



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Diagnòstic i monitorització de la malaltia  
d'Alzheimer mitjançant tècniques de ressonància  
magnètica *in vivo* en el model 3xTg-AD: Avaluació  
de l'eficàcia del tractament longitudinal amb dos  
fragments d'anticòs contra el pèptid A $\beta$ .**

**Jofre Güell Bosch**

**Tesi doctoral | Juny 2017**





**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

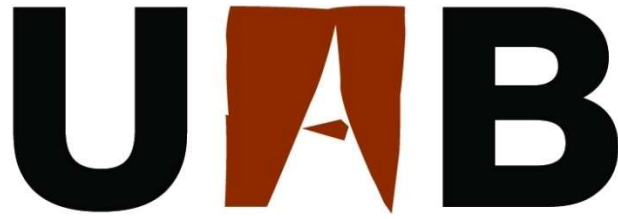
**TESI DOCTORAL**

**Diagnòstic i monitorització de la malaltia d'Alzheimer  
mitjançant tècniques de ressonància magnètica *in vivo*  
en el model 3xTg-AD: Avaluació de l'eficàcia del  
tractament longitudinal amb dos fragments d'anticòs  
contra el pèptid A $\beta$**

**Jofre Güell Bosch**

**Juny 2017**





**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Diagnòstic i monitorització de la malaltia d'Alzheimer mitjançant tècniques de ressonància magnètica *in vivo* en el model 3xTg-AD: Avaluació de l'eficàcia del tractament longitudinal amb dos fragments d'anticòs contra el pèptid A $\beta$**

**Tesi presentada per Jofre Güell Bosch per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina, sota la direcció de la Dra. Sandra Villegas Hernández**

**Treball realitzat a la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona**

Jofre Güell Bosch

Dra. Sandra Villegas Hernández

Bellaterra, Juny 2017



## AGRAÏMENTS

*Em disculpo per si m'he deixat algú en aquestes pàgines però, al cap i a la fi, les gràcies es donen amb fets, no amb paraules. Tot i així...unes quantes paraules boniques sempre van bé!*

En primer lloc, agrair a la **Sandra** per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral en un gran grup com és PFs, en un moment en què les oportunitats no sobraven, precisament, i per dirigir-la i corregir-la. També per instar-nos a celebrar, sempre, els èxits, per petits que siguin, i perquè no, també les decepcions, tot fent pinya amb cerveses entre mans. Vencimos! (Per fi!)

També vull donar les gràcies a tota la gent del laboratori de la **Mara** Dierssen, que són els primers que em van ensenyar que un laboratori és un grup de persones i que, com a tal, és un bon lloc per fer-hi grans amics. **Nasi, Maria, Mónica, Davide, Txell, Thomas, Carmen, Tizi, Silvina** i, sobretot, a tu, **Susi**! Sempre seràs la "jefa"! Merci també a l'**Esteban**! Vaig passar molt bons moments entre el lab i el vòlei platja...haha

Amb més de 4 anys al departament he tingut temps de veure passar molta gent a causa de la pròpia naturalesa d'aquest "mundillu", en el qual els camins es separen constantment, i tot i les dificultats professionals i personals a les quals t'enfrontes, he estat feliç dins el que podríem anomenar, la família de la Torre. Per això, m'agradaria donar-vos les gràcies a totes les persones que heu coincidit amb mi durant aquest període.

Als anteriors PFs per haver obert camí i posar-nos les coses més fàcils amb els scFvs i tota la pesca... **Gyo**, vam coincidir poc, però la teva aura estava present contínuament, segur que ens tornem a trobar més endavant. **Marta**, la meva jefa PF, que em vas intentar ensenyar, a contrarellotge, tot el que sabies, abans de marxar. Per sort, hem tingut més temps per anar parlant i anar-nos coneixent amb més calma. I **Bernat**, que no vam coincidir a la UAB, però és com si ho haguéssim fet! Qui ha estat PF, ho segueix essent tota la vida!

I relacionats amb vosaltres tres, tota la colla del Holy Lab, que ens van integrar al seu grup de dinars al solàrium des del primer moment. **Pulido, Serra, Font, Paula, Rita i Pol**, gràcies per les converses entre tappers, birres, fondues i tesis. No podia haver tingut millors referents!

A més, hi ha hagut certs elements de l'entorn UAB amb els quals hem compartit molt bones estones, sobretot birres en mà, **Bigotis, Irati, Ferran, Padilla, Ricardo, i Pablo** mi amooooo, gràcies a vosaltres també!! Al final baixar al bar de ciències era com entrar a la cuina de casa, que sempre trobes algú amb qui xerrar!



Als companys i companyes de la torre que han anat marxant però que també han format part d'aquesta família, amb qui he compartit molts moments, i que no han tingut mai cap problema en ajudar-me quan els ho he demanat! Gràcies a les Plantes i les Cromatines: **Laia, Eleonora, Eva i Andrea**, tot i deixar-nos gairebé sols a la 4a planta...; als ADHs: **Sergio, Julio, Joan, Cris i Isidro**; als Kinàsics: **Papito i Fani** (molta sort vagis allà on vagis!); als Ribos, **Mohammed** (l'autèntic amo de la torre, sempre compartint la saviesa acumulada), **Vivian**, a la parelleta **Diego i Marcel** (ara fent manetes a l'IBB), i a en **Javi**, un plaer haver coincidit amb tu company, segur que tot et va genial i et converteixes en un autèntic gironí!; a les RMNs, gràcies pels consells! **Ana Paula, Elena, Laura i Nuria** (al final ho aconseguiràs, ho sé, t'ho mereixes sobradament!); i, per acabar, a les Pros, **Irantzu i Carla** (que torni la teva alegria!).

Tampoc em vull oblidar de la gent dels Serveis, que també m'han ajudat quan ha calgut, moltes vegades fent més del que els hi correspondria: **Ignacio** Segovia i a tot el personal de l'estabulari (al final ens n'hem sortit, tot i els maldecaps continus que em donaven els ratolins!), **Silvia** Bronsoms (moltes gràcies!!), **Toni** Iborra, **Mar** Castillo, **Ignasi** Villarroya, **Pablo** Castro i, finalment, a la gent del SeRMN (**Miquel, Eva**, etc.) per fer que les llargues hores al Biospec fossin menys solitàries.

En especial, m'agradaria agrair a la **Silvia** Lope, la dedicació i supervisió que ha fet d'aquest treball, des d'ensenyar-me com funcionava tota la part de ressonància, fins a les correccions del text escrit, passant pels comentaris i les crítiques constructives que m'has fet durant aquests 4 anys. Sense tu, tant jo com aquest treball, estaríem molt pitjor, no en tinc cap dubte.

Agrair també a la gent de la comissió de seguiment (**Pepo, Ana Paula i Mohammed**) per aguantar la xapa cada any i assessorar-me! I als membres del tribunal (**Francisco, Ana Paula, Marta, Xavier i Carles**) per haver accedit a llegir aquest totxo i a avaluar-lo. A més, m'agradaria donar les gràcies a en **Jaume** Piñol per totes les hores compartides donant pràctiques.

Finalment, agrair als qui, des de fora de l'entorn del lab, i a vegades sense saber-ho, han fet que el meu estat anímic no defallís en els moments més difícils d'aquesta etapa. Ex-amics del GAS, (**Guille, Vice, Genís, Romero i Serrano** (que algun dia ens valoraran!)), espero veure-us una mica més el pèl a partir d'ara, i encara que estigueu lluny, els ex-amics sempre hi seran); a les **Nenis**, a tota la tropa de la **Degeneració Empordanesa**, als companys de **Borrell 187**, als **eXplaiencs**, a les transsegreres **Gemma i Montse**, a les **Genètiques** del màster, i, evidentment, a la meva **família** per haver-me procurat sempre el millor, i per donar-me totes les facilitats per a poder perseguir els meus somnis. No em vull oblidar de la **família** política i dels tupperes de la sogra, element bàsic per sobreviure. Gràcies!!!

I tot i que ara em toca a mi tancar aquesta etapa, la vida a la torre continua i la família no podria estar en millors mans. Així que també m'agradaria donar les gràcies...

A tot el personal que fa que hi hagi certa continuïtat: **Salva** (el servei és una tapadera, ja ho sabem, en realitat és un espai de trobada per a tothom, i un lloc on sempre hi ha alguna cosa per picar, merci!); **Helena** (a part de la feinada pròpiament dita (que ha estat molta!), gràcies per fer que els dilluns fossin menys dilluns!); **Magda** i **Santi** (formeu una parella entranyable! Gràcies per l'eficiència i les converses surrealistes, i disculpeu-nos per haver monopolitzat el rentaplats durant mesos...; finalment, a la gent de secretaria, **Maria**, **Mar** i **Juan Carlos**, sense vosaltres això no funcionaria ni de conya. I perquè no... també a l'**Araceli**, que sempre ens has ajudat a mantenir les aparences després de les festetes al seminari...

A totes i tots els nous predocs, l'energia i el bon rotllo dels quals, ha portat a formar un col·lectiu amb el qual ja es comencen a acumular els grans moments. **Raquel**, **Lucía**, **Pilar**, **Shuang**, **Guillem**, **Helena**, **Lu**, **Valen**, **Samu**, **Jaime**, **Francisca**, **Cris**, **Marcos** i **Jara**, intentaré seguir passant a saludar, i afegir-me a les vostres festes! No defalliu i seguiu fent pinya! La torre és vostra!

Especial agraïment per en **Jordi**, que has estat allà gairebé des del primer dia. Segueix buscant, segueix creixent, seguim compartint.

Als nous PFs, **Gabri** i **Alejandro**, la tercera generació. La vostra arribada ens ha vingut molt bé per respirar aire nou. Heu enganxat una etapa difícil (tres finals de tesi...no és poca cosa!) i espero que no us haguem cremat abans d'hora...! Seguiu els vostres instints, que teniu molt potencial.

**Gabri**, has tingut l'honor de ser el meu primer i únic deixeble...haha Lluita pel que creguis i no deixis d'insistir. Al final ho tiraràs endavant, faràs una bona tesi, i seràs un gran Doctor PF, n'estic convençut!

**Alejandro**, camarada, sort que has pujat a la 4a, no sé què haguéssim fet sense el Dj Folding...haha. Gaudeix de la vida, que aquests anys ja no tornen!! I ho petaràs igualment al lab! Ets un grande!

M'alegro d'haver-vos conegut als dos i marxo tranquil sabent que PFs queda en les millors mans. No canvieu. Gràcies nanos!

Per acabar, vull donar les gràcies a la **Lídia**, per creure sempre en mi, i confiar en les meves capacitats més que del que jo mateix ho faig. Per voler ser la meva companya en aquest viatge que és la vida, per créixer junts, per estar sempre al meu costat, per aguantar-me (tasca especialment complicada en alguns moments d'aquesta tesi) i per entendre'm i estimar-me incondicionalment. T'estimo.

I, expressament, he guardat per al final el meu agraïment infinit a dues persones sense les quals, segurament, hagués estat impossible que aquest doctorat arribés a bon port: la **Laia** i la **Gisela**. Junts hem format la segona generació PF (rebatejats com a Professionals del Feltre).

Les meves germanes científiques, dues grans investigadores i millors persones. Feia poc que havíeu començat els màsters quan vaig arribar i hem estat més de 4 anys colze a colze al laboratori. Ens hem trobat problemes de tot tipus i situacions complicades, però sempre que m'ha calgut ajuda heu estat allà. Em quedo però, amb els bons moments que hem viscut (que han estat moltíssims!) dins i fora del lab. Els que em feien arribar al lab de bon humor tot i que els experiments i els resultats no sortissin (dia rere dia) i els que feien que sempre em vingués de gust fer plans amb vosaltres.

No puc posar en paraules tot el meu agraïment i admiració cap a vosaltres, així que us haureu de conformar amb un gràcies, de tot cor. Només espero que hàgiu gaudit tant de mi com jo ho he fet de vosaltres, i us desitjo lo millor en els vostres projectes post-tesi, siguin els que siguin. **Laia, Gis**, aquesta tesi es tant meva com vostra.

*Hi ha una tornada d'una cançó de Txarango a la qual, no sé perquè, li trobo cert paral·lelisme amb tot això del laboratori, el doctorat i la tesi. Diu així:*

*Ja sé que ens trencarem,  
que ens caurà a terra el món,  
ja sé que plorarem  
i que podem perdre-ho tot.  
Per sempre no hi ha res  
i el tren del temps no frena,  
tinc un desig només:  
que tot valgui la pena!!*

Creieu-me que, si això ha valgut la pena, ha estat gràcies a vosaltres!

**MOLTES GRÀCIES A TOTHOM!!**

ÍNDEX DE FIGURES	ix
ÍNDEX DE TAULES	xiii
ÍNDEX D'EQUACIONS	xiii
ABREVIACIONS	xv
RESUM	xxiii
ABSTRACT	xxv
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1.1 Context social i històric de la malaltia d'Alzheimer (AD) .....	1
1.2 La component genètica de l'Alzheimer .....	2
1.2.1 APP .....	3
1.2.2 PSEN1/PSEN2.....	4
1.2.3 APOE .....	5
1.3 Fisiopatologia de l'Alzheimer.....	6
1.3.1 La cascada amiloide.....	6
1.3.2 La relació entre l'A $\beta$ i la resta de trets característics de l'AD.....	11
1.4 Teràpies contra l'Alzheimer.....	13
1.4.1 Esperances de la immunoteràpia .....	14
1.4.2 El cas del bapineuzumab i els scFvs h3D6-WT i EL .....	17
1.5 Diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer .....	20
1.5.1 Biomarcadors al CSF.....	22
1.5.2 Tomografia d'emissió de positrons.....	23
1.5.3 <i>Ressonància magnètica nuclear (RMN)</i> .....	23
1.5.3.1 <u>Fonaments de la tècnica</u> .....	23
1.5.3.1.1 <i>Temps de relaxació</i> .....	27
1.5.3.2 <u>MRI</u> .....	28

1.5.3.2.1	<i>Imatges ponderades en <math>T_1</math></i> .....	30
1.5.3.2.2	<i>Imatges ponderades en <math>T_2</math></i> .....	31
1.5.3.2.3	<i>Imatges ponderades en densitat protònica</i> .....	32
1.5.3.2.4	<i>Imatges de difusió (DWI, de l'anglès diffusion weighted imaging)</i> .....	32
1.5.3.3	<u><i>MRS</i></u> .....	33
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I OBJECTIUS</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Animals</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Obtenció dels animals</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.2</b>	<b><i>Genotipat dels ratolins</i></b> .....	<b>40</b>
3.1.2.1	<u><i>Extracció del DNA</i></u> .....	40
3.1.2.2	<u><i>PCR</i></u> .....	41
3.1.2.3	<u><i>Gel d'agarosa</i></u> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Obtenció de les proteïnes terapèutiques</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Expressió i purificació dels scFvs (h3D6-WT i h3D6-EL)</i></b> .....	<b>43</b>
3.2.1.1	<u><i>Processos previs</i></u> .....	43
3.2.1.1.1	<i>Soques d'Escherichia coli (E.coli)</i> .....	43
3.2.1.1.2	<i>Vectors d'expressió</i> .....	44
3.2.1.1.3	<i>Medis de cultiu dels bacteris</i> .....	45
3.2.1.1.4	<i>Antibiòtics</i> .....	45
3.2.1.1.5	<i>Producció de DNA recombinant</i> .....	45
3.2.1.1.6	<i>Preparació de les cèl·lules competents i transformació</i> .....	46
3.2.1.1.7	<i>Purificació de la proteasa TEV</i> .....	47
3.2.1.2	<u><i>Expressió preparativa de les proteïnes</i></u> .....	48
3.2.1.3	<u><i>Purificació preparativa de les proteïnes</i></u> .....	49

3.2.1.3.1	<i>Separació de fraccions, solubilització i replegament</i> .....	49
3.2.1.3.2	<i>Digestió amb la proteasa TEV</i> .....	50
3.2.1.3.3	<i>Cromatografia d'afinitat amb metall immobilitzat (IMAC)</i> .....	51
3.2.1.3.4	<i>Cromatografia d'intercanvi catiònic (CEX)</i> .....	51
3.2.1.3.5	<i>Cromatografia CEX analítica</i> .....	52
3.2.1.3.6	<i>Extracció de LPS, canvi de tampó i preparació de les alíquotes finals</i> ..	53
3.2.1.3.7	<i>Espectrometria de masses</i> .....	54
3.2.1.3.8	<i>Electroforesi SDS-PAGE (de l'anglès, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)</i> .....	54
<b>3.2.2</b>	<b><i>MAb-m3D6</i></b> .....	<b>55</b>
3.2.2.1	<u><i>Obtenció del mAb-m3D6 (de l'anglès, monoclonal Antibody-mouse 3D6)</i></u> ..	55
3.2.2.2	<u><i>Expressió i purificació del mAb-m3D6</i></u> .....	56
3.2.2.2.1	<i>Descongelació i expansió del cultiu</i> .....	56
3.2.2.2.2	<i>Inoculació al bio-reactor</i> .....	57
3.2.2.2.3	<i>Purificació de l'anticòs</i> .....	58
3.2.2.2.4	<i>Lots d'anticòs monoclonal purificat</i> .....	58
<b>3.3</b>	<b><i>Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6-WT i EL</i></b> .....	<b>59</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Disseny experimental</i></b> .....	<b>59</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Sessions MRI/MRS</i></b> .....	<b>59</b>
3.3.2.1	<u><i>Seqüències de MRI</i></u> .....	60
3.3.2.1.1	<i>Tripilot</i> .....	60
3.3.2.1.2	<i>Referències anatòmiques</i> .....	60
3.3.2.1.3	<i>Mapes d'ADC</i> .....	61
3.3.2.1.4	<i>Imatges d'alta resolució ponderades en T<sub>2</sub></i> .....	62

3.3.2.1.5	Mapes de $T_2$ .....	63
3.3.2.2	<u>MRS</u> .....	63
3.3.2.2.1	Homogeneïtzació del camp .....	63
3.3.2.2.2	Comprovació de l'ajust d'homogeneïtat .....	64
3.3.2.2.3	Supressió del pic d'aigua .....	64
3.3.2.2.4	Espectroscòpia dels metabòlits .....	64
<b>3.3.3</b>	<b>Anàlisi de les imatges</b> .....	<b>65</b>
3.3.3.1	<u>Volumetria</u> .....	65
3.3.3.2	<u><math>T_2</math></u> .....	66
3.3.3.3	<u>ADC</u> .....	68
<b>3.3.4</b>	<b>Anàlisi dels espectres</b> .....	<b>69</b>
3.3.4.1	<u>Processament</u> .....	69
3.3.4.2	<u>Selecció d'espectres i metabòlits</u> .....	70
<b>3.3.5</b>	<b>Sacrifici dels animals i emmagatzematge de les mostres</b> .....	<b>71</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Histologia</b> .....	<b>72</b>
3.3.6.1	<u>Immunofluorescència</u> .....	73
3.3.6.1.1	Condicions experimentals.....	73
3.3.6.1.2	Adquisició d'imatges.....	74
3.3.6.1.3	Anàlisi de les imatges .....	74
3.3.6.2	<u>Immunohistoquímica</u> .....	75
3.3.6.2.1	Condicions experimentals.....	75
3.3.6.2.2	Adquisició i anàlisi d'imatges.....	76
<b>3.3.7</b>	<b>Anàlisis bioquímiques</b> .....	<b>77</b>
3.3.7.1	<u>Realització dels homogenats</u> .....	77
3.3.7.2	<u>Quantificació de l'<math>A\beta_{1-42}</math></u> .....	78

3.3.7.2.1	<i>Procediment experimental</i> .....	78
3.3.7.2.2	<i>Representació dels resultats</i> .....	79
3.3.7.3	<u><i>Anàlisi d'inflamació</i></u> .....	79
3.3.7.3.1	<i>Procediment experimental</i> .....	79
3.3.7.3.2	<i>Representació dels resultats</i> .....	80
3.3.7.4	<u><i>Quantificació de colesterol i transaminases</i></u> .....	80
<b>3.4</b>	<b>Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic</b> .....	<b>81</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Disseny experimental</i></b> .....	<b>81</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Sessions MRI i anàlisi de les imatges</i></b> .....	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J.</b> .....	<b>83</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Disseny experimental</i></b> .....	<b>83</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Sessions MRI/MRS</i></b> .....	<b>84</b>
<b>3.6</b>	<b>Anàlisi estadístic</b> .....	<b>85</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6-WT i EL</b> .....	<b>87</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Comprovacions prèvies</i></b> .....	<b>87</b>
4.1.1.1	<u><i>Genotipat dels ratolins</i></u> .....	87
4.1.1.2	<u><i>Purificació dels scFvs h3D6-WT i EL</i></u> .....	88
<b>4.1.2</b>	<b><i>MRI</i></b> .....	<b>93</b>
4.1.2.1	<u><i>Volumetria</i></u> .....	93
4.1.2.1.1	<i>Volum de l'hipocamp</i> .....	94
4.1.2.1.2	<i>Volum del còrtex</i> .....	97
4.1.2.1.3	<i>Volum del cervell</i> .....	99



4.1.2.1.4	<i>Volum del cerebel</i> .....	101
4.1.2.1.5	<i>Volum del bulb olfactori</i> .....	105
4.1.2.1.6	<i>Volum de l'encèfal</i> .....	105
4.1.2.2	<u><i>T<sub>2</sub></i></u> .....	<u>108</u>
4.1.2.2.1	<i>T<sub>2</sub> a l'hipocamp</i> .....	108
4.1.2.2.2	<i>T<sub>2</sub> al còrtex</i> .....	110
4.1.2.2.3	<i>T<sub>2</sub> a la zona del còrtex entorrinal</i> .....	113
4.1.2.3	<u><i>ADC</i></u> .....	<u>115</u>
4.1.2.3.1	<i>ADC a l'hipocamp</i> .....	115
4.1.2.3.2	<i>ADC al còrtex</i> .....	118
<b>4.1.3</b>	<b><i>MRS</i></b> .....	<b>120</b>
4.1.3.1	<u><i>Perfil metabòlic de l'hipocamp</i></u> .....	<u>120</u>
4.1.3.1.1	<i>N-acetil aspartat (NAA)</i> .....	121
4.1.3.1.2	<i>Mio-Inositol (mIns)</i> .....	121
4.1.3.1.3	<i>NAA/mIns</i> .....	123
4.1.3.1.4	<i>Taurina (Tau)</i> .....	124
4.1.3.1.5	<i>Glutamina (Gln)</i> .....	125
4.1.3.1.6	<i>Fenilalanina (PAI)</i> .....	126
4.1.3.1.7	<i>Altres metabòlits</i> .....	128
4.1.3.2	<u><i>Perfil metabòlic del còrtex</i></u> .....	<u>128</u>
4.1.3.2.1	<i>N-acetil aspartat (NAA)</i> .....	129
4.1.3.2.2	<i>Mio-Inositol (mIns)</i> .....	129
4.1.3.2.3	<i>NAA/mIns</i> .....	130
4.1.3.2.4	<i>Taurina (Tau)</i> .....	131
4.1.3.2.5	<i>Glutamina (Gln)</i> .....	132

4.1.3.2.6	Fenilalanina (PAI).....	133
4.1.3.2.7	Altres metabòlits.....	133
<b>4.1.4</b>	<b>Histologia .....</b>	<b>136</b>
4.1.4.1	<u>Anàlisi del marcatge d'A<math>\beta</math> .....</u>	<u>136</u>
4.1.4.1.1	Recompte de neurones mAb-6E10 positives (6E10+) .....	137
4.1.4.1.2	Intensitat del marcatge del mAb-6E10.....	139
4.1.4.2	<u>Anàlisi de plaques amiloides.....</u>	<u>144</u>
<b>4.1.5</b>	<b>Anàlisis bioquímiques.....</b>	<b>147</b>
4.1.5.1	<u>Quantificació d'A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>.....</u>	<u>147</u>
4.1.5.2	<u>Anàlisi d'inflamació.....</u>	<u>148</u>
4.1.5.3	<u>Anàlisi de colesterol i transaminases.....</u>	<u>150</u>
4.1.5.3.1	Colesterol.....	150
4.1.5.3.2	Transaminases.....	151
<b>4.2</b>	<b>Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic.....</b>	<b>153</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J.....</b>	<b>157</b>
<b>4.3.1</b>	<b>MRI: Volumetria .....</b>	<b>157</b>
<b>4.3.2</b>	<b>MRS.....</b>	<b>159</b>
4.3.2.1	<u>Perfil metabòlic de l'hipocamp.....</u>	<u>159</u>
4.3.2.1.1	N-acetil aspartat (NAA) .....	160
4.3.2.1.2	Mio-inositol (mIns).....	160
4.3.2.1.3	NAA/mIns.....	161
4.3.2.1.4	Altres metabòlits.....	162
4.3.2.2	<u>Perfil metabòlic del còrtex.....</u>	<u>165</u>
4.3.2.2.1	N-acetil aspartat (NAA) .....	165

4.3.2.2.2	<i>Mio-Inositol (mIns)</i> .....	165
4.3.2.2.3	<i>NAA/mIns</i> .....	166
4.3.2.2.4	<i>Altres metabòlits</i> .....	167
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b>	<b>171</b>
5.1	<b>Posada a punt del mètode de diagnòstic d'AD en el model 3xTg-AD</b> .....	<b>171</b>
5.1.1	<i>Caracterització del model 3xTg-AD als 12 mesos</i> .....	<b>171</b>
5.1.2	<i>Desenvolupament regional i temporal de la malaltia</i> .....	<b>176</b>
5.2	<b>Eficàcia i seguretat dels tractaments amb scFv-h3D6-WT i scFv-h3D6-EL</b> .....	<b>179</b>
5.2.1	<i>scFv-h3D6-WT</i> .....	<b>179</b>
5.2.2	<i>scFv-h3D6-EL</i> .....	<b>182</b>
5.3	<b>Aproximació a la visualització d'edema vasogènic</b> .....	<b>184</b>
5.4	<b>Combinació del tractament amb scFv-h3D6-WT i els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J</b> .....	<b>186</b>
5.5	<b>Limitacions de l'estudi i possibles millores de cares a futurs estudis</b> .....	<b>187</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>193</b>
6.1	<b>Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6-WT i EL</b> .....	<b>193</b>
6.2	<b>Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic</b> .....	<b>195</b>
6.3	<b>Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J</b> .....	<b>195</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>197</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.</b> Les isoformes i mutacions més comunes a la proteïna precursora del pèptid amiloide (APP) .....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema de l'evolució de la hipòtesi de la cascada amiloide (ACH) .....	7
<b>Figura 3.</b> Processament de la proteïna precursora del pèptid amiloide (APP).....	9
<b>Figura 4.</b> Estructura tridimensional i fibril·lar de l'A $\beta_{1-40}$ . .....	10
<b>Figura 5.</b> Representació dels diferents tipus de fragments d'anticòs.....	16
<b>Figura 6.</b> Representació del model de l'estructura tridimensional del scFv-h3D6. ....	19
<b>Figura 7.</b> Progressió de la malaltia d'Alzheimer .....	21
<b>Figura 8.</b> Representació del comportament dels nuclis en diferents situacions. ....	24
<b>Figura 9.</b> Representació de la pertorbació de la magnetització macroscòpica d'una mostra rotant a la freqüència de ressonància .....	26
<b>Figura 10.</b> Representació de l'aplicació de la transformada de Fourier (TF) .....	27
<b>Figura 11.</b> Representació dels temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) i transversal ( $T_2$ ).....	28
<b>Figura 12.</b> Temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) de diferents teixits.....	31
<b>Figura 13.</b> Temps de relaxació transversal ( $T_2$ ) de diferents teixits .....	32
<b>Figura 14.</b> Exemple d'un perfil metabòlic de cervell de ratolí .....	35
<b>Figura 15.</b> Mapa del vector d'expressió dels scFv.....	44
<b>Figura 16.</b> Esquema simplificat del procés de purificació dels scFv .....	49
<b>Figura 17.</b> Esquema del disseny experimental del tractament longitudinal .....	59
<b>Figura 18.</b> Geometria utilitzada a les imatges per tensor de difusió (DTI) i als mapes de $T_2$ .....	62
<b>Figura 19.</b> Geometria utilitzada a les imatges d'alta resolució ponderades en $T_2$ .....	62
<b>Figura 20.</b> Geometria dels vòxels .....	65
<b>Figura 21.</b> Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el volum .....	66
<b>Figura 22.</b> Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el $T_2$ .....	67

<b>Figura 23.</b> Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el coeficient de difusió aparent (ADC) .....	68
<b>Figura 24.</b> Límits de les zones tallades per histologia .....	72
<b>Figura 25.</b> Àrea seleccionada per al recompte de plaques .....	77
<b>Figura 26.</b> Pauta temporal de les administracions i les sessions d'imatge per ressonància magnètica (MRI) .....	81
<b>Figura 27.</b> Pauta temporal d'administració de les combinacions de scFv-h3D6-WT amb els pèptids mimètics (MP) de les apolipoproteïnes E i J.....	83
<b>Figura 28.</b> Genotipat de diferents ratolins de l'estudi longitudinal .....	88
<b>Figura 29.</b> Anàlisi SDS-PAGE de les diferents etapes del procés de purificació .....	89
<b>Figura 30.</b> Anàlisi mitjançant una cromatografia d'intercanvi catiònic (CEX) .....	90
<b>Figura 31.</b> Anàlisi analític mitjançant una cromatografia d'intercanvi de cations (CEX) .....	91
<b>Figura 32.</b> Anàlisi SDS-PAGE dels passos finals de preparació de la proteïna per a ser administrada .....	92
<b>Figura 33.</b> Anàlisi del volum de l'hipocamp en el temps .....	95
<b>Figura 34.</b> Anàlisi de l'evolució del volum de l'hipocamp al llarg del temps. ....	96
<b>Figura 35.</b> Anàlisi del volum del còrtex en el temps .....	97
<b>Figura 36.</b> Anàlisi de l'evolució del volum del còrtex al llarg del temps .....	98
<b>Figura 37.</b> Anàlisi del volum del cervell en el temps.....	100
<b>Figura 38.</b> Anàlisi de l'evolució del volum del cervell al llarg del temps .....	101
<b>Figura 39.</b> Anàlisi del volum del cerebel en el temps .....	102
<b>Figura 40.</b> Anàlisi de l'evolució del volum del cerebel al llarg del temps .....	103
<b>Figura 41.</b> Anàlisi del volum del bulb olfactori en el temps .....	104
<b>Figura 42.</b> Anàlisi de l'evolució del volum del bulb olfactori al llarg del temps .....	105
<b>Figura 43.</b> Anàlisi del volum de l'encèfal en el temps .....	106
<b>Figura 44.</b> Anàlisi de l'evolució del volum de l'encèfal al llarg del temps .....	107

<b>Figura 45.</b> Anàlisi del T <sub>2</sub> a l'hipocamp en el temps. ....	109
<b>Figura 46.</b> Anàlisi de l'evolució del T <sub>2</sub> a l'hipocamp al llarg del temps. ....	110
<b>Figura 47.</b> Anàlisi del T <sub>2</sub> al còrtex en el temps ....	111
<b>Figura 48.</b> Anàlisi de l'evolució del T <sub>2</sub> al còrtex al llarg del temps. ....	112
<b>Figura 49.</b> Anàlisi del T <sub>2</sub> a la zona del còrtex entorrinal en el temps ....	113
<b>Figura 50.</b> Anàlisi de l'evolució del T <sub>2</sub> a la zona del còrtex entorrinal al llarg del temps .....	114
<b>Figura 51.</b> Anàlisi del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp en el temps. ....	116
<b>Figura 52.</b> Anàlisi de l'evolució del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp al llarg del temps .....	117
<b>Figura 53.</b> Anàlisi del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex en el temps .....	119
<b>Figura 54.</b> Anàlisi de l'evolució del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex al llarg del temps .....	120
<b>Figura 55.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns a l'hipocamp .....	122
<b>Figura 56.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de la Tau, la Gln i la PAI, a l'hipocamp .....	125
<b>Figura 57.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns al còrtex. ....	130
<b>Figura 58.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de la Tau, la Gln i la PAI, al còrtex .....	132
<b>Figura 59.</b> Recompte del número de neurones 6E10+ a l'hipocamp i al còrtex .....	137
<b>Figura 60.</b> Recompte del número de neurones 6E10+ a les capes CA1 i CA2/CA3 de l'hipocamp .....	138
<b>Figura 61.</b> Imatge de la doble immunofluorescència (NeuN i 6E10) a la capa CA1 de l'hipocamp .....	139
<b>Figura 62.</b> Imatge de la doble immunofluorescència (NeuN i 6E10) a la capa piramidal V del còrtex .....	140

