal se analizaron utilizando el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (LICOR).

40 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado. Las comparaciones estadísticas de los datos entre ratones Tg2576 AD envejecidos y jóvenes y compañeros de camada control de tipo salvaje se realizaron tanto con la prueba t de Student como con una ANOVA de 2 vías para valores no coincidentes con las correcciones de Bonferroni posteriores. Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (v5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Los p valores inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los valores se expresan como media \pm SEM.

50 RESULTADOS:

Los ratones Tg2576 presentaron una mayor incidencia de morfología cerebrovascular de unión estrecha anormal.

Para evaluar los cambios en la morfología de las TJ, se examinaron los patrones de tinción de occludina y ZO-1 mediante microscopía confocal, ambos marcadores de TJ bien establecidos. La morfología de las TJ se caracterizó en varias regiones del cerebro, incluyendo el neocórtex, el hipocampo y el plexo coroideo de ratones de tipo salvaje y Tg2576. Casi todos los vasos sanguíneos observados se seccionaron longitudinalmente. Los vasos sanguíneos transversales eran escasos. Los patrones de tinción marcados, continuos y lineales de occludina y ZO-1 dentro de la vasculatura cerebral se consideraron normales, lo cual era indistinguible tanto en la corteza como en el hipocampo independientemente de la edad o el genotipo [[Figura 1: A, C, E y G]]. El débil delineado del contorno del vaso, mejorado por la contratinción nuclear, permitió detectar fácilmente las anomalías de la unión. En comparación con los controles, los ratones Tg2576 mostraron una mayor incidencia de tinción punteada de occludina [[Figura 1: B y F]] y ZO-1 [[Figura 1: D y H]] en el neocórtex y el hipocampo, respectivamente. El plexo coroideo, una región del cerebro no afectada en la EA, mostró patrones de TJ normales para la occludina y la ZO-1 en todos los ratones (datos no mostrados).

65

La alteración de la TJ se cuantificó calculando el porcentaje promedio de vasos sanguíneos que presentan una morfología anormal. El neocórtex de ratones Tg2576 envejecidos mostró un aumento significativo en la alteración de TJ ($30,50 \pm 1,94\%$; *** $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías) en comparación con los compañeros de camada de tipo salvaje (que promediaron un 10%) [[Figura 2: A]. También hubo una diferencia significativa en la incidencia de la alteración de la TJ entre ratones Tg2576 jóvenes y envejecidos (* $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) [[Figura 2: A]].

Se observaron resultados similares en el hipocampo. Los ratones Tg2576 envejecidos ($24,75 \pm 2,32\%$; *** $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías) mostraron un aumento significativo en la incidencia de la alteración de la TJ en comparación con los compañeros de camada de tipo salvaje (con un promedio del 10%) [[Figura 2: C]]. Se observó un aumento significativo en la prevalencia de la alteración de la TJ en ratones Tg2576 envejecidos en comparación con ratones Tg2576 jóvenes (* $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) [[Figura 2: C]]. La cantidad de alteración de la TJ en ratones jóvenes, tanto en la corteza como en el hipocampo, de ambos genotipos promedió aproximadamente un 10 % y no fue significativa.

Los niveles de proteína ocludina se examinaron mediante electrotransferencia en el neocórtex y el hipocampo de ratones Tg2576 envejecidos. En el córtex, en los ratones transgénicos la proporción de ocludina sobre β -actina se redujo casi a la mitad [[Figura 2: B]] ($3,78 \pm 0,49$) en comparación con el tipo salvaje ($6,81 \pm 0,80$, ** $p = 0,0072$, prueba t). El hipocampo presentó una reducción similar en la proporción de ocludina sobre β -actina en ratones Tg2576 envejecidos ($5,89 \pm 0,76$) en comparación con el tipo salvaje [[Figura 2: D]] ($10,31 \pm 1,15$, ** $p = 0,0076$, prueba t).

Los cerebros Tg2576 envejecidos tienen señales apoptóticas cerebrovasculares limitadas y señales angiogénicas cerebrovasculares aumentadas.

Se indagó sobre la apoptosis y la angiogénesis como posibles mecanismos para explicar las anomalías cerebrales vasculares de las TJ observadas en los ratones Tg2576 envejecidos. La caspasa-3 activada se usó como marcador de apoptosis [[Figura 3: C-E]]. En todas las secciones examinadas en células endoteliales, no hubo inmunorreactividad para caspasa-3 activada. La tinción con caspasa-3 activada se observó en otros tipos de células y tenía una morfología de tipo filamentoso. En ratones de tipo salvaje jóvenes y envejecidos, hubo una tinción de caspasa-3 activada muy limitada dentro del neocórtex [[Figura 3: C]]. Los vasos sanguíneos en la corteza y el hipocampo que exhibieron anomalías TJ, [[Figure 3: D]], tenían una tinción de tipo neuronal que estaba directamente adyacente o superpuesta con los vasos sanguíneos [[Figura 3: D (flechas blancas)]]].

Todos los ratones tenían tinción de hipocampo de caspasa-3 activada de diferentes grados en las regiones CA1, CA2, CA3 y DG. Los Tg2576 jóvenes y de tipo salvaje (tanto jóvenes como ancianos) tuvieron densidades de tinción de caspasa-3 activadas significativamente más altas dentro del hipocampo en comparación con la corteza. Se observó que la densidad general de la tinción de la caspasa-3 en el hipocampo en ratones Tg2576 jóvenes y de tipo salvaje (todas las edades) era menor que en los ratones Tg2576 envejecidos. Sin embargo, los ratones Tg2576 envejecidos tenían una tinción de caspasa-3 activada significativa tanto en el neocórtex como en el hipocampo que tendía a centrarse alrededor de las posibles ubicaciones de la placa.

Para evaluar la angiogénesis se usó CD105, un marcador endotelial bien establecido [Duff et al. (2003) FASEB J 17: 984-992]. CD105 tiñó todos los vasos de manera uniforme, independientemente de la edad y el genotipo. Sin embargo, en el Tg2576 envejecido se tiñeron una mayor proporción de vasos sanguíneos con CD105 en comparación con los ratones de tipo salvaje y jóvenes de ambos genotipos de la misma camada [[Figura 3: B]].

Los ratones Tg2576 envejecidos tienen una densidad microvascular incrementada.

Previamente se señaló que en los ratones Tg2576 envejecidos se tiñó una mayor proporción de vasos sanguíneos con CD105. La densidad microvascular (MVD) se cuantificó en los cerebros de ratones Tg2576 jóvenes y envejecidos y en los de tipo salvaje de la misma edad de la misma camada, mediante tinción con CD105. La MVD se definió como una relación del TFA con respecto al área total de un campo visualizado y se usó como una medida sustituta de la angiogénesis. Los ratones Tg2576 envejecidos tenían una MVD significativamente mayor en comparación con los de tipo salvaje. El promedio de MVD en ratones Tg2576 envejecidos ($0,4453 \pm 0,0146$; *** $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías) fue más del doble que en los de tipo salvaje [[Figura 4: A]] ($0,1882 \pm 0,0010$). Cuando se comparó con ratones Tg2576 jóvenes, la MVD en los Tg2576 envejecidos fue 1,5 veces superior (* $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías). Los ratones Tg2576 jóvenes tenían una tendencia hacia una MVD promedio más alta ($0,2674 \pm 0,0161$) pero las diferencias no fueron significativamente diferentes en comparación con el tipo salvaje [[Figura 4: A]] ($0,2321 \pm 0,0110$).

Los niveles de expresión de la proteína CD105 se cuantificaron mediante electrotransferencia en ambos neocórtex e hipocampo de ratones Tg2576 envejecidos y de tipo salvaje. En la corteza, la proporción de CD105 con respecto a β -actina fue casi el doble en los ratones Tg2576 [[Figura 4: B]] ($4,57 \pm 0,27$) en comparación con los del tipo salvaje ($2,52 \pm 0,27$, *** $p < 0,001$, prueba t). El hipocampo mostró un aumento similar en la proporción de CD105 con respecto a β -actina en los ratones Tg2576 envejecidos ($5,66 \pm 0,62$) en comparación con el tipo salvaje [Figura 4: C]] ($3,53 \pm 0,46$, * $p < 0,05$, prueba t).

En un examen preliminar de tejidos humanos, la cuantificación de la cantidad de tinción de laminina en cerebros sin enfermedad (ND) y pacientes con AD se realizó en casos del Kinsmen Laboratory Brain Bank de la Universidad de Columbia Británica cuidadosamente validados. Estas muestras se utilizaron como estándares de referencia de tejidos cerebrales post mortem de la corteza medial e hipocampales [Jantaratnotai et al. (2010) *Curr Alzheimer Res* 7: 625-636] para brindar apoyo a que la densidad vascular incrementada también se extiende desde modelos animales hasta patologías clínicas en humanos. En el córtex del estándar de referencia de AD, el promedio de MVD por porcentaje de área fue casi el doble ($12,23 \pm 1,28\%$, * $p < 0,05$, prueba t) en comparación con el paciente ND [[Figura 4: D]] ($7,25 \pm 1,25\%$). De manera similar, el hipocampo de la referencia de AD mostró una duplicación en el MVD promedio ($11,35 \pm 0,60\%$, *** $p < 0,001$, prueba t) en comparación con la referencia de ND [[Figura 4: E]] ($7,10 \pm 0,23\%$). La magnitud del aumento de la densidad vascular cerebral cortical por la tinción de laminina en el paciente con AD [[Figura 4: G]] en comparación con el control del paciente ND [[Figura 4: F]] se puede ver visualmente en las imágenes representativas. El tejido del hipocampo mostró patrones de tinción similares en los pacientes con AD y ND (datos no mostrados).

15 DISCUSIÓN:

Anteriormente, se estableció mediante cuantificación utilizando el método de tinción Evans Blue que la BBB se ve comprometida en el modelo de ratones Tg2576 AD y que la degradación se puede salvar mediante la inmunización con abeta [Ujii et al. (2003) *Microcirculation* 10: 463-470; Dickstein et al. (2006) *FASEB J* 20: 426-433]. El hecho de que la integridad reducida de la BBB es anterior a otras neuropatologías como las placas amiloides, proporcionó un fuerte vínculo entre la vascularización cerebral y la enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, el dogma actual sostiene que la filtración de la BBB en la AD es probablemente debido al deterioro vascular y a la apoptosis. El objetivo del estudio descrito en el Ejemplo 1 fue probar la hipótesis de que la angiogénesis y la hipervascularización subyacen al aumento de la permeabilidad vascular en la AD. La integridad de la BBB se evaluó al examinar la morfología de la TJ en ratones Tg2576 AD que expresan la APP humana que contiene las mutaciones de cambio de sentido, encontradas en una familia sueca, que causa la aparición temprana de la AD. Se examinaron dos grupos de ratones separados por edad: cinco meses de edad (antes de la aparición de la enfermedad) y mayores de 18 meses de edad (mucho después de la aparición de la enfermedad). Se encontró que los ratones Tg2576 envejecidos tenían una expresión de TJ significativamente anormal, en comparación con los controles, lo cual se correlacionó con un aumento de la angiogénesis aberrante. Tomados en conjunto, la angiogénesis influenciada por abeta parece causar una degradación de la BBB en ratones Tg2576 a nivel de las TJ.

Recientemente, se ha cuestionado si las grandes placas de abeta extracelular agregadas, un distintivo de la patología de la AD, causan directamente los efectos neurodegenerativos en la AD. Ahora se cree que los oligómeros de abeta solubles, más pequeños y más tóxicos, inician directamente la enfermedad (revisado en Sakono M, Zako T (2010) *FEBS J* 277: 1348-1358). La presencia de estos oligómeros tóxicos podría influir en la supervivencia endotelial y en la expresión de la TJ. Varias líneas de evidencia *in vitro* han investigado la disfunción endotelial por abeta. Marco et al. [*Neurosci Lett* 401: 219-224] demostró que los cultivos endoteliales estimulados por abeta1-42 indujeron una expresión aberrante de proteínas TJ, incluidas las claudinas, las ocludinas y la ZO-1. Gonzalez *et al.* [Gonzalez-Velasquez et al. (2008) *J Neurochem* 107: 466-477] demostraron que los agregados de abeta1-40 más pequeños indujeron la permeabilidad de las células endoteliales y la relocalización de ZO-1 al citoplasma. Las especies reactivas de oxígeno inducidas por abeta (ROS) se descartaron como una posible causa de la filtración de la BBB debido a que la presencia de enzimas detoxificantes de ROS no influyó en el daño inducido por abeta [Nagababu et al. (2009) *J Alzheimers Dis* 17: 845-854]. Sin embargo, se creía que la reorganización de las proteínas del citoesqueleto influye directamente en la integridad de la BBB [Nagababu *et al. ibid.*]. Aunque la participación de la producción de ROS relacionada con abeta se encuentra actualmente en revisión, las ROS procedentes de otras fuentes, incluidas la activación y la inflamación microgliales y las de filtración de suero, podrían tener un efecto en la integridad de la BBB [Pun et al. (2009) *Free Radic Res* 43: 348-364].

Se ha relacionado directamente con la pérdida de memoria en ratones Tg2576 a un oligómero abeta dodecamérico específico altamente tóxico de 56kDa, denominado "abeta*56" [Lesne et al. (2006) *Nature* 440: 352-357]. Este oligómero se origina aproximadamente a los seis meses de edad en los ratones Tg2576, cuando los déficits de memoria aparecen por primera vez, pero está ausente en ratones más jóvenes [Lesne *et al. ibid.*]. En el presente estudio, los ratones de cinco meses de edad tuvieron una tendencia hacia un aumento de las TJ vasculares anormales. Sin embargo, los ratones Tg2576 comienzan a mostrar una pérdida de integridad de la BBB a partir de los cuatro meses de edad [Ujii et al. (2003) *Microcirculation* 10: 463-470]. Durante este tiempo, una acumulación de oligómeros más pequeños y menos tóxicos podría comenzar a influir negativamente en la integridad de la BBB en este ratón. A los seis meses de edad, se plantea la hipótesis de que la presencia tóxica de abeta*56 inicia una cascada de eventos patológicos asociados con el ratón Tg2576. Aunque, entre las edades de seis a 13 meses, los niveles relativos de abeta*56 permanecen constantes en los ratones Tg2576 [Lesne *et al. ibid.*]. Durante este tiempo, la acumulación eventual de placas y neuronas distróficas es suficiente para causar un deterioro patológico mayor en este ratón. Esto podría explicar la enorme presencia de expresión anormal de la TJ vascular cerebral en los ratones Tg2576 envejecidos.

En el estudio que se muestra en el Ejemplo 1, un anticuerpo contra la caspasa-3 activada no pudo detectar eventos apoptóticos endoteliales. Sin embargo, los ratones Tg2576 jóvenes (5 meses de edad) y envejecidos (18-24 meses

de edad) y los correspondientes de tipo salvaje mostraron una expresión activa de caspasa-3 predominantemente dentro del hipocampo con tinción no endotelial. Estos datos son congruentes con la ausencia ampliamente extendida de muerte celular endotelial. Aunque no se observaron células endoteliales apoptóticas en este estudio, la evidencia *in vitro* sugiere que abeta, especialmente las mutaciones pertenecientes al mutante holandés, han demostrado ser capaces de inducir apoptosis en células endoteliales cultivadas [ossati S, et al. (2010) FASEB J 24: 229-241; Miravalle et al. (2000) J Biol Chem 275: 27110-27116; Paris et al. (2005) Brain Res Mol Brain Res 136: 212-230].

La angiogénesis también se analizó como otro mecanismo potencial de alteración de la TJ en el endotelio cerebrovascular. Hay varias líneas de evidencia que sugieren que la angiogénesis ocurre durante la AD. Primero, la neuroinflamación es una característica patológica de AD [Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) J Neuroinflammation 1: 14] y está asociada con el aumento de citoquinas, como IL-1 β , que son capaces de inducir angiogénesis [Pogue AI, Lukiw WJ (2004) Neuroreport 15: 1507-1510]. El factor de crecimiento proangiogénico VEGF también es inducido por estas citoquinas [Schultheiss et al. (2006) Angiogenesis 9: 59-65] y está elevado en pacientes con AD [Tarkowski et al. (2002) Neurobiol Aging 23: 237-243]. VEGF estimula directamente la proliferación endotelial [Shibuya M (2009) FEBS J 276: 4636-4643]. Los péptidos abeta también han demostrado tener propiedades angiogénicas por sí mismos [Boscolo et al. (2007) Int J Mol Med 19: 581-587].