<b>Figura 63.</b> Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 a l'hipocamp i al còrtex .....	141
<b>Figura 64.</b> Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 al còrtex distribuïda per categories .....	142
<b>Figura 65.</b> Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 a les capes CA1 i CA2/CA3 de l'hipocamp .....	143
<b>Figura 66.</b> Quantificació de les plaques d'A $\beta$ a tot el còrtex cerebral .....	144
<b>Figura 67.</b> Diferència del tipus de placa amiloide existent entre genotips.....	145
<b>Figura 68.</b> Imatge de plaques amiloides a les zones dels còrtexs entorrinal i piriforme .....	146
<b>Figura 69.</b> Quantificació de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> a partir d'homogenats de teixit .....	147
<b>Figura 70.</b> Quantificació de la interleucina 6 (IL-6) a l'hipocamp i al còrtex .....	149
<b>Figura 71.</b> Quantificació dels nivells de colesterol en sang .....	151
<b>Figura 72.</b> Quantificació dels nivells de transaminases aspartat (AST) i alanina (ALT) en sang .....	152
<b>Figura 73.</b> Valors del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp .....	153
<b>Figura 74.</b> Valors del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex .....	154
<b>Figura 75.</b> Anàlisi del volum de les diferents zones seleccionades.....	158
<b>Figura 76.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns a l'hipocamp .....	161
<b>Figura 77.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Glu, Gln, GSH i GPC+PCh, a l'hipocamp .....	162
<b>Figura 78.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Tau i Ala, a l'hipocamp.....	163
<b>Figura 79.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns al còrtex .....	166
<b>Figura 80.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Glu, Gln, Asp i GPC+PCh, al còrtex .....	167

<b>Figura 81.</b> Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Tau i Ala, al còrtex .....	168
--	-----

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1.</b> Masses moleculars observades i esperades segons la formació dels ponts disulfur....	93
<b>Taula 2.</b> Quantificació dels nivells de diferents metabòlits a l'hipocamp, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) .....	127
<b>Taula 3.</b> Quantificació dels nivells de diferents metabòlits al còrtex, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).....	135
<b>Taula 4.</b> Quantificació dels nivells de diferents metabòlits a l'hipocamp, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).....	164
<b>Taula 5.</b> Quantificació dels nivells de diferents metabòlits al còrtex, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).....	169

## ÍNDIX D'EQUACIONS

<b>Equació 1.</b> Equació de la freqüència de precessió de Larmor ( $\nu_0$ ) .....	25
<b>Equació 2.</b> Equació de la diferència entre estats energètics .....	25





## ABREVIACIONS

$\Delta E$	Separació energètica entre les diferents orientacions dels espins nuclears
$\delta$	Desplaçament químic
$\theta$	Angle de gir
$\lambda$	Longitud d'ona
$\vec{\mu}$	Moment magnètic nuclear
2xYT	Medi de cultiu amb doble quantitat de llevat i triptona, de l'anglès <i>Yeast and Triptone</i>
2HG	2-Hidroxiglutarat
3xTg-AD	Model de ratolí, triple transgènic, de la malaltia d'Alzheimer
A $\beta$	Pèptid beta-amiloide
ABCA7	Gen que codifica per la proteïna del mateix nom, de l'anglès <i>ATP-binding cassette sub-family A member 7</i>
ACH	Hipòtesi de la cascada amiloide, de l'anglès <i>Amyloid Cascade Hypothesis</i>
AD	Malaltia d'Alzheimer, de l'anglès <i>Alzheimer's Disease</i>
ADC	Coefficient de difusió aparent, de l'anglès <i>Apparent Diffusion Coefficient</i>
AGAUR	Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca
AICD	Domini C-terminal intracel·lular de l'APP, de l'anglès <i>APP Intracellular C-terminal Domain</i>
Ala	Alanina
ALT	Alanina Transaminasa
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoic
APH-1	De l'anglès <i>Anterior Pharynx-defective 1 protein</i>
apoE	Apolipoproteïna E
APOE	Gen que codifica per l'apolipoproteïna E
apoJ	Apolipoproteïna J
APOJ	Gen que codifica per l'apolipoproteïna J
APP	Proteïna precursora del pèptid amiloide, de l'anglès, <i>Amyloid Precursor Protein</i>
ARIA-E	Anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide, de l'anglès <i>Amyloid-Related Imaging Abnormalities – Edema</i>
ARIA-H	Anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide, de l'anglès <i>Amyloid-Related Imaging Abnormalities – Microhemorrhage</i>
Asp	Aspartat
AST	Aspartat Transaminasa
ATCC	De l'anglès, <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	De l'anglès, <i>Adenosine Triphosphate</i>

b	Factor de difusió
B <sub>0</sub>	Camp magnètic extern
B <sub>1</sub>	Camp magnètic addicional
BACE1	Enzim de tall de l'APP pel lloc β, de l'anglès <i>Beta-site APP Cleaving Enzyme 1</i>
BBB	Barrera hematoencefàlica, de l'anglès <i>Blood Brain Barrier</i>
BCA	De l'anglès, <i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
BIN1	Gen que codifica per la proteïna del mateix nom, de l'anglès <i>Myc box-dependent-interacting protein 1</i>
bp	Parells de bases, de l'anglès <i>Base Pairs</i>
BSA	Albúmina de sèrum boví, de l'anglès <i>Bovine Serum Albumin</i>
BW	Amplada de banda, de l'anglès <i>Bandwidth</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CAA	Angiopatia amiloide cerebral, de l'anglès <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i>
CD33	Gen que codifica per la proteïna del mateix nom, de l'anglès <i>sialic acid binding Ig-like lectin 3</i>
CDR	Regions determinants complementàries, de l'anglès <i>Complementary Determining regions</i>
CEEAH	Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal i Humana
CEX	Cromatografia d'intercanvi catiònic, de l'anglès <i>Cationic Exchange chromatography</i>
C <sub>H</sub>	Domini constant de la cadena pesada, de l'anglès <i>Heavy chain Constant domain</i>
Cho	Colina
CIBER-BBN	Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa – Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina
Cit	Citrat
C <sub>L</sub>	Domini constant de la cadena lleugera, de l'anglès <i>Light chain Constat domain</i>
CNS	Sistema nerviós central, de l'anglès <i>Central Nervous System</i>
Cr	Creatina
-CrCH <sub>2</sub>	Grup metilè de la creatina simulat negativament.
CR1	Receptor del complement de tipus 1, de l'anglès <i>Complement Receptor Type 1</i>
CRLB	De l'anglès, <i>Crámer-Rao Lower Bounds</i>
CSF	Líquid cefaloraquídi, de l'anglès <i>Cerebrospinal Fluid</i>
C-terminal	Carboxil terminal
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DARPin	De l'anglès, <i>Designed Ankyrin Repeat Proteins</i>
DCS	Deteriorament cognitiu subtil
ddH <sub>2</sub> O	Aigua doblement desionitzada

DMEM	De l'anglès, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic, de l'anglès <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	De l'anglès, <i>Deoxynucleotides triphosphate</i>
DPX	De l'anglès, <i>Di-N-Butyle Phthalate in Xylene</i>
DTI	Imatges basades en tensors de difusió, de l'anglès <i>Diffusion Tensor Imaging</i>
DTT	Dithiothreitol
DWI	Imatges de difusió, de l'anglès <i>Diffusion Weighted Imaging</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	De l'anglès, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Assaig immunoabsorbent lligat a l'enzim, de l'anglès <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMA	Agència Europea dels Medicaments, de l'anglès <i>European Medicines Agency</i>
endA	Gen de la endonucleasa A
EOAD	AD d'aparició precoç, de l'anglès <i>Early Onset Alzheimer's Disease</i>
EPI	De l'anglès, <i>Echo Planar Imaging</i>
Eth	Etanol
EU	Unitats d'endotoxines
Fab	Fragment d'unió a l'antigen, de l'anglès <i>Fragment Antigen-Binding</i>
FAD	AD familiar, de l'anglès <i>Familial Alzheimer's Disease</i>
FASTMAP	De l'anglès, <i>Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections</i>
Fc	Fragment cristal·litzable
FCS	De l'anglès, <i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	Administració de medicaments i d'aliments d'Estats Units, de l'anglès <i>Food and Drug Administration</i>
FDG-PET	Tomografia d'emissió de positrons basada en la fluoro-desoxi-glucosa, de l'anglès <i>Fluoro-Desoxy-Glucose Positron Emission Tomography</i>
FEDER	Fons Europeus per al Desenvolupament Regional
FID	De l'anglès, <i>Free Induction Decay</i>
FOV	Camp de visió, de l'anglès <i>Field Of Vision</i>
FPLC	De l'anglès, <i>Fast Liquid Protein Chromatography</i>
Fv	Fragment variable
GABA	Àcid $\gamma$ -aminobutíric, de l'anglès <i>gamma-Aminobutyric acid</i>
GFP	Proteïna verd fluorescent, de l'anglès <i>Green Fluorescent Protein</i>
Glc	Glucosa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamat

Glyc	Glicina
gor	Gen de la glutatió reductasa
GPC	Glicerofosfocolina
GSH	Glutatió
GSK-3 $\beta$	De l'anglès, <i>Glycogen Synthase Kinase 3<math>\beta</math></i>
GSSG	Glutatió oxidat
GWAS	Estudis d'associació del genoma complet, de l'anglès <i>Genome-Wide Association Studies</i>
HDLs	Lipoproteïnes de densitat alta, de l'anglès <i>High Density Lipoproteins</i>
His-Tag	Cua d'histidines
HSPG	De l'anglès, <i>Heparan Sulfate Proteoglicans</i>
Hz	Hertz
I	Espín nuclear
IDE	Enzim degradador d'insulina, de l'anglès <i>Insulin-Degrading Enzyme</i>
IgG	Immunoglobulina G
IL	Interleucina
IMAC	Cromatografia d'afinitat amb un metall immobilitzat, de l'anglès <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	De l'anglès, <i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IVIGs	Immunoglobulines intravenoses, de l'anglès <i>Intravenous Immunoglobulins</i>
IWG	Grup internacional de treball, de l'anglès <i>International Working Group</i>
Kb	quilobases
KDa	quilodàltons
Kn	kanamicina
Lac	Lactat
LB	Luria-Bertani
LC Model	De l'anglès, <i>Linear Combination Model</i>
LDLR	Receptors de lipoproteïnes de baixa intensitat, de l'anglès <i>Low Density Lipoprotein Receptors</i>
Lip	Lípids
LLEB	Laboratori de Luminescència i Espectroscòpia de Biomolècules de la UAB
LOAD	AD d'aparició tardana, de l'anglès <i>Late Onset Alzheimer's Disease</i>
LPS	Lipopolisacàrids
LRP1	De l'anglès, <i>LDL Related Protein Receptor 1</i>
LTD	Depressió a llarg termini, de l'anglès <i>Long-Term Depression</i>
LTP	Potenciació a llarg termini, de l'anglès <i>Long-Term Potentiation</i>
M <sub>0</sub>	Magnetització en estat d'equilibri

mAb	Anticòs monoclonal, de l'anglès <i>Monoclonal Antibody</i>
mAb-m3D6	Anticòs monoclonal 3D6 de ratolí, de l'anglès <i>Monoclonal Antibody - mouse 3D6</i>
MALDI-TOF	De l'anglès, <i>Matrix-Assisted Lase Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MAPT	Gen que codifica per la proteïna tau, de l'anglès <i>Microtubule-Associated Protein Tau</i>
MBP	Proteïna d'unió a la maltosa, de l'anglès <i>Maltose-Binding Protein</i>
MCI	Deteriorament cognitiu lleu, de l'anglès <i>Mild Cognitive Impairment</i>
mIns	Mio-Inositol
MM	Macromolècules
MP	Pèptid mimètic, de l'anglès <i>Mimetic Peptide</i>
MRI	Imatge per ressonància magnètica, de l'anglès <i>Magnetic Resonance Image</i>
MRS	Espectroscòpia per ressonància magnètica, de l'anglès <i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
MSME	De l'anglès, <i>Multi-Spin Multi-Echo</i>
MTA	De l'anglès, <i>Material Transfer Agreement</i>
MTX	Matriu d'adquisició, de l'anglès <i>Matrix</i>
Mw	Pes molecular, de l'anglès <i>Molecular Weight</i>
M <sub>xy</sub>	Components longitudinals de la magnetització
M <sub>z</sub>	Component transversal de la magnetització
NAA	N-acetil aspartat
NAAG	N-acetil aspartilglutamat
nAChR	Receptors nicotínics d'acetilcolina, de l'anglès <i>Nicotinic Acetylcholine Receptors</i>
NFTs	Cabdells neurofibril·lars, de l'anglès <i>Neurofibrillary Tangles</i>
NGS	De l'anglès, <i>Normal Goat Serum</i>
NIA-AA	Institut Nacional d'Envel·liment i Associació de l'Alzheimer, de l'anglès <i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i>
NMDA	N-metil-D-aspartat
NR	Nombre de Repeticions
N-terminal	Amino terminal
NTg	No transgènic
O/N	Tota la nit, de l'anglès <i>Overnight</i>
OD	Densitat òptica, de l'anglès <i>Optical Density</i>
p/v	Pes/volum
P1CALM	Gen que codifica per la proteïna amb el mateix nom, de l'anglès <i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PAI	Fenilalanina
PBS	Tampó fosfat salí, de l'anglès <i>Phosphate Buffer Serum</i>

PCh	Fosfocolina
PCr	Fosfocreatina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Fosforiletanolamina, de l'anglès <i>Phosphorylethanolamine</i>
PEN2	De l'anglès, <i>Presenilin Enhance Protein 2</i>
PET	Tomografia d'emissió de positrons, de l'anglès <i>Positron Emission Tomography</i>
Pgc	Propilè-glicol
PHFs	Filaments helicoidals aparellats, de l'anglès <i>Paired Helical Filaments</i>
pI	Punt isoelèctric
PiB	De l'anglès, <i><sup>11</sup>C-Pittsburg-Compound B</i>
ppm	Parts per milió
PRESS	De l'anglès, <i>Point-Resolved Spectroscopy</i>
PS1	Presenilina 1
PS1-KI	De l'anglès, <i>knock in</i> per la mutació PS1 <sub>M146V</sub>
PS2	Presenilina 2
PSEN1	Gen que codifica per la presenilina 1
PSEN2	Gen que codifica per la presenilina 2
PVDF	De l'anglès, <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
RAGE	De l'anglès, <i>Receptors for Advanced Glycation End products</i>
RARE	De l'anglès, <i>Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement</i>
recA	Gen de recombinació A
RF	Pols de radiofreqüència
RFU	Unitats de fluorescència relativa, de l'anglès <i>Relative Fluorescence Units</i>
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RNA	Àcid ribonucleic, de l'anglès <i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	Regió d'interès, de l'anglès <i>Region Of Interest</i>
ROS	Espècies reactives de l'oxigen, de l'anglès <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Revolucions per minut
RT	Temperatura ambient, de l'anglès <i>Room Temperature</i>
SAD	AD esporàdic, de l'anglès <i>Sporadic Alzheimer's Disease</i>
SCAC	Servei de Cultius cel·lulars, producció d'Anticossos i Citometria de la UAB
scFv h3D6-EL	Fragment variable de cadena senzilla allargat, provinent de l'anticòs 3D6 humanitzat, de l'anglès <i>Elongated Single Chain Variable Fragment of humanized 3D6</i>
scFv h3D6-WT	Fragment variable de cadena senzilla estàndard, provinent de l'anticòs 3D6 humanitzat, de l'anglès <i>Wild Type Single Chain Variable Fragment of humanized 3D6</i>

scFv	Fragment variable de cadena senzilla, de l'anglès <i>Single Chain Variable Fragment</i>
Scyllo	De l'anglès <i>scyllo-inositol</i>
SD	Desviació estàndard, de l'anglès <i>Standard Deviation</i>
sdAbs	Anticossos d'un únic domini, de l'anglès <i>Single-Domain Antibodies o nanobodies</i>
SDS-PAGE	De l'anglès, <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electroporesis</i>
SE	Servei d'Estabulari
SEM	Error estàndard de la mitjana, de l'anglès <i>Standard Error of the Mean</i>
SePBioEs	Servei de Proteòmica i Biologia Estructural de la UAB
SeRMN	Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la UAB
sMRI	Imatge per ressonància magnètica estructural, de l'anglès <i>structural Magnetic Resonance Image</i>
SV	Un únic vòxel, de l'anglès <i>Single Voxel</i>
T <sub>1</sub>	Temps de relaxació longitudinal
T <sub>2</sub>	Temps de relaxació transversal
T <sub>2</sub> *	Temps de relaxació transversal que incorpora les inhomogeneïtats del camp magnètic
TAE	Tampó format per Tris, àcid acètic i EDTA
Tau	Taurina
TBS	Tampó de tris salí, de l'anglès <i>Tris Buffer Saline</i>
Tc	Tetraciclina
tCr	Creatina total
TE	Temps d'Eco
TEV	De l'anglès, <i>Tobacco Etch Virus</i>
tExp	Temps Experimental
TF	Transformada de Fourier
Tg	Transgènic
Thr	Treonina
TNF $\alpha$	De l'anglès, <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TR	Temps de Repetició
trxB	Gen de la tioredoxina reductasa B
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
Val	Valina
VC	Volums de columna
V <sub>H</sub>	Domini variable de la cadena pesada, de l'anglès <i>Heavy chain Variable domain</i>
V <sub>L</sub>	Domini variable de la cadena lleugera, de l'anglès <i>Light chain Variable domain</i>
VLDL	Lipoproteïnes de densitat molt baixa, de l'anglès <i>Very Low Density Lipoproteins</i>





## RESUM

La malaltia d'Alzheimer (AD) és, actualment, una malaltia incurable que afecta la major part dels 47 milions de persones que s'estima que pateixen demència arreu del món. Tot i que els mecanismes que donen lloc a desenvolupar l'AD no estan ben definits, hi ha un consens bastant ampli en acceptar la hipòtesi de la cascada amiloide, la qual situa el pèptid A $\beta$  o, més concretament, els oligòmers que forma aquest pèptid, com els responsables principals de l'inici del procés neuropatològic que porta a l'AD.

En els últims anys la immunoteràpia anti-A $\beta$  s'ha erigit com una eina esperançadora per tractar la malaltia. Una de les estratègies és la utilització dels fragments variables de cadena senzilla (scFv), els quals eviten els efectes del fragment cristal·litzable (Fc), que es creu que desencadena una resposta de la micròglia que pot donar lloc a microhemorràgies i edemes vasogènics, com va passar en assajos clínics amb el bapineuzumab, un anticòs sencer dirigit contra l'extrem N-terminal del pèptid A $\beta$ , del qual deriven els scFv-h3D6-WT i scFv-h3D6-EL produïts en el nostre grup de recerca.

En aquesta tesi s'ha tractat longitudinalment el model murí d'AD, 3xTg-AD, amb 1 dosi intraperitoneal mensual de 100  $\mu$ g de scFv-h3D6-WT, EL o PBS, des dels 5 fins als 12 mesos, edat en la qual s'han sacrificat els ratolins i s'han emmagatzemat les mostres per a poder realitzar anàlisis histològiques i bioquímiques. Durant el tractament, s'han realitzat 4 sessions de monitorització dels animals utilitzant tècniques d'imatge i espectroscòpia per ressonància magnètica (MRI/MRS) als 5, 7, 9 i 12 mesos.

D'una banda, s'ha pogut caracteritzar el 3xTg-AD utilitzant paràmetres *in vivo* derivats de les tècniques de MRI i MRS, i *ex vivo*, a partir d'anàlisis bioquímiques i histològiques. Així, s'ha observat que el 3xTg-AD presenta, entre d'altres característiques, un volum més petit en gairebé totes les regions cerebrals i edats analitzades, un increment de l'A $\beta$  tan intra com extracel·lular als 12 mesos i un increment en la inflamació a aquesta mateixa edat, tan a l'hipocamp (IL-6 i mIns) com al còrtex (IL-6).

D'altra banda, s'han pogut analitzar els efectes que els tractaments amb scFv-h3D6-WT o EL provoquen en aquest model i s'ha observat com la variant WT és capaç de recuperar, parcialment, els valors de volumetria, A $\beta$ , IL-6 i mIns, entre d'altres. La variant EL, en canvi, no sembla tenir efectes en volumetria, però sí en les anàlisis histològiques, especialment a l'hipocamp on, fins i tot, aquest efecte sembla superior al del WT.

Per últim, s'han realitzat dos estudis complementaris consistents en (1) aproximar la visualització d'edema vasogènic mitjançant l'administració de l'anticòs sencer mAb-m3D6 i (2) exportar algunes de les tècniques posades a punt, a un projecte extern que té per objectiu veure l'eficàcia de les diferents combinacions de tractaments entre el scFv-h3D6-WT i 2 pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J.

En resum, aquesta tesi aporta nova informació sobre l'eficàcia i seguretat de dos scFvs contra el pèptid A $\beta$  en el seu afany per combatre l'AD, a l'hora que ajuda a caracteritzar el model 3xTg-AD, aportant informació que, de ben segur, serà molt útil en la recerca preclínica d'aquesta devastadora malaltia.



## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is an incurable disease that affects most the 47 million people estimated as living with dementia worldwide. Although the exact mechanisms that drive to AD development are not well known, a wide consensus exists to accept the amyloid cascade hypothesis, which claims that the A $\beta$  peptide oligomers are the main responsible for the triggering of the neuropathological process leading to the disease.

In recent years, A $\beta$ -immunotherapy has been revealed as a hopeful tool in AD treatment. One strategy consists of using single-chain variable fragments (scFvs), which avoid the fragment crystallizable (Fc) effects that are supposed to trigger the microglial response, giving place to microhemorrhages and vasogenic edemas, as happened in clinical trials with bapineuzumab. The scFv-h3D-WT and the scFv-h3D6-EL generated in our research group derivate from this antibody targeting the N-terminal of the A $\beta$  peptide.

In the present thesis, 3xTg-AD mice were treated with a 100  $\mu$ g intraperitoneal monthly dose of scFv-h3D6-WT, EL or PBS, from 5 to 12 months, age at which mice were sacrificed and samples were collected to perform histological and biochemical analyses. During the therapy, 4 monitoring sessions using magnetic resonance image and spectroscopy (MRI/MRS) were performed at 5, 7, 9 and 12 months.

On the one hand, a 3xTg-AD mouse model characterization using the *in vivo* parameters from MRI/MRS techniques and the *ex vivo* ones from histological and biochemical analyses has been done. Thus, we have observed that 3xTg-AD presents a smaller volume in almost all cerebral regions and ages examined, an increase in both intra and extracellular A $\beta$  at 12 months, and an inflammation process at this age, in both hippocampus (IL-6 and mIns) and cortex (IL-6).

On the other hand, the effects of both scFv-h3D6-WT and EL have been tested in this model. The WT variant seems to partially recover the values in brain volume, and in A $\beta$ , IL-6 and mIns concentrations, among others. In contrast, the EL variant does not seem to affect the brain volume values. However, it does seem to have positive effects in histology, especially in the hippocampus region, where its effect seems to be greater than the one caused by the WT.

Finally, two complementary studies have been carried out in order to (1) visualize a vasogenic edema by treating the 3xTg-AD with the full-length antibody mAb-m3D6, and (2) to export some of the set up techniques to another project, which aims to study the efficacy of combining the scFv-h3D6-WT treatment with E and J apolipoprotein mimetic peptides.

To sum up, this thesis provides new information about the efficacy and security of two scFvs targeting A $\beta$  peptide in their way to fight AD and, at the same time, it provides new insights in 3xTg-AD characterization, releasing new information which will be very helpful for AD preclinical research.



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 Context social i històric de la malaltia d'Alzheimer (AD)

Actualment, la majoria dels 47 milions de persones que s'estima que pateixen demència arreu del món s'atribueixen a la malaltia d'Alzheimer (AD, de l'anglès *Alzheimer's Disease*), amb projeccions d'arribar, a causa de l'envelliment de la població mundial, als 131 milions de persones l'any 2050, segons dades de l'informe anual que publica l'organització internacional de la malaltia d'Alzheimer (de l'anglès, *Alzheimer's Disease International*) (1). Per si les xifres no fossin prou dramàtiques, la idiosincràsia de la malaltia, els símptomes de la qual comencen amb la pèrdua puntual de memòria i evolucionen cap a una pèrdua progressiva d'orientació en l'espai i en el temps fins a acabar amb un dèficit general de les funcions motores, fa que aquesta suposi un gran problema tan social, pel patiment que comporta a pacients i a cuidadors (normalment de l'àmbit familiar) durant els més de 10 anys que sol durar la malaltia, com econòmic, amb un cost estimat de 818000 milions de dòlars estatunidencs arreu del món l'any 2016, que es preveu que arribi a un bilió l'any 2018 (1).

Avui dia però, només hi ha dos tipus de tractaments pal·liatius aprovats tan per l'Agència Europea dels Medicaments (EMA, de l'anglès *European Medicines Agency*) com la dels Estats Units (FDA, de l'anglès *Food and Drug Administration*): els que actuen sobre el sistema colinèrgic i els que ho fan sobre el glutamatèrgic. En el primer grup, trobem diversos inhibidors de l'acetilcolinesterasa, que hidrolitza l'acetilcolina en colina i àcid acètic perquè les neurones colinèrgiques tornin al seu estat de repòs un cop activades. Aquests inhibidors, que són el donepezil, la galantamina i la rivastigmina, tenen per objectiu compensar, incrementant els nivells d'acetilcolina, la pèrdua d'aquest neurotransmissor a causa de la mort de neurones colinèrgiques que es produeix a la malaltia (2). En el segon grup, en canvi, només hi trobem la memantina, un antagonista dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA), un subtipus de receptors de glutamat, que té un efecte neuroprotector, encara que el mecanisme molecular pel qual aquest es produeix no està gens clar (3).

Tot i això, tan uns com altres només tenen efectes pal·liatius durant algunes etapes de la malaltia i depenen de cada individu, per la qual cosa es pot afirmar que, a dia d'avui, la malaltia d'Alzheimer no té cura.

Aquesta malaltia, es va descriure per primer cop l'any 1906 quan, en una conferència de la 37<sup>ena</sup> Trobada de Psiquiatria del Sud-Oest d'Alemanya celebrada a Tubingen, el psiquiatre alemany, Alois Alzheimer, va parlar d'una peculiar malaltia del còrtex cerebral (4). Alzheimer va descriure la patologia d'una pacient a la qual havia fet un seguiment durant 5 anys, a partir del moment en què ella havia admès pèrdua de memòria, desorientació, al·lucinacions i demència, i fins a la seva mort. En les anàlisis histològiques, Alzheimer destacava una important reducció de les neurones del còrtex, l'aparició d'unes plaques extracel·lulars i d'uns cabdells neurofibril·lars intracel·lulars (NFTs, de l'anglès *neurofibrillary tangles*). Tot i que els descobriments d'Alzheimer van passar bastant desapercibuts, Emil Kraepelin ja va incloure el terme *Alzheimer's disease* en la 8<sup>a</sup> edició del seu text *Psychiatrie* el 1910.

No va ser fins l'any 1984 quan Glenner i Wong van informar que un pèptid de 4 kDa era el principal component dels amiloides cerebrovasculars associats a l'AD, que la investigació sobre aquesta malaltia va agafar rellevància (5). La seqüenciació del pèptid A4 ("A", d'amiloide i "4", del seu pes molecular), extret a partir del nucli de plaques amiloides obtingudes d'individus que havien patit l'AD o la Síndrome de Down, va permetre localitzar el gen de la seva proteïna precursora (APP, de l'anglès *Amyloid Precursor Protein*), un receptor de superfície cel·lular, en el cromosoma humà 21 (6). Avui dia, el pèptid A4 es coneix com a pèptid beta-amiloide (A $\beta$ ) ja que agrega adoptant l'estructura secundària de fulles  $\beta$  (7).

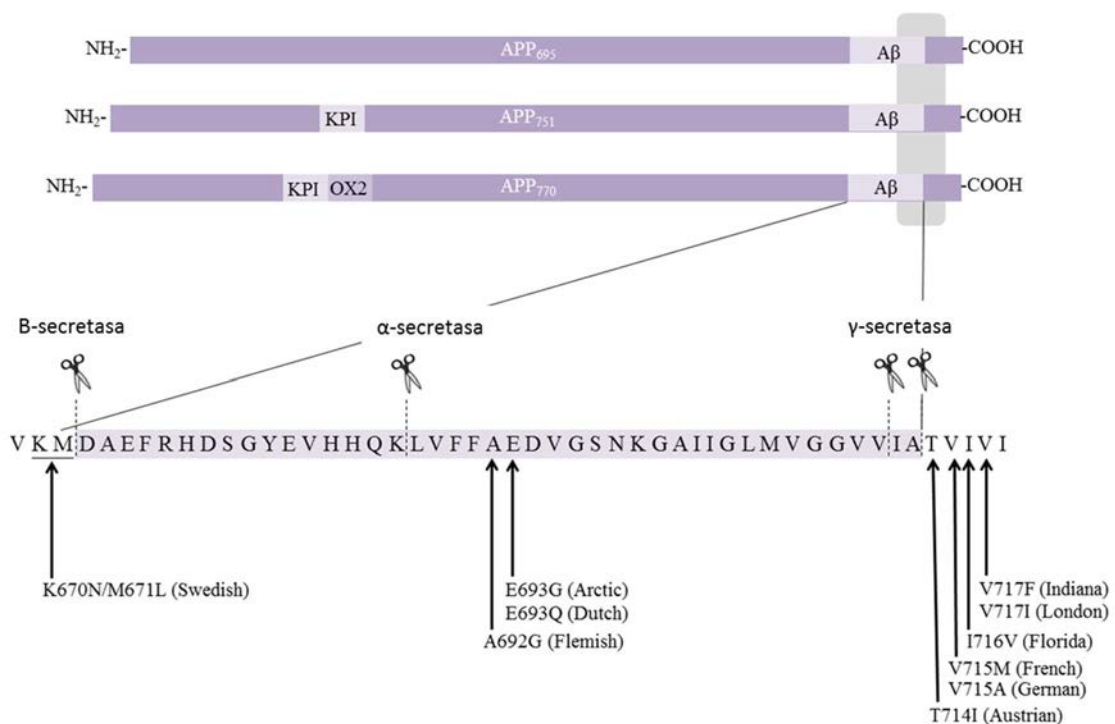
### 1.2 La component genètica de l'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer es pot classificar en dos tipus principals segons l'edat en què apareixen els primers símptomes clínics: l'AD d'aparició precoç (EOAD, de l'anglès *early onset AD*), i el d'aparició tardana (LOAD, de l'anglès *late onset AD*), amb el llindar entre un i altre situat al voltant dels 60-65 anys. Pel que fa a l'EOAD, representa només un 1-2% dels casos d'AD, una petita part dels quals és considerat AD familiar (FAD) ja que s'hi troben mutacions autosòmiques dominants hereditàries. D'aquesta manera, la resta de casos es solen classificar, conjuntament amb els casos LOAD, com a AD esporàdic (SAD). El fet que algunes mutacions autosòmiques dominants siguin les causants d'algun tipus d'Alzheimer, ha estat molt important pel desenvolupament de la recerca contra l'AD. A continuació s'expliquen, de forma detallada, els principals gens implicats en aquesta malaltia.

1.2.1 APP

El gen de l'APP es troba, com s'ha dit anteriorment, al cromosoma 21, amb la qual cosa causa un efecte de dosi gènica en els pacients amb la Síndrome de Down. Des que el 1991 es va trobar la primera mutació de FAD en el gen de l'APP, se n'han descrit un total de 67, 51 de les quals han estat catalogades com a patogèniques (8).

Depenent del lloc on es produeixen les mutacions, tal com mostra la figura 1, aquestes es poden classificar en 3 grups: les que es donen al lloc de tall de la  $\beta$ -secretasa (1), les que es donen al lloc de tall de la  $\gamma$ -secretasa (2) i, finalment, les que es produeixen en la regió central del pèptid A $\beta$ , és a dir, prop del lloc de tall de l' $\alpha$ -secretasa (3) (per a més detalls, veure apartat 1.3.1). Per tant, segons on es produeixi la mutació, aquesta tindrà un efecte o un altre en el processament de l'APP i, en conseqüència, en el desenvolupament de la malaltia.