En el estudio aquí descrito, se usó CD105 para examinar la angiogénesis en vasos sanguíneos cerebrales marcados con los marcadores TJ. La tinción de anticuerpos no fue capaz de distinguir los vasos con anomalías de TJ de los que no tenían [Duff et al. (2003) FASEB J 17: 984-992]. En este estudio, la tinción panendotelial aparente de CD105 fue extremadamente útil ya que permitió la cuantificación de la densidad de la tinción de CD105 y por lo tanto la densidad microvascular (MVD) en todo el cerebro. La MVD se usó como un marcador sustituto para la cantidad de angiogénesis presente dentro de un área determinada de la sección de tejido. Cuanto mayor es la densidad vascular, más angiogénesis se cree que ha ocurrido. La medición de la MVD no está exenta de limitaciones, que incluyen la falta de estandarización y la dependencia del operador para minimizar el sesgo que conduce a la pérdida de objetividad [Goddard et al. (2002) Angiogenesis 5: 15-20]. No obstante, los ratones Tg2576 envejecidos tenían casi el doble de MVD en comparación con los ratones de tipo salvaje emparejados por edad. Los ratones jóvenes Tg2576 no mostraron diferencias significativas en la MVD, pero tuvieron una tendencia hacia un aumento en la MVD en comparación con los controles.

La angiogénesis en el ratón Tg2576 es controvertida. Paris et al [Neurosci Lett 366: 80-85] notaron que el ratón Tg2576 tenía una angiogénesis limitada. El marcador panendotelial PECAM se utilizó para cuantificar la angiogénesis en ratones de hasta 17 meses de edad. Aunque no hay consenso en la literatura acerca de cuál es el "mejor" anticuerpo, PECAM no se ve favorecido como marcador angiogénico en comparación con CD105 [El-Gohary et al. (2007) Am J Clin Pathol 127: 572-579], puesto que PECAM no se limita a la expresión panendotelial, y las células plasmáticas e inflamatorias también suelen estar inmunomarcadas [Giatromanolaki et al. (1999) Oncol Res 11: 205-212]. Por otra parte, se ha demostrado que CD105 reacciona de manera sistemática con las células endoteliales [El-Gohary et al. *ibid.*], especialmente aquellas que sufren angiogénesis, y no reaccionan con células estromales o inflamatorias [Saad et al. (2003) J Gynecol Pathol 22: 248-253; Saad et al. (2004) Mod Pathol 17: 197-203]. Los datos expuestos en el presente documento, demuestran que un aumento de MVD relacionado con CD105 demuestra indirectamente que la angiogénesis y las anomalías de la TJ están relacionadas en el ratón Tg2576. Se han detectado señales proangiogénicas en el ratón Tg2576. El VEGF elevado en el tejido cortical de ratones Tg2576 de 20 meses de edad [Burger et al. (2009) Int J Dev Neurosci 27: 517-523] apoya la hipótesis de que la angiogénesis ocurre en este modelo de la AD. Finalmente, se ha observado un aumento de la expresión de marcadores asociados con la angiogénesis de la vasculatura cerebral en cerebros con AD humanos: [Jantaratnotai (2010) Curr Alzheimer Res 7: 625-636] (laminin or von Willerbrand factor expression); [Desai et al. (2009) J Neural Transm 116: 587-597] (integrin α V- β 3 expression); y en el modelo de ratón APP23 AD (expresión de la subunidad beta3-integrina). Las conclusiones de estos estudios, sin embargo, enseñan que la angiogénesis es el resultado de la remodelación vascular que se produce como resultado de la neuroinflamación que conduce al daño vascular y a la muerte.

En el estudio aquí descrito, no se encontró evidencia de muerte vascular cerebral en el ratón Tg2576, y en cambio, se observó evidencia de un aumento masivo en la neovascularización en ambos ratones Tg2576. Además, un examen preliminar de los estándares de referencia normal y de AD bien caracterizados de los tejidos cerebrales post mortem de la zona cortical media e hipocampales indica que estos tejidos también muestran una hipervascularidad significativa en la AD (Figura 4F-G).

En resumen, este estudio indica que hay un aumento significativo en la alteración de las TJ en ratones Tg2576 y que estas alteraciones se manifiestan con la edad y con la gravedad de la enfermedad. Estos datos respaldan el modelo de que la alteración de la TJ es el resultado de una mayor permeabilidad vascular que se produce durante la neovascularización extrema en la AD, desencadenada por una mayor producción de abeta. Estas características fisiopatológicas son profundas y graves, aparecen temprano en el desarrollo de la enfermedad y rivalizan con tau y abeta como distintivos característicos de la AD.

EJEMPLO 2: La hipervascularidad y las uniones estrechas alteradas se corrigen en ratones con enfermedad de Alzheimer inmunizados con péptido beta-amiloide

Resumen:

El estudio descrito en el Ejemplo 2 caracteriza la integridad cerebrovascular en ratones modelo Tg2576 AD al estudiar la expresión de proteínas de unión estrecha (TJ) (occludina y ZO-1) junto con marcadores de apoptosis y angiogénesis. En ratones AD envejecidos, se relacionó directamente un aumento significativo en la incidencia de TJ alteradas con un aumento de la densidad microvascular pero no con apoptosis, lo que apoya firmemente la hipervascularidad como base para la disfunción de la BBB. La hipervascularidad, la organización de TJ y el resellado de la BBB se solucionan mediante la vacunación con péptidos abeta.

Este estudio demostró que, en un modelo de ratón AD inmunizado con abeta, la integridad de la BBB en cuanto a las TJ está relacionada con la presencia de abeta. La eliminación del abeta del parénquima cerebral elimina la patología TJ microvascular relacionada y corrige la angiogénesis. Además, la microhemorragia relacionada con CAA observada en los ensayos de inmunización humana puede explicarse por la pérdida de las TJ en los vasos sanguíneos afectados. Este estudio conecta la remodelación vascular con la AD y esta redefinición puede conducir a mejores opciones terapéuticas para los pacientes con AD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Como se describe en el ejemplo 1.

Vacunación con abeta

La vacunación con abeta se realizó según lo descrito por (Dickstein et al. (2006) FASEB J 20, 426-433) utilizando un protocolo desarrollado por Schenk et al. (Naturaleza 400, 173-177). Brevemente, se llevaron a cabo dos estrategias de vacunación separadas, la terapéutica y la preventiva. Antes de la inmunización, a los ratones se les extrajo la vena safena y se les recogió el suero. En el planteamiento preventivo, los ratones se vacunaron a partir de las 6 semanas de edad y se sacrificaron a los 12 meses. Los ratones utilizados en la estrategia terapéutica se vacunaron a los 11 meses de edad y se sacrificaron a los 15 meses. El péptido abeta se preparó a partir de polvo liofilizado de forma que fuera reciente para cada conjunto de inyecciones. Para las inmunizaciones, se agregaron 2 mg de abeta (abeta1-40 humana, Bachem) a 0,9 ml de agua desionizada y se mezclaron exhaustivamente. Luego se agregaron 100 µl de PBS 10X para obtener una concentración final de PBS IX. La solución se agitó en un mezclador de vórtice y se puso a 37°C durante la noche hasta su uso al día siguiente. Se mezcló con una relación 1:1 (v/v) abeta1-40 (100 µg de antígeno por inyección) o PBS (control) con adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera inmunización. Esto fue seguido de un refuerzo con abeta1-40 (100 µg) o PBS mezclado 1:1 (v/v) con adyuvante incompleto de Freund (ICFA) a las dos semanas y mensualmente a partir de entonces. A partir de la quinta inmunización, se inyectaron directamente con PBS o abeta. Las inyecciones se realizaron *i.p.*

Preparación de los tejidos

Los ratones se anestesiaron de forma terminal con ketamina/xilazina (100 mg/kg; 10 mg/kg). Los cerebros se extirparon rápidamente, se extrajeron los bulbos olfativos y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % durante cuatro días a 4 °C. Luego, los cerebros se incluyeron en parafina y se seccionaron en serie a 5 µm. La inclusión, el corte y el desparafinado de parafina fueron realizados por Wax-it Histology Services Inc. (Vancouver).

Inmunotinción

Las secciones de parafina desparafinada se sometieron a la recuperación de antígenos utilizando una olla a presión de cocina convencional utilizando Tris 20 mM con tampón EDTA 0,7 mM (pH 9,0) a todo vapor durante 2 minutos. Luego los portaobjetos enfriados se incubaron en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 25%; BSA al 3%; Triton X-100 al 0,3%, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron anti-ZO-1 de conejo (1:200, Invitrogen), anti-ZO-1 de ratón (1:200, Invitrogen), anti-occludina de conejo (1:200, Invitrogen), anti-caspasa activada 3 de conejo (1:1000, Imgenex) y CD105 anti-humano de ratón (1:20, DAKO). La tinción con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4°C en tampón de tinción (10% de suero de cabra normal; 3% de BSA; 0,3% de Triton X-100). Cuando se tiñó con anticuerpos primarios de cabra se usó suero de burro normal. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron complementarios a las especies del primario conjugado con los colorantes Alexa Fluor 488 o 568 (1: 500, Invitrogen). La tinción con anticuerpos secundarios se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en tampón de tinción. Se utilizó TOTO-3 (1:10000, Invitrogen) para la contratinción nuclear. Las secciones se lavaron en PBS con Tween-20 al 0,1% (Sigma) tres veces durante 5 minutos cada uno entre las etapas de tinción. Las secciones teñidas se cubrieron con un cubreobjetos usando Fluoromount-G (Southern Biotech) y se dejaron secar al aire en la oscuridad durante la noche.

Análisis confocal y cuantitativo de la morfología de unión estrecha

Las secciones del cerebro se analizaron a partir de bloques de parafina de cada quinta sección. Las imágenes tomadas en un Zeiss LSM510 Meta (Zeiss, Alemania), se adquirieron con 16 cortes, con un promedio de cuatro veces, a través del plano Z utilizando un objetivo de inmersión en aceite 40x/1,3 Plan-Neofluor. La imagen compuesta proyectada se importó a Adobe Photoshop, a 600 dpi, y se optimizó en cuanto al contraste y el brillo. El análisis cuantitativo de la morfología de unión estrecha se analizó de acuerdo con la metodología desarrollada por Plumb et al. (Brain Pathol 12, 154-169). Los conjuntos de datos confocales representaron aproximadamente 100 vasos sanguíneos cerebrales de ambos controles Tg2576 jóvenes y ancianos de la misma camada en la corteza frontal y el hipocampo. Los vasos individuales se calificaron como normales (1) o anormales (0) para la expresión de ZO-1. La expresión normal de ZO-1 se juzgó como tinción marcada, continua, intensa y lineal. En contraste, la expresión anormal de ZO-1 se juzgó como tinción débil, punteada y/o discontinua. La expresión anormal de los vasos sanguíneos ZO-1 se comparó con los vasos sanguíneos normales que se encuentran en el control normal o en los vasos normales en los cerebros enfermos. Para minimizar el registro de vasos incompletos u ondulados como anormales, debido a los "huecos" observados en la tinción con ZO-1, se buscó evidencia de continuidad del vaso en las imágenes. Por ejemplo, la presencia de núcleos teñidos (con TOTO-3) o remanentes punteados o difusos de ZO-1 se usó para localizar la posición de brechas anormales a lo largo del tracto vascular. La incidencia de alteración de la unión estrecha se definió como el porcentaje promedio de vasos sanguíneos en una región determinada del cerebro que mostraba una morfología de unión estrecha anormal.

Quantificación de la densidad de microvasos

La densidad de microvasos (MVD) se cuantificó mediante microscopía confocal utilizando los métodos desarrollados por Guo et al. (Angiogenesis 4, 187-191 with minor modifications). Utilizando CD105 como marcador de la vasculatura cerebral angiogénica (Masliah et al. (2005) Neurology 64, 129-131), se adquirieron y analizaron imágenes de intensidad de fluorescencia óptima utilizando el software Zeiss LSM510 Meta. Las áreas dentro de la sección del cerebro que contienen alta densidad ("puntos calientes") (Bombois et al. (2007) Arch Neurol 64, 583-587) teñidas con CD105 se visualizaron usando el objetivo 20x/0,45 N-Achroplan usando los parámetros de imagenología confocal mencionados anteriormente. El área de fluorescencia total (TFA) en μm^2 se integró sobre el fondo, mediante el software, para cada punto caliente. Se cuantificó el TFA promedio de cuatro puntos calientes diferentes por ratón. El TFA se usó como una representación numérica de los microvasos totales teñidos por el anticuerpo CD105. La MVD del campo visualizado se expresó como una relación del TFA con respecto al área total de la imagen.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado. Las comparaciones estadísticas de los datos entre ratones Tg2576 AD envejecidos y jóvenes y compañeros de camada control de tipo salvaje se realizaron tanto con la prueba t de Student como con una ANOVA de 2 vías para valores no coincidentes con las correcciones de Bonferroni posteriores. Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (v5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Los p valores inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los valores se expresan como media \pm SEM.

RESULTADOS:

Los ratones Tg2576 inmunizados mostraron una patología cerebrovascular de unión estrecha reducida

La morfología y patología de unión estrecha (TJ) se caracterizó en la corteza y el hipocampo de ratones Tg2576 y de tipo salvaje inmunizados con abeta o PBS. Los patrones de tinción marcados, continuos y lineales de ocludina y ZO-1 dentro de la vasculatura cerebral Figura 5a y b se consideraron normales, lo cual fue uniforme e indistinguible en la corteza o el hipocampo independientemente del genotipo, la estrategia de inmunización o el agente. Los patrones de tinción débiles, punteados y/o discontinuos para la ocludina y la ZO-1 en la vasculatura cerebral figuras 5c y d (puntas de flecha blancas) se consideraron anormales. La expresión de anomalías de TJ fue uniforme e indistinguible en la corteza y el hipocampo de todos los ratones, independientemente de su genotipo, estrategia de inmunización o agente. La mayoría de los microvasos observados en ratones Tg2576 inmunizados con abeta tenían TJ normales Figura 5a y b, mientras que los vasos que mostraban anomalías TJ eran poco frecuentes. Sin embargo, los vasos más grandes en los ratones Tg2576 inmunizados con abeta, ya sea de forma preventiva o terapéutica, parecían tener una mayor proporción de expresión anormal de TJ, Figura 5e y f (puntas de flecha blancas) en comparación con los capilares.

Análisis cuantitativo de la patología cerebrovascular de unión estrecha en ratones inmunizados

La incidencia de la patología de TJ se evaluó cuantitativamente, mediante microscopía confocal, en ratones Tg2576 inmunizados como parte de una estrategia terapéutica o preventiva con abeta o PBS. La incidencia de la patología de TJ se definió como el porcentaje promedio de vasos sanguíneos que mostraban una morfología TJ anormal. La corteza de ratones Tg2576 inmunizados preventivamente con PBS mostró un porcentaje significativamente mayor ($29,00 \pm 4,02 \%$; ** p <0,05, ANOVA de 2 vías) de expresión de TJ alterada en comparación con los PBS de tipo salvaje (aproximadamente 10%) Figura 6a. Los ratones Tg2576 inmunizados con abeta mostraron un porcentaje significativamente menor de expresión de TJ vascular anormal ($11,33 \pm 2,40\%$; * p <0,05, ANOVA de 2 vías) en comparación con la contraparte transgénica de PBS en la corteza Figura 6a. La incidencia de la alteración de la TJ en

el hipocampo fue la misma que la de la corteza para ratones inmunizados preventivamente. Los ratones Tg2576 inmunizados con PBS mostraron una alteración significativamente mayor ($29,75 \pm 1,89 \%$; **** $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con los ratones PBS (aproximadamente el 10%) Figura 6b. La alteración de la TJ en el hipocampo en ratones Tg2576 inmunizados con abeta fue significativamente menor ($11,91 \pm 1,73\%$; *** $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con ratones Tg2576 inmunizados con PBS Figura 6b.

Los ratones inmunizados terapéuticamente mostraron casos similares de TJ vasculares alterados similares a los de los ratones preventivos. En la corteza, los ratones Tg2576 inmunizados terapéuticamente con PBS mostraron un porcentaje significativamente mayor de expresión de TJ alterada ($28,67 \pm 4,91\%$; ** $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con los PBS de tipo salvaje Figura 7a (aproximadamente 10%). Los ratones Tg2576 inmunizados con abeta mostraron un porcentaje significativamente menor de expresión de TJ vascular anormal en la corteza ($10,40 \pm 0,81\%$; * $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con la contraparte transgénica de PBS Figura 7a. La incidencia de alteración de TJ en el hipocampo para ratones inmunizados terapéuticamente fue la misma que la de la corteza. Los ratones Tg2576 inmunizados con PBS mostraron una alteración significativamente mayor ($27,33 \pm 4,06 \%$; **** $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con los ratones PBS de tipo salvaje (aproximadamente el 10%) Figura 7b. La alteración de TJ en el hipocampo en ratones Tg2576 inmunizados con abeta fue significativamente menor ($11,00 \pm 2,26 \%$; *** $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con ratones Tg2576 inmunizados con PBS Figura 7b.