**Figura 1. Les isoformes i mutacions més comunes a la proteïna precursora del pèptid amiloide (APP).** A la part superior de la imatge es mostra el processament alternatiu dels exons 7 (que codifica per un inhibidor de proteasa Kunitz, KPI) i 8 (que codifica per un domini OX2), el qual dóna lloc a les 3 isoformes de la APP: APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub> and APP<sub>770</sub>. A la part inferior de la imatge, es mostren algunes de les mutacions més representatives dels 3 grups esmentats: lloc de tall de la  $\beta$ -secretasa (1), lloc de tall de la  $\gamma$ -secretasa (2) i lloc de tall de la  $\alpha$ -secretasa (3). Figura extreta de (9).



Les mutacions de l'APP s'anomenen segons l'origen geogràfic de la primera família identificada com a portadora de la mutació, i el número que identifica la posició de la mutació en qüestió es refereix, sempre, a la isoforma més llarga de l'APP (APP<sub>770</sub>). Així doncs, una de les mutacions més conegudes és la doble mutació *Swedish* o APP<sub>Swe</sub> (K670N/M671L), que forma part del grup (1), i resulta en un increment de la producció d'Aβ ja que afavoreix l'activitat de la β-secretasa.

En canvi, les mutacions del grup (2) descrites fins ara, no incrementen la producció d'Aβ total però sí que afavoreixen la formació del pèptid Aβ<sub>1-42</sub>, el qual té més toxicitat que quan es troba en forma d'Aβ<sub>1-40</sub>. Les que tenen una prevalença més gran són la *London* (V717I) i la *Indiana* (V717F) però se n'han descrit moltes més com, per exemple, la *Florida* (I716V), la *French* (V715M), la *German* (V715A) o l'*Austrian* (T714I).

Finalment, les mutacions del grup (3) s'han descrit com a altament amiloidogèniques ja que incrementen l'acumulació d'Aβ tan als teixits neuronals com a les parets dels vasos sanguinis. Les mutacions *Flemish* (A692G) i *Dutch* (E693Q) estan involucrades en l'angiopatia amiloide cerebral (CAA, de l'anglès *cerebral amyloid angiopathy*), mentre que la mutació *Arctic* (E693G) causa una agregació d'Aβ molt agressiva tot i tenir una relació d'Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub> més baixa (10).

### 1.2.2 PSEN1/PSEN2

L'any 1995 es van descriure diverses mutacions en el gen *PSEN1* que codifica per la proteïna presenilina 1 (PS1) i que es troba al cromosoma humà 14 (11). Mesos més tard es descrivia la proteïna homòloga presenilina 2 (PS2), el gen de la qual (*PSEN2*) tenia una mutació associada a FAD (12). Des d'aleshores, en aquest gen del cromosoma 1, s'hi han descrit 39 mutacions, 16 de les quals ja s'ha demostrat que són patogèniques. Pel que fa al gen *PSEN1*, s'hi han descrit 230 mutacions, l'àmplia majoria de les quals són patogèniques i, algunes, la causa més comuna de FAD com, per exemple, la M146V, la M146L, la L286V o la ΔE9 (8).

Les presenilines 1 i 2 formen el nucli catalític del complex de la γ-secretasa, que també conté la proteïna APH-1 (de l'anglès, *anterior pharynx-defective 1 protein*), la nicastrina i la *presenilin enhance protein 2* (PEN2), involucrades en la maduració i l'estabilitat del complex (13). Tradicionalment, les mutacions en les presenilines s'havien associat amb l'increment d'Aβ<sub>1-42</sub> respecte d'altres formes del pèptid, mitjançant l'alteració de l'activitat de la γ-secretasa. Estudis més recents però, suggereixen que, en alguns casos, la pèrdua d'altres funcions essencials de la

PS1 podria explicar millor la neurodegeneració i la demència en l'AD que no pas l'alteració del processament de l'APP (14).

A més dels gens *APP*, *PSEN1* i *PSEN2*, que suposen menys d'un 1% dels casos d'AD, hi ha altres gens considerats com a factors de risc a l'hora de desenvolupar la malaltia, el més important dels quals és, sense cap mena de dubte, el gen que codifica per la apolipoproteïna E (*APOE*) (15). La funció de l'apolipoproteïna E (apoE), així com les evidències de la seva influència a l'hora de desenvolupar l'Alzheimer s'expliquen, de forma detallada, a continuació.

### 1.2.3 *APOE*

La proteïna apoE és un potent modulador dels nivells de colesterol i de lipoproteïnes en el plasma, la qual actua a través de la interacció amb membres de la família de receptors de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR, de l'anglès *low density lipoprotein receptors*). Aquesta proteïna està formada per un domini amino-terminal (N-terminal), que forma la regió d'unió als receptors, i d'un domini carboxil terminal (C-terminal), que forma la regió d'unió als lípids, units per una regió frontissa flexible.

Existeixen 3 isoformes diferents de la proteïna apoE (apoE2, apoE3 i apoE4) les quals difereixen només en les posicions 112 i/o 158. Així doncs, l'apoE2 conté una cisteïna en les dues posicions mentre que l'apoE3 conté una cisteïna a la posició 112 i una arginina a la 158 i, finalment, l'apoE4 conté arginines a les dues posicions (16). Aquestes diferències, encara que petites, són suficients per alterar el plegament de la proteïna i la seva habilitat per unir-se tan als receptors de lipoproteïnes com als lípids, la qual cosa provoca que, en molts dels processos en què es troba involucrada l'apoE, la seva funcionalitat depengui de quina sigui la isoforma implicada.

Tot i que el rol que juga l'apoE en la malaltia de l'AD no està clar, hi ha múltiples exemples de la seva influència en processos cabdals de la malaltia i que, aquesta influència, depèn de la isoforma implicada, sempre essent l'apoE4 la més perjudicial o més propensa a afavorir el progrés de l'AD. A continuació es descriuen alguns d'aquests exemples.

Anàlisis histològiques realitzades en cervells amb Alzheimer han revelat la presència d'apoE, dipositada conjuntament amb el pèptid A $\beta$ , en les plaques amiloides, suggerint un paper de modulador de l'agregació del pèptid A $\beta$  (17). A més, s'ha observat que l'apoE és capaç d'agregar de forma irregular per si sola i que, en altes concentracions, provoca co-precipitats d'apoE-A $\beta$

d'elevat pes molecular, la qual cosa podria indicar que l'apoE guia, a partir de la pròpia agregació, la del pèptid A $\beta$  (18,19). En contraposició, s'ha descrit que l'apoE disminueix la capacitat de generació de fibres de l'A $\beta$  interaccionant amb els pèptids que mostren una conformació  $\beta$  i prevenint, per tant, l'acumulació de més pèptid (20).

D'altra banda, s'ha constatat el paper que l'apoE juga en la retirada i l'eliminació de l'A $\beta$  mitjançant diversos mecanismes. Un d'ells podria ser la sortida del pèptid amiloide a través de la barrera hemato-encefàlica (BBB, de l'anglès *blood brain barrier*), utilitzant els receptors de superfície cel·lular que tenen en comú l'A $\beta$  i l'apoE, com són els LRP1 (de l'anglès *LDL related protein receptor 1*), els LDLR i els HSPG (de l'anglès *heparan sulfate proteoglycans*), on l'apoE facilitaria que els complexos A $\beta$ -apoE s'unissin a aquests receptors. En aquest cas, l'isoforma apoE4, tendria a utilitzar els receptors de VLDL (de l'anglès *very low density lipoproteins*) que són molt menys efectius que els LRP1 (21).

Finalment, una altre mecanisme de neteja de l'A $\beta$  que podria ser facilitat per l'apoE, és la fagocitosi per micròglia, la qual perdria capacitat en el cas de l'apoE4 (19).

Així doncs, queda clar que, d'alguna manera, molt probablement pleiotròpica, l'apoE juga un paper important en la fisiopatologia de la malaltia i que, per tant, el gen *APOE*, concretament el seu al·lel *APOE4*, que codifica per l'isoforma apoE4, és un factor de risc important a l'hora de desenvolupar la malaltia (22).

Per acabar, existeixen altres gens que, a través d'anàlisis de genotip d'alt rendiment i de GWAS (de l'anglès *genome-wide association studies*), han estat considerats factors de risc com són l' *APOJ*, el *CR1*, el *PICALM*, el *BIN1*, l'*ABCA7* i el *CD33* (23). Tot i que el nombre d'estudis realitzats per aquests gens és molt menor que en el cas de l'*APOE* i els mecanismes pels quals aquests afecten el desenvolupament de l'AD no estan clars, la majoria són gens relacionats amb el processament dels lípids, amb la qual cosa podrien incidir en el metabolisme del colesterol, que sí que té una relació directe amb l'AD, com s'explica en l'apartat 1.3.2.

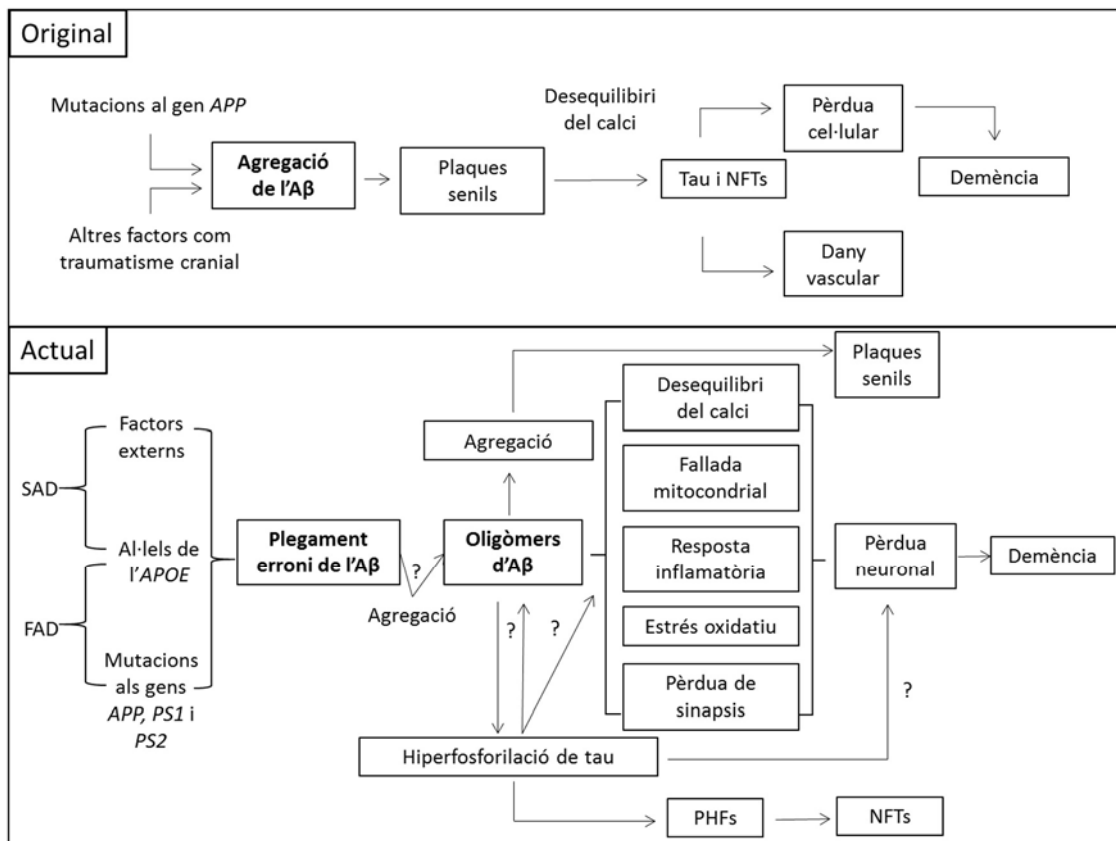
### 1.3 Fisiopatologia de l'Alzheimer

#### 1.3.1 La cascada amiloide

Tot i que els mecanismes que donen lloc a desenvolupar la malaltia d'Alzheimer no estan ben definits, hi ha un consens bastant ampli en situar el pèptid A $\beta$  com a primer desencadenant

d'una sèrie d'esdeveniments que acaben conduint a la demència. Aquest consens es basa en l'acceptació de la hipòtesi de la cascada amiloide (ACH, de l'anglès *amyloid cascade hypothesis*), que va ser proposada, en primer lloc, l'any 1992 per Hardy i Higgins (24).

Segons aquesta teoria, el fenomen d'agregació del pèptid amiloide és la causa que desencadena la patologia de l'AD, i ve seguida per la formació de NFTs, pèrdua cel·lular, dany vascular i, finalment, demència.



**Figura 2. Esquema de l'evolució de la hipòtesi de la cascada amiloide (ACH).** Al requadre superior es mostra l'ACH en la seva forma original, situant l'agregació del pèptid Aβ a l'inici de la cascada, com a element desencadenant de la resta d'esdeveniments. Al requadre inferior, es mostra la visió actual de l'ACH, on els oligòmers d'Aβ tenen un rol central en el desenvolupament de la malaltia però, deixant clar, que no es coneix de quina manera es relacionen amb la hiperfosforilació de la proteïna tau ni com això provoca pèrdua neuronal. FAD: forma familiar de la malaltia d'Alzheimer, SAD: forma esporàdica de la malaltia d'Alzheimer, ApoE: apolipoproteïna E, APP: proteïna precursora del pèptid amiloide, PS1/PS2: presenilines 1 i 2, NFTs: cabdells neurofibril·lars, PHFs: filaments helicoidals aparellats. Figura extreta de (9).

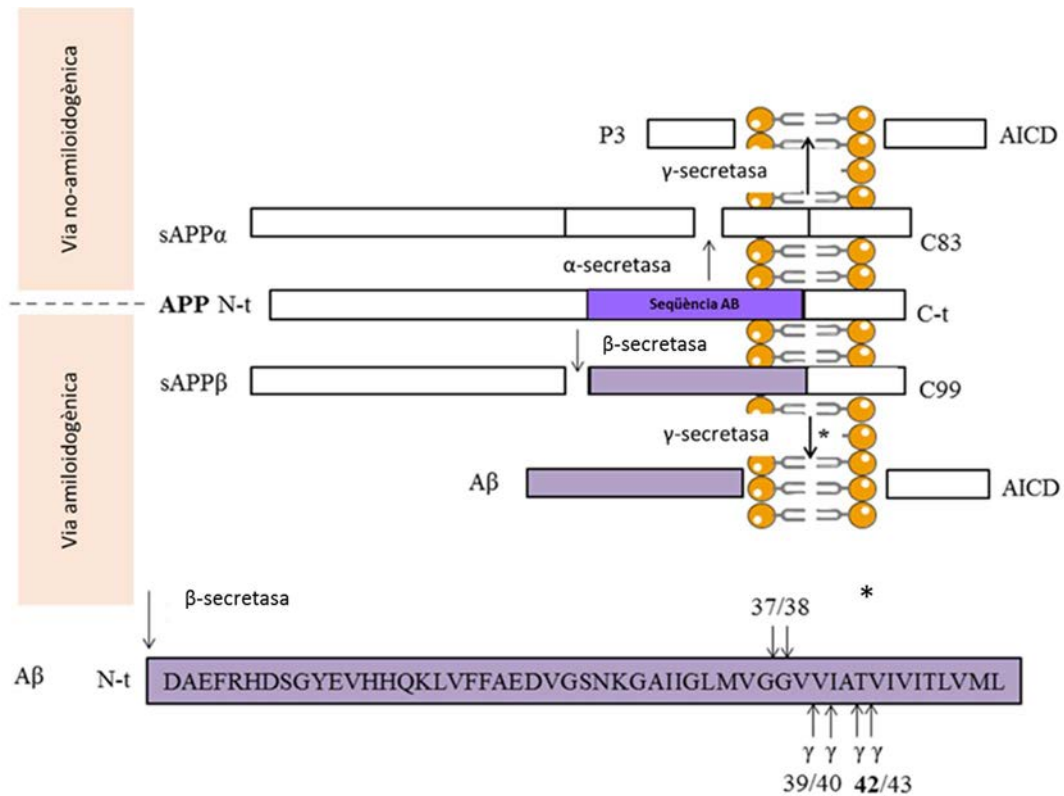
Aquesta teoria, que s'ha vist reforçada pel descobriment de les mutacions dominants explicades anteriorment, als gens *APP*, *PSEN1* i *PSEN2*, ha evolucionat durant aquests 25 anys, situant els oligòmers d'A $\beta$  com a element central i previ a la resta d'alteracions, i incorporant fenòmens com la pèrdua de sinapsis, la fallada mitocondrial o la resposta inflamatòria tal com mostra l'esquema representat en la figura 2 (25).

L'APP és una proteïna transmembrana que es troba, majoritàriament, en les sinapsis neuronals, on la seva funció és, entre d'altres, la de regular-ne la formació (26). També es pot trobar però, en diferents membranes intracel·lulars com la dels mitocondris, la dels endosomes i la dels lisosomes, al reticle endoplasmàtic i a la xarxa trans-Golgi (27).

A la via de processament de l'APP més habitual, la no-amiloidogènica, l' $\alpha$ -secretasa fa un tall dins la regió del pèptid A $\beta$  de manera que s'allibera el fragment extracel·lular sAPP $\alpha$ , relacionat amb la plasticitat neuronal, i el fragment C83 C-terminal es queda a la membrana cel·lular (veure figura 3, part superior). Aquest segon fragment pot, a continuació, ser degradat als lisosomes o tallat per la  $\gamma$ -secretasa, alliberant així un petit fragment conegut com p3 i el domini C-terminal intracel·lular de l'APP (AICD, de l'anglès *APP intracellular C-terminal domain*), ambdós relacionats amb l'homeòstasi del colesterol en les neurones (28).

En canvi, si en comptes de l' $\alpha$ -secretasa, la que talla primer l'APP és la  $\beta$ -secretasa (també coneguda com a BACE1 (de l'anglès  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*) s'inicia la via amiloidogènica. El fragment de l'APP que s'allibera, el sAPP $\beta$ , és més curt que el sAPP $\alpha$  i, per contra, el fragment C-terminal que queda ancorat a la membrana, el C99, és més llarg que el C83. És llavors, quan el C99 pot ser processat per la  $\gamma$ -secretasa, alliberant el fragment AICD i, el que és més important, el pèptid extracel·lular A $\beta$  (veure figura 3, part inferior).

La  $\gamma$ -secretasa sovint talla el substrat diverses vegades, amb la qual cosa es poden generar pèptids d'A $\beta$  de diferents longituds, des d'A $\beta$ <sub>1-37</sub> fins a A $\beta$ <sub>1-43</sub>, essent l'A $\beta$ <sub>1-40</sub>, la forma més abundant en el cervell humà i, l'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, que normalment es troba en una relació 1:10 respecte l'A $\beta$ <sub>1-40</sub>, la més hidrofòbica i propensa a agregar. De fet, mentre que l'A $\beta$ <sub>1-40</sub> tendeix a agregar en el sistema vascular, l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> és el principal component de les plaques amiloides del cervell i, la variació de la relació entre aquestes dues formes d'A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub>/ A $\beta$ <sub>1-40</sub>), és un dels principals determinants de la patogenicitat del pèptid (29).

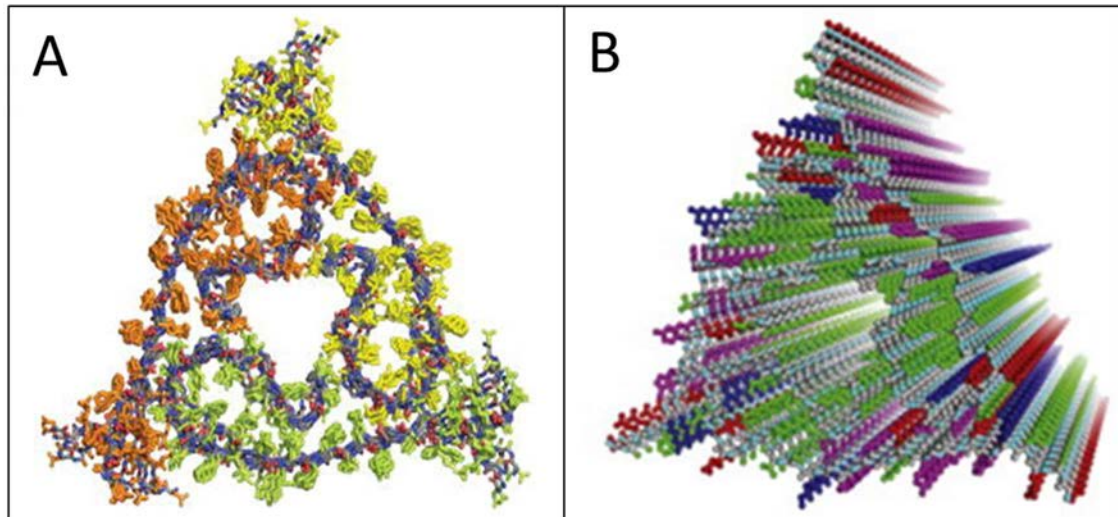


**Figura 3. Processament de la proteïna precursora del pèptid amiloide (APP).** A la part superior es mostra la via no-amiloidogènica on l'APP és processada, de manera seqüencial, per l' $\alpha$ -secretasa i la  $\gamma$ -secretasa. A la part inferior, en la via amiloidogènica, l'APP és tallada, seqüencialment, per la  $\beta$ -secretasa (en comptes de l' $\alpha$ -secretasa), i la  $\gamma$ -secretasa. Aquest darrer tall es pot donar en diferents llocs, generant pèptids d'A $\beta$  de diferents tamanys, des dels 37 residus fins als 43. L' A $\beta$ <sub>1-40</sub> és la forma més abundant mentre que l' A $\beta$ <sub>1-42</sub> és la més amiloidogènica. AICD: fragment intracel·lular del domini C-terminal de l'APP. Figura extreta de (9).

La diferència de llargada entre els productes finals de les vies no-amiloidogènica i amiloidogènica, els pèptids p3 i A $\beta$ , respectivament, és deguda al fet que, aquest últim, té la regió N-terminal més llarga. A partir del sisè residu, aquesta seqüència està involucrada en el gir- $\beta$  en el qual es basa l'estructura tridimensional trimèrica de l' A $\beta$ <sub>1-40</sub>, tal com es pot observar en la figura 4 (30).

Els monòmers d' A $\beta$ <sub>1-40</sub> tendeixen a agregar en oligòmers múltiples de 3 (trímers, hexàmers, nonàmers i dodecàmers), on els 5 primers residus del N-terminal dels pèptids que formen els trímers (DAEFR), queden exposats al solvent mentre que, els extrems C-terminal, que són altament hidrofòbics, queden enterrats en el nucli del trímer. D'aquesta manera, l'empaquetament hidrofòbic dels trímers, amb una rotació de 0.48 nm entre ells, condueix a la formació d'unes fibres amiloides on tots els extrems N-terminals queden exposats. De fet, es

creu que l'agregació del pèptid A $\beta$  es produeix en forma de polimerització nucleada, on els monòmers d'A $\beta$  s'associarien com a oligòmers solubles, els quals, actuant com a pol d'atracció, formarien, de forma successiva, oligòmers insolubles, protofibras, fibres amiloides llargues i, finalment, plaques amiloides o senils (31).



**Figura 4. Estructures tridimensional i fibril·lar d'A $\beta$ <sub>1-40</sub>.** (A) L'estructura tridimensional, obtinguda per ressonància magnètica nuclear (pdb 2M4J) mostra les cadenes laterals dels 5 aminoàcids del N-terminal (DAEFR) exposades al solvent, mentre que les del C-terminal (es mostren les del V40) estan enterrades en el nucli hidrofòbic. La fulla  $\beta$  va dels residus L17 fins a l'A21. Els diferents pèptids que formen aquest trímer estan representats en taronja, groc i verd, respectivament. (B) L'estructura fibril·lar teòrica mostra els diferents girs periòdics de 0.48 nm existents entre oligòmers. Figura adaptada de (32).

De totes les formes en què es poden presentar els pèptids d'A $\beta$ , la presència d'oligòmers solubles és la que es correlaciona millor amb el dèficit cognitiu, contradient la hipòtesi inicial, que deia que les plaques eren la forma més tòxica del pèptid A $\beta$  (33). Això no obstant, els mecanismes pels quals aquests oligòmers solubles són capaços d'induir toxicitat es desconeixen. Tampoc està clara la correlació d'aquests oligòmers amb els altres trets característics de la malaltia, especialment, amb la formació de NFTs, però tampoc amb la pèrdua neuronal, l'estrès oxidatiu, etc., fet que ha comportat l'aparició d'una hipòtesi no-amiloidogènica, la qual advoca per un desenvolupament de la malaltia on l'A $\beta$  no té perquè situar-se a l'inici de l'ACH ni desencadenar la resta d'esdeveniments (25). De moment però, aquesta teoria és minoritària ja que tampoc és capaç d'explicar tota la patofisiologia de la malaltia.

A continuació es descriuen la resta de trets característics de l'AD i la relació que aquests tenen amb el pèptid A $\beta$ .

### **1.3.2 La relació entre l'A $\beta$ i la resta de trets característics de l'AD**

Els NFTs que descrivia Alzheimer l'any 1906 han resultat ser acumulacions de formes aberrants (normalment hiperfosforilades i fragmentades) de la proteïna tau, una proteïna associada, principalment, a l'estabilitat i l'assemblatge dels microtúbuls, tot i que també participa en altres funcions com el creixement de les neurites o el transport axonal (34).

La fosforilació en llocs específics de la proteïna en pot modular la funció i la localització però, quan es produeix hiperfosforilació, la proteïna tau es dissocia dels microtúbuls, prevenint el transport axonal, i agrega en filaments helicoidals aparellats (PHFs, de l'anglès *paired helical filaments*) els quals, al seu torn, acaben agregant i formant els NFT.

La proteïna tau, que està codificada per el gen *MAPT* (de l'anglès, *Microtubule-Associated Protein Tau*), té una llargada d'entre 352 i 441 aminoàcids, presenta 6 isoformes en el cervell humà i, els seus oligòmers, com els d'A $\beta$ , són citotòxics i poden causar dèficits cognitius, els quals es correlacionen amb la progressió de la malaltia però no amb la mort neuronal (35). A més, el fet que la proteïna tau pugui causar pèrdua cel·lular i demència en altres malalties, com en la demència frontotemporal, sense necessitat del pèptid A $\beta$ , fa pensar que els processos d'agregació dels dos pèptids, d'alguna manera, es retro-alimenten, contradient així, la hipòtesi inicial on l'agregació de l'A $\beta$  desencadenava la de tau (36).

La pèrdua de sinapsis, un altre dels trets característics de l'Alzheimer, es deu, principalment, al propi procés d'envelliment però, en cervells amb Alzheimer, el nombre de sinapsis es troba desproporcionadament reduït respecte la pèrdua neuronal i, de fet, correlaciona millor amb el declivi cognitiu que la presència d'oligòmers (37). Sembla que el pèptid A $\beta$  podria perjudicar la plasticitat sinàptica facilitant l'endocitosi tan dels receptors de NMDA com dels  *$\alpha$ -amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazolepropionic* (AMPA), generant un desequilibri entre la potenciació i la depressió a llarg termini (LTP i LTD, de l'anglès *long-term potentiation* i *long-term depression*, respectivament) (38,39). A més, l'A $\beta$ , podria unir-se també als receptors nicotínics d'acetilcolina  $\alpha$ -7 (nAChR) afectant l'alliberament d'acetilcolina i la regulació de tot el sistema colinèrgic (40).

Pel que fa la disfunció mitocondrial, és un fet que provoca una sèrie d'alteracions en diversos mecanismes cel·lulars, des de l'augment de l'estrès oxidatiu per l'alliberament de radicals lliures



oxidants, fins a la desregulació del metabolisme de la glucosa (41). El pèptid A $\beta$ , que és un gran generador d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), pot causar aquest perjudici mitjançant la producció d'elevats nivells de ions dels metalls de transició divalents lliures que, al seu torn, provoquen tan neurodegeneració com agregació de la proteïna tau.

D'altra banda, l'A $\beta$  és capaç d'incrementar la permeabilitat de la membrana als ions calci, provocant una acumulació d'aquest mineral al citosol la qual afavoreix l'amiloidogènesi i l'agregació del pèptid A $\beta$  (42). El desequilibri en el balanç del calci, que està modulats per les presenilines, afecta l'estabilitat de les espines sinàptiques madures i desencadena pèrdues de memòria (43).

A més, l'afectació de la disfunció mitocondrial en el metabolisme de substàncies com la glucosa ha fet, per exemple, que la intolerància a aquest monosacàrid, tal com es dona en el cas de la diabetis de tipus 2, sigui un factor de risc per a patir l'AD. De fet, s'ha observat que diversos components de la via de senyalització de la insulina al cervell estan reduïts en alguns pacients d'AD (44). Uns nivells alts de glucosa al sèrum provoquen tan la regulació a l'alça de la GSK-3 $\beta$  (de l'anglès *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), que és capaç de fosforillar tau, com la reducció dels nivells de l'enzim degradador d'insulina (IDE, de l'anglès *insulin-degrading enzyme*), el qual també pot degradar l'A $\beta$  (45).

Un altre cas de metabolisme alterat en l'Alzheimer és el del colesterol, el qual té un paper clau en el manteniment i el desenvolupament de la plasticitat neuronal (46). En alguns estudis s'ha vist que els nivells de colesterol al cervell estan reduïts en pacients amb AD mentre que, en d'altres, s'ha demostrat, tan en cultius cel·lulars com en models animals, que la hipercolesterolèmia està associada a un increment d'acumulació del pèptid A $\beta$  al cervell (47). Aquesta aparent contradicció porta a pensar que no és la quantitat total de colesterol el que influeix en l'AD sinó la seva distribució, ja que el processament de l'APP (veure apartat anterior) es dona prop d'acumulacions de lípids, on es regula negativament l'activitat de l' $\alpha$ -secretasa mentre que es potencia les de la  $\beta$ - i  $\gamma$ -secretases, amb la qual cosa s'incrementa la producció d'A $\beta$ .

El colesterol, que pot utilitzar-se per a la formació de sinapsis, per a la proliferació dels terminals o per ser emmagatzemat i utilitzat a mitjà termini, queda lliure després de la degradació del complex format per les lipoproteïnes de densitat alta (HDLs, de l'anglès *high density lipoproteins*) i la proteïna apoE, el gen de la qual és un factor de risc per el desenvolupament de l'Alzheimer, tal com s'ha explicat anteriorment (consultar apartat 1.2.3). Aquesta proteïna, que normalment és sintetitzada pels astròcits i la micròglia al cervell, s'uneix

a les HDLs per a facilitar la mobilització i el transport del colesterol i els fosfolípids entre les cèl·lules de la glia i les neurones (23). Ara bé, quan es tracta de la isoforma apoE4, aquesta tendeix a associar-se amb les VLDLs i les LDLs en comptes d'anar amb les HDLs, fet que provoca un augment del colesterol plasmàtic, incrementant així, el risc de desenvolupar tan malalties cardiovasculars com AD, aquesta última, com a conseqüència de la poca capacitat de remodelació sinàptica (47).

Finalment, també s'associen amb l'AD lesions vasculars com anormalitats en els capil·lars, alteració de la BBB, CAA i processos inflamatoris. Les lesions vasculars podrien ser degudes a un desequilibri entre l'expressió de les molècules encarregades de l'entrada (LRP1) i la sortida (RAGE, de l'anglès *receptors for advanced glycation end products*) de l'A $\beta$  a través de la BBB, afectant-ne la seva retirada (48). Altres mecanismes de retirada de l'A $\beta$  també involucren l'activació de la micròglia i els astròcits reactius, que col·localitzen amb les plaques amiloides i els marcadors bioquímics dels quals es troben augmentats en AD (49). A més, en el cas que s'activés la micròglia, es podria desencadenar la generació de citocines i l'activació de la via clàssica del complement, creant així una resposta inflamatòria (50).

Un cop descrits tan els factors de risc genètics de la malaltia com la seva fisiopatologia i tots els mecanismes que s'hi veuen involucrats, es pot concloure que l'Alzheimer és una malaltia molt complexa, raó per la qual s'han provat i, de fet, s'estan provant, una àmplia gamma d'estratègies terapèutiques, la majoria de les quals es centren en el pèptid A $\beta$ . Altres, en canvi, es focalitzen en diferents actors que intervenen en la malaltia com la proteïna tau, els canals de calci, el metabolisme de la glucosa, etc.

En el següent apartat es fa un resum de les noves estratègies que han sorgit en els últims temps, així com també, dels tractaments que han arribat més endavant en els assajos clínics, descrivint, d'una forma més detallada, la teràpia utilitzada en aquesta tesi.