Los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tienen una reducción generalizada de la filtración cerebrovascular

Los ratones Tg2576 y los de tipo salvaje inmunizados, preventiva o terapéuticamente, con abeta o PBS se evaluaron para detectar filtraciones cerebrovasculares y anomalías de TJ mediante microscopía confocal. La albúmina de ratón se usó como marcador para la filtración vascular y se visualizó como una tinción de gradiente difusa que emana de los vasos Figura 8b (punta de flecha blanca). Independientemente de la estrategia o el agente de inmunización, todos los ratones de tipo salvaje examinados no tuvieron fugas vasculares y produjeron patrones de tinción similares a los de la Figura 8a. Los ratones Tg2576 inmunizados con PBS, ya sea de forma preventiva o terapéutica, no mostraron signos notables de filtración vascular ni en la corteza ni en el hipocampo. La filtración vascular en ratones Tg2576 inmunizados con PBS se asoció con anomalías de TJ (no se muestra), según lo determinado con la tinción con ambos ocludina y ZO-1.

Los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tenían poca o ninguna filtración vascular dentro de los microvasos Figura 8ab. Sin embargo, los vasos más grandes de ratones Tg2576 inmunizados con abeta tenían una filtración vascular periódica, Figura 8b (punta de flecha blanca). La expresión anormal de TJ, tanto de ocludina (no mostrada) como de ZO-1 Figura 8b, se observó de manera consistente en los vasos más grandes que tenían una filtración vascular. Para evaluar si los vasos más grandes de ratones Tg2576 inmunizados con abeta habían alterado la patología de TJ se asoció con depósitos de abeta vascular, se realizó una doble tinción para las TJ y abeta Figura 8c. Se observó una leve deposición de abeta vascular solo en los vasos más grandes, tanto en los ratones Tg2576 inmunizados preventivamente con abeta como en los inmunizados terapéuticamente. Los vasos grandes que tenían deposición vascular de abeta también tenían patología de TJ, tanto de ocludina (no mostrada) como de ZO-1 Figura 8c (flechas blancas huecas). No se observó deposición de abeta en los capilares cerebrales de los ratones Tg2576 inmunizados con abeta. El tipo salvaje tratado no tenía abeta vascular. El Tg2576 tratado con PBS o bien durante un año o cuatro meses tenía un abeta vascular muy reducido.

Angiogénesis y apoptosis en cerebros Tg2576 inmunizados

Los casos de apoptosis y angiogénesis se examinaron, mediante microscopía confocal, en ratones Tg2576 inmunizados preventivamente o terapéuticamente con abeta o PBS. Se utilizó un anticuerpo anti-caspasa-3 activada como marcador de apoptosis Figura 9. En todas las secciones examinadas, la caspasa-3 activada no tiñó directamente el endotelio. De manera similar a los patrones de tinción observados en ratones Tg2576 envejecidos y jóvenes, se observó caspasa-3 activada en cuerpos celulares de tipo filamentosos que se presume que eran neuronas. Todos los ratones inmunizados mostraron tinción con caspasa-3 activada en el hipocampo, aunque en distintas cantidades, en las regiones CA1, CA2, CA3 y DG. Los ratones Tg2576 inmunizados con PBS, tanto preventivos como terapéuticos, tenían una tinción con caspasa-3 activada significativa dentro de la corteza de la Figura 9a y el hipocampo (no se muestra) que tendían a rodear las probables placas abeta. Los ratones de tipo salvaje (abeta y PBS) y Tg2576 inmunizados con abeta exhibieron tinción con caspasa-3 restringida por hipocampo, figura 9b. Se observó que la densidad global de la tinción con caspasa-3 activada en estos ratones era inferior a la de los Tg2576 tratados con abeta. La corteza de los ratones Tg2576 inmunizada con abeta, tanto preventiva como terapéuticamente, tenía una tinción de caspasa-3 limitada Figura 9c. La tinción de caspasa-3 activada de la corteza de las variantes de tipo salvaje se asemeja a las Tg2576 inmunizadas con abeta. Estos resultados fueron constantes en todos los ratones examinados.

La tinción con CD105 se usó como un marcador endotelial angiogénico; sin embargo, se observó tinción de CD105 en toda la vasculatura cerebral, independientemente de la ausencia o la presencia de anomalías de TJ. La densidad de microvasos (MVD) en los ratones inmunizados, se cuantificó por microscopía confocal mediante tinción con CD105 como parte de la estrategia de inmunización preventiva o terapéutica. La MVD se definió como una relación del TFA con respecto al área total de un campo visualizado y se usó como una medida sustituta de la angiogénesis. El promedio

de MVD en ratones Tg2576 inmunizados con PBS de forma preventiva durante un año ($0,4560 \pm 0,0072$; * $p < 0,0001$, prueba t) fue significativamente mayor en comparación con el tipo salvaje inmunizado con PBS ($0,1951 \pm 0,0123$) Figura 10a. Los ratones Tg2576 inmunizados preventivamente con abeta tuvieron una MVD significativamente reducida ($0,1972 \pm 0,0075$; ** $p < 0,0001$, prueba t) en comparación con los transgénicos inmunizados con PBS Figura 10a. La MVD en los ratones inmunizados terapéuticamente fue similar al grupo preventivo. El promedio de MVD en ratones Tg2576 inmunizados con PBS terapéuticamente durante cuatro meses ($0,4939 \pm 0,0077$; *** $p = 0,0001$, prueba t) fue significativamente mayor en comparación con el tipo salvaje inmunizado con PBS ($0,2044 \pm 0,0222$) Figura 10b. Los ratones Tg2576 inmunizados terapéuticamente con abeta tuvieron una MVD significativamente reducida ($0,2180 \pm 0,0130$; **** $p < 0,0001$, prueba t) en comparación con los transgénicos inmunizados con PBS Figura 10b.

DISCUSIÓN:

Se ha demostrado previamente que los ratones inmunizados con abeta, ya sea de forma preventiva o terapéutica, provocaron una respuesta inmune al péptido según se midió a través de un aumento en los títulos de anticuerpos anti-abeta (Dickstein et al. (2006) FASEB J 20, 426-433). Patológicamente, estos ratones Tg2576 inmunizados con abeta habían reducido significativamente las cargas de placa y la microgliosis. Estos hallazgos fueron concordantes con los resultados publicados previamente utilizando modelos de ratones con AD y métodos de inmunoterapia similares, y muestran que la integridad global de la BBB mejora significativamente en los ratones Tg2576 tras la inmunización con abeta.

La pregunta que se abordó en este estudio fue si la BBB mejorada se extiende a nivel de las TJ. Se demostró que los ratones Tg2576 inmunizados con abeta tenían una patología de TJ marcadamente reducida en la microvasculatura. La reducción en la patología TJ se observó tanto en el neocórtex como en el hipocampo, que normalmente se ven muy afectados durante la AD (Hsiao et al. (1996) Science 274, 99-102; Braak y Braak, E. (1991) Acta Neuropathol 82, 239-259). La filtración de albúmina de ratón en suero de los microvasos de ratones Tg2576 inmunizados con abeta fue mínima. Sin embargo, se observó un aumento de la filtración de albúmina en ratones en los vasos más grandes, que mostraron anomalías de TJ y una deposición vascular leve de abeta. Aunque la deposición de abeta vascular leve y la filtración de suero se observaron de forma cualitativa en este estudio, Wilcock et al. (J Neuroinflammation 1, 24) describió aumentos significativos en CAA y microhemorragias relacionadas con CAA en la inmunización pasiva de la misma cepa de ratón AD. Esta diferencia se atribuye muy probablemente a la edad de los ratones utilizados en los respectivos estudios de vacunación. En el presente estudio, los ratones inmunizados de forma preventiva se sacrificaron al año. Los ratones inmunizados terapéuticamente se sacrificaron a los 15 meses. Se sabe que la deposición vascular en el ratón Tg2576 es bastante "intermedia" a los 15 meses (Domnitz et al. (2005) J Neuropathol Exp Neurol 64, 588-594). Los ratones Tg2576 inmunizados del estudio de Wilcock et al. mencionado anteriormente se vacunaron a los 23 meses de edad, cuando se sabe que la CAA está "extendida" (Domnitz et al. (2005) J Neuropathol Exp Neurol 64, 588-594). Tomados en conjunto, la alteración de la TJ de la vasculatura cerebral está directamente relacionada con la presencia de abeta, por lo que prevenir la acumulación de abeta permite que la microvasculatura repare cualquier daño.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el(los) mecanismo(s) de la inmunoterapia con abeta. Brevemente, los mecanismos más populares son la eliminación microglial de las placas de abeta, la disolución catalítica y la hipótesis del sumidero periférico. El mecanismo de eliminación microglial de abeta se ha resumido (Morgan, D. (2009) CNS Neurol Disord Drug Targets 8, 7-15). Brevemente, los anticuerpos anti-abeta periféricos circulares entran al cerebro y opsonizan las placas. La microglia, los macrófagos cerebrales residentes, elimina las placas a través de la fagocitosis mediada por el receptor Fc. La disolución catalítica implica anticuerpos anti-abeta circulares periféricos que se unen a los agregados de abeta y los alteran al alterar la estructura terciaria de la placa (Solomon et al. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94, 4109-4112). El mecanismo final es la hipótesis del sumidero periférico (DeMattos et al. (2001) Proc Natl Acad Sci U S A 98, 8850-8855). En este mecanismo, los anticuerpos anti-abeta circulares se unen y secuestran la abeta plasmática, lo que altera el equilibrio del flujo de salida de abeta a través de la BBB. El resultado neto es la eliminación de la abeta del cerebro. Este mecanismo se ha favorecido recientemente debido a una mayor incidencia de CAA y microhemorragias relacionadas en ensayos en humanos de la inmunoterapia con abeta (Masliah y otros (2005) Neurology 64, 129-131; Nicoll y otros (2006) J Neuropathol Exp Neurol 65, 1040-1048; Nicoll y otros (2003) Nat Med 9, 448-452; Ferrer y otros (2004) Brain Pathol 14, 11-20). La CAA es una enfermedad independiente donde la abeta se deposita en la vasculatura, lo que provoca el engrosamiento de las arterias cerebrales y se describe como una arteriopatía por fallo en la eliminación de proteínas (Weller et al. (2009) Alzheimers Res Ther 1, 6). El abeta que se extrae del cerebro como resultado de la inmunoterapia se deposita en las arterias y, por lo tanto, exacerba la CAA relacionada con la inmunoterapia observada (Weller et al., *ibid*). Es discutible en cuanto a si alguno de estos mecanismos juega un papel prominente en la reducción o la eliminación de la abeta. Sin embargo, es probable una combinación de los tres mecanismos.

Un efecto secundario observado en el ensayo clínico fallido de inmunización con abeta fue la microhemorragia cerebral asociada a CAA (Boche, D., Zotova, E., Weller, RO, Love, S., Neal, JW, Pickering, RM, Wilkinson, D., Holmes, C., y Nicoll, JA (2008) Brain 131, 3299-3310). Varios estudios han observado microhemorragias en la vasculatura cerebral en una variedad de modelos de ratones con AD después de la inmunización activa (Wilcock et al. (2007) Neuroscience 144, 950-960; Petrushina et al. (2008) J Neuroinflammation 5, 42; Wilcock et al. (2009) J Neurosci 29, 7957-7965) e

inmunización pasiva (Pfeifer et al. (2002) *Science* 298, 1379; Racke et al. (2005) *J Neurosci* 25, 629-636; Wilcock et al. (2004) *J Neuroinflamación* 1, 24). La alteración de las TJ de la vasculatura cerebral explica este efecto secundario en relación con la hipótesis del sumidero periférico. Se propone el siguiente modelo de eliminación de abeta. Antes de la inmunización, la abundancia de abeta influye en la integridad del endotelio de la BBB, lo que resulta en la alteración de las TJ. Se genera una filtración microvascular. Durante la inmunización, se activan varios mecanismos de eliminación de la abeta, incluida la eliminación de la microglía y la disgregación de anticuerpos. A medida que se disuelven las placas de abeta, la abeta solubilizada se elimina del parénquima cerebral a lo largo de las vías de drenaje perivasculares (Weller et al. (2009) *Alzheimers Res Ther* 1, 6). Por razones desconocidas, el drenaje perivascular de la abeta se detiene y se deposita en las arterias cerebrales, lo que resulta en CAA. Las especies primarias de abeta que se encuentran depositadas en la vasculatura afectada por CAA es abeta1-40 más soluble, que se cree que es de origen neuronal (Herzig et al. (2006) *Brain Pathol* 16, 40-54). La precipitación de abeta daña las TJ endoteliales circundantes creando las microhemorragias observadas que podrían estar mediadas por el abeta inducido por ROS derivado de la NADPH-oxidasa (Park et al. (2005) *J Neurosci* 25, 1769-1777). Este modelo parece que se repitió en el ensayo fallido de inmunización contra la abeta AD humana (Boche et al. (2008) *Brain* 131, 3299-3310).

La apoptosis endotelial, medida mediante la tinción con caspasa-3 activada, no se observó en ninguno de los ratones a través de la tinción con caspasa-3 activada. Todos los ratones inmunizados, de tipo salvaje y Tg2576, tenían una extensa tinción de caspasa-3 activada en el hipocampo, que parecía ser de tipo neuronal. La presencia de caspasa-3 activada por el hipocampo tanto en ratones de tipo salvaje como en Tg2576 es coherente con un estudio previo (Niu et al. (2010) *Neurosci Bull* 26, 37-46). Sin embargo, los Tg2576 inmunizados con PBS tenían una extensa tinción de caspasa-3 activada de tipo neuronal por toda la corteza y el hipocampo. Gran parte de la tinción de caspasa se centró en los halos TJ (específicamente ZO-1) asociados a la placa. Los Tg2576 inmunizados con abeta, que carecían de patología de placa, tenían tinción de caspasa-3 solo en el hipocampo. Aunque la naturaleza exacta de la muerte celular que se produce durante la AD aún es controvertida, se cree que la apoptosis desempeña un papel importante (Rohn, T. T., and Head, E. (2008) *Caspase activation in Alzheimer's disease: early to rise and late to bed. Rev Neurosci* 19, 383-393). Además, el ratón Tg2576 no se conoce por mostrar pérdida neuronal (Irizarry et al. (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 965-973). La presencia de caspasa-3 activada por la corteza en los ratones control Tg2576 tratados sugiere que existen señales incrementadas de apoptosis, probablemente debido a la abeta. Una vez que se elimina la abeta, se presume que las señales apoptóticas se reducen.

La inmunización con Abeta también pareció modular las señales angiogénicas en ratones tratados. La angiogénesis se puede cuantificar a través de las densidades de tinción microvesicular promedio de CD105 en el cerebro (Holley et al. (2010) *Neurosci Lett* 470, 65-70; Barresi et al. (2007) *Acta Neuropathol* 114, 147-156). La cantidad relativa de angiogénesis se cuantificó por la MVD de la tinción con CD105. Los ratones Tg2576 tratados con PBS, tanto preventiva como terapéuticamente, tenían densidades vasculares significativamente mayores en comparación con los ratones de tipo salvaje y los ratones Tg2576 tratados con abeta. Esto implica que las señales angiogénicas se reducen cuando se elimina la abeta. Se presume que la neuroinflamación se reduce como resultado de la inmunoterapia amiloide. Se cree que la microglía es una fuente importante de neuroinflamación en la enfermedad neurodegenerativa (Perry et al. (2010) *Nat Rev Neurol* 6, 193-201). Una reducción tanto de la neuroinflamación como de la abeta puede reducir directa o indirectamente las señales angiogénicas asociadas con ambos (Pogue, AI y Lukiw, WJ (2004) *Neuroreport* 15, 1507-1510; Naldini, A., y Carraro, F. (2005) *Curr Drogas contra Inflamm Allergy* 4, 3-8; Boscolo, et al. (2007) *Int J Mol Med* 19, 581-587). Contrariamente al estudio actual, un estudio de inmunización pasiva con ratones APP+PS1 examinó la angiogénesis relacionada con neurogénesis (Biscaro et al. (2009) *J Neurosci* 29, 14108-14119). Después de la inmunización pasiva en los ratones transgénicos con AD se encontró, mediante tinción con BrdU, la cual puede marcar las células que se someten a reparación de ADN (Schmitz et al. (1999) *Acta Neuropathol* 97, 71-81) en lugar de los vasos angiogénicos (replicantes), que la angiogénesis estaba aumentando en el hipocampo.