#### **1.4 Teràpies contra l'Alzheimer**

Com s'ha dit a l'inici de la introducció, actualment només existeixen dos tipus de medicaments acceptats per a tractar l'AD de forma pal·liativa: 3 inhibidors de colinesterasa i un antagonista dels receptors NMDA. Ara bé, la quantitat de tractaments estudiats per intentar combatre aquesta malaltia és enorme i els punts de vista des dels quals s'enfoquen, molt variat. Dels tractaments que estan a fases clíniques, trobem des de modificadors de receptors

neuronal que opten per seguir l'estratègia dels medicaments existents al mercat, potenciant el sistema colinèrgic a través d'agonistes de receptors nicotínics d'acetilcolina (51,52), fins a la immunoteràpia, passant pels inhibidors de l'agregació de la proteïna tau (53), estratègies que es centren en la sensibilització a la insulina basant-se en les relacions existents entre diabetis i AD (54), inhibidors de la  $\beta$ -secretasa que pretenen disminuir la producció del pèptid A $\beta$  (55), bloquejadors del canals de calci (56) o productes naturals com el resveratrol o la curcumina (57,58).

A part d'aquests tractaments, n'hi ha d'altres que després d'arribar i fallar en els assajos clínics s'han desestimat i, molts més, que encara es troben en fase preclínica, la majoria essent testats en els diferents models de ratolins existents per a la malaltia d'AD (10). Alguns estan seguint estratègies ja descrites, com les que intenten modular l'activitat de les secretases que participen en el processament del pèptid A $\beta$  (59) i d'altres fan servir estratègies més innovadores com la teràpia amb cèl·lules mare (60). Per a conèixer millor els detalls de totes aquestes estratègies, es pot consultar el capítol de llibre *Prospective Therapies for Alzheimer Disease: Biomarkers, Clinical Trials and Preclinical Research* escrit per aquest autor amb la col·laboració de tot el grup de recerca, en el qual es fa un extens resum de totes les estratègies per combatre l'AD que estan essent estudiades (9).

### **1.4.1 Esperances de la immunoteràpia**

D'entre totes les estratègies provades fins al moment, una de les que genera més esperances, a jutjar per el nombre de tractaments que han arribat fins a fases clíniques avançades, és la immunoteràpia, la qual es pot dividir, de manera general, en dos grans grups: immunoteràpia activa i immunoteràpia passiva (61).

La immunoteràpia activa consisteix, bàsicament, en administrar un antigen (o una molècula que tingui el mateix efecte que l'antigen) per activar una resposta immunològica de l'organisme, el que s'entén, de forma general, com a vacuna. El primer cop que es va demostrar la seva efectivitat va ser l'any 1999, quan es va aconseguir prevenir l'acumulació amiloide injectant A $\beta_{1-42}$  a ratolins transgènics (62). Després que l'any 2002 es desestimés, a fase clínica II, el primer tractament basat en immunoteràpia activa a causa de l'aparició de meningoencefalitis en un 6% dels pacients, les vacunes anti-A $\beta$  posteriors han deixat d'incorporar el pèptid A $\beta_{1-42}$  sencer, doncs, com a conseqüència dels epítops de cèl·lules T que té al seu extrem C-terminal, el pèptid A $\beta$  és capaç de desencadenar la resposta de les cèl·lules T, provocant així la meningoencefalitis

observada (63). Diversos medicaments basats en immunoteràpia activa, ja sigui contra el pèptid A $\beta$  o contra un fragment de la proteïna tau, es troben en fase clínica mentre que, d'altres, es troben encara en fase preclínica, un dels quals provant una immunització amb àcid desoxiribonucleic (DNA, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*) del pèptid A $\beta$ , el qual s'injecta amb una pistola gènica i, posteriorment, es transcriu i es tradueix provocant la resposta immunitària (64).

Per contra, la immunoteràpia passiva consisteix en l'administració d'un anticòs monoclonal (mAb, de l'anglès *monoclonal antibody*) contra una diana específica que, en el cas de l'AD, sol ser el pèptid A $\beta_{1-42}$  sencer o un fragment del mateix. Respecte a la immunoteràpia activa, la passiva té múltiples avantatges com la possibilitat de parar l'administració quan apareix un efecte advers, evita l'activació del sistema immune i es pot dirigir contra formes específiques d'una proteïna o epítops concrets. Si aquests anticòs s'obtenen de línies cel·lulars humanes, els seus noms acaben en *-umab*, mentre que si s'obtenen en models murins i llavors s'humanitzen (procés que consisteix en substituir les regions marc (FR, de l'anglès *framework*) dels ratolins per les humanes que corresponguin, mantenint-ne les regions determinants complementàries (CDR, de l'anglès *complementary determining regions*)), els seus noms acaben en *-zumab* (65).

D'aquesta manera, els principals tractaments de la immunoteràpia passiva que estan essent estudiats en fases clíniques són:

a) El solanezumab. Està dirigit contra la regió central del pèptid A $\beta$ , concretament, l'A $\beta_{16-24}$ , i és capaç d'unir-se i segrestar l'A $\beta$  del plasma, amb la qual cosa, la seva administració perifèrica redueix la deposició d'A $\beta$  al cervell promovent el flux de sortida des del sistema nerviós central (CNS, de l'anglès *central nervous system*) cap al plasma (66). Actualment hi ha dos estudis de fase 3 en marxa però, fins al moment, els estudis més prometedors han acabat sense complir les expectatives (67).

b) El gantenerumab. És la primera immunoglobulina de tipus 1 (IgG1) sencera utilitzada per la immunoteràpia contra el pèptid A $\beta$  i s'uneix a un epítoc conformacional de les fibres  $\beta$ -amiloides. Interactua, sobretot, amb els agregats d'A $\beta$  que es formen al cervell, tan parenquimal com vasculars (68).

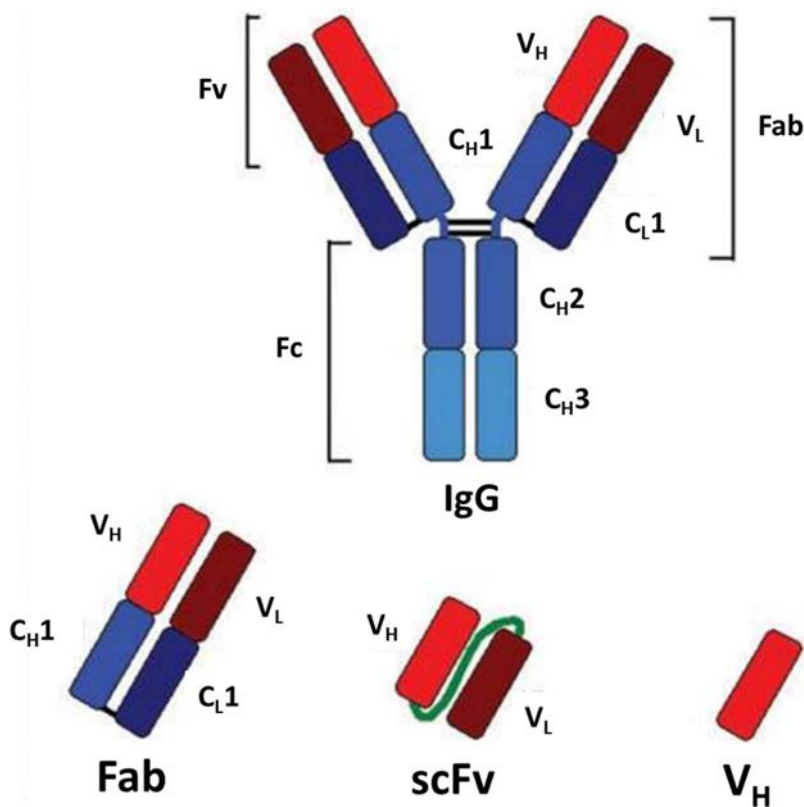
c) El crenezumab. També està dirigit contra la regió central del pèptid A $\beta$ , en aquest cas, però, contra l'A $\beta_{12-23}$ . Està dissenyat en una estructura d'IgG4 per tal d'evitar els efectes inflamatoris com l'activació de la micròglia, l'edema i les microhemorràgies (69). S'uneix a protofibrilles prevenint l'agregació del pèptid A $\beta$  i desfent les plaques ja formades.

d) L'aducanumab. Deriva d'un pacient d'Alzheimer amb una trajectòria clínica inusualment estable. Després d'aïllar-lo, clonar-lo i expressar-lo de forma recombinant, aquest anticòs ha demostrat reconèixer tan el N-terminal de l'A $\beta$  (A $\beta_{3-6}$ ) com un epítot estructural present en la seva forma agregada, a més de tenir una elevada afinitat per les fibres insolubles d'A $\beta$ , reduint la càrrega amiloide en ratolins model (70).

e) El mAb158. Està dirigit contra la mutació APP<sub>Arcctic</sub> i reconeix una conformació única en les protofibrils d'A $\beta$  (71).

f) El mAb13C3. Deriva d'una IgG4 i reconeix un epítot conformacional que es repeteix en els agregats d'A $\beta$  prefibril·lars, organitzats pels residus 4-12 i 9-20 (72).

g) Les immunoglobulines intravenoses (IVIGs, de l'anglès *intravenous immunoglobulins*). És una barreja d'IgGs humanes que deriven del plasma de voluntaris joves i sans, la qual conté anticossos contra diferents conformacions de monòmers d'A $\beta$  i agregats (73).



**Figura 5. Representació dels diferents tipus de fragments d'anticòs.** A la part superior de la imatge es mostra un anticòs sencer amb la seva regió de fragment cristal·litzable (Fc) i el seu fragment variable (Fv). A la part inferior, d'esquerra a dreta, es mostren un fragment d'unió a l'antigen (Fab), un fragment variable de cadena senzilla (scFv) i un domini variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>), també conegut com a *nanobody*. C<sub>H</sub>: domini constant de la cadena pesada, C<sub>L</sub>: domini constant de la cadena lleugera, IgG; immunoglobulina de tipus G, V<sub>L</sub>: domini variable de la cadena lleugera, lleugera. Figura extreta de (74).

A part dels tractaments que es troben en fase clínica, hi ha diverses estratègies en fase preclínica, algunes d'elles representades a la figura 5, entre les quals es troben els  $F(ab')_2$  (de l'anglès *antibody-binding fragments*), consistents en dos fragments d'unió a l'antigen, cada un dels quals conté un domini constant i un domini variable de cada una de les cadenes lleugeres ( $C_L$  i  $V_L$ , de l'anglès *constant light chain* i *variable light chain*, respectivament) i pesades ( $C_H$  i  $V_H$ , de l'anglès *constant heavy chain* i *variable heavy chain*, respectivament) de l'anticòs (75); els fragments variables de cadena senzilla (scFvs, de l'anglès *single chain variable fragments*), consistents en un  $V_H$  unit a un  $V_L$  mitjançant un polipèptid (76,77); els sdAbs (de l'anglès *single-domain antibodies*), també anomenats *nanobodies*, consistents en un sol domini d'anticòs que es manté estable (78); les DARPins (de l'anglès *designed ankyrin repeat proteins*), consistents en proteïnes petites i d'elevada estabilitat ideals per acomodar fragments proteïcs d'alta afinitat contra el pèptid  $A\beta$ , entre d'altres (79); i mAbs contra la proteïna tau fosforilada o contra la  $\beta$ -secretasa (80,81).

#### **1.4.2 El cas del bapineuzumab i els scFvs h3D6-WT i EL**

Tot i que els estudis clínics amb el bapineuzumab van ser aturats el 2012, en aquest apartat se'n detallen les característiques ja que és la molècula en la qual es basen els tractaments utilitzats en aquest treball, els scFvs h3D6-WT (de l'anglès *humanized 3D6 wild-type*) i EL (de l'anglès *elongated*).

El bapineuzumab, o AAB-001, és el successor humanitzat del mAb-3D6, un anticòs dirigit específicament contra el N-terminal del pèptid  $A\beta$ , concretament l' $A\beta_{1-5}$ , que en reconeix totes les formes solubles (monomèrica, oligomèrica i fibril·lar) i que l'any 2000 va demostrar que injectant-lo perifèricament, era capaç de passar al cervell, unir-se a les plaques amiloides i induir la fagocitosi microglial, vehiculada pels receptors de la regió Fc dels dipòsits d' $A\beta$  en ratolins model d'AD (82).

Als estudis clínics fets amb el bapineuzumab, però, hi van haver diversos contratemps, els més destacats dels quals van ser l'aparició de microhemorràgies i d'edema vasogènic, especialment en el cas dels individus amb l'al·lel  $\epsilon 4$  de l'*APOE*, els quals van portar a la creació de dos nous termes, els ARIA-H i els ARIA-E (de l'anglès *amyloid-related imaging abnormalities -microhemorrhage* i *-edema*, respectivament). Aquestes anomalies es creu que són conseqüència del vessament transitori dels vasos sanguinis cerebrals, producte de la retirada vascular del pèptid amiloide induïda per el mAb. Tot i la millora en algun dels biomarcadors característics de

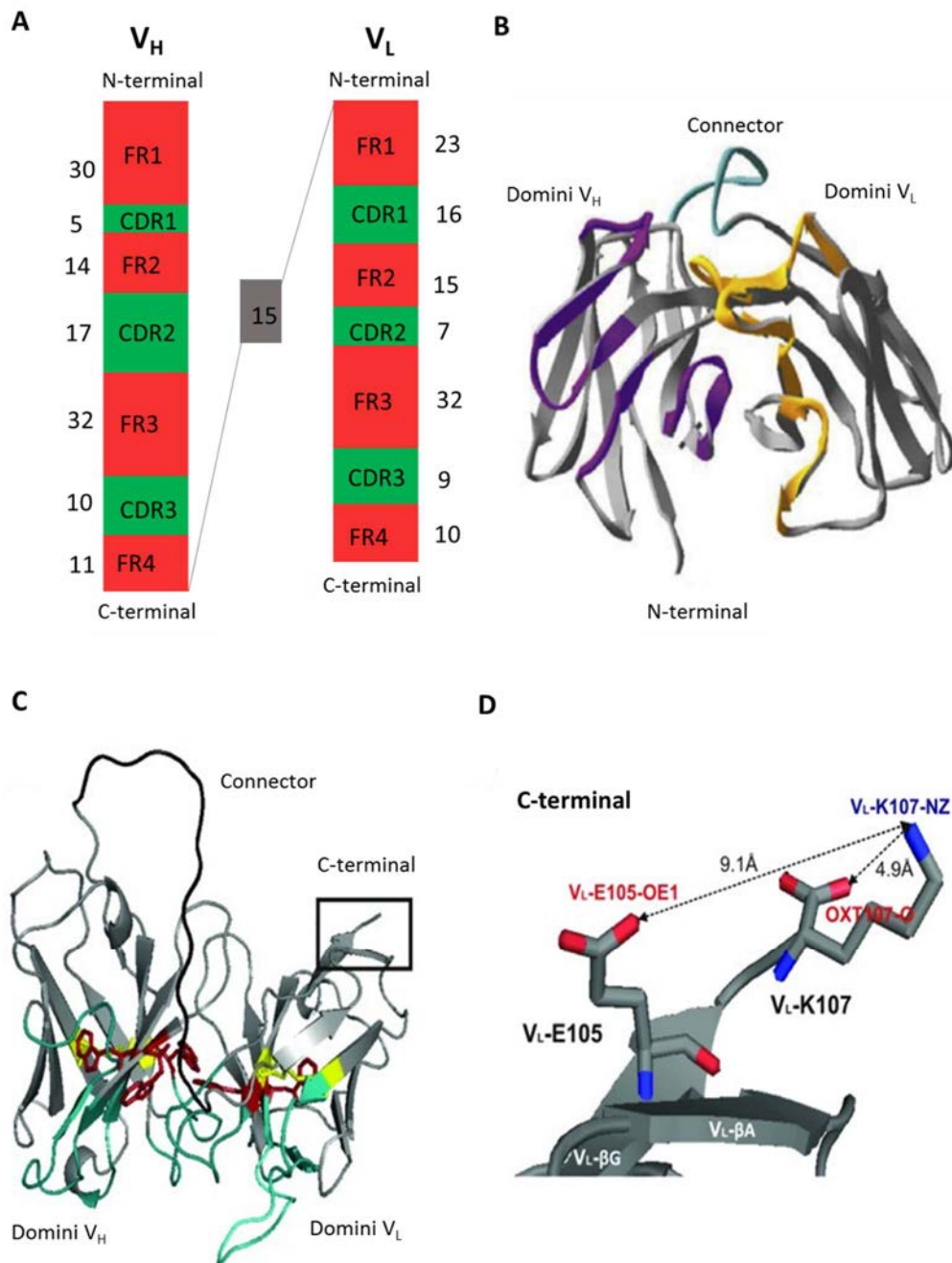
l'AD, com la disminució de la proteïna tau fosforilada en el líquid cefaloraquídi (CSF, de l'anglès *cerebrospinal fluid*) en els portadors de l'*APOE ε4*, i els resultats parcialment positius en alguns dels estudis, el fet que no s'observessin millores clíniques en els pacients d'AD en estudis clínics de fase III va fer que els assajos s'aturessin definitivament l'any 2012. De totes maneres, la principal hipòtesi del fracàs del tractament és que aquest es va aplicar en un estadi de desenvolupament de la malaltia massa avançat (83).

Això no obstant, diverses estratègies es van basar en els bons resultats obtinguts pel bapineuzumab, especialment en els seus inicis, per redissenyar la molècula i evitar així els efectes secundaris observats anteriorment.

Aquest és el cas del scFv-h3D6-WT que, com s'ha mencionat anteriorment, consisteix en la unió, mitjançant un polipèptid, d'un  $V_H$  amb un  $V_L$  (veure figura 6A,B). D'aquesta manera, la molècula segueix reconeixent l' $A\beta_{1-5}$  com ho feia el bapineuzumab però, en canvi, s'eviten els efectes del Fc, el qual es creu que va ser el responsable de desencadenar la resposta de la micròglia que va originar l'edema en el cas del bapineuzumab (84).

Aquest scFv, que fou dissenyat i purificat per la Prof. Villegas i el seu equip l'any 2008, va donar resultats positius *in vivo* l'any 2011 quan, després d'una única dosi intraperitoneal de 100  $\mu$ g en ratolins 3xTg-AD (model murí, triple transgènic, d'Alzheimer) es va observar, al cap de 5 dies, que es revertia la velocitat de natació dels animals tornant a valors normals, i que milloraven els dèficits de memòria i aprenentatge que aquests patien (85).

Les anàlisis del teixit cerebral van revelar una disminució dels oligòmers d' $A\beta$  tan al còrtex com al bulb olfactori i una disminució fins a nivells no patològics de les proteïnes apoE i apoJ, les quals estan elevades en aquest model (fet que quadra amb la relació que tenen aquestes proteïnes amb la malaltia) (76). A més, un estudi preliminar amb aquest scFv, va mostrar la capacitat del scFv-h3D6-WT de protegir les neurones del nucli cerebel·lar profund de la mort (86).



**Figura 6. Representació del model de l'estructura tridimensional del scFv-h3D6.** (A) Es mostra un esquema de l'estructura modular del scFv-h3D6 on s'observen els dominis variables de les cadenes pesada i lleugera ( $V_H$  i  $V_L$ ) units per un polipèptid de 15 residus. En vermell es representen les regions marc (FR) mentre que, en verd, trobem els llocs de reconeixement de l'antigen (CDRs). (B) Es mostra el model de l'estructura en tridimensional del scFv-h3D6 on es marquen els CDRs amb diferents colors segons el domini al qual pertanyen: CDRs del  $V_H$  en lila, CDRs del  $V_L$  en ocre i, el connector, en blau. (C) En el mateix model mostrat a (B), es remarca l'extrem C-terminal amb un quadrat negre i s'amplia (D) per veure en detall els últims aminoàcids del domini  $V_L$ , les interaccions entre les seves cadenes laterals i el perquè dels dos residus afegits a la variant scFv-h3D-EL. Figura adaptada de (87) (A), (88) (B) i (89) (C i D).



D'altra banda, el mateix grup va crear la variant scFv-h3D6-EL, que afegeix dos residus aminoacídics al C-terminal de la forma WT (R108 i T109), millorant l'estabilitat de la molècula *in vitro* (89), i la capacitat de retirar els oligòmers d'A $\beta$  en cultius cel·lulars de neuroblastoma SH-SY5Y (90). La millora en l'estabilitat es basa en el fet que l'últim residu de l'extrem C-terminal al WT, que correspon a V<sub>L</sub>-K107, encara pertany a la cadena- $\beta$  G (Figura 6C, D) i, per tant, la seva cadena lateral interacciona amb la de V<sub>L</sub>-E105. Aquesta interacció però, no es pot realitzar correctament a causa de l'atracció que exerceix el carboxil C-terminal sobre la cadena lateral de V<sub>L</sub>-K107. Afegint dos residus a la seqüència s'allunya el carboxil i es permet la interacció, estabilitzant l'estructura secundària i, per tant, el plegament global (89).

Tan el scFv-h3D6-WT com la seva variant estabilitzada, scFv-h3D6-EL, s'han aplicat de forma longitudinal en aquest treball per tal d'observar i quantificar els efectes d'ambdós tractaments en el model 3xTg-AD.

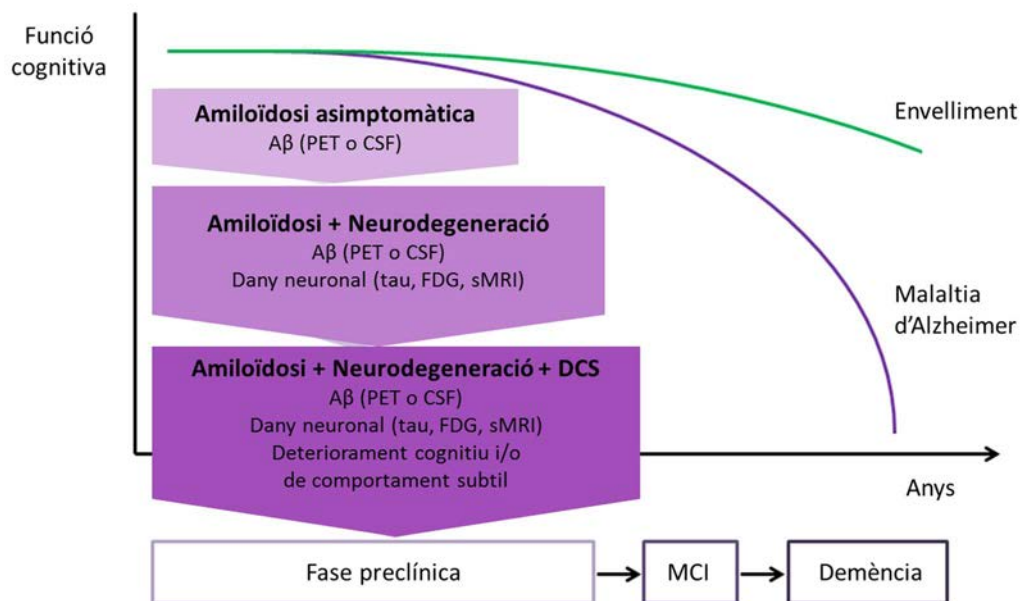
Resumint, tot i la gran quantitat d'estratègies terapèutiques que s'han intentat, cap d'elles ha tingut èxit i l'Alzheimer és, a dia d'avui, una malaltia incurable. És per això que la investigació de nous mètodes de diagnòstic, que siguin capaços de detectar la malaltia d'una forma més precisa i més precoç, és imprescindible per a poder encaminar millor la recerca d'un tractament efectiu. En el següent apartat es parla dels mètodes de diagnòstic més utilitzats per a detectar l'Alzheimer, fent especial èmfasi a les tècniques de ressonància magnètica emprades en aquest treball.

### 1.5 Diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer

De la mateixa manera que la causa de l'AD no està clara, tampoc existeix un consens absolut sobre el seu diagnòstic. Tot i que els símptomes de la malaltia són evidents, des de la pèrdua puntual de memòria inicial, fins al dèficit general de les funcions motores final, passant per una pèrdua progressiva d'orientació en l'espai i en el temps, aquests corresponen a la fase final o clínica de la malaltia i, per tant, hi ha certa controvèrsia en si es pot diagnosticar l'Alzheimer abans d'arribar a aquest punt. De fet, s'ha demostrat que el pèptid A $\beta$  comença a acumular-se fins a dues dècades abans que els primers símptomes clínics de l'AD es manifestin (91).

El grup internacional de treball (IWG, de l'anglès *International Working Group*) és partidari de no considerar l'existència de l'Alzheimer fins que no apareixen els primers símptomes clínics, mentre que l'Institut Nacional d'Envel·liment i l'Associació de l'Alzheimer (NIA-AA, de l'anglès

*National Institute on Aging and Alzheimer's Association* s'inclina per establir l'inici de la neuropatologia molt abans que aquests apareguin (92). Aquesta segona opció, que està més en consonància amb la forma en què s'estan desenvolupant els estudis actuals, determina 3 fases de la malaltia: la fase preclínica, la fase amb deteriorament cognitiu lleu (MCI, de l'anglès *mild cognitive impairment*) i, finalment, la fase de demència. Al seu torn, la fase preclínica es subdivideix en 3 etapes marcades pels esdeveniments acumulatius que van succeint: amiloïdosi, neurodegeneració i deteriorament cognitiu subtil (veure figura 7).



**Figura 7. Progressió de la malaltia d'Alzheimer.** A la figura es mostra un esquema del model patològic de l'AD proposat per l'Institut Nacional de l'Envel·liment i l'Associació de l'Alzheimer (NIA-AA) segons el qual, la fase preclínica, la qual precedeix les fases de deteriorament cognitiu lleu (MCI) i la demència, està composta per 3 etapes: amiloïdosi asimptomàtica, amiloïdosi amb neurodegeneració i, per últim, l'afegiment del deteriorament cognitiu subtil (DCS). A més, es mostren, per a cada etapa, els principals biomarcadors utilitzats per al diagnòstic. PET: tomografia per emissió de positrons, CSF: líquid cefaloraquídi, FDG: fluoro-desoxi-glucosa i sMRI: imatge per ressonància magnètica estructural. Figura extreta de (9).

Aquesta diferenciació d'etapes es basa en l'existència dels denominats biomarcadors, que no són més que indicadors biològics dels fets que estan ocorrent en un determinat moment dins l'individu i que, en aquest cas, o són característics de l'AD, o bé precedeixen esdeveniments que ho són. Existeix una llarga llista de biomarcadors (o possibles biomarcadors) per l'Alzheimer,

alguns amb més importància o més incidència que altres, depenent de l'etapa en la que es trobi la malaltia, que es classifiquen segons la tècnica que els identifica (imatge, CSF, sang, etc.). De tots els biomarcadors existents, els més utilitzats i contrastats són, per una banda, la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> al CSF i la imatge d'A $\beta$  mitjançant tomografia d'emissió de positrons (PET, de l'anglès *positron emission tomography*), que indiquen un processament anormal de l'APP i, per l'altra, la quantitat de la proteïna tau al CSF, el FDG-PET (PET basat en la fluoro-desoxi-glucosa) i la imatge per ressonància magnètica estructural (sMRI, de l'anglès *structural magnetic resonance image*) que indiquen neurodegeneració i disfunció sinàptica (93).

### 1.5.1 Biomarcadors al CSF

Els nivells d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> al CSF es troben disminuïts a l'AD a causa de l'acumulació d'espècies amiloides a les regions corticals. Aquest fet es correlaciona perfectament tan amb el diagnòstic clínic de l'Alzheimer com amb la neuropatologia de l'A $\beta$  a les autòpsies (94). De fet s'ha vist que els nivells d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> al CSF són completament anormals entre 5 i 10 anys abans de diagnosticar la demència, amb la qual cosa es situa com a un dels primers indicadors de la malaltia (95).

Pel que fa la proteïna tau, tan els nivells de tau fosforilada (que es pot considerar un marcador més específic d'AD) com els de tau total, es troben incrementats a l'AD (96). Aquests últims, tot i no ser exclusius de l'AD, es correlacionen tan amb el grau de severitat de la malaltia, com amb l'existència de NFTs a les autòpsies (97). Aquests increments es deuen, principalment, a l'acumulació de tau a les neurones, la qual cosa interromp l'activitat neuronal i fa que s'alliberi a l'espai extracel·lular i, posteriorment, al CSF, essent un clar indicador de dany neuronal.

El fet que el CSF estigui en contacte directe amb la parènquima del cervell fa que la seva composició reflecteixi molt bé els canvis que es donen al teixit neural i el converteix en una eina de gran valor per identificar fluctuacions neuropatològiques. Per això, canvis en altres molècules o en altres formes del propi pèptid A $\beta$  han estat proposats com a biomarcadors com, per exemple, l'increment en el nivell d'apoE, i molts altres estan essent estudiats (98,99).

Per altra banda, també s'investiguen biomarcadors en sang, ja que és un fluid molt més fàcil d'obtenir i de treballar-hi que el CSF. Ara bé, la forta divisió entre la sang i la parènquima cerebral que causa la BBB, la diversitat cel·lular del fluid i el seu entorn altament dinàmic, afecten severament a la seva composició, raó per la qual, de moment, no s'han pogut definir, de forma clara, biomarcadors en aquest fluid (100).

### 1.5.2 Tomografia d'emissió de positrons

La PET és la tècnica de neuroimatge més utilitzada per detectar i quantificar la deposició amiloide ja que permet detectar, *in vivo*, l'existència de fibres amiloides en etapes molt primerenques. Per a fer-ho es basa en la utilització de radioisòtops que fan de traçadors d'una partícula concreta, el més utilitzat dels quals és el PiB (de l'anglès, *<sup>11</sup>C-Pittsburg-Compound B*), el qual s'uneix, de forma selectiva, a les fibres que forma l'A $\beta$  (101). Els resultats positius obtinguts amb aquesta tècnica concorden, en l'àmplia majoria dels casos, amb els baixos nivells d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> al CSF descrits anteriorment (102).

La variant FDG-PET, permet analitzar el metabolisme de la glucosa al cervell mitjançant el <sup>18</sup>F-FDG, un anàleg de la glucosa que conté un isòtop radioactiu que permet distingir l'activació de les neurones quan aquestes necessiten glucosa (103). Una disminució del patró metabòlic, el qual es relaciona amb disfunció sinàptica i neurodegeneració, confereix un risc elevat de desenvolupar l'AD (104).

### 1.5.3 Ressonància magnètica nuclear (RMN)

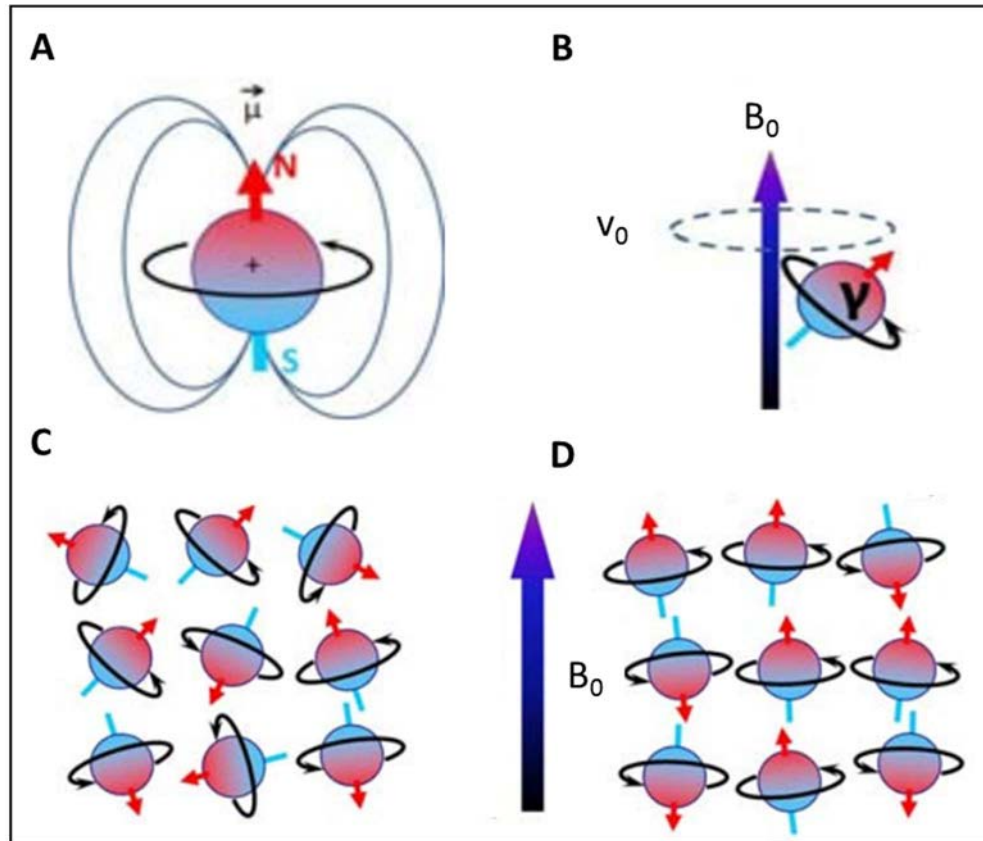
Encara que la PET sigui la tècnica d'imatge més utilitzada en humans, el PiB mostra una baixa afinitat per les fibres amiloides en ratolí de manera que, en aquest últim cas, es sol fer servir la ressonància magnètica (105).

Tenint en compte que aquesta és la principal tècnica utilitzada en aquest treball i a causa de les moltes possibilitats que ofereix, en aquest apartat es fa una explicació extensiva tan del seu fonament com de la seves aplicacions, per tal de comprendre'n millor el seu funcionament i els resultats que se'n deriven.

#### 1.5.3.1 Fonaments de la tècnica

La ressonància magnètica nuclear es basa en una propietat quàntica que tenen els nuclis de determinats àtoms on hi ha un nombre imparell de protons o de neutrons. Aquesta propietat s'anomena espín nuclear ( $I$ ) i és la que confereix, a cada nucli, un moment magnètic nuclear ( $\vec{\mu}$ )

diferent a zero, que és la capacitat que té aquest vector de girar sobre el seu propi eix (veure figura 8A) (106).



**Figura 8. Representació del comportament dels nuclis en diferents situacions. (A)** Diagrama del moment magnètic ( $\vec{\mu}$ ) causat pel gir d'un nucli amb espín nuclear diferent a 0 com a analogia d'un imant amb pol nord (N) i sud (S). **(B)** Representació de la precessió de Larmor on el  $\vec{\mu}$  del nucli gira al voltant d'un camp magnètic extern ( $B_0$ ) amb una velocitat ( $v_0$ ) que depèn de la constant giromagnètica ( $\gamma$ ) i del valor de  $B_0$ . **(C)** Representació d'una població de nuclis els espins dels quals s'orienten aleatòriament en totes les direccions en absència de camp magnètic. **(D)** Al aplicar un camp magnètic  $B_0$ , els espins nuclears s'orienten en dues direccions diferents que s'anomenen, de manera general, paral·lela i antiparal·lela. Figura adaptada de (107).

En presència d'un camp magnètic extern ( $B_0$ ), els espins nuclears s'orienten d'una manera determinada respecte l'orientació del camp magnètic. En el cas dels nuclis amb  $I = \frac{1}{2}$  (com per exemple el  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  o  $^{23}\text{Na}$ , estudiats comunament per RMN), poden adoptar dues orientacions diferents: paral·lela o antiparal·lela respecte a  $B_0$  (veure figura 8D). A causa de la interacció de cada  $\vec{\mu}$  amb  $B_0$ , però, l'alineació no és del tot paral·lela o antiparal·lela sinó que

existeix un angle, de manera que els 2 vectors existents produeixen dues forces que porten a cada  $\vec{\mu}$  a girar seguint un moviment anomenat precessió de Larmor, l'equació del qual és la següent (veure figura 8B):

$$\nu_0 = -\frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0$$

**Equació 1. Equació de la freqüència de precessió de Larmor ( $\nu_0$ ).** On  $\gamma$  és la constant giromagnètica que depèn de cada nucli atòmic i  $B_0$  és el camp magnètic extern.

Les dues orientacions possibles dels nuclis corresponen a 2 nivells d'energia, essent l'orientació paral·lela el nivell de menor energia, de manera que, tot i repartir-se de forma força equitativa, en un sistema en equilibri sempre hi haurà més nuclis orientats de manera paral·lela que no antiparal·lela. Com que els nuclis orientats en direccions contràries es contraresten, la magnetització neta vindrà donada per els nuclis que es troben en excés en el nivell d'energia més baix i, per tant, la magnetització macroscòpica neta en estat d'equilibri ( $M_0$ ), sempre estarà orientada en el mateix sentit del camp magnètic extern ( $B_0$ ).

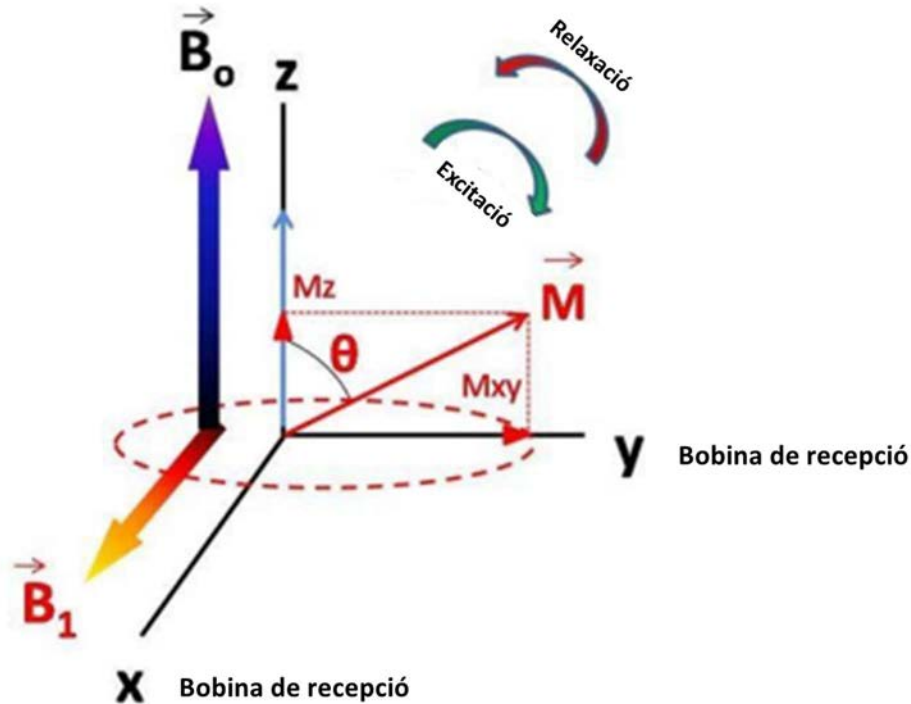
A més, com més gran sigui la intensitat de  $B_0$ , més augmentarà la separació energètica entre les diferents orientacions ( $\Delta E$ ), és a dir, que hi haurà un número més gran de nuclis en l'estat de menor energia provocant una  $M_0$  major i, en conseqüència, una major captació del senyal en ressonància magnètica. Aquest  $\Delta E$  ve definida per la fórmula següent:

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0 = h \cdot \omega_0$$

**Equació 2. Equació de la diferència entre estats energètics.** On  $h$  és la constant de Plank i  $\omega_0$  és la velocitat angular corresponent a la freqüència de precessió de Larmor.

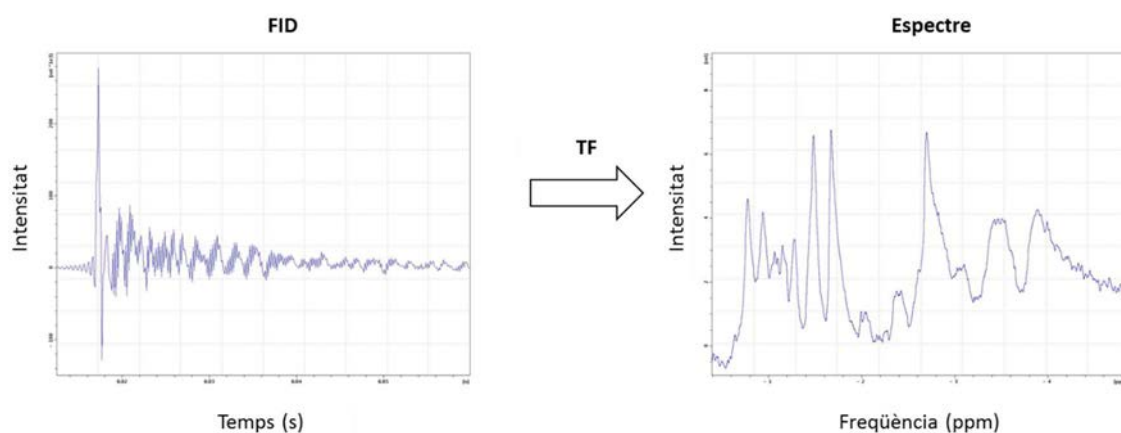
La captació de senyal per ressonància magnètica es basa en la capacitat dels nuclis per canviar de nivell d'energia, la qual cosa és possible aplicant uns camps magnètics addicionals ( $B_1$ ) en forma de polsos de radiofreqüència (RF) d'una potencia i duració determinades. Aquests RF provoquen una excitació dels nuclis, que arriben al nivell superior d'energia i que, quan s'acaba el pols, tornen al nivell d'energia inicial, mitjançant uns processos de relaxació els quals

són explicats en el següent apartat (figura 11). Durant aquest procés, els nuclis alliberen l'energia absorbida, produint un senyal que és recollit per una bobina de recepció (veure figura 9).



**Figura 9. Representació de la pertorbació de la magnetització macroscòpica d'una mostra rotant a la freqüència de ressonància.** En el sistema de coordenades, s'observa que al aplicar un camp magnètic addicional ( $B_1$ ) perpendicular a  $B_0$  (excitació), es produeix un gir, d'angle  $\theta$ , de la magnetització neta ( $M$ ), que es divideix en les seves components longitudinals ( $M_z$ ) i transversal ( $M_{xy}$ ). Quan es deixa d'aplicar  $B_1$ , el sistema torna al estat d'equilibri tèrmic inicial (relaxació). La component  $M_{xy}$  gira en torn a  $B_0$  a la freqüència de ressonància i induirà un senyal elèctric de corrent altern que serà captat per les bobines de recepció. Figura extreta de (107).

D'aquesta manera, la senyal captada s'obté en forma d'una sinusoide atenuada, anomenada FID (de l'anglès *free induction decay*), en funció del temps i es processa, matemàticament, mitjançant la transformada de Fourier (TF), que descompon la FID en totes les components freqüencials diferents que la conformen, representant-les en el domini de les freqüències en comptes d'en el del temps per obtenir, així, un espectre de RMN, tal com es mostra a la figura 10.



**Figura 10. Representació de l'aplicació de la transformada de Fourier (TF).** La figura mostra la transformació d'una FID, obtinguda en un experiment de ressonància magnètica nuclear (en el domini del temps) en un espectre en el domini de les freqüències, mitjançant l'aplicació de la transformada de Fourier (TF).

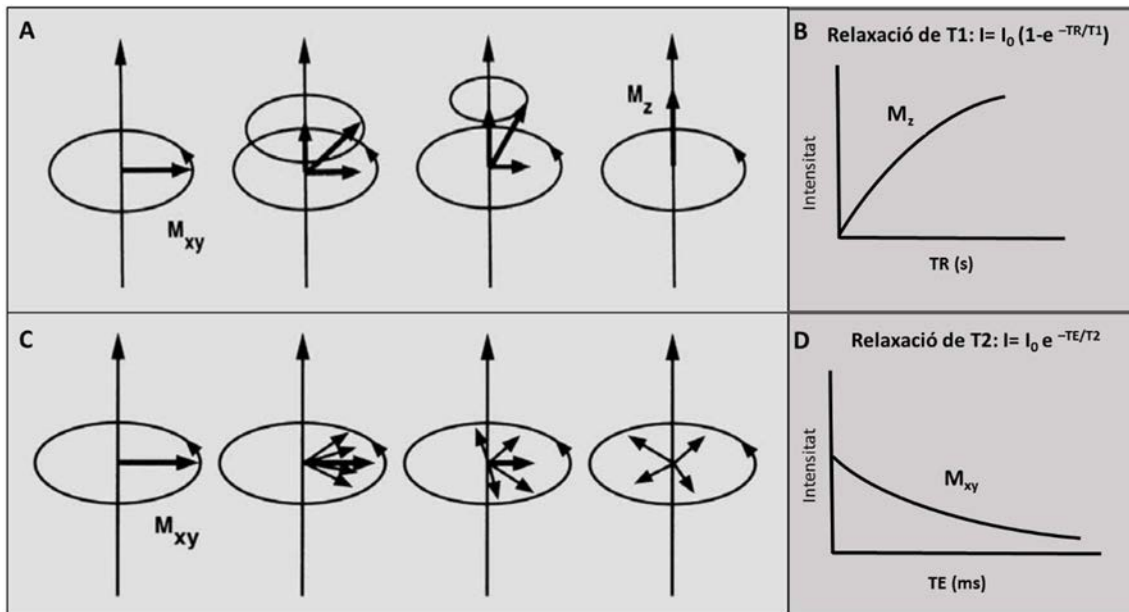
#### 1.5.3.1.1 Temps de relaxació

Tal com s'ha esmentat anteriorment, la senyal de RMN es detecta durant els temps de relaxació, els quals es poden dividir essencialment en 2: temps de relaxació longitudinal i temps de relaxació transversal (veure figura 11) (106).

- a) El temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) fa referència al temps que tarda la component longitudinal ( $M_z$ ) de la magnetització  $M_0$  en tornar a l'estat d'equilibri tèrmic. A mesura que avança el temps,  $M_z$  augmenta de forma exponencial. De fet, el  $T_1$ , és la constant que mesura el temps que tarda el sistema en recuperar el 63.2% de la magnetització inicial després d'haver-li aplicat un pols de  $90^\circ$ .
- b) El temps de relaxació transversal ( $T_2$ ), en canvi, fa referència a la pèrdua de la coherència de fase de la component transversal ( $M_{xy}$ ) de la magnetització  $M_0$ . Al aplicar un pols de RF, tots els espins tenen coherència de fase, ara bé, durant el procés de relaxació, aquesta coherència es va perdent a causa de la interacció entre els espins que fa que aquests precessin a diferents velocitats en certs moments i es creï un desfasament entre ells. El  $T_2$  és la constant que mesura el temps que tarda el sistema en perdre el 63.2% del senyal inicial. Tot i això, la pèrdua de la coherència global del sistema sol ser més gran ja que les inhomogeneïtats del camp magnètic també l'afecten. La constant que engloba les interaccions entre espins i la contribució de la falta d'homogeneïtat en el



camp magnètic es denomina  $T_2^*$ . En qualsevol cas, el  $T_2$ , que ocorre simultàniament a el  $T_1$ , és igual o inferior a aquest ( $T_2 \leq T_1$ ).



**Figura 11. Representació dels temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) i transversal ( $T_2$ ).** A la part superior **(A)**, on hi ha representat el  $T_1$ , s'observa com, just després d'haver-se aplicat un pols de  $90^\circ$  (figura de l'esquerra), la component longitudinal de la magnetització ( $M_z$ ) és igual a 0 i, a mesura que passa el temps, aquesta va augmentant fins a recuperar l'estat d'equilibri tèrmic (figura de la dreta). Al costat **(B)**, es mostra la corba d'intensitat que segueix  $M_z$  en funció del temps de repetició (TR) i l'equació que permet calcular  $T_1$  a partir del TR. A la part inferior **(C)**, on hi ha representat el  $T_2$ , s'observa com just després d'haver-se aplicat un pols de  $90^\circ$  (figura de l'esquerra), els espins dels diferents nuclis tenen coherència de fase i el senyal  $M_{xy}$  és màxim. A mesura que va avançant el temps, aquesta coherència de fase es va perdent fins que al final tots els espins estan totalment desfasats, moment en el qual  $M_{xy}$  és 0 (figura de la dreta). Al costat **(D)**, es mostra la corba d'intensitat que segueix  $M_{xy}$  en funció del temps d'eco (TE) i l'equació que permet calcular  $T_2$  a partir del TE. Figura adaptada de (106).

### 1.5.3.2 MRI

La imatge per ressonància magnètica (MRI) és una tècnica àmpliament utilitzada per al diagnòstic tan clínic com preclínic ja que, sense ser gaire invasiva, permet obtenir imatges d'un contrast i una resolució molt elevades.

A les seccions anteriors hem vist com detectar el senyal de RMN. Per obtenir una imatge per ressonància magnètica és necessari localitzar espacialment la procedència d'aquest senyal, la qual cosa s'aconsegueix mitjançant l'aplicació de gradients de camp magnètic en tres direccions ortogonals de l'espai durant breus períodes de temps, en el transcurs de l'adquisició de les seqüències, els quals modifiquen el camp magnètic efectiu en cada punt, de manera que cada protó tindrà una codificació en fase i en freqüència diferent segons la seva posició.

Una imatge consisteix en un conjunt d'elements digitals d'imatge (píxels), però que realment representen elements de volum del teixit original (vòxels). La manera més senzilla d'obtenir imatges per MRI és seleccionant primer el o els plans dels quals es vulgui fer la imatge per, posteriorment, codificar espacialment les altres dues dimensions dins d'aquest pla seleccionat, passant de tenir un volum en 3-dimensions a múltiples seccions en 2-dimensions. D'aquesta manera, els tres gradients utilitzats s'anomenen:

- a) Gradient de selecció de tall (*slice-selection*) o codificació espacial. Determina la orientació del pla en el que es vol obtenir la imatge bidimensional. Aquestes dues dimensions seran codificades en freqüència i en fase.
- b) Gradient de lectura (*readout gradient*) o codificació en freqüència. Mitjançant l'aplicació d'aquest gradient de lectura durant l'adquisició del senyal s'obté la codificació en freqüència.
- c) Gradient per la codificació en fase (*phase encoding*). Entre els dos gradients anteriors, se n'aplica un tercer que és perpendicular al gradient de lectura i que permet la codificació en fase.

Tot i que, com s'ha dit anteriorment, la tècnica de RMN es pot aplicar als nuclis de diferents elements com el  $^{13}\text{C}$  o el  $^{31}\text{P}$ , el més habitual és utilitzar la RMN de  $^1\text{H}$ . En aquest cas, les imatges que s'obtenen provenen del senyal dels hidrògens presents en els teixits, principalment formant part de l'aigua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), però també de la grassa.

Abans de detallar les característiques de cada tipus d'imatge, convé remarcar que, per tal de maximitzar els contrastos entre els diferents teixits, existeixen diverses seqüències de polsos de RF que combinen els paràmetres següents:

- temps d'eco (TE), que mesura el temps que transcorre des de l'aplicació del pols de RF fins a la captació de la senyal de RMN
- temps de repetició (TR), que fa referència al temps entre els diferents polsos de RF d'excitació

- angle de gir ( $\theta$ ), que es refereix a l'angle que es dona al vector de magnetització després del pols de RF (normalment es treballa amb angles de  $90^\circ$  o  $180^\circ$ )

Les seqüències de polsos bàsiques consisteixen, o bé en una seqüència d'espín-eco (pols d'excitació de  $90^\circ$  seguit d'un pols de re-enfocament de  $180^\circ$  i posterior adquisició) o bé en una seqüència de pols-adquisició, també denominada com a gradient d'eco en MRI (un sol pols de RF d'angle  $\theta$ , que generalment és inferior als  $90^\circ$ , i adquisició).

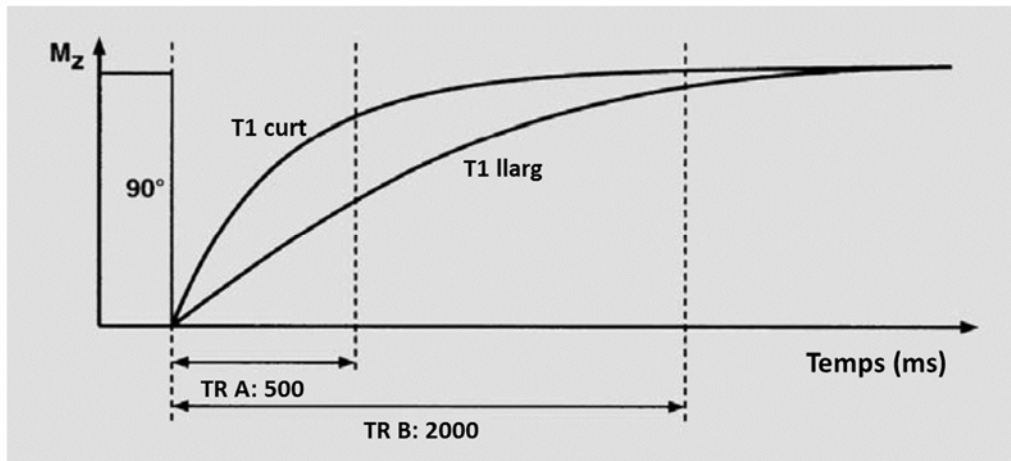
El contrast que s'obté a les imatges és degut a les diferències de densitat protònica (d'hidrògens) entre teixits, així com dels seus temps de relaxació característics ( $T_1$  i  $T_2$ ), per la qual cosa, en general, les imatges es classifiquen en 3 tipus segons el paràmetre en el qual es basa la generació del contrast: ponderades en densitat protònica, en  $T_1$  o en  $T_2$  (106).

Així, per exemple, utilitzant una seqüència espín-eco amb un TE i un TR curts en l'adquisició, es ponderarà més la imatge en  $T_1$  mentre que si, per contra, s'utilitza un TE i un TR llargs, s'obté una imatge ponderada en  $T_2$ . Per a les imatges ponderades en densitat protònica es sol fer servir un TE curt i un TR llarg (veure figures 12 i 13).

### 1.5.3.2.1 *Imatges ponderades en $T_1$*

Les imatges ponderades en  $T_1$  es basen en els diferents temps que tarden els nuclis a arribar de nou a l'estat d'equilibri poblacional després de l'aplicació d'un pols de RF, segons el teixit o la patologia del teixit en el que es trobin.

Els nuclis que cedeixin ràpidament a l'entorn, l'energia rebuda mitjançant els pols de RF, tindran un  $T_1$  curt mentre que, els que ho facin de manera més lenta, tindran un  $T_1$  més llarg. En una imatge ponderada en  $T_1$ , la intensitat de la senyal és inversament proporcional al valor de  $T_1$  ja que, a l'adquirir-la, s'utilitzen TE molt curts de manera que les substàncies amb  $T_1$  curt estan arribant al màxim de la seva recuperació mentre que, les de  $T_1$  llarg, tot just estan a l'inici de la recuperació. A més, s'utilitza un TR curt amb la qual cosa es minimitza l'efecte de  $T_2$ , ja que els nuclis encara no han perdut la coherència de fase.



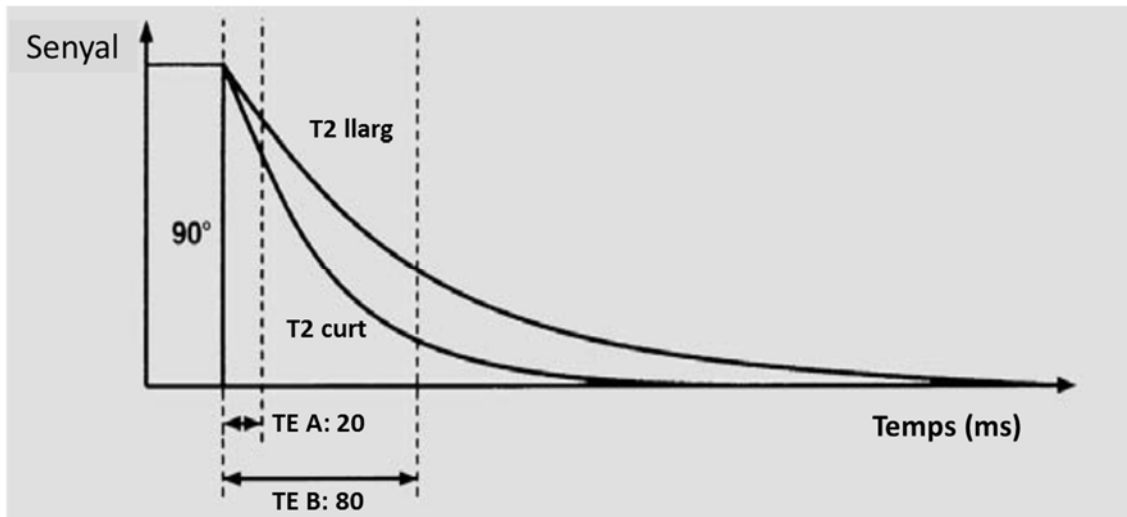
**Figura 12. Temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) de diferents teixits.** La figura compara un teixit de  $T_1$  curt i un de  $T_1$  llarg. Tal com mostra el gràfic, si s'utilitza un TR curt (opció A, 500 milisegons (ms)) el teixit de  $T_1$  curt haurà recuperat gairebé el total de la seva magnetització longitudinal, amb la qual cosa, donarà un senyal elevat, a diferència del teixit de  $T_1$  llarg, el qual no s'haurà recuperat gaire i, per tant, donarà un senyal més baix. Així doncs, el contrast entre els dos teixits serà evident i, per tant, la imatge estarà essent ponderada en  $T_1$ . D'altra banda, si s'utilitza un TR llarg (opció B, 2000 ms) els dos teixits tenen temps a recuperar la seva magnetització longitudinal i, per tant, la diferència entre ells serà gairebé inexistent, amb la qual cosa s'estarà minimitzant l'efecte de  $T_1$ . Figura extreta de (106).

#### 1.5.3.2.2 Imatges ponderades en $T_2$

Les imatges ponderades en  $T_2$  es basen en els diferents temps de pèrdua de coherència de fase, un cop aplicat el pols de RF, que tenen els nuclis en funció del tipus de teixit en el que es trobin.

Per exemple, en el cas de l'aigua lliure, com la que trobem al CSF, les variacions magnètiques locals són gairebé nul·les a causa de la mobilitat de les seves molècules, amb la qual cosa els seus nuclis tindran una gran coherència a l'hora de processar i, per tant, tindrà un  $T_2$  llarg. Al contrari, si l'aigua es troba lligada a altres estructures, els seus nuclis percebran petites diferències de camp magnètic, amb la qual cosa perdran la coherència abans i, en conseqüència, tindran un valor de  $T_2$  més petit.

En una imatge ponderada en  $T_2$  la intensitat de la senyal serà directament proporcional al valor de  $T_2$  ja que, en utilitzar valors de TE llargs, es maximitzaran les diferències existents entre les diferents zones d'interès. A més, s'utilitzen valors de TR llargs per minimitzar les diferències que es puguin donar a causa del  $T_1$ .



**Figura 13. Temps de relaxació transversal ( $T_2$ ) de diferents teixits.** La figura compara un teixit de  $T_2$  curt i un de  $T_2$  llarg. Tal com mostra el gràfic, si s'utilitza un TE curt (opció A, 20 milisegons (ms)) la diferència entre els dos teixits és petita i, per tant, s'està minimitzant l'efecte de  $T_2$ . D'altra banda, si s'utilitza un TE llarg (opció B, 80 ms), els espins dels nuclis del teixit de  $T_2$  llarg no pateixen tanta pèrdua de la coherència de fase i, per tant, mantenen més senyal. En canvi, els espins dels nuclis del teixit de  $T_2$  curt perdran la coherència de fase i gairebé no es veurà senyal. D'aquesta manera s'estarà ponderant la imatge en  $T_2$  i la diferència entre els teixits quedarà plasmada. Figura extreta de (106).

#### 1.5.3.2.3 Imatges ponderades en densitat protònica

Aquestes imatges es basen, únicament, en la diferència de la densitat de protons de cada zona o teixit (concentració d'aigua/grassa), amb la qual cosa, s'intenten minimitzar els efectes dels temps de relaxació. Per això, s'utilitzen valors de TE curts, que minimitzen els efectes del  $T_2$ , i valors de TR llargs per minimitzar els efectes de  $T_1$ . En les imatges ponderades en densitat protònica, una major concentració d'aigua donarà una senyal més intensa.

#### 1.5.3.2.4 Imatges de difusió (DWI, de l'anglès *diffusion weighted imaging*)

Aquestes imatges es basen en la mobilitat de les molècules d'aigua, les quals tenen un moviment tèrmic que les fa moure aleatòriament en l'espai. Aquest moviment és isotròpic, és a dir, que no depèn de la direcció en la que es produeix, quan es tracta d'aigua lliure o, gairebé isotròpic, en zones com els ventricles o el CSF. En canvi, a la major part del cervell, el moviment

de l'aigua és anisotròpic, essent diferent en funció de la direcció en què es produeixi, ja que existeixen estructures que la limiten, com les membranes cel·lulars. Per exemple, si es mesura el moviment en la mateixa direcció d'un axó amb les baines de mielina intactes, aquest serà més elevat que si es mesura en la direcció perpendicular a l'axó. Per a estudiar les difusions anisotròpiques s'han desenvolupat les tècniques basades en els tensors de difusió (DTI, de l'anglès *diffusion tensor imaging*), les quals avaluen la mobilitat de l'aigua en funció de la direcció (106).

Per a l'obtenció de les imatges de difusió s'apliquen gradients en diferents direccions durant l'adquisició del senyal de RM, els quals estan definits pel factor de difusió ( $b$ ). El senyal en aquestes imatges és inversament proporcional a  $b$  i segueix una corba exponencial decreixent. A partir d'imatges obtingudes en diferents direccions i amb diferents valors de  $b$ , es calcula el tensor de difusió per a cada vòxel, a partir del qual s'extreuen les tres difusivitats principals, corresponents a les tres direccions principals de l'aigua en aquest vòxel. En el cas de difusió isotròpica, les tres difusivitats principals tenen el mateix valor mentre que, en el cas de moviment anisotròpic, una o dues d'aquestes difusivitats principals seran molt més grans que les altres. Un dels paràmetres quantitius que es pot calcular a partir del tensor de difusió és el coeficient de difusió aparent (ADC, de l'anglès *apparent diffusion coefficient*) que correspon a la mitjana aritmètica de les difusivitats principals. L'ADC, doncs, caracteritza la mobilitat de les molècules en el medi on es troben. En un mapa d'ADC, la intensitat de cada píxel és proporcional a la difusió aparent en el vòxel corresponent i, per tant, les zones hiperintenses indiquen un coeficient de difusió més gran (108).

### 1.5.3.3 MRS

L'espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) és una tècnica que, combinada amb la MRI, permet mesurar una gran quantitat de metabòlits i macromolècules d'una regió localitzada, *in vivo* i d'una forma no-invasiva. L'espectroscòpia localitzada més utilitzada és la d'un únic vòxel (SV, de l'anglès *single voxel*), en la qual s'obté un espectre dels metabòlits existents en un volum determinat de l'espai, que correspon al punt d'intersecció de tres plans ortogonals.

L'espectroscòpia més comuna *in vivo* és la de  $^1\text{H}$ , tot i que, com passa amb la MRI, també es fa espectroscòpia basada en altres elements com el  $^{13}\text{C}$  o el  $^{31}\text{P}$ . El fonament de la tècnica es basa en el desplaçament químic ( $\delta$ ) que pateixen els nuclis en funció de les estructures de les quals

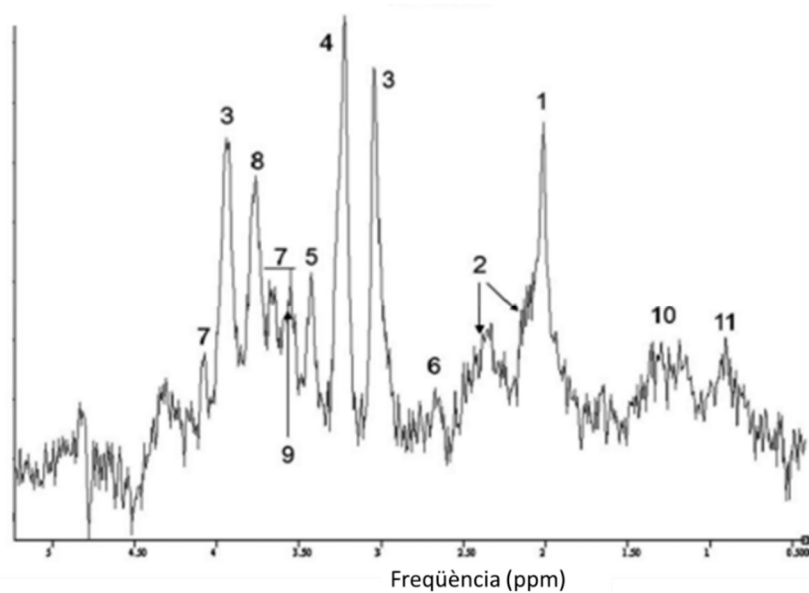
formin part. És a dir, els electrons que orbiten al voltant dels nuclis i que també estan sotmesos al camp magnètic  $B_0$ , contraresten l'efecte d'aquest camp formant petits camps magnètics al voltant del nucli, provocant el que es coneix com efecte d'apantallament. D'aquesta manera, nuclis de la mateixa espècie respondran a  $B_0$  (ressonaran) de manera diferent segons la posició que ocupin en una determinada estructura molecular.