EJEMPLO 3: La reversión vascular en la enfermedad de Alzheimer resulta de la inmunización beta-amiloide

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo incurable y es la principal causa de demencia en los ancianos (Castellani et al., *Dis Mon* 56, 484-546 (2010)). Un distintivo neuropatológico clave de la AD es la presencia de placas neuríticas extracelulares compuestas de péptido beta amiloide (A β) (Castellani et al., *Dis Mon* 56, 484-546 (2010)). Estudios recientes relacionan la disfunción neurovascular (Zlokovic, *Nat Rev Neurosci* 12, 723-738 (2011)) con factores de riesgo vascular (Dickstein et al., *Mt Sinai J Med* 77, 82-102 (2010)) en el desempeño de papeles fundamentales en la patogenia de AD. Las vacunas con A β , pueden reducir dramáticamente la deposición amiloide, y prevenir la pérdida de memoria en modelos de ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, se propuso que la amiloidogénesis promueve la neoangiogénesis extensa, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y posterior hipervascularización en la AD (Biron et al., *PLoS ONE* 6, e23789 (2011)). Aquí se prueba la hipótesis de que la inmunización puede resolver esta característica fisiopatológica de la AD. Se demuestra que la inmunización activa con A β soluciona la carga de placa y neutraliza el desencadenante amiloide que conduce a la angiogénesis y revierte la hipervascularidad en un modelo de ratón con AD. Estos datos apoyan la conclusión de que la neoangiogénesis es un proceso clave que subyace a la formación de placa en la AD. Este parece ser el primer ejemplo de reversión vascular después de cualquier intervención terapéutica y apoya la conclusión de que la modulación de la neoangiogénesis puede reparar el daño en el cerebro con AD.

La inmunoterapia con A β ha recibido una atención considerable como estrategia que modifica el tratamiento de la EA (Morgan, *J Intern Med* 269, 54-63 (2011)) debido a que varios modelos de ratones con AD se trataron con éxito (Golde et al., *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 31-49 (2009)). Complementando estos descubrimientos, se ha demostrado previamente en este documento que la inmunización activa con A β restaura la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) en un modelo de ratón con AD (Dickstein et al., *FASEB J* 20, 426-433 (2006)). Los efectos positivos generales de los estudios preclínicos de la inmunización con A β en animales alentaron a un ensayo clínico en humanos realizado por Elan/Wyeth a fines de 1999 (Wilcock & Colton, *J. Alzheimer Dis* 15, 555-569 (2008)). El ensayo clínico incompleto tuvo resultados mixtos que incluían una patología reducida de la placa pero taupatías persistentes y neuroinflamación (Masliah et al., *Neurology* 64, 129-131 (2005)). Los efectos secundarios inesperados observados en los primeros ensayos clínicos en humanos demuestran que nuestro conocimiento de la patogénesis de A β y AD es incompleto.

Métodos:

Ratones: Como se describe en el ejemplo 1.

Vacunación con abeta: como se describe en el ejemplo 2.

Preparación del tejido: los tejidos se prepararon como se describe previamente por Dickstein et al. (*FASEB J* 20, 426-433 (2006)). Los ratones se anestesiaron de forma terminal con ketamina/xilazina (100 mg/kg; 10 mg/kg) y se perfundieron con PBS durante 5 minutos. Los cerebros se extirparon rápidamente, se extrajeron los bulbos olfativos y el cerebelo, se pesaron y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % durante cuatro días a 4 °C. Luego, los cerebros se incluyeron en parafina y se seccionaron en series de 5 μ m. La inclusión, el corte y el desparafinado de parafina fueron realizados por Wax-it Histology Services Inc. (Vancouver). Los pesos cerebrales promedio se compararon entre los ratones inmunizados comparando las relaciones de masa del cerebro con respecto al cuerpo.

Inmunotinción: Las secciones de parafina desparafinadas se sometieron a la recuperación de antígenos utilizando una olla a presión convencional utilizando Tris 20 mM con tampón de EDTA 0,7 mM (pH 9,0) a todo vapor durante 5 minutos. Los portaobjetos enfriados se incubaron luego en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 25 %; BSA al 3 %; Triton X-100 al 0,3 %, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron anti-ZO-1 de conejo (1:200, Invitrogen), CD105 anti-humano de ratón (1:20, DAKO) y anti-A β ₁₋₁₆ de ratón (6E10) (1:2000, Covance). La tinción con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4° C en tampón de tinción (10 % de suero de cabra normal; 3 % de BSA; 0,3 % de Triton X-100). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron complementarios a las especies del primario conjugado con los colorantes Alexa Fluor 488 o 568 (1:500, Invitrogen). La tinción con anticuerpos secundarios se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en tampón de tinción. Se utilizó TOTO-3 (1:10000, Invitrogen) para la contratinción nuclear. Las secciones se lavaron en PBS con Tween-20 al 0,1 % (Sigma) tres veces durante 5 minutos cada uno entre las etapas de tinción. Las secciones teñidas se cubrieron con un cubreobjetos usando Fluoromount-G (Southern Biotech) y se dejaron secar al aire en la oscuridad durante la noche.

Análisis confocal y cuantitativo de la morfología de unión estrecha: Las secciones del cerebro se analizaron a partir de bloques de parafina de cada quinta sección. Las imágenes se tomaron en un Zeiss LSM510 Meta (Zeiss, Alemania) utilizando un objetivo de inmersión en aceite 40x/1,3 Plan-Neoflaur. La imagen compuesta proyectada se importó a Adobe Photoshop, a 600 dpi, y se optimizó para el contraste y el brillo. El análisis cuantitativo de la morfología de la unión estrecha se analizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Los conjuntos de datos confocales representaron aproximadamente 100 vasos sanguíneos cerebrales en la corteza frontal y el hipocampo tanto de los controles de Tg2576 jóvenes como de los envejecidos de la misma camada. Los vasos individuales se calificaron como normales (1) o anormales (0) para la expresión de ZO-1. La expresión normal de ZO-1 se juzgó como tinción marcada, continua, intensa y lineal. En contraste, la expresión anormal de ZO-1 se juzgó como tinción débil, punteada y/o discontinua. La expresión anormal de ZO-1 de los vasos sanguíneos se comparó con los vasos sanguíneos normales que se encuentran en el control normal o en los vasos normales en los cerebros enfermos. Para minimizar el registro de vasos incompletos u ondulados como anormales, debido a los "huecos" observados en la tinción con ZO-1, se buscó evidencia de continuidad del vaso en las imágenes. Por ejemplo, la presencia de núcleos teñidos (con TOTO-3) o remanentes punteados o difusos de ZO-1 se usó para localizar la posición de brechas anormales a lo largo del tracto vascular. La incidencia de alteración de unión estrecha se definió como el porcentaje promedio de vasos sanguíneos en una región determinada del cerebro que mostraba una morfología de unión estrecha anormal. Las imágenes de A β se visualizaron con escaneado láser Zeiss LSM 710.

Cuantificación de la densidad de microvasos: La densidad de microvasos (MVD) se cuantificó mediante microscopía confocal utilizando los métodos descritos anteriormente por Biron et al., *PLoS ONE* 6, e23789 (2011)). Utilizando CD105 como marcador de la vasculatura cerebral angiogénica (Holley et al. *Neurosci Lett* 470, 65-70 (2010)), se adquirieron y analizaron imágenes de intensidad de fluorescencia óptima utilizando el software Zeiss LSM510 Meta. Las áreas dentro de la sección del cerebro que contienen alta densidad ("puntos calientes") teñidas con CD105 se visualizaron usando el objetivo 20x/0,45 N-Achroplan usando los parámetros de imagenología confocal mencionados anteriormente. El área de fluorescencia total (TFA) en μ m² se integró sobre el fondo, mediante el software, para cada punto caliente. Se cuantificó el TFA promedio de cuatro puntos calientes diferentes por ratón. El TFA se usó como una

representación numérica de los microvasos totales teñidos por el anticuerpo CD105. La densidad microvascular del campo visualizado se expresó como una relación del TFA con respecto al área total de la imagen.

5 Análisis estadístico: las comparaciones estadísticas de los datos entre los ratones Tg2576 (Tg/+) AD y los controles de tipo salvaje de la misma camada (+/+) en las diferentes estrategias de inmunización utilizando PBS y A β se realizaron con una ANOVA de 2 vías para valores no coincidentes con pruebas posteriores de Bonferroni.

10 Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado. Las comparaciones estadísticas en las diferentes estrategias de inmunización entre los ratones Tg2576 (Tg/+) AD y los controles de tipo salvaje de la misma camada (+/+) inmunizados con PBS o A β se realizaron con una ANOVA de 2 vías para valores no coincidentes con pruebas posteriores de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (v5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, EE. UU., www.graphpad.com). Los p valores inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los valores se expresan como media \pm SEM.

15 Los ratones Tg2576 inmunizados presentan una patología de unión estrecha cerebrovascular reducida: ¿la inmunización con A β restaura la integridad de TJ? los patrones de expresión de ZO-1 se evaluaron en la vasculatura cerebral del neocórtex y el hipocampo de ratones Tg2576 (Tg/+) y de tipo salvaje (+/+) de la misma camada inmunizados con A β y PBS tanto preventiva como terapéuticamente. La expresión normal de TJ se visualizó como patrones de tinción marcados, continuos e ininterrumpidos. La expresión anormal se determinó como tinción débil, puntuada y/o discontinua. Los ratones +/- inmunizados con A β o PBS tenían patrones de tinción de ZO-1 normales (Figura 11a-d) indistinguibles independientemente de la región del cerebro. Los ratones Tg/+ inmunizados, preventiva y terapéuticamente, con A β mostraron una expresión normal de ZO-1 en los capilares (Figura 11g y h) similar a los ratones +/- . Los vasos sanguíneos de sección transversal extraños pero normales tenían secciones de expresión de ZO-1 cortas, generalmente paralelas (Figura 11h) o radiales (no mostradas). Los ratones Tg/+ que recibieron PBS tuvieron una marcada patología TJ (Figura 11e y f). Curiosamente, los ratones Tg/+ inmunizados con A β mostraron alguna patología TJ anormal principalmente en vasos más grandes (Figura 11i y j). El cambio en la patología ZO-1 de los capilares a los vasos más grandes en los ratones Tg/+ inmunizados con A β parece imitar el aumento de la patología CAA observado en otros modelos de inmunoterapia AD y en observaciones clínicas (revisado por Vasilevko et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 1207, 58-70 (2010)).

20 Análisis cuantitativo de la patología de unión estrecha cerebrovascular en ratones inmunizados: la incidencia de la patología de TJ se cuantificó anotando el porcentaje de vasos sanguíneos cerebrales con las TJ intactas frente a las perforadas. Los ratones Tg/+ inmunizados con PBS, tanto preventiva como terapéuticamente, tuvieron un porcentaje significativamente mayor de expresión de TJ alterada en el neocórtex y el hipocampo (Figura 12), en comparación con los +/- , inmunizados con PBS. De acuerdo con los datos anteriores que demuestran el beneficio de la inmunización con A β en la patología BBB (Dickstein et al., *FASEB J.* 20, 426-433 (2006)), se muestra que el ratón Tg/+ inmunizado preventivamente al inicio a las 6 semanas de edad con A β mostró un porcentaje significativamente inferior de expresión vascular anormal de TJ (con un promedio del 10 %; * $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con su contraparte transgénica de PBS en el neocórtex y el hipocampo (Figura 12a y b). El nivel de alteración de TJ en estos ratones fue similar a los controles +/- inyectados con A β y PBS. La patología de TJ en ratones Tg/+ inmunizados terapéuticamente con A β a los 11 meses de edad mostró una disminución significativa (con un promedio del 10%; * $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en la patología de TJ en comparación con los ratones Tg/+ inmunizados con PBS tanto en neocórtex como en el hipocampo (Figura 12c y d). Es más, la inmunización con A β después del inicio de la enfermedad fue capaz de restaurar la expresión de la proteína TJ a niveles similares a +/- (Figura 12c y d). Es importante tener en cuenta que los ratones +/- tratados con PBS o A β dieron como resultado una alteración mínima de TJ.

25 Angiogénesis en cerebros Tg2576 inmunizados: la densidad microvascular (MVD) esta incrementada en ratones Tg2576 AD envejecidos (Biron et al., *PLoS ONE* 6, e23789 (2011)), lo que sugiere un aumento en la angiogénesis con progresión y gravedad de la enfermedad. ¿La inmunización activa con A β altera la densidad de los vasos en ratones con AD? La MVD se cuantificó mediante CD105, un marcador endotelial angiogénico conocido, patrones de tinción de inmunofluorescencia en el neocórtex y el hipocampo. La tinción con CD105 fue predominante en la vasculatura cerebral independientemente de la ausencia (Figura 13a) o la presencia (Figura 13b) de anomalías TJ. Los ratones Tg/+ inmunizados preventivamente con PBS tenían más del doble de MVD ($0,4560 \pm 0,0072$; *** $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías) en comparación con su PBS +/- ($0,1951 \pm 0,0130$) (Figura 13c). En contraste, la MVD en ratones Tg/+ inmunizados preventivamente con A β se redujo significativamente en comparación con su control PBS del mismo genotipo ($0,1972 \pm 0,0075$; * $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) (Figura 13c) y de manera similar a lo observado en animales +/- . La MVD en los ratones tratados terapéuticamente reflejó las observaciones en los ratones inmunizados preventivamente. Los ratones Tg/+ inmunizados con PBS después del inicio de la enfermedad ($0,4939 \pm 0,0077$) tuvieron más del doble de MVD en comparación con su PBS +/- ($0,2044 \pm 0,0222$; *** $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías) (Figura 13d). Como se vio en los ratones Tg/+ inmunizados antes del inicio de la enfermedad, los ratones Tg/+ inmunizados con A β después del inicio de la enfermedad también tuvieron una MVD significativamente reducida ($0,2180 \pm 0,0130$; * $p < 0,05$, ANOVA de 2 vías) en comparación con los ratones Tg/+ inmunizados con PBS (Figura 13d). Los cambios en la densidad vascular parecían ser independientes del tamaño físico del cerebro de los ratones. La relación promedio entre el peso corporal y el cerebro no fue significativa, independientemente del genotipo, inmunógeno o estrategia de inmunización (Figura 13e y f).

Deposición de abeta en cerebros Tg2576 inmunizados: como se describió anteriormente (Dickstein et al., FASEB J 20, 426-433 (2006)), los ratones Tg/+ inmunizados con A β tuvieron una reducción dramática en las placas de A β parenquimatosas (Figura 14a-d). Se observó una eliminación completa en las placas de A β en los ratones Tg/+ inmunizados preventivamente con A β (Figura 14d). Sin embargo, el Tg/+ tratado terapéuticamente con A β tuvo una disminución dramática en la patología de placa A β (Figura 14b).

Discusión:

La inmunoterapia con A β continúa investigándose como una opción de tratamiento experimental para la AD. Los inesperados efectos secundarios vasculares negativos observados en los primeros ensayos clínicos de la vacuna AD humana demuestran nuestro conocimiento limitado de la patogénesis del A β y de la AD. Los modelos existentes no incorporan inquilinos que puedan explicar estas observaciones. Este estudio demostró que en un modelo de inmunización con A β de ratón AD, la integridad de la TJ de la BBB está relacionada con la angiogénesis provocada por la amiloidogénesis. La eliminación de A β del parénquima cerebral elimina la patología de TJ microvascular relacionada. Además, la hemorragia relacionada con CAA observada en los ensayos de inmunización en humanos podría explicarse por la pérdida de las TJ en los vasos sanguíneos afectados.

La disfunción de la BBB se identificó inicialmente en modelos animales de AD (Ujii et al., Microcirculation 10, 463-470 (2003)) y más tarde se confirmó como una característica clínica destacada, aunque inexplicable, de la AD en pacientes (Farrall & Wardlaw, Neurobiol Aging 30, 337-352 (2009)). Recientemente, se propuso una nueva hipótesis que es coherente con el conjunto de datos relacionados con la BBB en la AD: la amiloidogénesis promueve la neoangiogénesis generalizada que conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y a la subsiguiente hipervascularización en la AD (Biron et al., PLoS ONE 6, e23789 (2011)). En este documento se demuestra que la inmunización con A β modula las señales angiogénicas en ratones Tg2576 tratados que sobreexpresan el APP695 humano que contiene las mutaciones suecas de cambio de sentido (K670N/M671L), que causan la AD de inicio temprano. La cantidad relativa de angiogénesis se puede cuantificar a través de las densidades de tinción microvasculares promedio de CD105 en el cerebro (Holley et al. Neurosci Lett 470, 65-70 (2010); Barresi et al., Acta Neuropathol 114, 147-156 (2007)). Los ratones Tg2576 tratados con PBS, tanto preventiva como terapéuticamente, tenían densidades vasculares significativamente mayores en comparación con los ratones de tipo salvaje y los ratones Tg2576 tratados con A β . Los cambios en la densidad vascular parecían ser independientes del tamaño físico del cerebro del ratón. Esto implica que las señales angiogénicas se reducen cuando se elimina A β . Se presume que la neuroinflamación se reduce como resultado de la inmunoterapia amiloide. Una reducción tanto de la neuroinflamación como del A β puede reducir directa o indirectamente las señales angiogénicas asociadas a ambos (Boscolo et al., Int J Mol Med 19, 581-587 (2007)).