Com que la ressonància d'un determinat nucli depèn del camp magnètic aplicat, per a poder fer comparatives en diferents camps magnètics, s'utilitza una escala relativa de valors respecte un valor de referència, que s'expressa en parts per milió (ppm). En el cas de la MRS *in vivo*, es solen utilitzar, com a referències, l'aigua (4.75 ppm) o, sobretot, el grup metil ( $N-CH_3$ ) de la creatina total (tCr) que és molt estable (3.03 ppm).

Per a poder fer un bon anàlisi dels metabòlits que conté una mostra o regió determinada, primer es sol llençar una seqüència de supressió de l'aigua per intentar atenuar o, fins i tot, suprimir, la senyal que dona aquesta molècula, la qual és molt més forta que la de la resta de metabòlits a causa de la seva gran abundància. Un cop minimitzat aquest senyal, es pot adquirir l'espectre o perfil metabòlic, la qualitat del qual dependrà, entre d'altres motius, de la relaxació transversal ( $T_2$ ), la temperatura o les inhomogeneïtats del camp magnètic. És per això que, en molts casos, es llença, prèviament, una seqüència homogeneïtzadora del camp magnètic que afecta la zona en la que es vol obtenir l'espectre.

Per avaluar la qualitat de l'espectre cal fixar-se en l'alçada dels pics, que depèn de la quantitat de nuclis ressonants en aquella freqüència, i de l'amplada del pic a la meitat de l'alçada, que indica la resolució de l'espectre. En general, l'espectroscòpia *in vivo* té una mala resolució respecte altres tipus d'espectroscòpia, i la relació entre el senyal que s'obté i el soroll de fons sol ser bastant baixa. Aquesta, es pot millorar augmentant el nombre de registres d'una mateixa mostra tot i que, en fer-ho, s'augmenta el temps total d'adquisició, la qual cosa és un factor limitant quan es treballa *in vivo*.

Finalment, cal apuntar que no tots els senyals d'un espectre (els diferents pics) corresponen a un únic grup funcional d'una sol substància sinó que, a vegades, grups funcionals de diferents substàncies ressonen a la mateixa freqüència, amb la qual cosa les seves senyals es solapen. De la mateixa manera, una metabòlit pot tenir diferents grups funcionals que ressonin a diferents freqüències, donant senyal a diferents pics de l'espectre (veure figura 14). Per això, en la majoria de casos, és necessari recórrer a programes d'ajust dels espectres com el LC Model o el jMRUI per a poder quantificar els diferents metabòlits (109).



**Figura 14. Exemple d'un perfil metabòlic de cervell de ratolí.** Els números assenyalen els pics corresponents als següents metabòlits. (1) N-acetil aspartat, (2) glutamat/glutamina, (3) creatina/fosfocreatina, (4) components que contenen colina, (5) taurina, (6) protons de N-acetil-aspartat aspartil, (7) mio-inositol, (8) protons d'aminoàcid alfa, (9) glicina + mioinositol, (10) macromolècules ressonant al voltant de 1.4 ppm i (11) macromolècules ressonant al voltant de 0.9 ppm. Figura adaptada de (110).

Els metabòlits que es detectin dependran, principalment, de la zona en què s'efectuï la MRS. En el cas del cervell, els principals metabòlits que es detecten o, els que més interès neurocientífic tenen, són els següents:

- a) N-acetil-aspartat (NAA). Es considera un marcador de viabilitat neuronal ja que es sol trobar en una concentració relativament alta en teixits neuronals mentre que resulta indetectable en altres teixits com la glia (111). Per això, una disminució d'aquest metabòlit es relaciona amb pèrdua o disfunció neuronal, fet que promou que s'utilitzi com a marcador en diverses malalties com l'AD (112). L'enzim responsable de la seva síntesi es troba al mitocondri, amb la qual cosa, una disminució de NAA es pot relacionar també amb disfuncions mitocondrials (113).
- b) Mio-inositol (mi o mlns). La seva funció no està del tot clara, però es creu que juga algun paper en diversos sistemes de senyalització neuronals, en el metabolisme dels fosfolípids d'inositol units a membrana, i en l'emmagatzematge de la glucosa. Es considera un marcador de glia i s'ha relacionat amb l'AD, on els seus nivells estan incrementats respecte a cervells sans (114,115).



- c) Glutamat (Glu). És el neurotransmissor d'excitació més abundant al CNS i es troba, principalment, a les neurones. Molt sovint es comptabilitza juntament amb la Glutamina (Gln), ja que ressonen a freqüències molt properes que es solapen i són difícils de distingir si s'utilitzen TE llargs o camps magnètics de baixa intensitat. A diferència del glutamat, la glutamina es troba als astròcits i actua com a precursor i magatzem del glutamat. Baixos nivells de glutamat indiquen un desequilibri en el seu metabolisme, tal com s'ha observat en etapes primerenques de l'AD en ratolins, mentre que alts nivells de glutamina es relacionen amb fallades hepàtiques i, a més, s'ha observat una correlació d'aquest metabòlit amb la proteïna tau hiperfosforilada (116–118).
- d) Creatina total (tCr). Inclou la creatina (Cr) i la fosfocreatina (PCr), ambdues involucrades en el metabolisme energètic a través de la reacció de la creatina-cinasa, generant ATP (de l'anglès, *adenosine triphosphate*) (119). Es considera un marcador de l'estat energètic de les cèl·lules però, a causa de la seva relativa estabilitat en condicions fisiològiques sense alteracions amb els pas del temps, es fa servir com a referència interna per a la quantificació d'altres metabòlits, utilitzant relacions com ara NAA/tCr o mIns/tCr (109).
- e) Derivats de la colina. Aquest grup de molècules format, principalment, per la colina lliure (Cho), la fosfocolina (PCho) i la glicerofosfocolina (GPC), està involucrat en la síntesi i la degradació de la membra cel·lular ja que són imprescindibles per la formació i el reciclatge de la fosfatidilcolina, que n'és un component bàsic. Es consideren un marcador d'integritat de la membrana, ja que si aquesta es trenca, els compostos derivats de la colina queden més lliures i poden contribuir en major mesura al senyal d'aquest metabòlit. Alguns estudis han observat increment de Cho en AD (120).
- f) Lípids i macromolècules (MM). Els lípids i les MM donen diferents senyals en diverses zones de l'espectre metabòlic. Aquests senyals provenen, principalment, de lípids neutres com els triacilglicerols i no solen estar gaire elevats en condicions normals (121).
- g) Taurina (Tau). Aquest metabòlit és un aminoàcid lliure present en el cervell, especialment a la part dorsal del nucli estriat i a l'hipocamp, la concentració del qual és molt més elevada en ratolins que en humans (122). La taurina està involucrada en múltiples funcions, una de les quals és actuar com a osmoregulador, de manera similar a com ho fa el mIns en humans, per la qual cosa, la seva variació podria ser similar a la del mIns, augmentant en cervells amb AD (123). Tot i això, no és una teoria que gaudeixi del consens total, ja que alguns autors han descrit la no-variació d'aquest metabòlit en models murins d'Alzheimer (124).

## 2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I OBJECTIUS

Aquest estudi es situa en el context d'una malaltia molt complexa com és l'Alzheimer, la qual té efectes a diferents nivells, tan moleculars com cel·lulars. Es desconeix la causa de la malaltia, així com la seva cura i, tot i que existeix una hipòtesi predominant de com es desenvolupa, aquesta és incompleta. Per les greus conseqüències que genera, creant una dependència creixent de les persones que la pateixen, fins a la seva inevitable mort i, atès el problema social que això comporta, s'estan dedicant grans esforços en desenvolupar estratègies molt diverses per intentar, no només frenar el desenvolupament de la malaltia, sinó curar-la. Per això també, cada vegada es disposa d'unes eines de diagnòstic més potents, per bé que, de moment, encara són insuficients.

És en aquesta situació, en la que es desenvolupa aquest treball, l'estudi principal del qual té dos grans objectius:

1. Posar a punt un sistema de diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer en el model 3xTg-AD, a partir del seguiment del seu desenvolupament mitjançant marcadors *in vivo* derivats de les tècniques de MRI i MRS, i la seva comparació a punt final amb anàlisis bioquímiques i histològiques.

2. Avaluar l'eficàcia i la seguretat de dues molècules basades en la immunoteràpia passiva, que dirigeixen la seva acció contra el pèptid  $A\beta_{1-5}$ , i que pretenen millorar els resultats del fàrmac del qual deriven, aturat en estudis clínics de fase III. Aquestes molècules són el scFv-h3D6-WT i el scFv-h3D6-EL.

A més, s'han desenvolupat dos estudis més, el primer dels quals té com a objectiu visualitzar l'aparició d'edema vasogènic mitjançant tècniques de MRI a partir de l'administració de l'anticòs mAb-m3D6 a ratolins 3xTg-AD.

El segon, que és una col·laboració feta en un altre projecte dins el mateix grup de recerca, té com a objectiu aplicar el mètode de diagnòstic posat a punt en l'estudi principal, per estudiar el tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J.



### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1 Animals

##### 3.1.1 Obtenció dels animals

Amb la intenció d'obtenir animals suficients per a tot aquest treball, i per d'altres que s'han elaborat simultàniament al mateix grup de recerca, es van comprar, a *The Jackson Laboratory*, 6 mascles i 6 femelles de la soca 3xTg-AD (model murí de la malaltia d'Alzheimer homozigot pels tres transgens que incorpora: PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub> i tau<sub>P301L</sub>) i 4 mascles i 4 femelles de la soca B6129SF2/J (ratolins control del mateix *background* genètic que el 3xTg-AD) i, a partir d'aquests, es van desenvolupar i mantenir dues colònies pròpies al Servei d'Estabulari (SE) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (125),(126). A més, es van comprar dues femelles control i dues 3xTg-AD de 5 mesos d'edat per poder posar a punt les tècniques utilitzades posteriorment per dur a terme els experiments de MRI i MRS.

Durant tot l'estudi els ratolins s'han mantingut en condicions estàndard de laboratori (a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , humitat del  $55 \pm 5\%$ , cicles de llum/fosc de 12h començant a les 08.00 i amb menjar i beure *ad libitum*) i han estat supervisats pel personal del SE.

En tots els experiments d'aquest treball s'han utilitzat només femelles ja que està demostrat que, en aquest model murí d'AD, desenvolupen la malaltia de forma més visible i més primerenca que els mascles, especialment pel que fa a l'acumulació de l'A $\beta$  (127). La selecció de les soques de ratolins, així com el gènere d'aquests, s'ha basat en experiments previs fets al grup, els resultats dels quals ja havien estat publicats a l'hora de realitzar aquest treball (76,86).

De forma breu, el model 3xTg-AD incorpora, al model murí PS1-KI (*knock in* per la mutació PS1<sub>M146V</sub>), transgens de l'APP i la tau al mateix locus genètic i en homozigositat, de manera que es reproduïen i mantenen les mutacions com si fossin una de sola. Aquest fet facilita la formació d'una colònia àmplia, sense un cost massa elevat i sense necessitat de genotipar els animals contínuament (128).

Pel que fa al quadre patològic, el 3xTg-AD replica els dos grans trets característics de l'Alzheimer (plaques d'A $\beta$  i cabdells neurofibril·lars de tau), els quals estan precedits per l'aparició de disfunció sinàptica (amb dèficits de LTP inclosos), la qual es correlaciona amb

l'acumulació d'A $\beta$  intracel·lular. A més, la malaltia s'estén seguint el mateix patró espacial que en humans, començant pel còrtex i arribant, més tard, a l'hipocamp. Finalment, afegir que el fet que el model desenvolupi el fenotip neuropatològic d'una manera progressiva al llarg del temps, permet fer estudis longitudinals i situar les diferents etapes de la malaltia (128).

Per acabar, cal remarcar que tots els experiments que inclouen la utilització d'animals s'han realitzat d'acord amb el marc legal europeu (directiva 2010/63/EU) i mitjançant procediments aprovats pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) de la UAB i de la Generalitat de Catalunya.

### **3.1.2 Genotipat dels ratolins**

Per tal de comprovar que els ratolins transgènics amb els quals s'han fet els experiments tinguin incorporats els transgens corresponents i descartar, també, que no hi hagi hagut cap creuament entre els animals de les dues soques, s'han genotipat tots els ratolins.

Breument, es tracta d'extreure DNA de la cua dels animals, realitzar una reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de l'anglès *polymerase chain reaction*) que amplifiqui els gens d'interès i córrer un gel d'agarosa el qual, mitjançant l'aplicació de corrents elèctrics, separi el DNA en funció de la seva llargada i permeti la identificació de les diferents molècules de DNA. A continuació es detalla el protocol utilitzat.

#### **3.1.2.1 Extracció del DNA**

- a) Obtenció d'un tall de cua de cada individu per part del personal del SE i emmagatzematge a -20°C.
- b) Al mateix tub que conté la cua, afegir 490  $\mu$ L de tampó de lisi (50 mL de Tris-HCl 1M a pH= 9; 20 mL de NaCl 5M; 10 mL de SDS (de l'anglès, *sodium dodecyl sulfate*) 10%; 5 mL d'EDTA (de l'anglès *Ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,5M i 415 mL de ddH<sub>2</sub>O (de l'anglès *double distilled H<sub>2</sub>O*)) i 6  $\mu$ L de proteïnasa K (estoc a 19 mg/mL) i incubar-ho tota la nit (O/N, de l'anglès *overnight*) a 56°C (termobloc de Techne Dri-Block 2A, Techne).

- c) Centrifugar 15 min a 13200 revolucions per minut (rpm) (rotor FA-45-24-11 de la microcentrífuga *Eppendorf 5424*) a temperatura ambient (RT, de l'anglès *room temperature*).
- d) Transferir el sobrenedant a un tub nou amb 500 µL d'isopropanol i agitar fins a observar una mena de cotó blanc.
- e) Centrifugar 3 min a 13200 rpm a 4°C i descartar el sobrenedant.
- f) Afegir 500 µL d'etanol al 70% (guardat a -20°C) i agitar el tub per desenganxar el pellet (mantenir en fred).
- g) Centrifugar 3s a 13200 rpm a 4°C i descartar el sobrenedant.
- h) Deixar assecar el pellet amb els tubs oberts durant 15 min a RT.
- i) Afegir 100 µL de ddH<sub>2</sub>O autoclavada.
- j) Posar 10 min a 60°C, passar pel vòrtex i fer un pols de centrífuga. Congelar a -20°C fins a realitzar la PCR.

### 3.1.2.2 PCR

- a) Quantificar les diferents mostres al NanoDrop (*NanoDrop 2000 Spectrofotometer, Thermo Scientific*) mesurant l'absorbància a una longitud d'ona (λ) d'entre 200-340 nm, considerant que una unitat d'absorbància a 260 nm equival a 50 µg/mL de DNA, i comprovar-ne la qualitat amb el coeficient 260/280, que ha de ser pròxim a 1.8.
- b) Els encebadors utilitzats per a poder amplificar els dos transgens de l'APP i la tau són:
  - APP-F: 5'-GCTTGCACCAGTTCTGGATGG-3'
  - APP-R: 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3'
  - TAU-F: 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3'
  - TAU-R: 5'-TTCAAAGTTCACCTGATAGT-3'

Els encebadors amplifiquen regions de 450 parells de bases (bp de l'anglès *base pairs*) en el cas de l'APP i de 330 bp en el cas de la tau.

- c) La barreja mare per a realitzar la PCR conté, per a 50 µL finals:
  - 50 ng de DNA
  - 1 µM de cada oligonucleòtid
  - 200 µM de dNTPs (de l'anglès *deoxynucleoside triphosphate*)
  - 1X del tampó corresponent a la polimerasa utilitzada
  - 1U Polimerasa Taq (*Biotoools*)
  - Enrasar amb ddH<sub>2</sub>O autoclavada

- d) Posar els 4 oligonucleòtids 10 min a 70°C i, ràpidament, deixar-los en gel.
- e) Afegir la resta dels components de la barreja mare.
- f) Posar les mostres al termociclador (*TC-512, Techne*) amb un programa de 30 cicles, on cada cicle realitzi els 3 passos típics de la PCR amb els paràmetres descrits a continuació:
  - Desnaturalització a 94°C durant 30s.
  - Unió de l'encebador a 52°C durant 30s.
  - Elongació de la cadena a 72°C durant 1 min.

A més, incorpora una elongació final de 5 min.

### 3.1.2.3 Gel d'agarosa

- a) Preparació d'un gel d'agarosa a l'1,2% en pes/volum (p/v) que té un bon rang de separació per inserts de 0,4-0,6 quilobases (kb) (129).
  - Posar 150 mL de tampó TAE 1X (Tris base 2M, EDTA 0.5M i pH 8; ajustat amb àcid acètic glaciari).
  - Afegir 1,8g d'agarosa (*AG-100 Ecogen*).
  - Escalfar fins que l'agarosa quedi dissolta i, quan el recipient es pot tocar amb la mà (~ 60°C), afegir 15 µL de bromur d'etidi.
  - Barrejar bé i abocar-ho al motlle preparat per formar el gel amb els pous on es carregaran les mostres.
- b) Agafar 20 µL de la mostra de la PCR i afegir 4 µL de tampó de càrrega 6X (Blau de bromofenol al 0.25% (p/v); xilè cianol FF al 0.25% (p/v) i glicerol al 30% (p/v)).
- c) Carregar cada mostra en un pou diferent reservant el primer pou per a carregar-hi 5 µL del marcador de pes molecular de 100 parells de bases (bp) (*New England Biolabs*).
- d) Connectar el suport del gel a la font d'alimentació i fer-lo córrer durant 1h a 120 volts.
- e) Visualitzar el resultat del gel amb llum ultraviolada amb el Molecular Imager Gel Doc (*Biorad*) del Laboratori de Luminescència i Espectroscòpia de Biomolècules (LLEB) de la UAB.

## 3.2 Obtenció de les proteïnes terapèutiques

### 3.2.1 Expressió i purificació dels scFvs (*h3D6-WT* i *h3D6-EL*)

#### 3.2.1.1 Processos previs

Abans d'explicar els diferents passos que s'han seguit per a realitzar l'expressió i la purificació dels scFvs, convé detallar una sèrie de paràmetres així com determinar els procediments previs a la pròpia expressió i purificació de proteïnes per a tal de fer-la més entenedora. Cal remarcar que el mètode utilitzat en aquest treball per a purificar els scFvs (esquematzat a la figura 16) va ser posat a punt per la Dra. Marta Marín i el Dr. Geovanny Rivera tal com s'explica, àmpliament, a les seves respectives tesis doctorals (87,130).

#### 3.2.1.1.1 Soques d'*Escherichia coli* (*E.coli*)

- a) *XL1 Blue*. Soca utilitzada per a l'obtenció de DNA recombinant. Les principals característiques són la deficiència del gen de la endonucleasa (*endA*), la deficiència del gen de recombinació (*recA*) i la resistència a la tetraciclina (Tc).
- b) *Origami 2 (DE3)*. Soca utilitzada per a l'expressió heteròloga preparativa dels scFvs. A diferència de soques més utilitzades com les BL21, les Origami tenen mutacions als gens de la tioredoxina reductasa (*trxB*) i de la glutatió reductasa (*gor*) les quals afavoreixen el correcte plegament de les proteïnes i la bona formació dels ponts disulfur, gràcies a l'ambient oxidatiu que confereixen al citoplasma d'*E.coli*.

El sistema DE3 incorpora un fragment del genoma del bacteriòfag T7 en el qual es troba el gen de la polimerasa del RNA (de l'anglès *Ribonucleic Acid*) del T7, el qual utilitza el sistema d'expressió gènica Lac sota el control del promotor de T7 (131). D'aquesta manera, la inducció es realitza sobre la polimerasa que reconeix el promotor T7 present a plasmidis com els de la sèrie pET, i s'evita la expressió prematura de la proteïna recombinant.

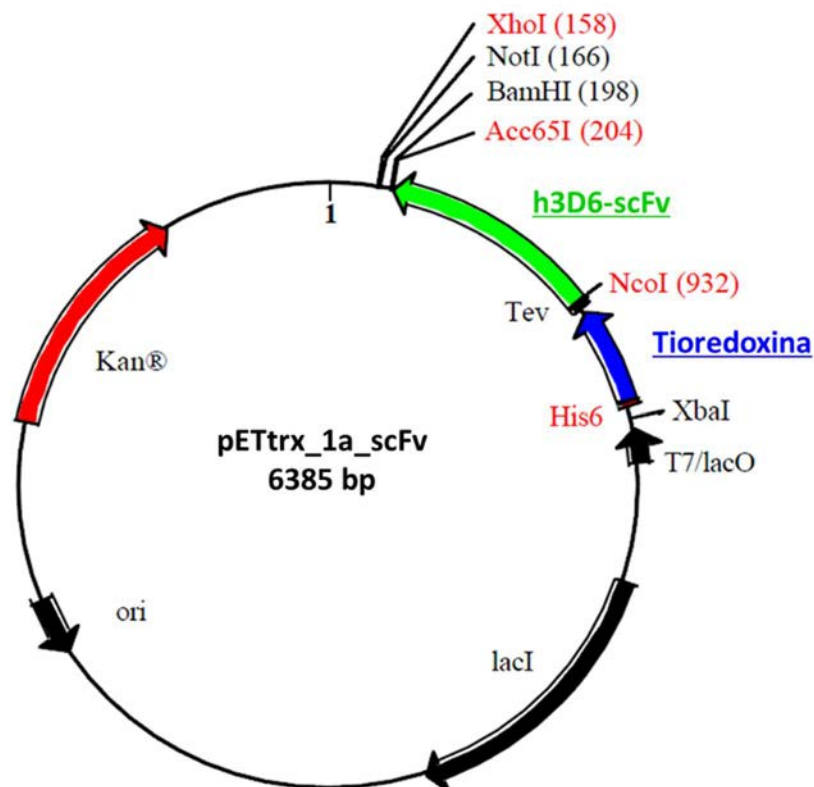
A més, aquesta soca d'*E.coli* té resistència a la Tc i a l'estreptomicina.

- c) *C41 (DE3)*. Soca derivada de les BL21 (DE3), que s'utilitza per a l'expressió heteròloga de la proteasa TEV (de l'anglès *Tobacco Etch Virus*).



## 3.2.1.1.2 Vectors d'expressió

- a) *pETtrx1a-scFv*. Aquest vector, que s'utilitza per expressar els scFvs, té 6385 bp, pesa 40.6 quilodàltons (kDa) i té un punt isoelèctric (pI) de 6.3. Tal com es mostra a la figura 15, a part del fragment corresponent al scFv, conté també una tioredoxina, una cua d'histidines (6His-tag) enganxada a l'N-terminal de tioredoxina, una diana de TEV a l'N-terminal del scFv de manera que al tallar amb aquesta proteasa, el scFv queda lliure, i té resistència a la kanamicina (Kn).
- b) *pMHTΔ238*. Aquest vector, que té un pI de 8.9 i pesa 27 kDa, porta clonada la proteasa TEV, fusionada a una MBP (de l'anglès *Maltose-Binding Protein*), i una cua d'histidines (6His-tag) separades, del fragment d'interès, per una diana de TEV que permet un auto-processament de la proteïna. A més, té resistència a la kanamicina (Kn).



**Figura 15.** Mapa del vector d'expressió dels scFv. S'observa la construcció formada per una cua d'histidines, la tioredoxina i la proteïna d'interès (scFv), separada dels altres components per una diana de tall de la proteasa TEV. Figura adaptada de (87).

### 3.2.1.1.3 Medis de cultiu dels bacteris

- a) LB (Luria-Bertani). És un dels medis més utilitzats per al creixement dels bacteris (129). Per a preparar un litre de medi LB es necessiten 10g de triptona, 5g d'extracte de llevat i 10g de NaCl i enrasar amb ddH<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 7 i autoclavar la solució per a la seva esterilització.
- b) 2xYT (de l'anglès *yeast and triptone*). És una variant enriquida del medi LB ja que porta el doble de llevat i de triptona que el LB estàndard.
- c) Plaques d'agar. Per fer créixer colònies d'*E.coli* en medi sòlid s'utilitza el mateix medi LB que en l'apartat a), afegint-hi un 15% d'agar (p/v) perquè es gelifiqui. Un cop autoclavat, es deixa refredar fins a 60°C, s'afegeixen els antibiòtics que es desitgi i es traspassa a les plaques de petri on es refreda i queda sòlid. S'emmagatzemen a 4°C.

### 3.2.1.1.4 Antibiòtics

Per a poder seleccionar les cèl·lules d'*E.coli* que porten incorporat el vector d'interès, aquest té resistència a algun antibiòtic de manera que, al aplicar l'antibiòtic en qüestió al cultiu, aquestes no moren. Els antibiòtics utilitzats en aquest treball són els següents:

- a) Kanamicina (Kn). Es parteix de 50 mg/mL i es dilueix 1:1000 en ddH<sub>2</sub>O.
- b) Tetraciclina (Tc). Es parteix de 5 mg/mL i es dilueix 1:500 en etanol.

### 3.2.1.1.5 Producció de DNA recombinant

Per a generar més estoc del DNA d'interès es parteix d'un cultiu O/N amb cèl·lules XL1-Blue que continguin el gen d'interès i, després de 3 centrifugacions de 5 min a 13200 rpm (rotor FA-45-24-11 de la microcentrífuga *Eppendorf 5424*), es segueixen les instruccions del kit de ThermoFisher GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) fins a obtenir el DNA. Llavors es quantifica al NanoDrop i es seqüencia la mostra (MacroGen) per tal d'assegurar-se que el DNA obtingut és el correcte (132).

### 3.2.1.1.6 Preparació de les cèl·lules competents i transformació

Per a poder introduir el plasmidi que conté el DNA de la nostra proteïna d'interès (scFv-h3D6-WT o scFv-h3D6-EL) a les cèl·lules d'*E.coli*, cal que aquestes siguin competents i, per això, necessiten un tractament previ, el protocol del qual s'explica a continuació (129):

- a) Picar una colònia d'Origami 2 d'una placa d'agar o inocular 5 µL de glicerinat (preparat prèviament a partir d'1 mL de cultiu saturat i 300 µL de glicerol al 50% estèril, i emmagatzemat a -80°C després de ser congelat amb Nitrogen líquid) en 5 mL de LB i incubar-ho O/N a 37°C i 300 rpm (incubador *Infors HT Ecotron*).
- b) Inocular 50 mL de medi LB amb 0.5 mL del cultiu de nit i incubar-ho a 37°C i 300 rpm fins que la densitat òptica (OD) arribi a 0.4-0.5 unitats ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).
- c) Transferir el cultiu a un tub estèril i centrifugar a 2900 g durant 15 min a 4°C. Decantar i deixar el tub de cap per avall en un paper de filtre durant 5 min.
- d) Resuspendre el pellet en 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (guardat a 4°C). Primer es resuspenen 2.5 mL pipetejant suaument i, llavors, la resta. Deixar-ho en gel durant 15 min.
- e) Centrifugar a 2900 g durant 15 min a 4°C, decantar el sobrenedant i deixar el tub de cap per avall en un paper de filtre durant 2 min.
- f) Resuspendre el pellet en 2.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (guardat a 4°C) i deixar-ho en gel durant 1h.
- g) Fer alíquotes de 100 µL i deixar-les en gel si es volen utilitzar el mateix dia o bé, si són per guardar, afegir 30 µL de glicerol 50% a cada alíquota i congelar-les a -80°C.

Un cop les cèl·lules són competents, es pot procedir a la transformació (introducció del DNA) d'aquestes (si no s'han preparat el mateix dia, deixar-les en gel 20 min com a mínim per a què es descongelin del -80°C):

- h) Afegir 50 ng del DNA d'interès, barrejar per inversió i incubar en gel durant 30 min.
- i) Posar els tubs en un bany d'aigua a 42°C durant 90s i llavors deixar-los 5 min en gel.
- j) Afegir 1 mL de LB líquid a cada tub i incubar-los a 37°C i agitació suau durant 60-90 min.
- k) Centrifugar 3 min a 13200 rpm i resuspendre el pellet amb 100 µL del sobrenedant (concentració 10X de la mostra).
- l) Sembrar les alíquotes de 100 µL (10X) en plaques d'agar + LB + antibiòtic corresponent i incubar a 37°C O/N.

### 3.2.1.1.7 Purificació de la proteasa TEV

Com ja s'ha explicat, el vector que conté els scFvs té un lloc de tall de la proteasa TEV per a separar la tioredoxina i la cua d'histidines del propi scFv. Per a poder-la utilitzar durant la purificació dels scFvs, (explicada més endavant, a l'apartat 3.2.1.3.2) primer s'ha d'expressar i purificar. El protocol per a fer-ho es detalla a continuació.

- a) Picar una colònia de la soca C41 (prèviament preparada per a ser competent i transformada amb el vector pMHTΔ238 que conté el DNA de TEV, seguint els passos descrits a l'apartat anterior) en 5 mL de LB, afegir 5 μL de Kn i deixar-ho O/N a 37°C i 220 rpm.
- b) Agafar els 5 mL d'O/N, posar-los en 1L de LB, afegir-hi 1 mL de kn i deixar a 37°C i 220 rpm fins que l'OD<sub>600</sub> estigui entre 0,7 i 1,2.
- c) Induir amb 0,5 mM d'IPTG (de l'anglès *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*. Estoc a 1M, per tant, per a 1L de cultiu s'han de posar 500 μL d'IPTG) i deixar-ho 4h a 25°C i 220 rpm.
- d) Centrifugar 30 min a 4°C i 8000 rpm (rotor JA-14, *Beckman*) i pesar el pellet resultant. Resuspendre'l amb tampó de lisi (Tris-HCl 160 mM + NaCl 4M, pH 8.5) fred a una relació de 6 mL de tampó per a cada gram de pellet.
- e) Fer 3 cicles de congelació i descongelació i, en acabat, fer 6 cicles de sonicació de 45s a una freqüència del 50% i potència de 9 (*B.Baun, Labsonic*).
- f) Centrifugar 45 min a 4°C i 19000 rpm (rotor JA-25.50, *Beckman*), recuperar el sobrenedant i passar-lo per un filtre de PVDF (de l'anglès *polyvinylidene difluoride*) de 0.45 μm.
- g) Introduir-lo a un flux constant d' 1 mL/min (mitjançant una bomba peristàtica P1 (*GE Healthcare*) en 2 columnes His-Trap acoblades i prèviament equilibrades amb 40 mL de tampó A (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM i pH 7.5).
- h) Un cop introduïda la mostra, connectar les columnes HisTrap™ HP (*GE Healthcare*) a l'aparell de FPLC (*Fast Liquid protein chromatography*) ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*), i córrer un programa amb un flux de 2.5 mL/min amb els següents passos (els passos previs pel correcte funcionament de l'ÄKTA es detallen més endavant, a l'apartat 3.2.1.3.4):
  - 4 volums de columna (VC) amb un 0% de tampó B (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 350 mM, 500 mM Imidazol i pH 7.5)
  - 8 VC amb un 15% de tampó B

- 10 VC amb un 100% de tampó B
  - 4 VC amb un 0% de tampó B
- i) Fer un pool de les fraccions que contenen la proteïna d'interès i fer un canvi de tampó a Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10% i pH 7.3 mitjançant les columnes PD-10 *Desalting Columns (GE Healthcare)* seguint els següents passos:
- Passar 25 mL de ddH<sub>2</sub>O i 25 mL de tampó per equilibrar la resina de la columna.
  - Afegir 2.5 mL de mostra.
  - Afegir 3.5 mL de tampó i recollir el que surt de la columna. Repetir el pas anterior i aquest fins haver passat tota la mostra.
- j) Quantificar la quantitat de proteïna de la mostra amb el NanoDrop mesurant l'absorbància a una  $\lambda$  de 280 nm.
- k) Fer alíquotes d' 1 mL, congelar-les amb nitrogen líquid i emmagatzemar-les a -20°C.