Un efecto secundario observado en el ensayo clínico fallido de inmunización con A β fue un aumento de la microhemorragia cerebral asociada a CAA (Boche et al., Brain 131, 3299-3310 (2008)), dicho efecto secundario también se observó en una variedad de modelos de ratones con AD después de la inmunización activa (Wilcock et al., Neuroscience 144, 950-960 (2007); Petrushina et al., J Neuroinflammation 5, 42 (2008); Wilcock et al., J Neurosci 29, 7957-7965 (2009)) y pasiva (Pfeifer et al., Science 298, 1379, (2002); Racke, M. M. et al., J Neurosci 25, 629-636 (2005); Wilcock, D. M. et al., J Neuroinflammation 1, 24 (2004)). La alteración de las TJ de la vasculatura cerebral por la angiogénesis explica este efecto secundario. Se propone el siguiente modelo de eliminación de A β . Antes de la inmunización, la abundancia de A β influye en la integridad del endotelio de la BBB a través de la neoangiogénesis desencadenada, lo que resulta en la alteración de las TJ. Se produce una filtración microvascular que permite que el amiloide periférico entre al cerebro y se una como placas amiloides neurotóxicas. El daño cerebrovascular se agudiza aún más por las ROS inducidas por A β derivadas de la NADPH-oxidasa (Park, L. et al., J Neurosci 25, 1769-1777 (2005)). Las microhemorragias se deben al debilitamiento de la TJ como resultado de la angiogénesis que conduce a la hipervascularidad. Durante la inmunización, se activan varios mecanismos de eliminación de A β , incluida la opsonización, la eliminación de la microglía y la desagregación de anticuerpos. A medida que se disuelven las placas de A β , se elimina A β solubilizado del parénquima cerebral a lo largo de las vías de drenaje perivasculares (Weller et al., Alzheimers Res Ther 1, 6 (2009)). Por lo tanto, la inmunización neutraliza la señal pro-angiogénica al estimular una respuesta inmune a A β , pero una vez formada, otros aspectos de la enfermedad pueden no solucionarse mediante la inmunización. Por razones que aún se conocen, el drenaje perivascular de A β se detiene, posiblemente por resellado de BBB y se deposita en las arterias cerebrales, lo que resulta en CAA. Cabe señalar que la especie A β primaria encontrada depositada en la vasculatura afectada por CAA es la A β ₁₋₄₀ más soluble, que se cree que es de origen neuronal (Herzig et al., Brain Pathol 16, 40-54 (2006)). Este modelo parece ser paralelo al ensayo de inmunización con A β fallido en humano AD (Boche et al., Brain 131, 3299-3310 (2008)).

Nuestro objetivo fue determinar si la inmunización con péptidos A β puede corregir la amiloidogénesis desencadenada por angiogénesis e hipervascularidad en ratones Tg2576 AD. Se descubrió que la reversión de la hipervascularización resulta de la inmunización con A β . Este parece ser el primer ejemplo de reversión vascular donde la densidad vascular vuelve a los niveles normales después de la intervención terapéutica. Estos datos también implican la existencia de una mayor plasticidad vascular de lo que se ha observado anteriormente. Se podría visualizar detener la angiogénesis sin solucionar la densidad vascular, por lo que esto podría implicar que se requiere la señal amiloidogénica para mantener la hipervascularidad. Una vez que se elimina la señal, la hipervascularidad desaparece. Estos datos subyacen claramente un modelo de angiogénesis vascular de la fisiopatología de la AD y proporcionan la primera

evidencia de que la modulación de la angiogénesis, repara el daño en el cerebro con AD. Recientemente, se ha visto que el fármaco antiproliferativo, bexaroteno, un agente anticanceroso oral, reduce la carga de placa y aumenta el desempeño de la memoria en modelos animales de AD (<http://www.sciencemag.org/content/early/2012/02/08/science.1217697>). Este estudio interpreta que el bexaroteno actúa sobre los receptores X del retinoide afecta el transporte de APOE, lo que reduce la acumulación de placa o la renovación, pero son posibles otros métodos de actuación en la AD. También se sabe que el bexaroteno (Targretin) aumenta la apoptosis y altera el control del ciclo celular, la diferenciación, la actividad antimetastásica y, por último, la actividad antiangiogénica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120806/>). Inhibe la angiogénesis al suprimir directamente la proliferación, adhesión, invasión y migración de las células endoteliales, y afecta la expresión de VEGF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120806/>). Estos datos y los presentados en el presente documento, por lo tanto, apuntan directamente hacia revertir la angiogénesis de la vasculatura cerebral como una nueva modalidad terapéutica para la AD.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad efectiva de bexaroteno para su uso en el tratamiento de la integridad reducida de la barrera hematoencefálica (BBB) en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.
2. La cantidad efectiva de bexaroteno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el bexaroteno previene y/o trata la enfermedad de Alzheimer.
- 10 3. La cantidad efectiva de bexaroteno para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el bexaroteno restaura la integridad de la unión estrecha en los vasos cerebrales.
4. La cantidad efectiva de bexaroteno para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el bexaroteno promueve reversión vascular en el cerebro.

Figura 1: los ratones Tg2576 AD tienen patología de unión estrecha cerebral.

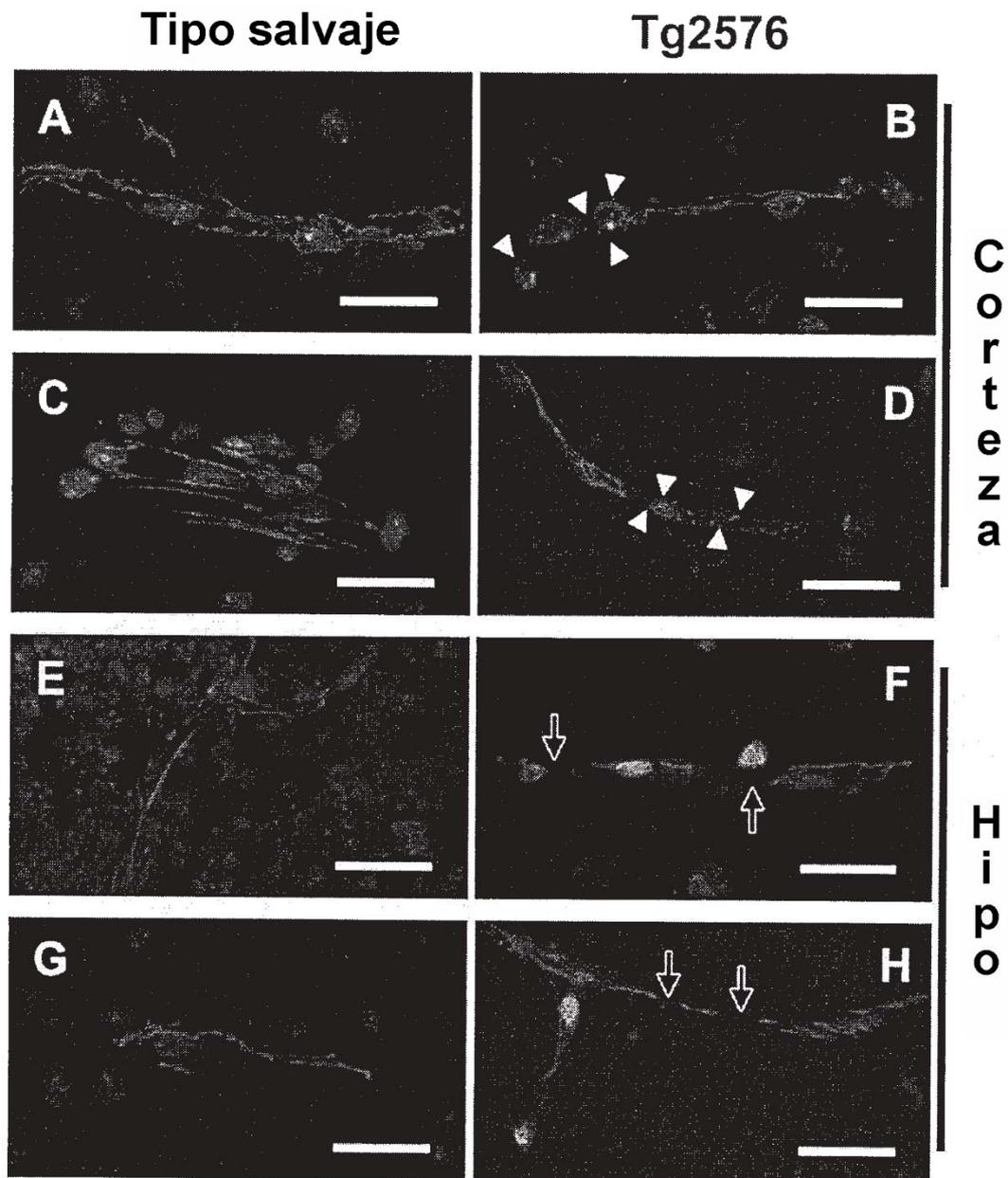
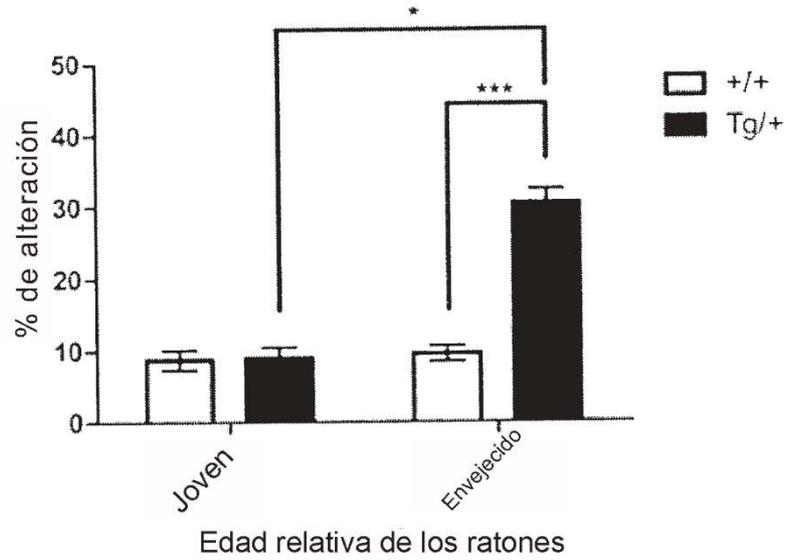


Figura 2

A



B

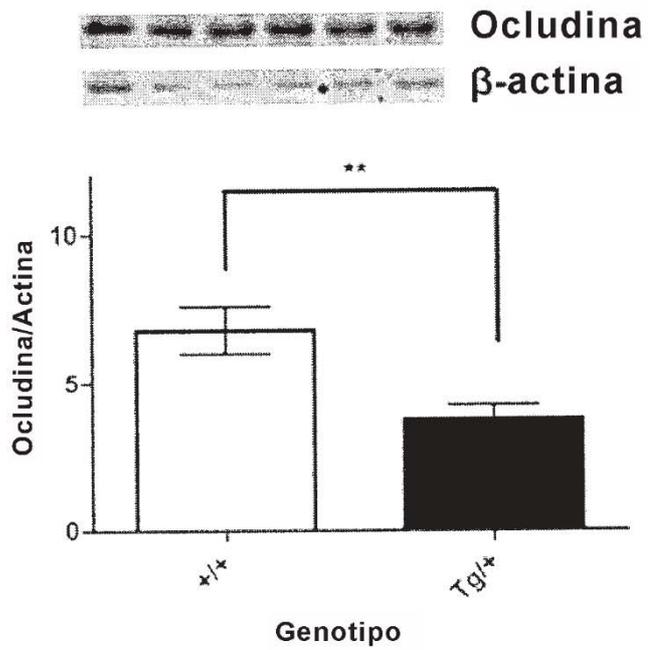
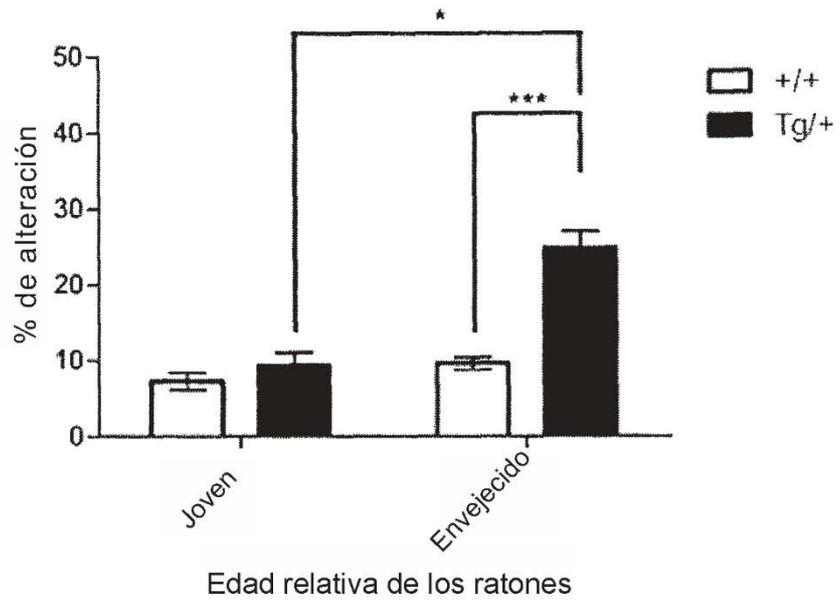


Figura 2 continuación

C



D

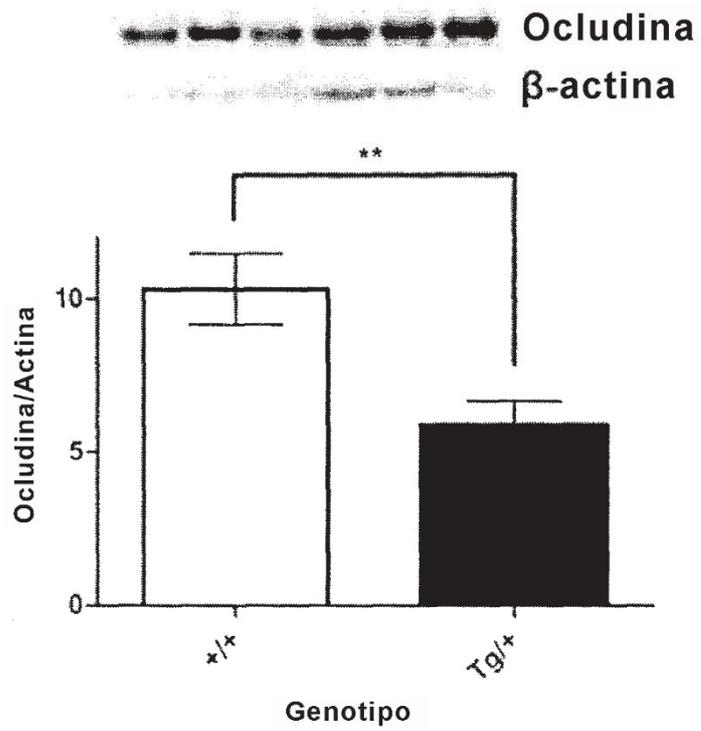


Figura 3: La angiogénesis no apoptótica induce alteraciones en la inmunorreactividad de la unión estrecha