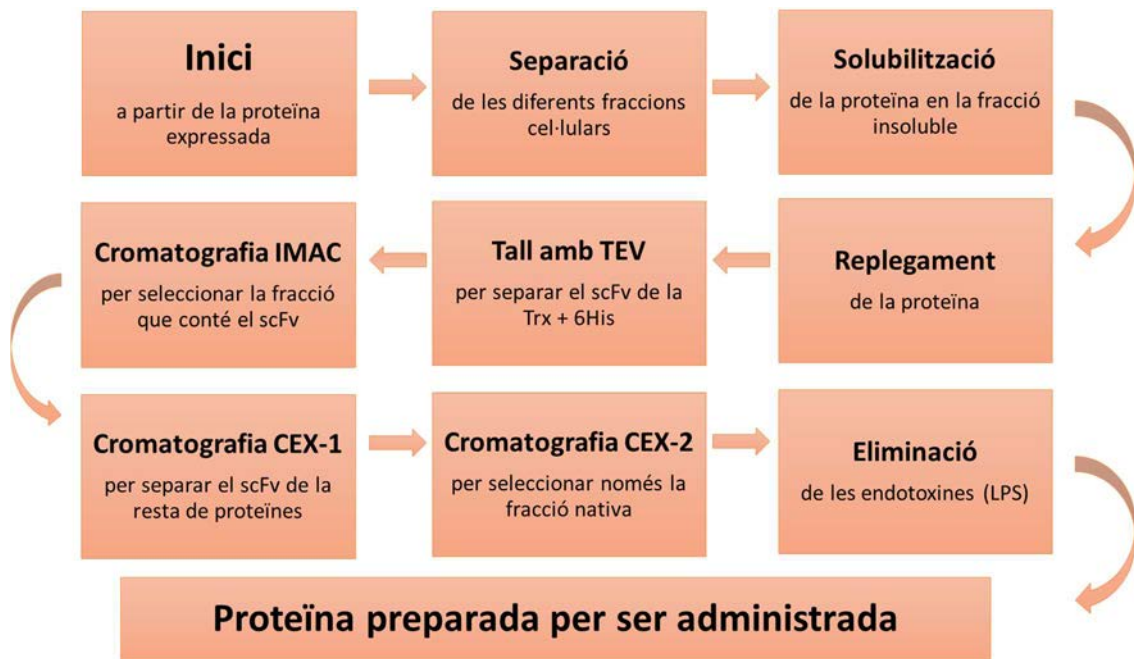
### 3.2.1.2 Expressió preparativa de les proteïnes

L'expressió preparativa consisteix en fer créixer un cultiu d'*E.coli* per tal que el nombre de cèl·lules que expressen la proteïna d'interès sigui màxim i, per tant, poder-la purificar en major quantitat. El sistema DE3 que incorpora la soca Origami 2 utilitzada, permet mantenir silenciada l'expressió de la proteïna d'interès fins a l'addició de l'IPTG, la qual cosa permet començar a expressar la proteïna quan el cultiu està en fase exponencial de creixement, maximitzant-ne així el rendiment (131). Els passos seguits es descriuen a continuació.

- a) Inocular 5 mL de LB picant una colònia de la placa amb les cèl·lules Origami 2 transformades.
- b) Afegir-hi 5  $\mu$ L de Kn i 5  $\mu$ L de Tc i deixar-ho O/N a 37°C i 220 rpm.
- c) Inocular 50 mL de LB, afegint-hi 50  $\mu$ L de Kn i 50  $\mu$ L de Tc i deixar-ho 3 hores a 37°C i 220 rpm.
- d) Inocular 4L de medi 2xYT (en 4 erlenmeyers de 2L diferents) amb 10 mL del pre-inòcul per erlenmeyer, afegir-hi els antibiòtics corresponents (1 mL de Kn i 1 mL de Tc) i deixar-ho a 37°C i 220 rpm fins que arribi a una OD<sub>600</sub> d'entre 0.6 i 0.8 unitats.

- e) Incluir l'expressió de la nostra proteïna amb 500  $\mu\text{L}$  d'IPTG 1M i deixar-ho O/N a 20°C i 220 rpm.
- f) Centrifugar 30 min a 4°C i 8000 rpm (rotor JA-14, *Beckman*) i resuspendre el pellet amb 160 mL de tampó de lisi fred. A partir d'aquest moment la proteïna s'ha de mantenir en gel fins al punt final.

### 3.2.1.3 Purificació preparativa de les proteïnes



**Figura 16.** Esquema simplificat del procés de purificació dels scFv. En aquest esquema es mostren els passos principals realitzats per purificar els scFv, partint de la proteïna expressada i fins a tenir-la a punt per administrar-la als ratolins.

#### 3.2.1.3.1 *Separació de fraccions, solubilització i replegament*

Els scFvs h3D6-WT i h3D6-EL s'expressen a la fracció insoluble de les cèl·lules d'*E.coli*, raó per la qual és necessari un procés de solubilització i replegament de la proteïna abans de poder-la purificar. A continuació s'enumeren els passos següents.

- a) Fer 3 cicles de congelació i descongelació i, en acabat, fer 6 cicles de sonicació de 45" a una freqüència del 50% i potència de 9 (*B.Baun, Labsonic*).

- b) Centrifugar 45 min a 4°C i 19000 rpm (rotor 25.50, *Beckman*) i decantar el sobrenedant.
- c) Resuspendre el pellet amb 40 mL de tampó de solubilització fred (Urea 8M en Tris-Acetat 100 mM pH 8.5) + Glutatió reduït (GSH) 10 mM) i deixar-lo resuspenent 2h, com a mínim, a l'agitador orbital (*J.P. Selecta S.A.*) de la cambra freda (4°C).
- d) Centrifugar 30 min a 4°C i 18000 rpm i recuperar el sobrenedant.
- e) Posar el sobrenedant en 360 mL de tampó de replegament, gota a gota, a 4°C i en agitació suau i deixar-lo així unes 60h (idealment, tot un cap de setmana). El tampó de replegament està format per Tris 100 mM, L-Arginina 100 mM i glutatió oxidat (GSSG) 0.15 mM (de manera que la relació GSH:GSSG és 1 mM:0.15 mM) diluït en ddH<sub>2</sub>O, a un pH final de 8.5 i en fred.
- f) Centrifugar 30 min a 4°C i 18000 rpm, recuperar el sobrenedant i passar-lo per un filtre de PVDF de 0.45 µm.
- g) Concentrar amb els centricons (*tubs Amicon® Ultra-15 10K, centrifugal filtre devices, Millipore*) la proteïna fins a 200 mL (2X) per a facilitar els processos posteriors.
- h) Dialitzar la proteïna dues vegades, durant un mínim de 3h cadascuna, en 5L de tampó fred de tall amb TEV (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.5 mM a pH 8.3) per tal que es compleixi el factor de diàlisi mínim que és de 1/200 i multiplicatiu.

#### 3.2.1.3.2 Digestió amb la proteasa TEV

Un cop la proteïna està replegada es procedeix a separar el scFv de la resta de la proteïna de fusió (tioredoxina i cua d'histidines) mitjançant un tall amb la proteasa TEV (anteriorment purificada, tal com s'ha explicat a l'apartat 3.2.1.1.7) i una posterior cromatografia d'afinitat que, al passar la mostra per la columna, retindrà la tioredoxina amb la cua d'histidines gràcies als ions níquel de la seva matriu i, en canvi, deixarà passar la resta de mostra, on es troba el scFv.

- a) Centrifugar 30 min a 4°C i 18000 rpm i quantificar la proteïna del sobrenedant en el NanoDrop ( $\lambda=280$ ) per saber la quantitat de proteasa TEV que cal posar.
- b) Afegir GSH a una concentració final de 3 mM i GSSG a una concentració final de 0.3 mM. Ajustar el pH a 8.3, afegir la proteasa TEV amb una relació pes/pes de 1/50 i incubar-la 4h a 30°C i 50 rpm.
- c) Dialitzar la proteïna dues vegades, durant un mínim de 3h cadascuna, en 5L de tampó A d'IMAC fred (Tris-HCl 20 mM i NaCl 150 mM a pH 8.3).

### 3.2.1.3.3 Cromatografia d'afinitat amb metall immobilitzat (IMAC)

- a) Col·locar dues columnes HisTrap™ HP de 5 mL en sèrie obtenint un volum de columna total de 10 mL.
- b) Equilibrar la doble columna amb 10 VC de tampó A d'IMAC.
- c) Filtrar la mostra amb un filtre de PVDF 0.45 µm i passar-la per la columna amb un flux constant d' 1 mL/min amb l'ajuda d'una bomba peristàtica P1 (*GE Healthcare*).
- d) Recollir la fracció que travessa la columna, que és on tenim el scFv separat de la resta del vector d'expressió.
- e) Rentar amb 4 VC de tampó A i ajuntar-lo amb la fracció recollida anteriorment.
- f) Rentar amb 20 VC de tampó C d'IMAC (Tris-HCl 80 mM, NaCl 4M i Imidazol 2M a pH 8.3).
- g) Concentrar la fracció on es troba l'scFv fins a un volum màxim de 50 mL amb els centricons.
- h) Dialitzar la mostra dues vegades, durant un mínim de 3h cadascuna, en 5L de tampó A de columna d'intercanvi catiònic (CEX) (8.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a pH 6.5).

### 3.2.1.3.4 Cromatografia d'intercanvi catiònic (CEX)

L'últim pas de la purificació consisteix en una cromatografia d'intercanvi catiònic que reté la proteïna d'interès a la columna (el scFv té un pI de 8.28, amb la qual cosa, si s'utilitza un tampó a pH 6.5, quedarà carregat positivament i s'enganxarà a la columna). Un cop passada tota la mostra, la proteïna s'elueix amb un gradient ascendent de NaCl. La interacció que es produeix entre una proteïna i la matriu de la columna és diferent per cada proteïna, la qual cosa permet que a un determinat % de NaCl es pugui eluir només el scFv i, per tant, obtenir-lo separat de totes les altres proteïnes presents a la mostra. En aquest cas, a més, es fa una segona cromatografia d'intercanvi catiònic a un flux més lent per a poder separar bé la conformació nativa de les conformacions *scrambled* (conformacions en les quals els ponts disulfur de la proteïna no estan formats entre els residus de cisteïna correctes i, en conseqüència, el pI efectiu varia segons les diferents conformacions; en aquest cas, es desenganxen de la columna una mica més tard). A continuació es descriuen els passos següents.

- a) Centrifugar 30 min a 4°C i 18000 rpm, recuperar el sobrenedant i passar-lo per un filtre de PVDF de 0.45 µm.
- b) Omplir el *superloop* amb 50 mL de mostra i guardar-lo en fred.



- c) Preparar 500 mL dels tampons A i B (8.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.5 i, pel tampó B, afegir NaCl 1 M) de CEX, filtrar-los, desgasar-los, posar-los en gel i col·locar-hi les bombes A i B, respectivament, de l'aparell de FPLC, ÄKTA Purifier.
- d) Iniciar el programa UNICORN 5.11 (*GE Healthcare*) des del qual es controla l'ÄKTA i connectar la columna Resource<sup>TM</sup> S (*GE Healthcare*) de 6 mL.
- e) Fer una purga de les vàlvules, netejar el sistema i equilibrar la columna amb 5 VC a un flux de 2 mL.
- f) Connectar el *superloop* on hi ha la proteïna d'interès.
- g) Iniciar un mètode de l'UNICORN prèviament editat per a què, mitjançant diferents concentracions dels tampons A i B, separi la proteïna d'interès i la reculli en tubs diferents (1 mL a cada un). Els passos del programa, que corre a un flux de 2 mL/min, són:
  - Injectar la mostra
  - Rentar amb 5 VC de tampó A
  - Pujar fins a un 10% de tampó B amb 28 VC
  - Pujar fins a un 100 % de tampó B amb 6 VC
  - Mantenir-se al 100% de tampó B durant 5 VC
  - Baixar fins al 0% de tampó B amb 0 VC
  - Mantenir-se al 0% de tampó B durant 5VC
- h) Fer un pool de les fraccions que contenen la proteïna d'interès en estat natiu i dialitzar-lo dues vegades, durant un mínim de 3h cadascuna, amb 5L de tampó A de CEX fred.
- i) Realitzar una segona cromatografia d'intercanvi catiònic repetint els passos anteriors però ara, amb un flux de 1 mL/min.
- j) Un cop finalitzada i obtingut el pool de les fraccions que contenen la proteïna d'interès en estat natiu, congelar a -20°C.

#### 3.2.1.3.5 Cromatografia CEX analítica

Abans d'ajuntar tota la proteïna obtinguda a partir de les diferents purificacions i passar a l'eliminació dels lipopolisacàrids (LPS), cal comprovar que la proteïna d'aquell lot concret és 100% nativa. Per això, es realitza una cromatografia analítica que consisteix, bàsicament, en aplicar el mateix programa utilitzat per a la purificació de la proteïna, però introduint molta

menys quantitat de proteïna a la columna de manera que, aquesta, sigui capaç de separar, clarament, la fracció nativa del *scrambled* (en cas que n'hi hagi).

#### 3.2.1.3.6 Extracció de LPS, canvi de tampó i preparació de les alíquotes finals

Finalment, abans de poder injectar la proteïna als ratolins, cal extreure'n els LPS, també coneguts com endotoxines. Aquestes molècules, que es troben a la membrana exterior de les bacteries gram negatives, són capaces de desencadenar una resposta immune en els animals, per la qual cosa és obligatori eliminar-les abans d'injectar la proteïna d'interès. El protocol que es detalla a continuació s'ha dut a terme amb el *Detoxi-Gel Endotoxin Removing Kit (Thermo Scientific/Cultek)*.

- a) Desgasar la reïna durant 15 min, posar-la a les columnes per a tenir un VC d'1 mL i deixar-la sedimentar un mínim de 30 min.
- b) Abans d'utilitzar-la, passar 5 VC de sodi desoxicolat a l'1% (1g/100 mL) i 4 VC de ddH<sub>2</sub>O per regenerar i netejar la reïna.
- c) Passar 4 VC de PBS per equilibrar-la.
- d) Afegir 5 VC de proteïna a una concentració aproximada de 0.5 mg/mL.
- e) Deixar sortir 1 mL d'eluit i llavors començar a recollir.
- f) Afegir 5 VC de PBS i seguir recollint.
- g) Repetir els passos a partir de l'addició de sodi fins a finalitzar el volum de mostra que hi hagi.

Un cop obtinguda tota la proteïna, canviar el tampó a PBS 1X pH 7.4 amb les columnes PD10 seguint el següent protocol:

- h) Passar 25 mL de ddH<sub>2</sub>O i 25 mL de tampó per equilibrar la resina.
- i) Afegir 2.5 mL de mostra.
- j) Afegir 3.5 mL de tampó i recollir el que surt de la columna. Repetir el pas anterior i aquest fins haver passat tota la mostra.
- k) Quantificar la quantitat de proteïna de la mostra amb el NanoDrop ( $\lambda=280$ ), filtrar-la i concentrar-la fins arribar a una concentració de 0.5 mg/mL.
- l) Quantificar els LPS, seguint les instruccions del kit *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Scientific)*, per tal d'assegurar que s'han eliminat correctament i que, per tant, la mostra està a punt per ser administrada als ratolins.

- m) Per acabar, fer alíquotes de 1.2 mL per tal de descongelar-ne dues cada vegada que haguem d'injectar la proteïna als ratolins, congelar-les amb nitrogen líquid i emmagatzemar-les a -20°C.

#### 3.2.1.3.7 *Espectrometria de masses*

La comprovació que la proteïna purificada es correspon amb la proteïna d'interès s'ha dut a terme al Servei de Proteòmica i Biologia Estructural (SePBioEs) de la UAB. Els principals passos seguits es resumeixen a continuació.

- a) Desnaturalització parcial de la proteïna amb urea 4M
- b) Digestió amb tripsina + Anàlisi per MALDI-TOF (de l'anglès *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)
- c) Reducció de la mostra amb dithiothreitol (DTT) + Digestió amb tripsina + Anàlisi per MALDI-TOF

Aquest conjunt de tècniques permet, d'una banda, identificar la proteïna purificada mitjançant els pèptids que apareixen i, per tant, comparar-la amb la seqüència teòrica per saber si encaixa i, de l'altra, saber si hi ha alguna conformació *scrambled* de la proteïna, la qual cosa és possible comparant les diferents combinacions teòriques de pèptids (tenint en compte els 2 ponts disulfur de la proteïna) amb els pèptids trobats en l'anàlisi, un cop reduïda la mostra.

#### 3.2.1.3.8 *Electroforesi SDS-PAGE* (de l'anglès, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Per a poder fer un seguiment de la proteïna d'interès a les diferents etapes de la purificació, així com, per a poder determinar en quines fraccions o tubs es troba un cop realitzada una cromatografia, s'han dut a terme diverses electroforesis SDS-PAGE. Aquesta tècnica permet separar les diferents proteïnes d'una mostra, exclusivament, pel seu pes molecular, de manera que, coneixent el pes molecular de la proteïna d'interès, es pot saber en quines mostres està present i en quines no (133). A continuació, s'explica breument com s'ha aplicat la tècnica en aquest treball.

- a) Preparar els gels d'acrilamida al 12%.

- b) Muntar els gels a la cubeta Mini-PROTEAN® Tetra Cell (*Bio-Rad*) i omplir-la amb tampó d'electroforesi 1X (Tris-HCl 0.25M, Glicina 1.87M i SDS 1% (p/v), diluït 1/10 en ddH<sub>2</sub>O).
- c) Preparar les mostres per a ser carregades al gel (barrejar 20 µL de mostra i 5µL de tampó de càrrega 5X (Tris-HCl 200 mM i pH 6; 2-mercaptoetanol 6%; glicerol 50% (v/v), blau de bromofenol 0.4% (p/v) i SDS 10% (p/v)) i posar-ho 5 min a 95°C.
- d) Carregar 20 µL de les diferents mostres als múltiples pous del gel, reservant el primer carril per a posar 5 µL de marcador de pes molecular (*Precision Plus Protein™ Unstained Standards, de Bio-Rad*).
- e) Córrer el gel a 30 mA fins que el marcador de color arribi al final del gel.
- f) Treure el gel i tenyir-lo 5 min amb blau de Coomassie.
- g) Retirar el blau de Coomassie i afegir-hi aigua per a destenyir-lo. Anar canviant l'aigua fins que apareguin les bandes de proteïna.
- h) Realitzar una fotografia amb l'escàner GS-800 (*Bio-Rad*) del LLEB.

### 3.2.2 MAb-m3D6

#### 3.2.2.1 Obtenció del mAb-m3D6 (de l'anglès, monoclonal Antibody-mouse 3D6)

En primer lloc, cal aclarir que la idea era que l'anticòs sencer del qual deriven els scFvs, el mAb-h3D6, conegut comercialment com bapineuzumab, formés part de l'estudi longitudinal que s'explica en l'apartat 3.3, per a poder comparar l'eficàcia dels scFvs a l'hora de combatre certs aspectes de l'AD, amb la de l'anticòs sencer i, de passada, veure si, aquest últim, desencadenava els efectes secundaris que s'havien observat en els estudis clínics amb humans (83).

De fet, a l'hora de demanar el projecte PRODUCTE-2014 (00032) (fons europeus per al desenvolupament regional, FEDER, i Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, AGAUR), projecte de transferència de tecnologia basat en una patent del grup sobre l'elongació de l'extrem C-terminal del scFv-h3D6-WT (134), i gràcies al qual s'ha pogut realitzar la major part d'aquest treball, l'empresa Janssen (co-propietària del bapineuzumab juntament amb Pfizer) va recolzar la sol·licitud expressant que s'utilitzaria l'anticòs desenvolupat per aquesta empresa per a fer els experiments descrits, de manera que es comprometien a la seva cessió. Ara bé, a l'hora de fer el tràmit (MTA, de l'anglès, *Material Transfer Agreement*), les clàusules que posava

l'empresa per a la cessió del bapineuzumab eren impossibles d'acceptar per a una entitat pública com la UAB, de manera que aquesta cessió no es va arribar a realitzar mai.

Així doncs, es va optar per a comprar a l'ATCC (de l'anglès *American Type Culture Collection*), que és el repositori de cultius més gran del món, un híbridoma de l'anticòs 3D6 (clon RB96 3D6.32.2.4, PTA-5130, ATCC). Un híbridoma, consisteix en la fusió d'una cèl·lula, generalment de limfòcits B de ratolí, capaç de produir anticossos monoclonals, amb una cèl·lula tumoral de mieloma (càncer de limfòcits B). D'aquesta manera s'aconsegueix que l'anticòs es produeixi en grans quantitats ja que la cèl·lula en qüestió es reproduïx de forma ràpida i indefinida si es troba en un medi adient. En conseqüència, es va obtenir un clon de l'híbridoma 3D6 produït en ratolí (mAb-m3D6).

L'inconvenient principal de tot aquest procés és que, a causa de la lentitud de la burocràcia, especialment a l'hora d'analitzar el MTA per part dels diferents departaments legals, no va permetre esperar a l'arribada del mAb-m3D6 per començar el tractament longitudinal, així que, aquest, es va realitzar només amb els scFvs-h3D6-WT i EL. Tot i això, sí que es va poder utilitzar aquest anticòs en l'estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic (veure apartat 3.4).

### 3.2.2.2 Expressió i purificació del mAb-m3D6

L'expressió i purificació del m3D6 va ser duta a terme pel Servei de Cultius cel·lulars, producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) de la UAB. A continuació s'explica el protocol seguit, a partir de l'informe facilitat pel responsable de la unitat de producció d'anticossos, el Dr. Antoni Iborra.

#### *3.2.2.2.1 Descongelació i expansió del cultiu*

- a) Descongelar el clon de mAb-m3D6 submergint el criovial durant 1 min a 37°C i afegir 10 mL de medi DMEM W/Glutamax (de l'anglès *Dulbecco's Modified Eagle's Medium glutamine supplemented, Gibco*) sense sèrum fetal per tal de diluir el crioprotector (DMSO, de l'anglès *dimethyl sulfoxide*) i evitar la seva toxicitat a 37°C

- b) Centrifugar 5 min a 200 g i, després d'eliminar el sobrenedant, resuspendre les cèl·lules en medi DMEM amb un 10% de sèrum fetal (*FCS, de l'anglès fetal calf serum, Life Technologies*).
- c) Quantificar la concentració de cèl·lules vives i el percentatge de vitalitat mitjançant una càmera de Neubauer i una tinció en blau de tripà i, a partir dels resultats, cultivar els hibridomes en una concentració de 1000000 cèl·lules/mL.
- d) Expandir el cultiu des de plaques de 24 pous (ja que el nombre inicial d'hibridomes és molt baix) fins a flascons de cultiu de 75 cm<sup>2</sup>, renovant el medi de cultiu cada tres dies, la qual cosa es duu a terme amb una centrifugació de 5 min a 200 g i resuspenent el sediment cel·lular amb medi fresc. Centrifugar el sobrenedant obtingut, que és on es troben els anticossos secretats per les cèl·lules durant els 3 dies de cultiu, 5 min a 1000 g i congelar el nou sobrenedant a -20°C. Anar acumulant sobrenedant fins al moment de la purificació.

#### 3.2.2.2.2 *Inoculació al bio-reactor*

- e) Inocular el cultiu en un bio-reactor Cell Line 350 (*VWR*) per tal de millorar la productivitat de l'anticòs. Aquest bio-reactor consta de dues parts:
  - Part externa. És on s'afegeix el medi de cultiu sense sèrum fetal que serveix com a font de glutamina, aminoàcids i sals, i on, al llarg de la setmana de cultiu, s'acumularan els metabòlits derivats del consum de medi per part de les cèl·lules.
  - Part interna. És on hi ha els hibridomes cultivats amb medi DMEM amb sèrum fetal i on, al llarg de la setmana, s'acumula l'anticòs secretat que, degut al seu tamany (aproximadament 150 kDa), no pot travessar la membrana porosa que separa les dues parts del bio-reactor.
- f) Realitzar, setmanalment, tan un canvi de medi extern com un control de les cèl·lules. Per això, cal recollir els hibridomes de la part interna i centrifugar-los 5 min a 200 g. Com abans, cal resuspendre el sediment cel·lular en medi fresc per realitzar el recompte i ajustar el cultiu a la densitat cel·lular recomanada pel fabricant (inferior a 135 milions de cèl·lules dins el reactor).
- g) D'altra banda, centrifugar el sobrenedant obtingut, que conté els anticossos secretats durant els 7 dies de cultiu, durant 5 min a 1000 g i congelar-lo a -20°C.

#### 3.2.2.2.3 Purificació de l'anticòs

La purificació dels anticossos dels diferents sobrenedants es realitza mitjançant una cromatografia d'afinitat, utilitzant una columna de proteïna A (*HiTrap MAb Select, GE Healthcare*) que pot unir fins a 30 mg d'anticòs/mL de resina. La monitorització del procés es duu a terme a través de l'equip, i programari associat, *BioLogic LP (Low-pressure Chromatography System, BioRad)*. Breument:

- h) Descongelar el volum de sobrenedant a purificar, passar-lo per un filtre de 0.22 µm i diluir-lo en tampó d'unió a la columna ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  20 mM a pH 7.0).
- i) Aplicar la mostra a la columna a un flux de 1 mL/min.
- j) Eluir els anticossos units a la columna mitjançant tampó d'elució (0.1M Glicina a pH 3.0). Donada l'acidesa d'aquest tampó, recollir alíquotes de l'eluit de 900 µL en 100 µL de tampó amortidor (Tris-HCL 1M a pH 9.0) que fa que, el pH del medi on es troba l'anticòs purificat, quedi en 7.2, aproximadament.
- k) Ajuntar les diferents fraccions que contenen anticòs i realitzar una diàlisi en tampó salí (diluit 1/10 per tal d'eliminar l'excés de sals) a 4°C, O/N.
- l) Finalment, congelar l'anticòs a -20°C.

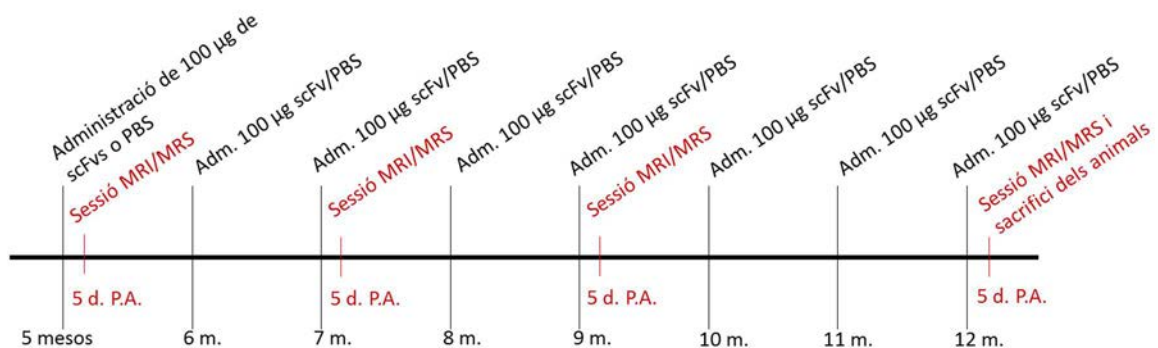
#### 3.2.2.2.4 Lots d'anticòs monoclonal purificat

Així doncs, durant aquest procés d'expressió i purificació del mAb-m3D6 s'han generat 2 lots d'anticòs. El primer, corresponent a 960 mL de sobrenedant obtinguts de l'expressió en flascons, s'ha purificat en dues tandes, aconseguint un rendiment mitjà de 15 µg/mL i, per tant, una quantitat total de 14.4 mg d'anticòs. El segon, corresponent a 317 mL de sobrenedant, 29 dels quals, obtinguts en les 5 fraccions del bio-reactor extretes abans de parar el cultiu, ha aconseguit un rendiment mitjà de 33.14 µg/mL i, per tant, una quantitat total de 10.5 mg d'anticòs.

### 3.3 Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6 WT i EL

#### 3.3.1 Disseny experimental

El procediment central d'aquest treball ha consistit en administrar, mitjançant injecció intraperitoneal, 100 µg de les proteïnes purificades, scFv-h3D6-WT i scFv-h3D6-EL, a 8 femelles 3xTg-AD i 8 femelles control, una vegada al mes, a partir dels 5 mesos i fins als 12 (punt final). A més, s'ha utilitzat l'administració de PBS com a control (veure figura 17).



**Figura 17. Esquema del disseny experimental del tractament longitudinal.** A l'esquema es mostren les diferents injeccions de scFvs (o PBS) administrades als ratolins al llarg del temps, així com les diferents sessions d'imatge i espectroscòpia per ressonància magnètica (MRI/MRS) practicades 5 dies post-administració (5 d. P.A).

#### 3.3.2 Sessions MRI/MRS

Les sessions s'han dut a terme a les instal·lacions conjuntes del Servei de Resonància Magnètica (SeRMN) de la UAB i el Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa – Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina (CIBER-BBN, formant la Unitat 25 de NANBIOSIS) que, des de 2016, és un espai registrat dins les instal·lacions del SE com a espai d'experimentació animal aprovat per la Generalitat. S'han explorat a 4 dels 8 animals de cada grup, 5 dies després de l'administració dels scFvs als 5, 7, 9 i 12 mesos d'edat dels ratolins, tal com es mostra a la figura 17. L'aparell de ressonància consisteix en un espectròmetre BioSpec 70/30 (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemanya), amb un imant horitzontal 7T, equipat amb una bobina de gradients B-GA12 inserida en un sistema de gradients B-GA20S i una sonda de recepció de superfície per



a cervell de ratolí, desacobrada activament d'una sonda d'emissió de volum de 72 mm de diàmetre intern. Abans de col·locar els animals dins l'imant, aquests han estat anestesiats amb isofluorà al 2% i s'han mantingut amb aquest nivell d'anestèsia i amb un cabal de 0.8 L/min d'O<sub>2</sub> durant tota la sessió.

A més, mitjançant el programa PC-SAM32 (*SA Instruments, Inc.*), s'ha monitoritzat tan la temperatura (a través d'una sonda rectal), que s'ha mantingut al voltant dels 37°C gràcies a un bany d'aigua exterior connectat amb el llit de l'animal, com la freqüència respiratòria (a través d'un coixinet col·locat sota el pit del ratolí) que s'ha mantingut entre 50 i 100 respiracions per minut.

Un cop l'animal està col·locat i fixat al llit i té les constants estables, es col·loca la sonda cerebral per a ratolí amb la configuració *Transceiver 1H1000w crosscoil (Bruker BioSpin)* i s'introdueix el llit dins l'imant. Es sintonitzen les sondes a la freqüència de ressonància específica de l'animal, per a una transferència d'energia òptima entre la bobina i el ratolí, i es passa a llençar, mitjançant el programa *Paravision 5.1 (Bruker BioSpin)*, les diferents seqüències de ressonància que ens permetran obtenir tan les imatges com l'espectroscòpia de cada animal.

### 3.3.2.1 Seqüències de MRI

#### 3.3.2.1.1 *Tripilot*

Aquesta seqüència adquireix una imatge a cada un dels tres plans ortogonals (axial, sagital i coronal) i permet saber si l'animal està centrat dins l'imant. Cal llençar la seqüència tantes vegades com faci falta fins a tenir l'animal ben centrat en els tres plans. Per aquesta seqüència s'han utilitzat els paràmetres següents: camp de visió (FOV de l'anglès *field of vision*) de 3 cm x 3 cm; TR= 100 ms; TE= 3 ms; Flip Angle= 30°, matriu d'adquisició (MTX, de l'anglès *Matrix*) = 128 x 128 i temps experimental (tExp) = 6s.

#### 3.3.2.1.2 *Referències anatòmiques*

Aquestes seqüències permeten obtenir unes imatges ponderades en T<sub>2</sub> i de baixa resolució espacial, que seran utilitzades com a referència per a la prescripció de les imatges definitives,

mitjançant l'aplicació de seqüències RARE (de l'anglès *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) en els 3 plans ortogonals (axial, sagital i coronal). Cada vegada que es canvia d'animal cal centrar la geometria de les 3 seqüències de la mateixa manera, per tal d'analitzar sempre la mateixa zona del cervell i minimitzar la variabilitat.

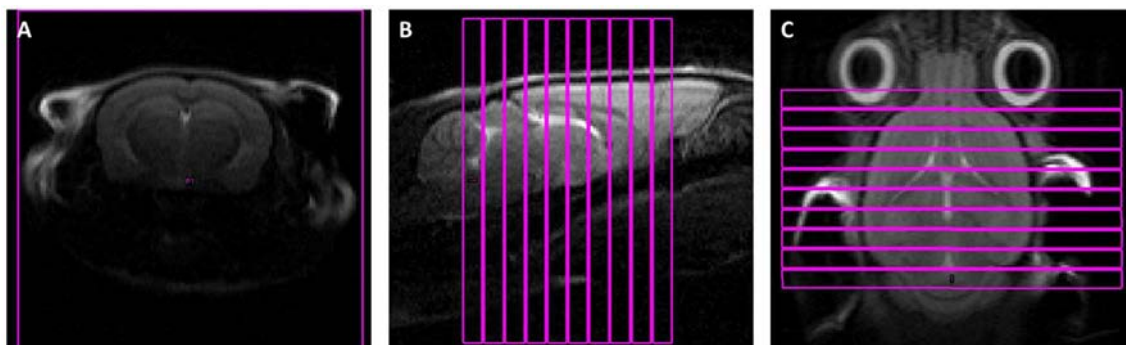
Al pla axial s'han adquirit 14 imatges amb un gruix de 1 mm i una distància entre imatges de 1.1 mm (aquest valor es refereix a la distància que hi ha entre l'inici d'una imatge i l'inici de la següent). Els paràmetres utilitzats han estat els següents: FOV= 1,92 cm x 1,92 cm; TR= 2000 ms; TE= 36 ms, factor RARE= 8 i MTX= de 128 x 128 i tExp = 24s.