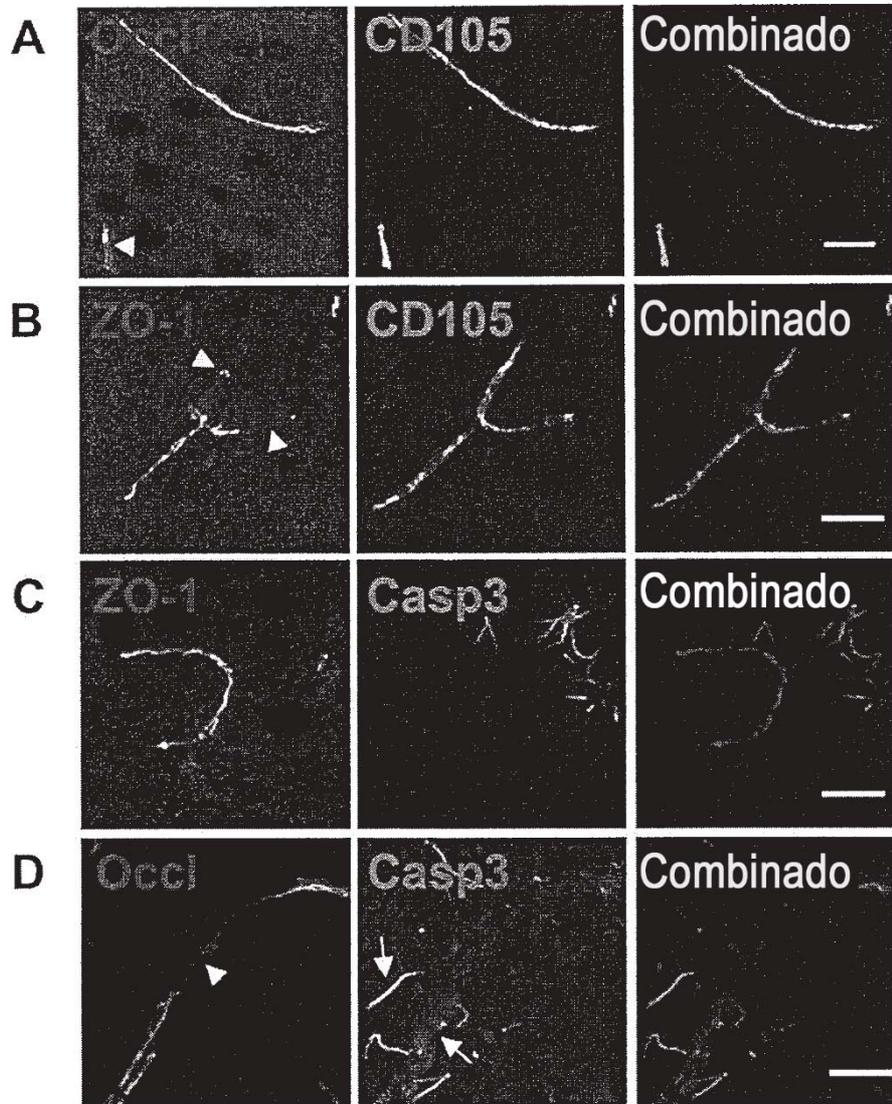


Figura 4

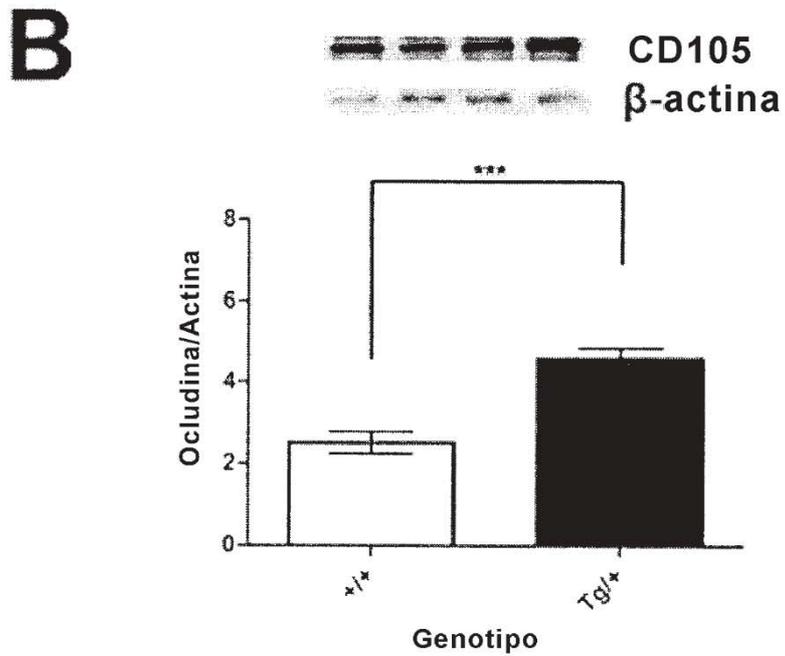
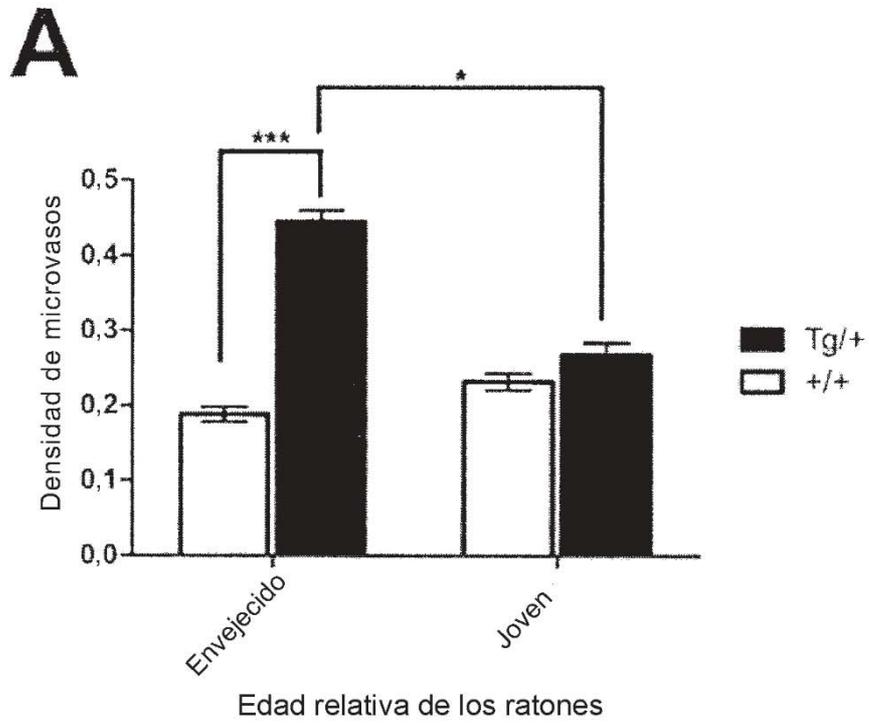
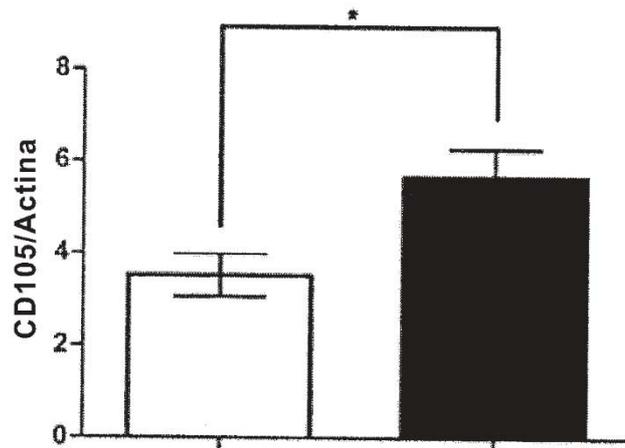
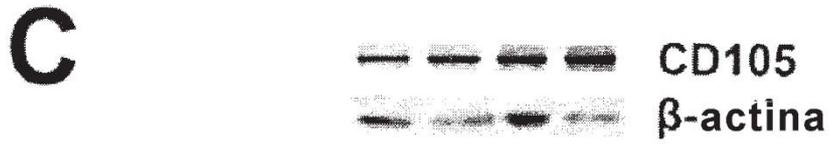
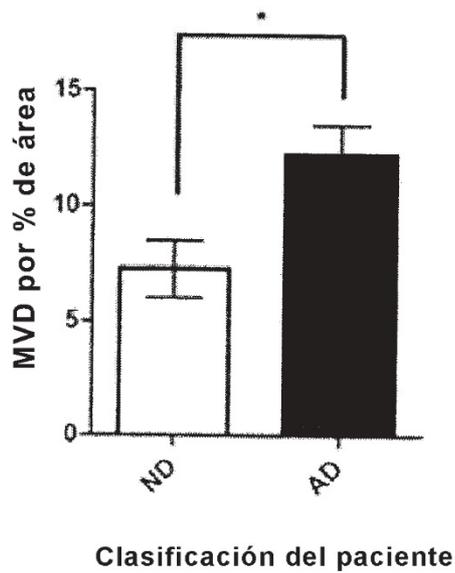


Figura 4 continuación



D



E

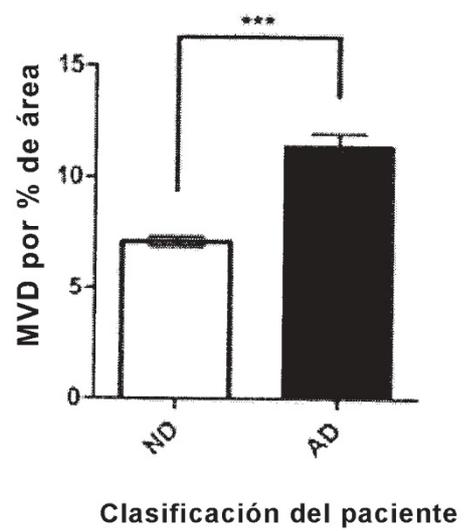
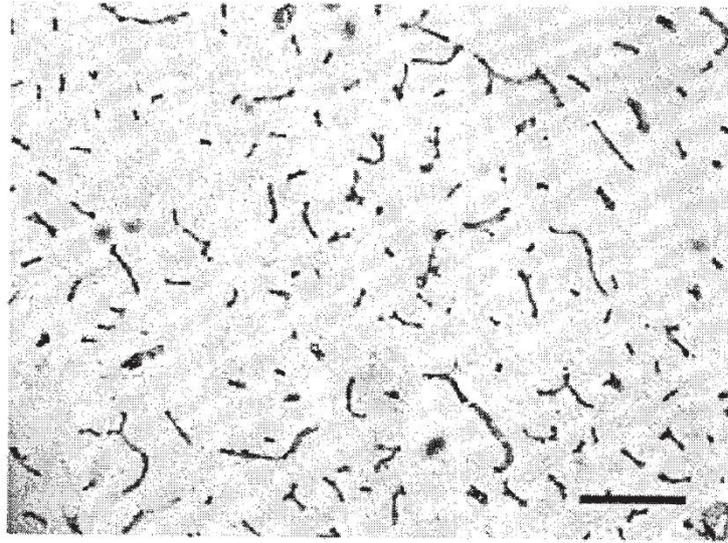


Figura 4 continuación

F



G

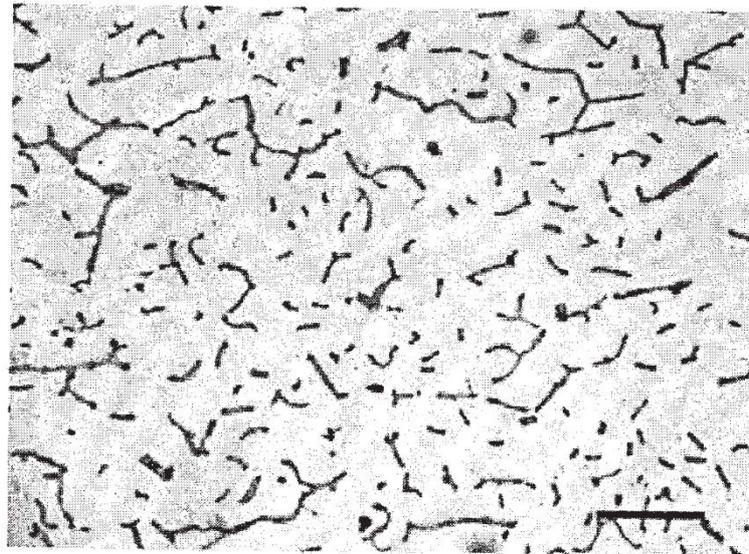


Figura 5:

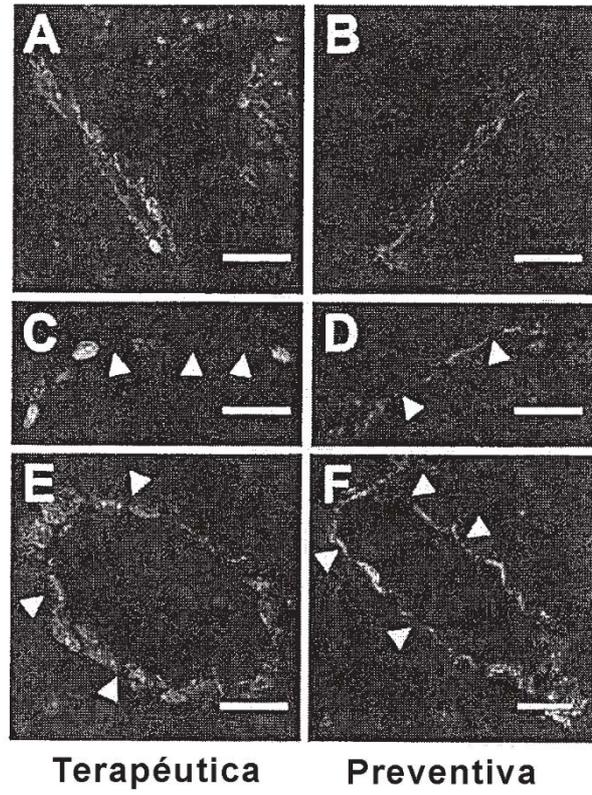


Figura 6:

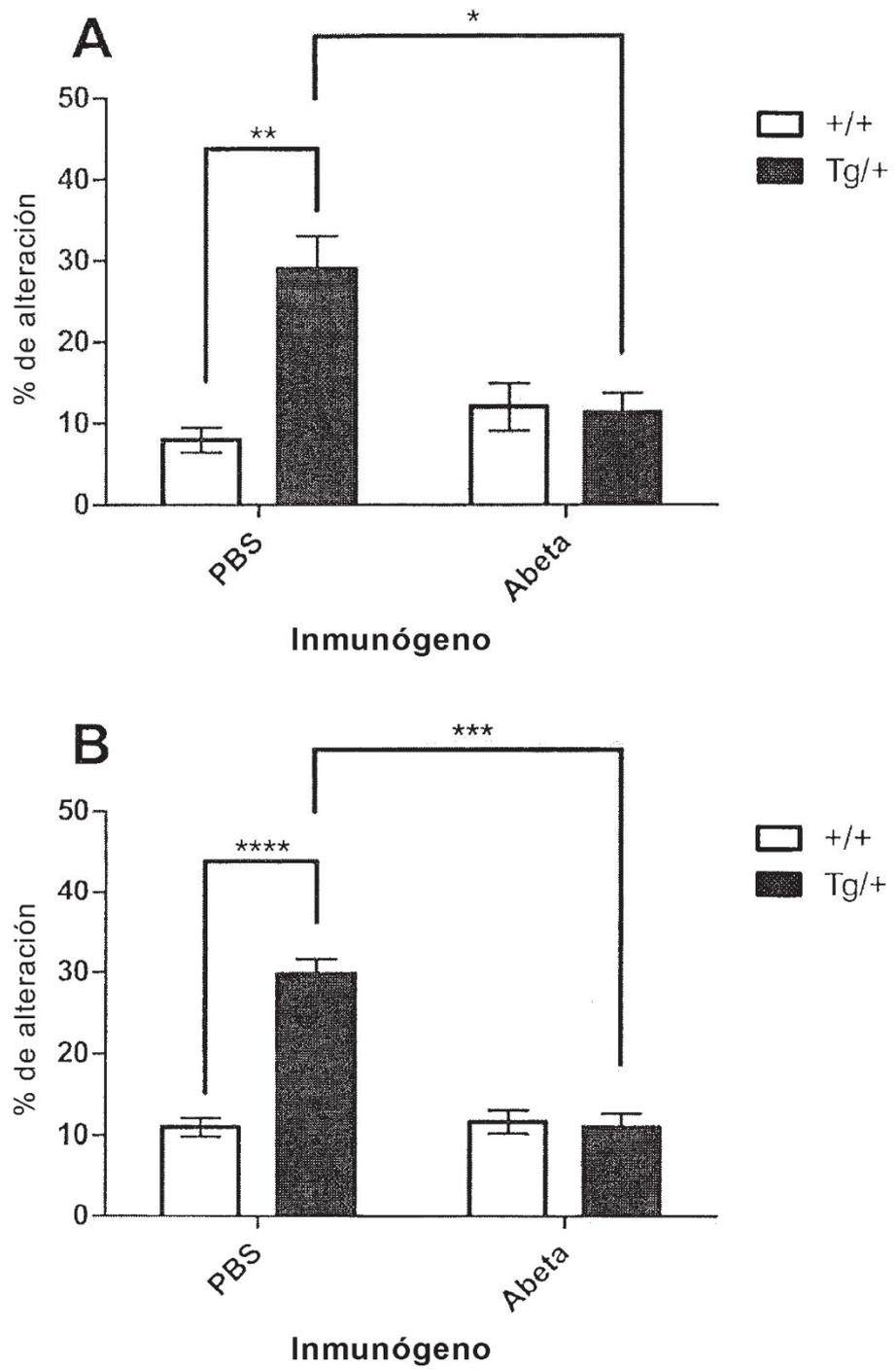


Figura 7:

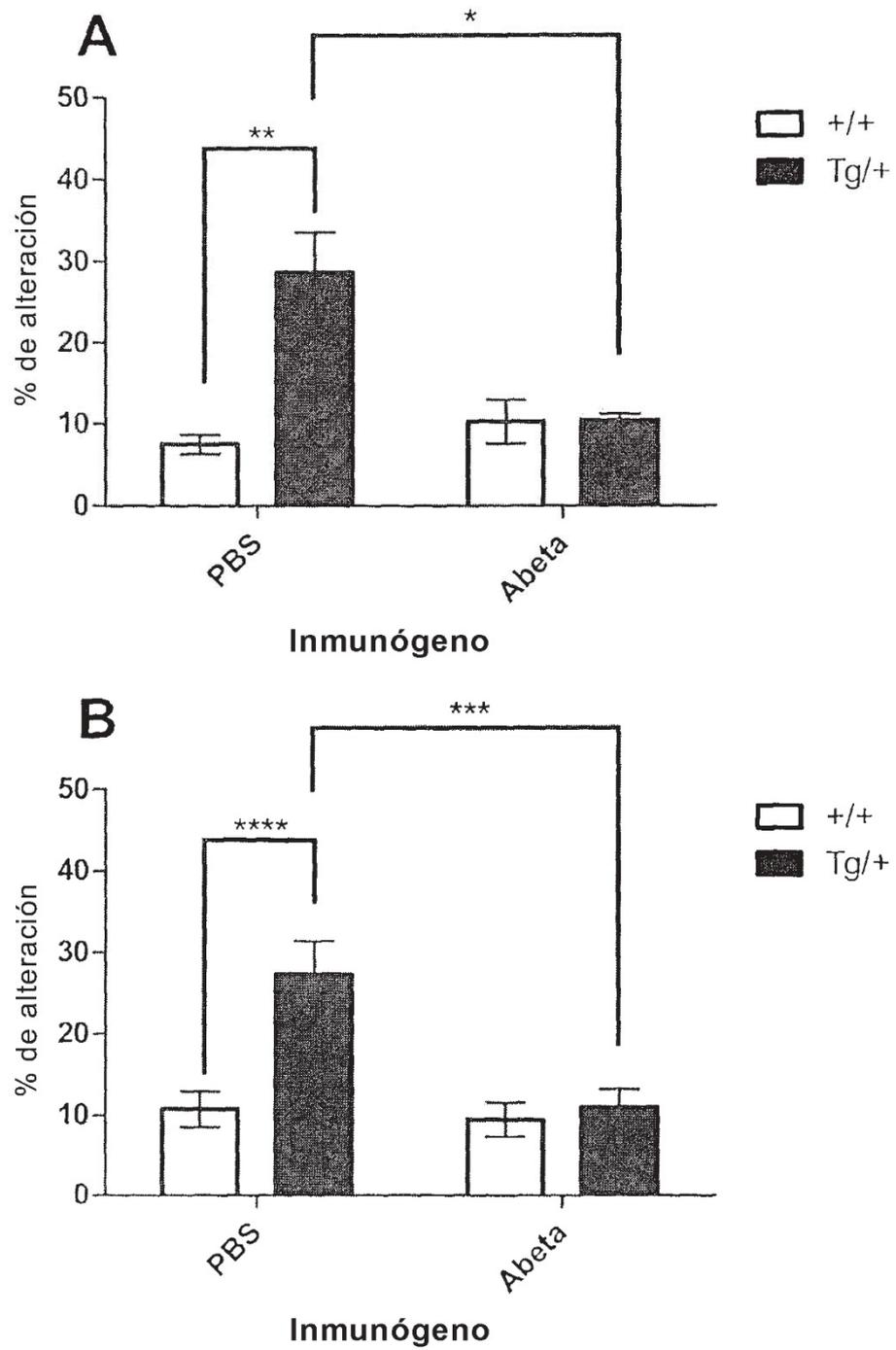


Figura 8:

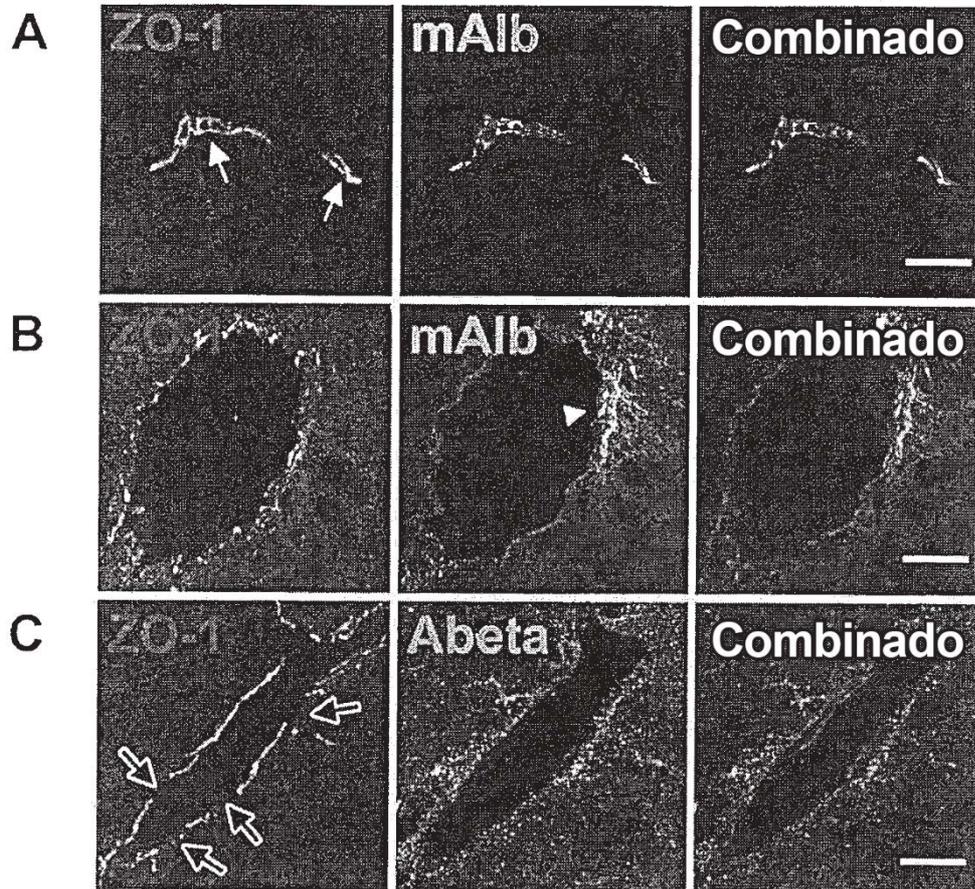


Figura 9:

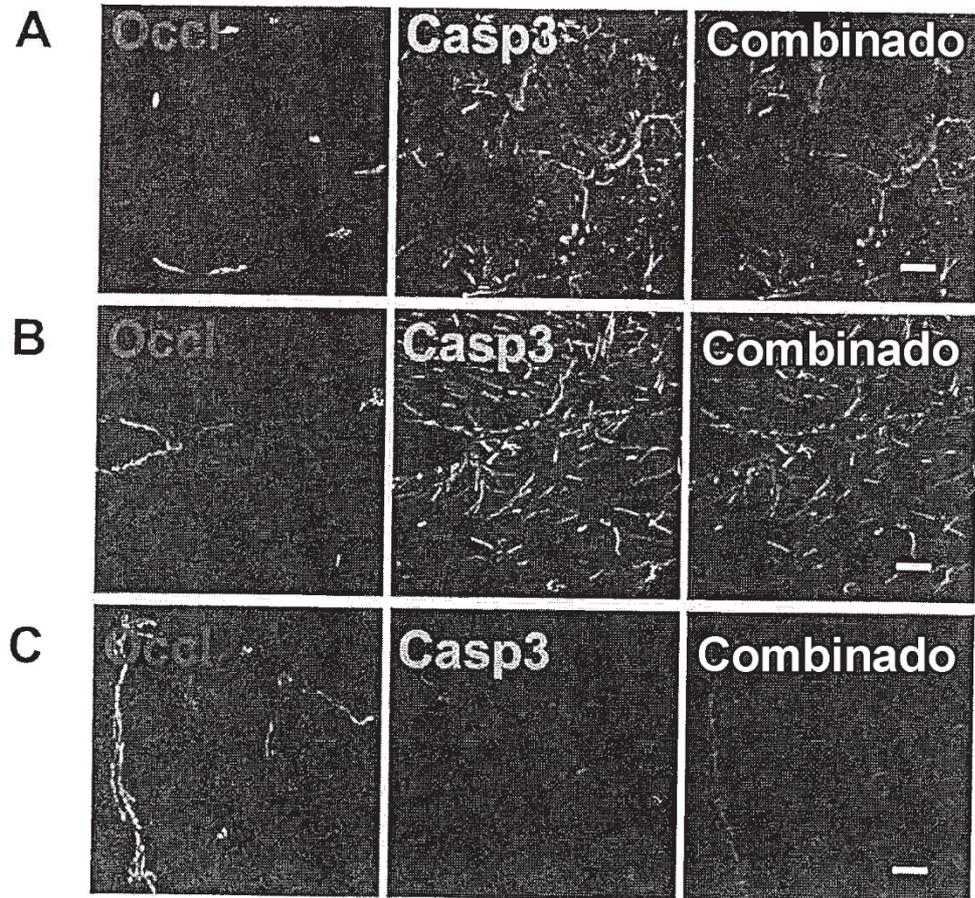


Figura 10:

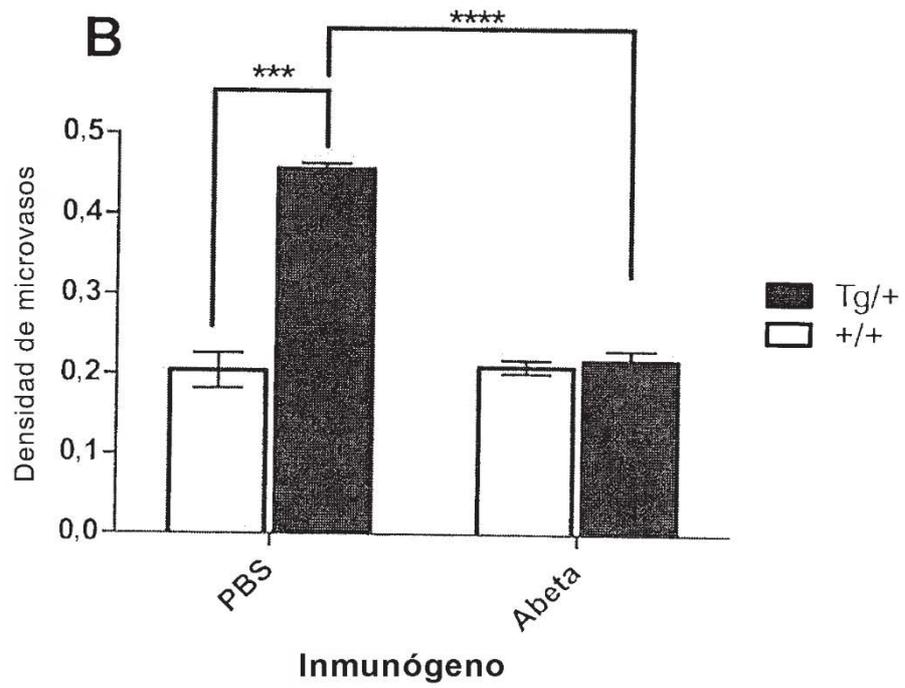
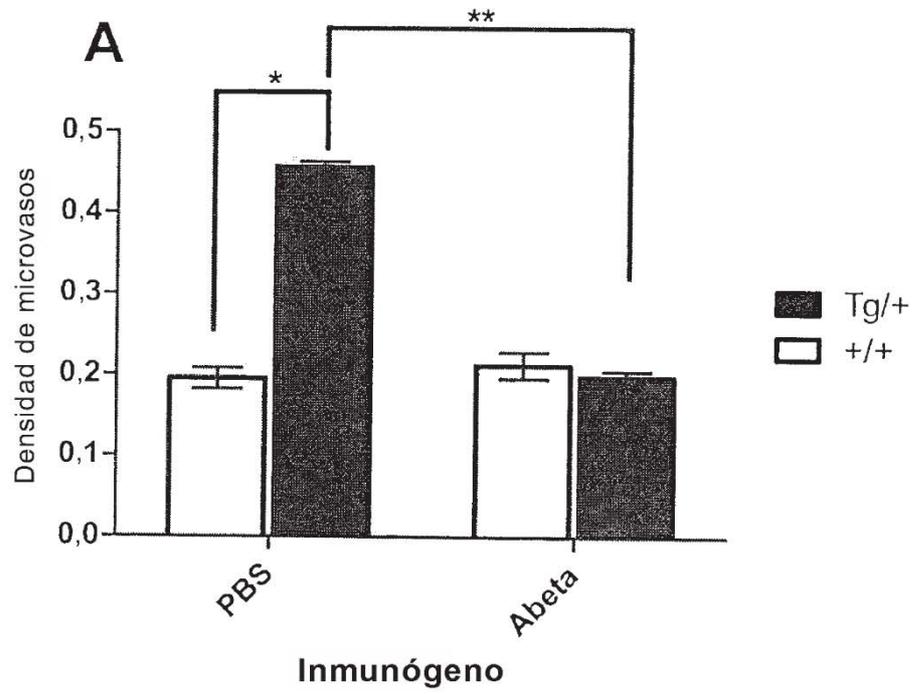


Figura 11

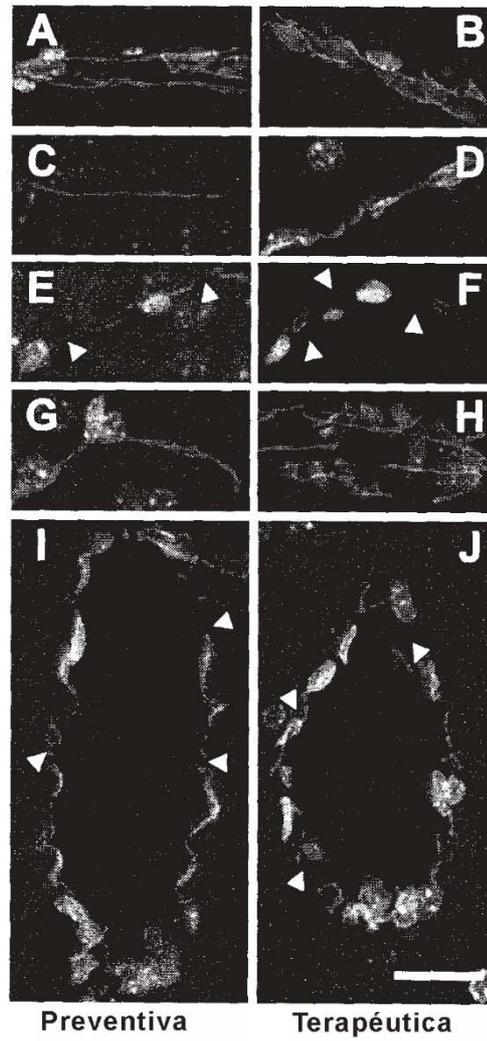


Figura 12

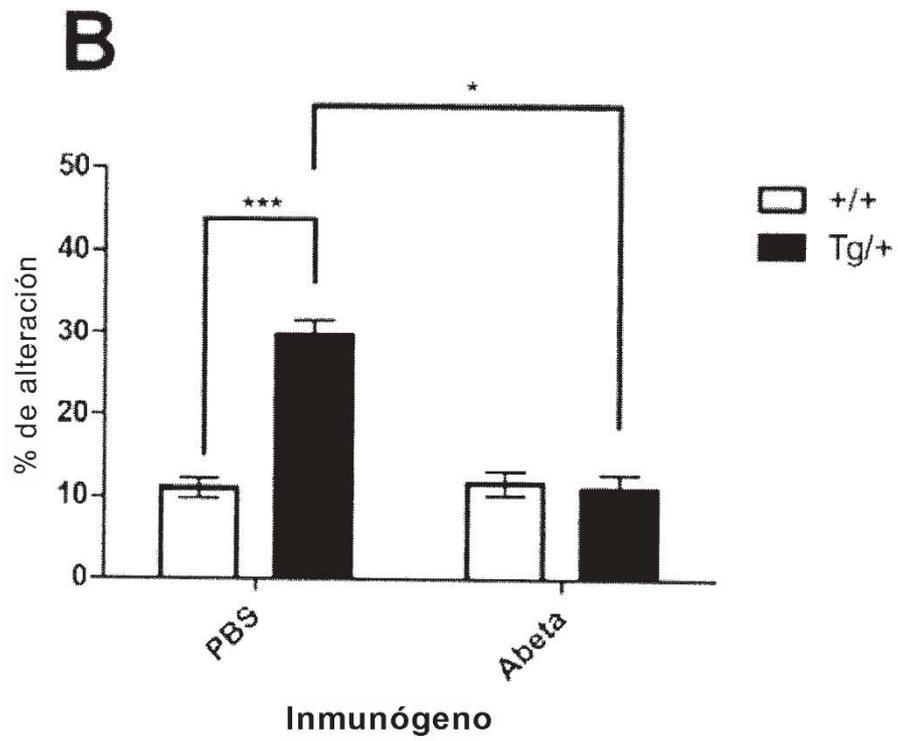
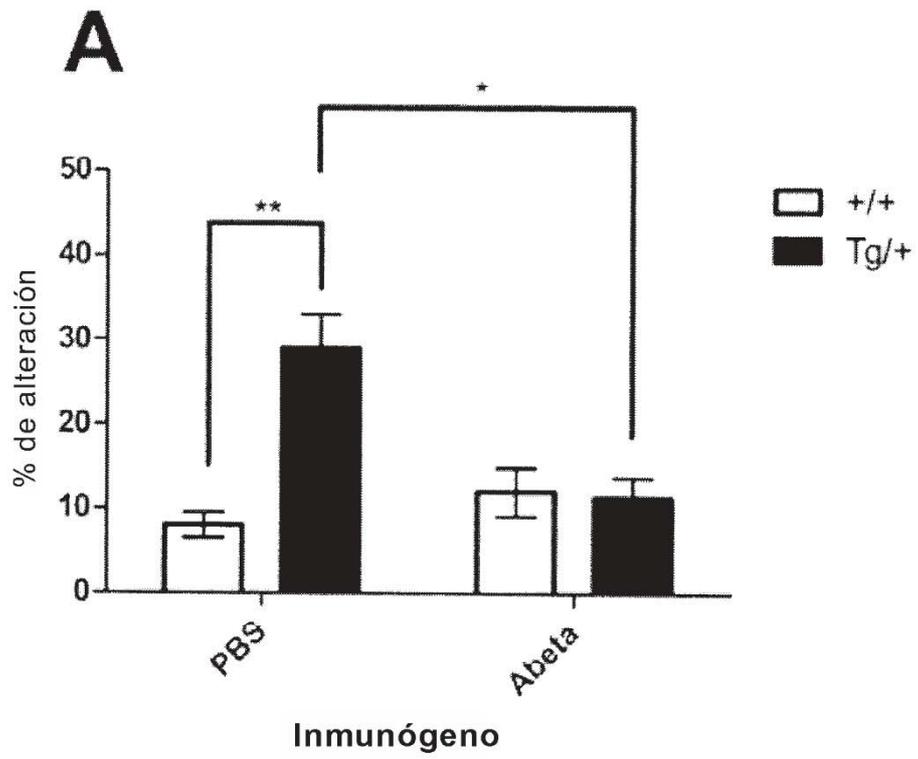


Figura 12 continuación

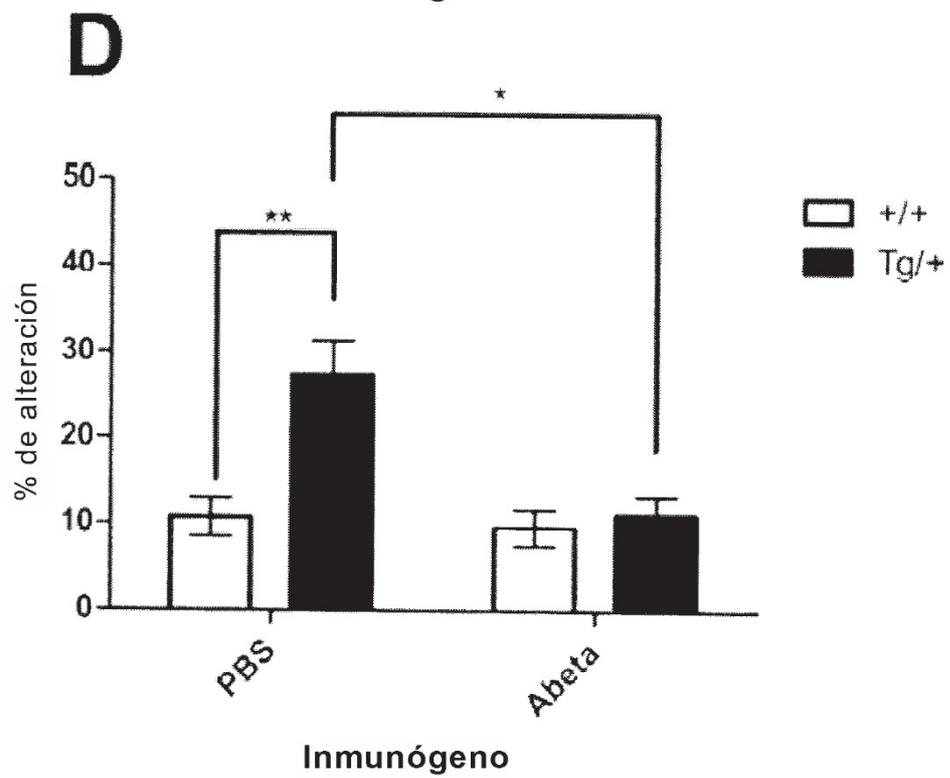
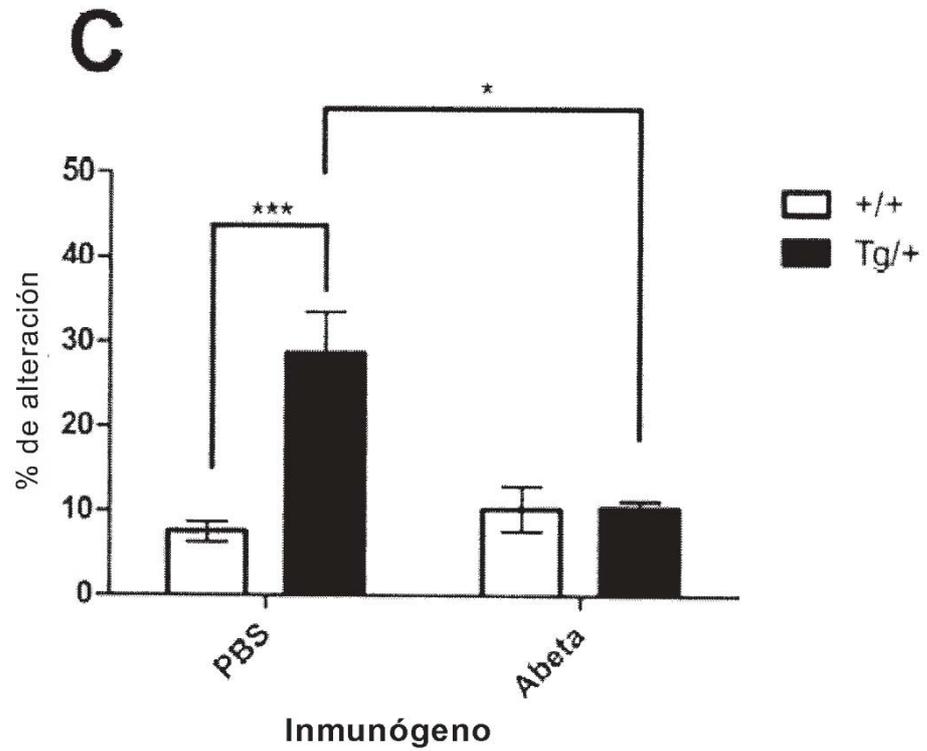


Figura 13

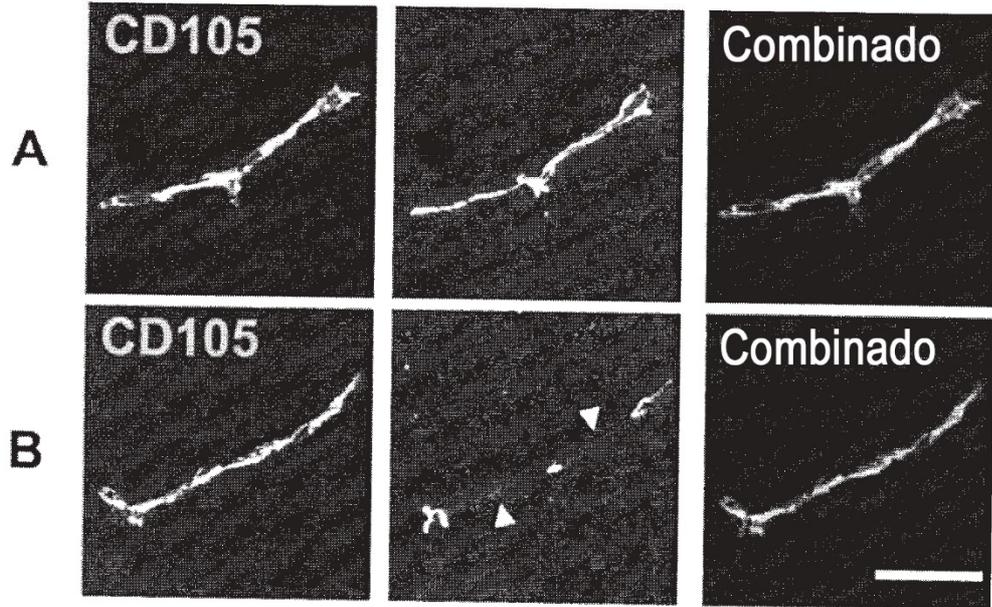


Figura 13 continuación

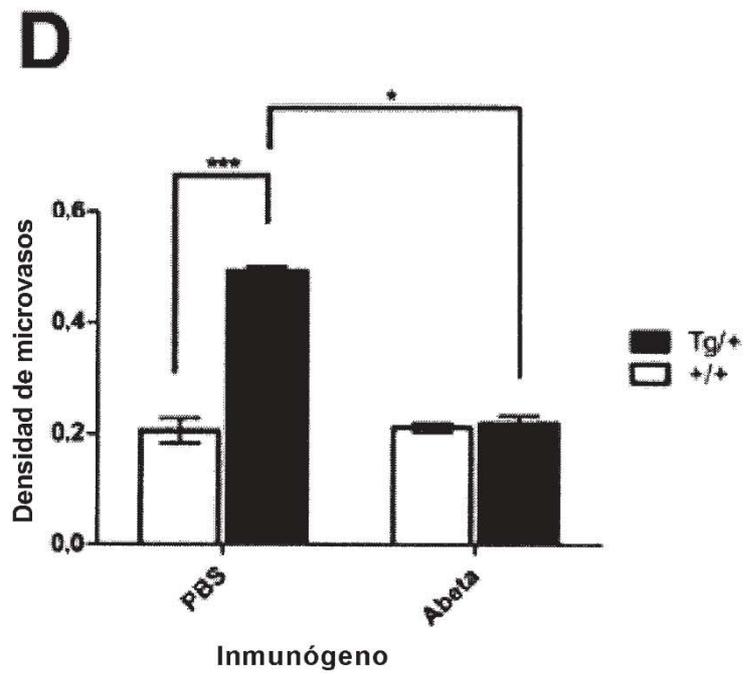
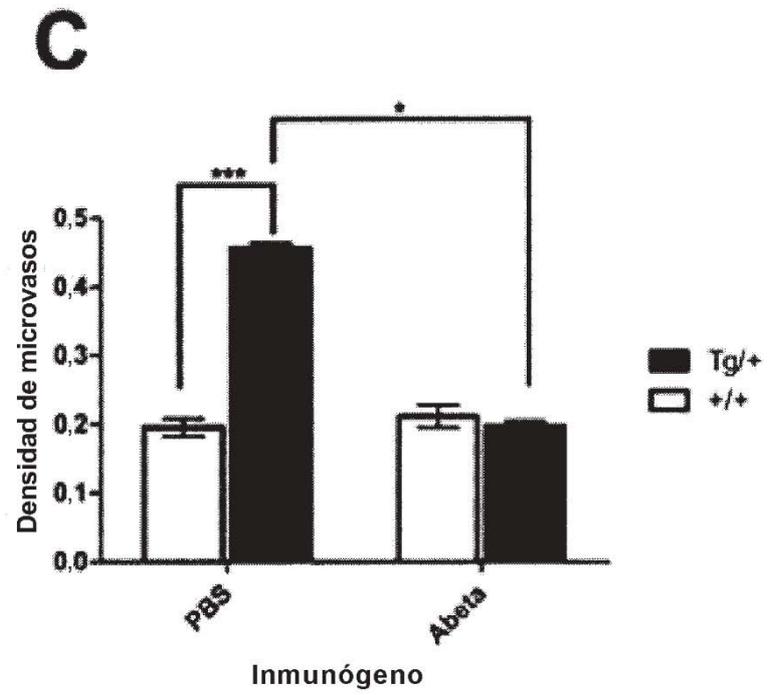


Figura 13 continuación

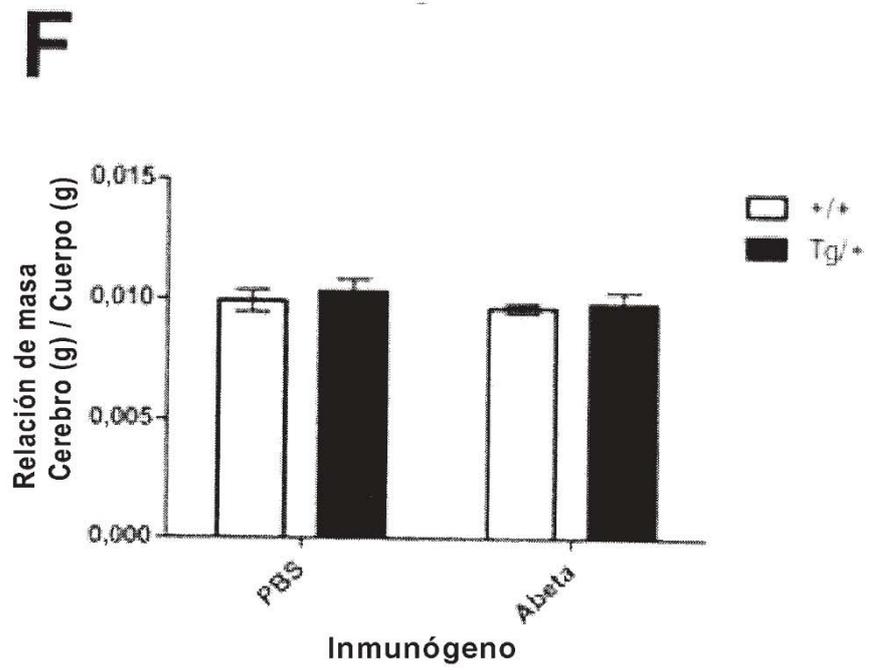
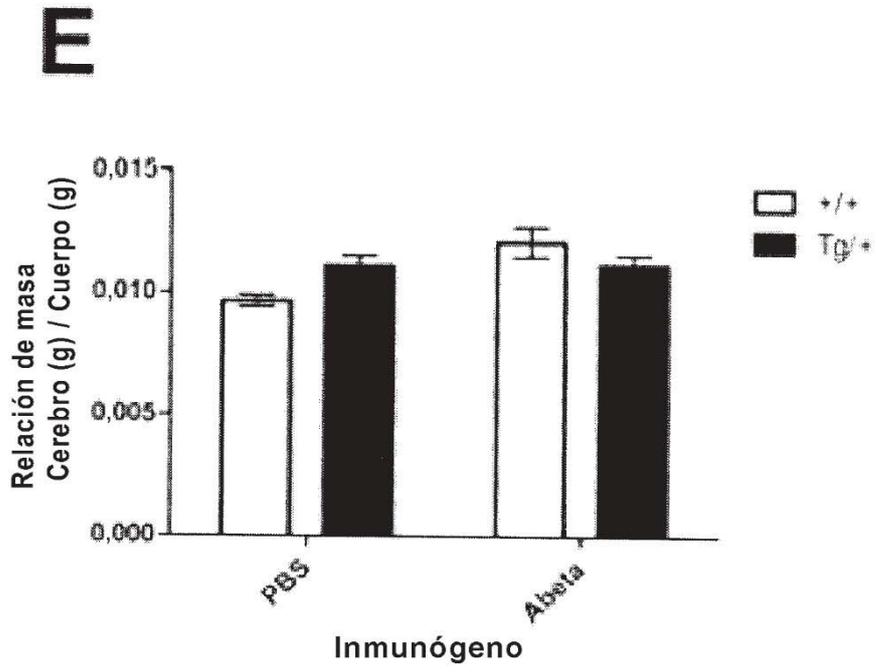


Figura 14