Als els altres dos plans s'apliquen els mateixos paràmetres variant només el nombre d'imatges adquirides (7 en el pla sagital i 5 en el pla coronal), el TR que, en el cas del pla coronal és de 4200 ms, i el tExp que, per aquest últim pla, és de 50s.

### 3.3.2.1.3 Mapes d'ADC

Com s'ha explicat anteriorment (apartat 1.5.3.2.4 de la introducció), les imatges de difusió avaluen la mobilitat de l'aigua i són les que permetran, posteriorment, calcular el coeficient de difusió aparent (ADC). En aquest cas, es llença una seqüència EPI (de l'anglès *Echo Planar Imaging*) segmentada per a l'adquisició d'imatges ponderades en difusió, sincronitzada amb la respiració de l'animal per tal de minimitzar els artefactes que aquesta produeix en l'adquisició del senyal. S'adquireixen imatges de 10 seccions de 1 mm de gruix i 1.1 mm de distància entre elles, amb els paràmetres següents: número de segments= 4; TR= 2600 ms; TE= 28 ms; FOV= 1,92 cm x 1,92 cm i MTX= 96 x 96 (veure figura 18).

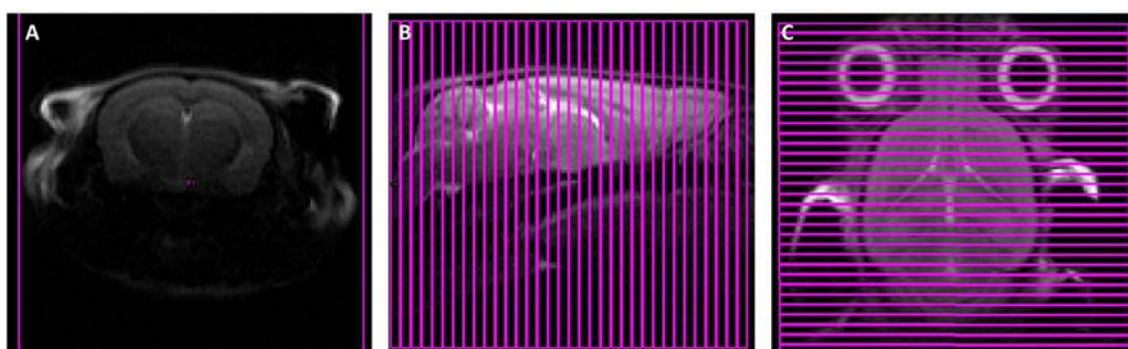
Per a cada secció s'han adquirit 5 imatges sense ponderació en difusió ( $b=0\text{s/mm}^2$ ) i imatges ponderades en difusió, en 20 direccions de difusió diferents, a tres valors de  $b$  (200, 600 i  $1000\text{s/mm}^2$ ). El temps de durada dels gradients de difusió ha estat de 5 ms separats per 15 ms i el tExp ha estat de 11 min 16s. Durant el transcurs de la seqüència cal parar atenció a la regulació de la temperatura ja que aquesta tendeix a augmentar.



**Figura 18. Geometria utilitzada a les imatges per tensor de difusió (DTI) i als mapes de  $T_2$ .** Es mostra la col·locació de les imatges que s'adquiriran en cada un dels 3 plans ortogonals de referència: axial (A), sagital (B) i coronal (C).

#### 3.3.2.1.4 Imatges d'alta resolució ponderades en $T_2$

Aquestes imatges, ponderades en  $T_2$  i agafades en alta resolució en el pla axial, seran les que ens serviran per mesurar, d'una forma més precisa, el volum de les diferents regions de l'encèfal. La geometria utilitzada és exactament la mateixa que en les imatges de DTI però, en aquest cas, adquirint 34 imatges de 0.5 mm de gruix i 0.55 mm de distància entre elles, tal com mostra la figura 19). La seqüència llançada és una seqüència RARE amb els paràmetres següents: FOV= 1,92 cm x 1,92 cm; TR= 4200 ms; TE= 36 ms, factor RARE= 8, MTX= 256 x 256 i tExp= 6 min 43s.



**Figura 19. Geometria utilitzada a les imatges d'alta resolució ponderades en  $T_2$ .** Es mostra la col·locació de les imatges que s'adquiriran a cada un dels 3 plans ortogonals de referència: axial (A), sagital (B) i coronal (C).

### 3.3.2.1.5 Mapes de $T_2$

En aquest cas, per adquirir les imatges ponderades en  $T_2$  que, posteriorment, permetran obtenir el valor de  $T_2$  dels diferents teixits, es llença una seqüència MSME (de l'anglès *Multi-Spin Multi-Echo*) amb la geometria exactament igual que a la seqüència de DTI (veure figura 18). Els paràmetres utilitzats però, sí que varien, i són els que segueixen: FOV= 1,92 cm x 1,92 cm; TR= 4000 ms; Nombre d'ecos= 18; primer TE= 10 ms; espaiat entre ecos= 10 ms; *Refocusing Flip Angle* 180°, MTX= 128 x 128 i tExp= 6 min 24s.

### 3.3.2.2 MRS

Per estudiar els diferents metabòlits d'una zona concreta del cervell, s'ha utilitzat l'espectroscòpia localitzada per ressonància de  $^1\text{H}$ . Per tal d'obtenir un espectre millor, abans de llançar la seqüència final s'han realitzat dos passos previs, els quals es detallen a continuació. Cal remarcar que tan per l'hipocamp com per al còrtex, els passos seguits han estat els mateixos, amb l'única diferència del tamany i la localització del vòxel (veure figura 20), el qual es situa a la seqüència final i llavors s'importa per a realitzar els passos previs.

#### 3.3.2.2.1 *Homogeneïtzació del camp*

En aquest pas s'intenten eliminar, tant com sigui possible, les inhomogeneïtats del camp a la zona on es realitzarà l'anàlisi. Per a fer-ho, es llança la seqüència FASTMAP (de l'anglès *Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections*) que, automàticament, realitza els ajusts de 1er i 2on ordre. Per determinar la zona a homogeneïtzar, s'importa la geometria de la seqüència final (veure apartat 3.3.2.2.4) i es modifica el tamany del vòxel, creant un cub de 5 mm<sup>3</sup> en el cas de l'hipocamp i de 4 mm<sup>3</sup> en el cas del còrtex. Els paràmetres utilitzats són els següents: TR= 800 ms; Flip Angle 90° i BW= 12019.2 Hz.

#### 3.3.2.2.2 Comprovació de l'ajust d'homogeneïtat

Mitjançant la seqüència localitzada PRESS (de l'anglès *Point-Resolved Spectroscopy*) sense supressió del senyal de l'aigua, s'adquireix un espectre de la regió d'interès, important la geometria de la seqüència final (apartat 3.3.2.2.4). Els paràmetres utilitzats són els següents: TE= 12 ms; TR = 2500 ms; BW espectral= 4006.41 Hz (13.34 ppm), nombre de punts adquirits= 4096, nombre de repeticions (NR)= 1 i tExp= 2.5s.

Un cop s'ha adquirit l'espectre, amb l'ajuda del programa TopSpin (*Bruker BioSpin*), podem comprovar la qualitat de l'ajust segons l'amplada que té el pic a la meitat de la seva alçada. Com més bona és la homogeneïtat del camp, més petita serà l'amplada dels pics de l'espectre i, per tant, s'obtindrà una millor resolució espectral. En aquest treball s'han donat per bons tots els ajustos on el valor esmentat no superava els 20 Hz.

#### 3.3.2.2.3 Supressió del pic d'aigua

Per a visualitzar millor els metabòlits a l'espectre de  $^1\text{H}$ , a més d'acumular durant molt més temps (NR=128 per l'hipocamp i 320 pel còrtex), es suprimeix el pic del senyal de l'aigua el màxim possible, ja que dona un senyal de protó tant gran, que dificulta la visualització dels senyals dels metabòlits d'interès. Per a fer-ho, s'activa el mòdul de supressió d'aigua a la seqüència PRESS descrita a l'apartat anterior utilitzant els mateixos paràmetres experimentals.

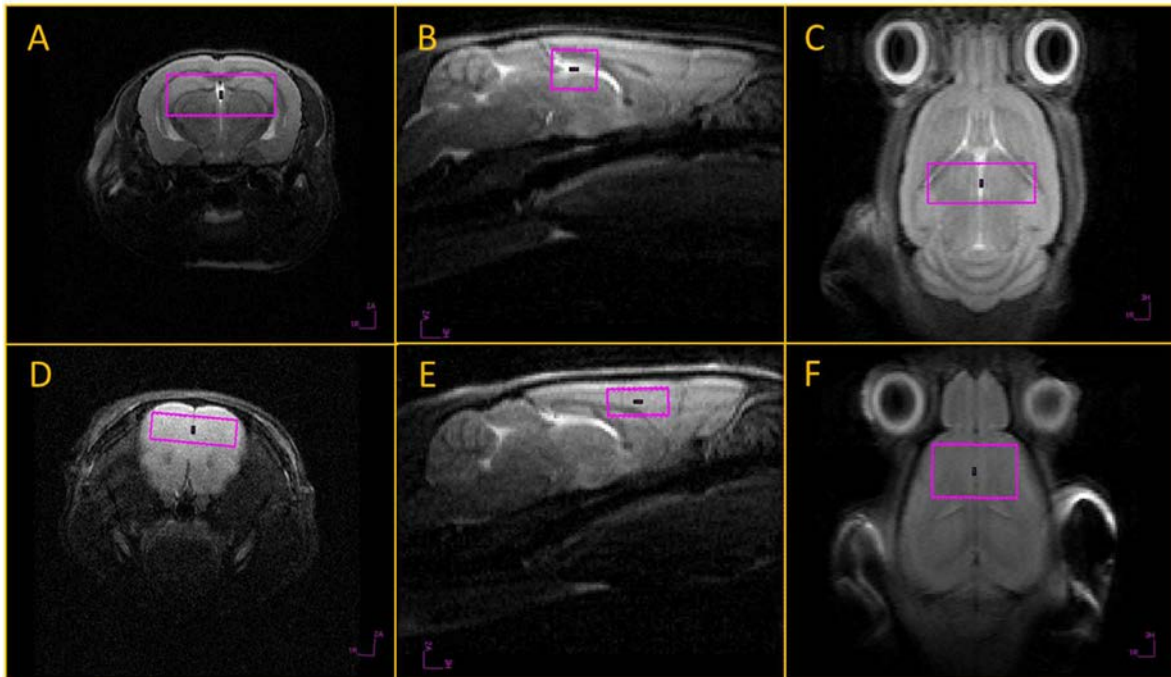
El mòdul de supressió d'aigua (VAPOR) consisteix en un tren de polsos de RF emesos a la freqüència de ressonància de l'aigua, la potència de la qual ha d'ésser ajustada per a cada ratolí i per a cada regió, per optimitzar la supressió del senyal de l'aigua.

#### 3.3.2.2.4 Espectroscòpia dels metabòlits

El primer que es fa és determinar el tamany del vòxel i col·locar-lo a la zona d'interès (veure figura 20). En el cas de l'hipocamp, es defineix un vòxel que fa  $6.5 \times 2.2 \times 2.2 \text{ mm}^3$  (en els eixos dreta-esquerra, anterior-posterior i dorso-ventral, respectivament) i es situa a la zona central de l'hipocamp, és a dir, agafant tan la part dreta com l'esquerra i tan sols deixant-ne fora la zona més ventral de la part posterior. Pel que fa al còrtex, es defineix un vòxel més petit ( $5 \times 1.5 \times 3$

mm<sup>3</sup>) i es col·loca a la part pre-frontal del còrtex. Els paràmetres utilitzats per a llençar la seqüència PRESS són: TE= 12 ms; TR= 2500 ms; BW = 50000 Hz i tExp= 5 min 30s i 13 min 30s per l'hipocamp i el còrtex, respectivament. Un cop realitzats els ajustos d'homogeneïtzació del camp magnètic i el calibratge de polsos de supressió d'aigua, es llança aquesta seqüència.

El temps total d'exploració de cada sessió de MRI/MRS ha estat de 90-120 min per animal.



**Figura 20. Geometria dels vòxels.** Localització del vòxel (rectangle rosa) en les seqüències d'espectroscòpia localitzada sobre imatges ponderades en T<sub>2</sub> en els plans axial (A i D), sagital (B i E) i coronal (C i F), per analitzar tan la zona de l'hipocamp (A, B i C) com la del còrtex (D, E i F) d'un ratolí 3xTg-AD.

### 3.3.3 Anàlisi de les imatges

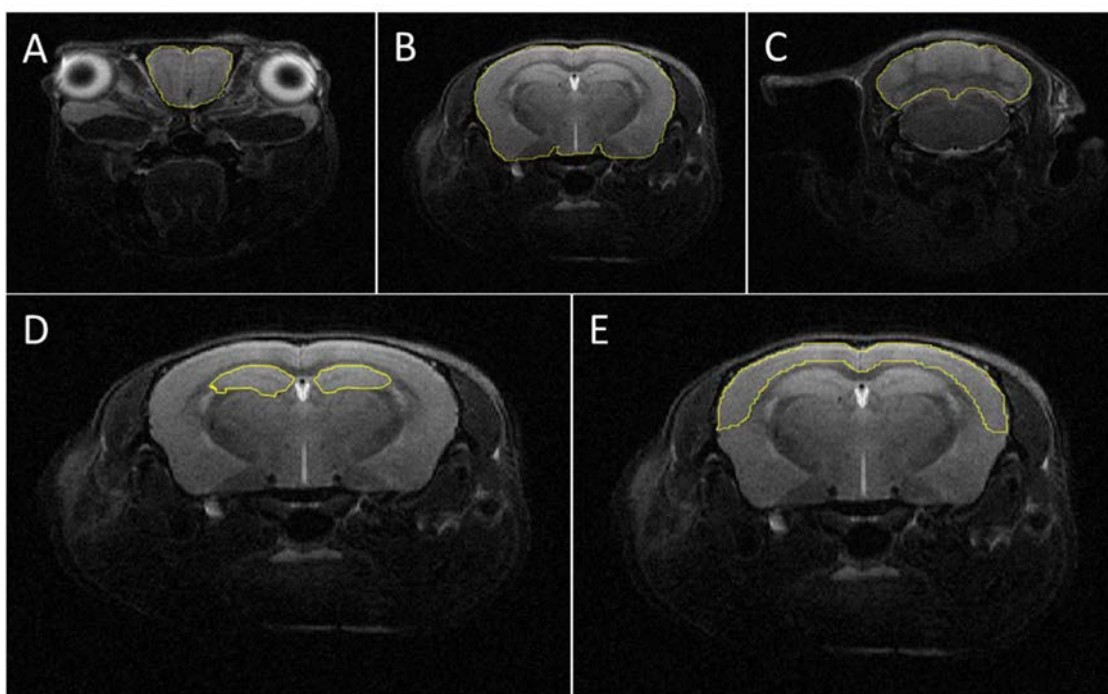
#### 3.3.3.1 Volumetria

Per quantificar els volums de les diferents regions dels cervell s'han utilitzat les imatges ponderades en T<sub>2</sub> d'alta resolució (veure apartat 3.3.2.1.4) on, a través del programari lliure ImageJ, s'han delimitat les regions d'interès (ROI, de l'anglès *regions of interest*) per a cada una de les 34 imatges que s'han adquirit de cada animal i se n'ha calculat l'àrea. Les regions

delimitades han estat, per ordre d'adquisició: el cerebel, el cervell i el bulb olfatori. A més, també s'han delimitat l'hipocamp i el còrtex en les imatges del cervell corresponents (veure figura 21).

Un cop obtingudes les àrees (en píxels<sup>2</sup>) per a cada secció, s'han sumat els valors de les àrees d'una mateixa regió en les seccions que la conté i se n'ha calculat el volum, multiplicant el nombre total de píxels pel volum d'un píxel a la imatge sabent que, aquest últim, es calcula amb la següent fórmula:

$$[(FOV_x \times FOV_y) / (n^\circ \text{ píxels}_x \times n^\circ \text{ píxels}_y)] \times \text{distància entre imatges}$$



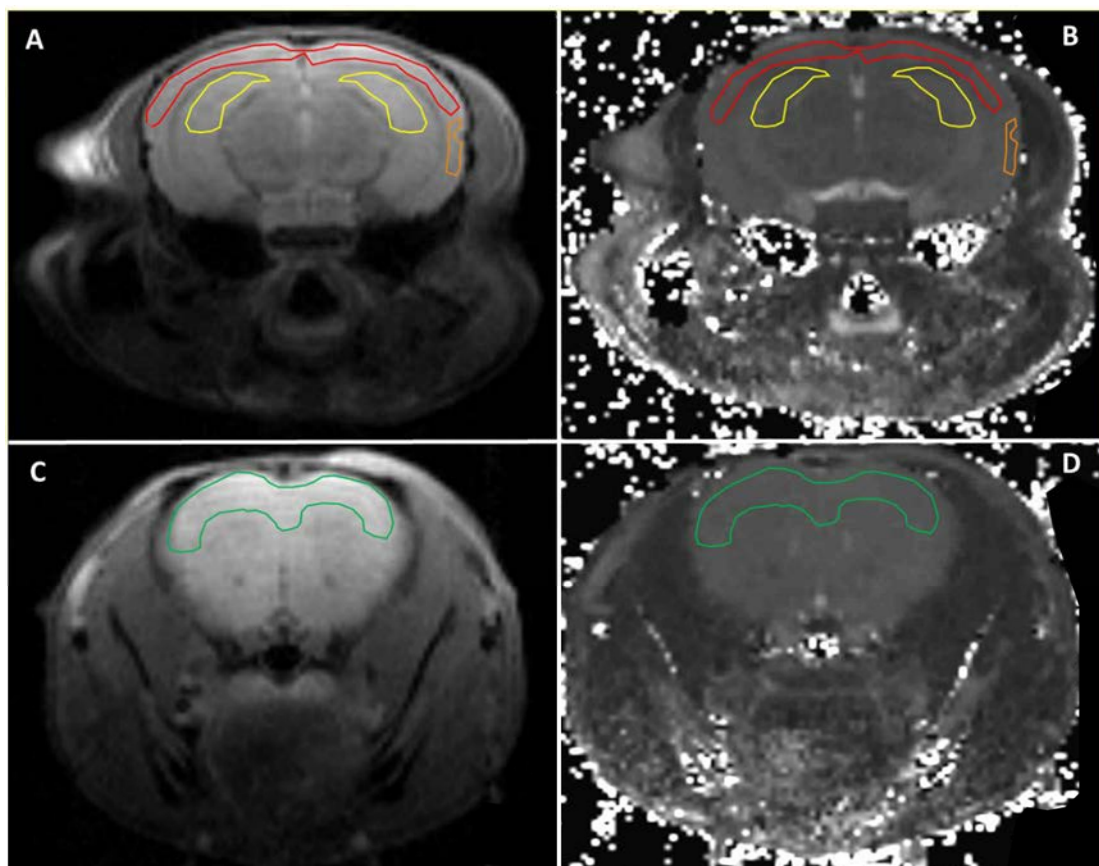
**Figura 21. Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el volum.** Imatges representatives del traçat de cada una de les ROI analitzades: bulb olfatori (A), cervell (B), cerebel (C), hipocamp (D) i còrtex (E).

### 3.3.3.2 $T_2$

A partir de les imatges adquirides a diferents TE (veure apartat 3.3.2.1.5) s'obtenen els mapes de  $T_2$ . Per aconseguir-ho, s'ajusta, per a cada píxel, els valors d'intensitat respecte al TE a una corba de decaïment exponencial. La constant de decaïment correspon al valor de  $T_2$ . Aquest procediment s'ha realitzat amb el mateix Paravision 5.1.

Un cop fet el post-processament, s'han delimitat les ROI en les imatges pertinents, de les 10 que s'han adquirit per cada animal. Les regions delimitades han estat, de més anterior a més posterior: còrtex frontal, hipocamp dret, hipocamp esquerra (s'agafen per separat perquè són dues regions separades en l'espai però, posteriorment, s'han interpretat com una de sola), còrtex de la zona de l'hipocamp i zona del còrtex entorrinal (veure figura 22).

Finalment, s'ha fet la suma dels valors d'una mateixa ROI, ponderats per l'àrea a la qual representa cada valor i s'ha obtingut un valor mitjà de  $T_2$  (expressat en ms) per a cada regió d'interès.



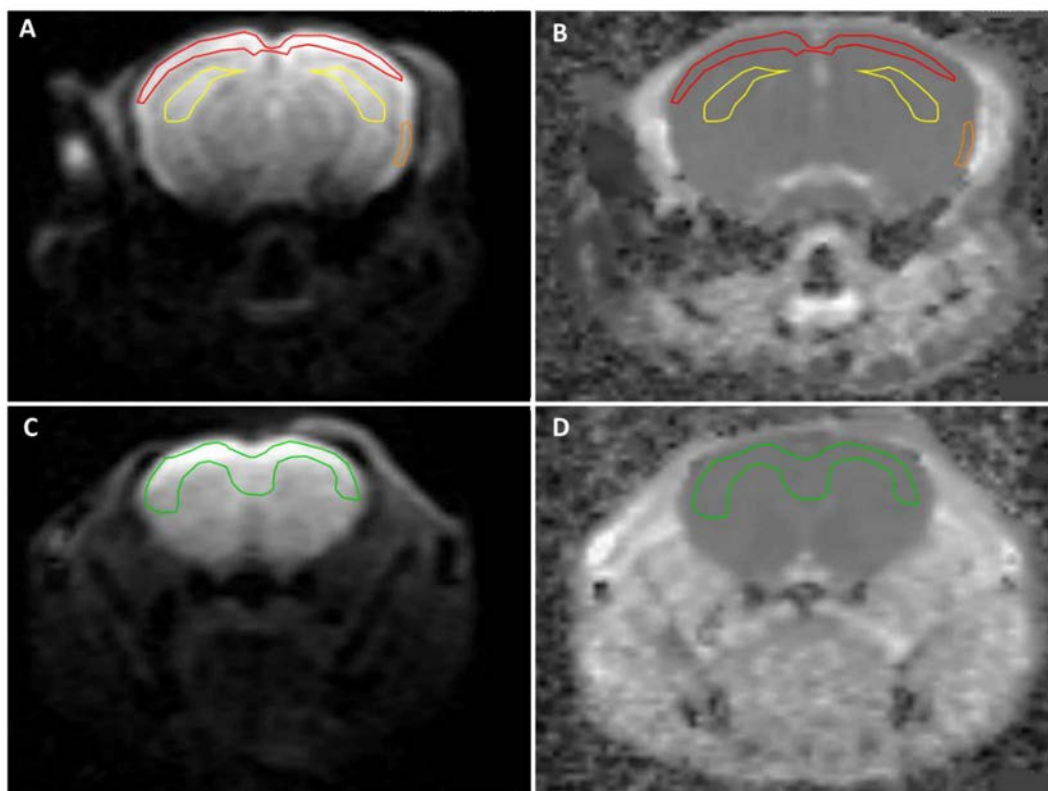
**Figura 22. Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el  $T_2$ .** La figura mostra les ROI agafades en diferents tipus de imatges: imatges ponderades en  $T_2$ , on es delimiten les ROI (A i C) i mapes de  $T_2$  processats, als quals s'exporten les ROI per obtenir els valors de  $T_2$  (B i D). Tot i que les imatges en les quals apareixen les ROI poden variar segons l'animal, a l'intentar col·locar els talls, sempre, de la mateixa manera, les imatges seleccionades solen ser la 4 (A i B) i la 5 per l'hipocamp (groc), el còrtex que col·localitza amb l'hipocamp (vermell) i la zona del còrtex entorrinal (taronja) i, la 9 (C i D), pel còrtex frontal (verd).



### 3.3.3.3 ADC

Per calcular els valors d'ADC s'ha partit de les imatges obtingudes per DTI (veure apartat 3.3.2.1.3), les quals han estat processades amb el propi Paravision 5.1 per a què reconstrueixi el tensor de difusió de totes les imatges i que, després de la diagonalització del mateix, s'obtinguin les difusivitats i direccions principals. D'aquestes difusivitats principals, el mateix software n'extreu diversos paràmetres quantitius, entre ells, l'ADC, expressat en  $\text{mm}^2/\text{s}$ , tal com mostra la figura 23.

El procés de selecció de les ROI, un cop fet el post-processament, és exactament el mateix que en el cas dels mapes de  $T_2$  (veure apartat anterior, 3.3.3.2).



**Figura 23. Regions d'interès (ROI) utilitzades per calcular el coeficient de difusió aparent (ADC).** La figura mostra les ROI agafades en diferents tipus de imatges: imatges ponderades en difusió, on es delimiten les ROI (A i C) i mapes d'ADC processats, als quals s'exporten les ROI per obtenir els valors d'ADC (B i D). Tot i que les imatges en les quals apareixen les ROI poden variar segons l'animal, a l'intentar col·locar els talls, sempre, de la mateixa manera, les imatges seleccionades solen ser la 4 (A i B) i la 5 per l'hipocamp (groc), el còrtex que col·localitza amb l'hipocamp (vermell) i la zona del còrtex entorrinal (taronja) i, la 9 (C i D), pel còrtex frontal (verd).

### 3.3.4 Anàlisi dels espectres

#### 3.3.4.1 Processament

El processament dels espectres s'ha dut a terme amb el programa LC Model (de l'anglès *Linear Combination Model*), el qual aplica un algoritme per quantificar, automàticament, els espectres. De forma breu, el que fa aquest algoritme és comparar els espectres a analitzar amb un espectre de referència, generat a partir de simulacions d'espectres individuals per a cada metabòlit, utilitzant les mateixes condicions d'estudi que l'espectre que es vol analitzar (135).

Així doncs, l'anàlisi dels espectres adquirits en aquest treball amb LC Model s'ha realitzat en el rang espectral de 0.2-4.0 ppm. La base de dades de LC Model utilitzada, que té en compte l'imant, la seqüència i el TE utilitzat, inclou els següents metabòlits: alanina (Ala), aspartat (Asp), citrat (Cit), creatina (Cr), el grup metilè de la creatina simulat negativament (-CrCH<sub>2</sub>), fosfocreatina (PCr), etanol (Eth), àcid  $\gamma$ -aminobutíric (GABA), glucosa (Glc), glutamina (Gln), glutamat (Glu), glicina (Glyc), glicerofosfocolina (GPC), fosfocolina (PCh), glutatió (GSH), 2-hidroxi-glutarat (2HG), *myo*-inositol (mIns), lactate (Lac), N-acetilaspargat (NAA), N-acetilaspargilglutamat (NAAG), fenilalanina (PAl), fosforiletanolamina (PE), propilè-glicol (Pgc), *scyllo*-inositol (Scyllo), taurina (Tau), treonina (Thr), valina (Val) i les combinacions GPC+PCh, NAA+NAAG, Ins+GLyc, Cr+PCr i Glu+Gln.

A part d'aquests metabòlits, el LCMoDel inclou en la seva base de dades 9 senyals simulats de macromolècules i lípids, i diverses combinacions entre ells (136). La quantificació absoluta dels metabòlits (en  $\mu\text{mol/g}$ ) s'ha obtingut relativa a la senyal d'aigua de l'espectre sense supressió d'aigua, el qual s'ha obtingut a la mateixa regió assumint una concentració d'aigua de 43300 mM (137).

Una altra possibilitat que ofereix el LCMoDel és la de calcular la concentració de cada metabòlit respecte la creatina total ( $tCr = Cr + PCr = \text{Creatina} + \text{Fosfocreatina}$ ). El valor de tCr és àmpliament utilitzat com a referència interna en els estudis d'aquest tipus ja que es manté força estable en el mateix teixit i no varia gaire amb el temps, de manera que és més fàcil la comparació entre regions i/o estudis. A més, els valors normalitzats per tCr són menys sensibles als efectes de volums parcials i de relaxació, facilitant el mètode de mesura. Com que en el nostre estudi s'ha observat que el valor de tCr es manté estable entre els diferents grups, en els diferents temps analitzats (dades no mostrades), s'ha optat per expressar les concentracions de

metabòlits respecte la concentració de tCr i, d'aquesta manera, poder comparar d'una forma més exacte, els resultats d'aquest treball amb els de la bibliografia (109,135,138,139).

### 3.3.4.2 Selecció d'espectres i metabòlits

A part de la concentració d'un metabòlit i de la seva relació respecte la tCr, el LC Model dona també una aproximació de desviació estàndard (SD, de l'anglès *standard deviation*), expressada en %, per a cada valor, o el que és el mateix, un valor que representa quant s'allunya l'ajust del valor real, és a dir, com de bo és, per aquell valor concret, l'ajust que ha fet el programa, de manera que permet avaluar la qualitat de l'ajust i, per tant, la fiabilitat del valor obtingut. Aquesta aproximació (% SD) s'anomena CRLB (de l'anglès *Cramér-Rao lower bounds*).

Com s'ha dit anteriorment, la base de dades utilitzada en aquest treball és capaç de reconèixer múltiples metabòlits, macromolècules, lípids i diferents combinacions d'aquests, però no tots els ajusta d'una manera fiable. Per a l'anàlisi dels resultats només s'han tingut en compte els metabòlits o les combinacions de metabòlits amb  $CRLB \leq 20$  en, almenys, el 50% dels espectres de cada un dels temps i regions analitzades. Així doncs, havent-hi 24 valors per a cada metabòlit (6 grups amb  $N=4$ ), a cada un dels temps analitzats, si 13 d'aquests valors de CRLB eren superiors a 20, aquest metabòlit ha quedat descartat de la llista final com ha succeït, per exemple, al mirar l'Alanina a l'hipocamp als 7 mesos (138).

A més, pels casos en què el LC Model dona tan la suma de dos valors, com els valors individuals per separat (per exemple, el cas de la glutamina i el glutamat), s'ha fet un anàlisi de covariància per decidir si agafar la suma de valors o no. En cas d'observar una covariància baixa ( $-0.5 > i < 0.5$ ), s'han agafat els valors individuals (140). Només s'han agafat les sumes de compostos quan, en l'anàlisi individual, cap dels 2 complia els criteris de selecció establerts.

D'aquesta manera, el llistat final està format per 11 compostos, ja siguin metabòlits, macromolècules, lípids o sumes de diferents molècules. Aquests es divideixen en 7 metabòlits, que són, per ordre alfabètic: la glutamina (Gln), el glutamat (Glu), el glutatió (GSH), el mioInositol (mIns), el N-acetil-aspartat (NAA), la fenilalanina (Pal) i la taurina (Tau); la suma dels compostos de la colina, glicerofosfocolina i fosfocolina (GPC+PCh); i, finalment, 3 sumes de lípids i macromolècules: les macromolècules que ressonen al voltant de 0.9 ppm (MM09), la suma de les macromolècules que ressonen al voltant de 1.4 ppm i els 2 principals pics de lípids que ho

fan a 1.3 ppm (MM14+Lip13a+Lip13b) i, finalment, la suma de les macromolècules i els lípids que ressonen al voltant de 2.0 ppm (MM20+Lip20).

Finalment, a l'hora de decidir quins valors dels diferents animals es consideraven per a calcular les mitjanes i les desviacions de cada grup d'estudi, en cada temps i regió analitzades, i per a cada metabòlit concret, s'han descartat aquells valors amb CRLB > 30.

### **3.3.5 Sacrifici dels animals i emmagatzematge de les mostres**

*Els sacrificis dels animals i l'obtenció de les mostres s'ha realitzat, de forma conjunta, amb la Gisela Esquerda, investigadora amb experiència prèvia en aquest tipus de procediments.*

Un cop arribats als 12 mesos d'edat, i després d'haver-se sotmès a la sessió de ressonància 5 dies després de l'administració dels tractaments, els animals han estat sacrificats per decapitació mitjançant la guillotina. Abans però, els animals s'han anestesiats amb isofluorà a l'1% en O<sub>2</sub> i se'ls ha practicat una extracció sanguínia per punció cardíaca. A la sang extreta (1 mL aproximadament) se li ha afegit un 14% (v/v) d'EDTA per evitar-ne la coagulació i un 10% (v/v) d'inhibidors de proteases. Un cop acabats tots els animals, s'han centrifugat els tubs amb mostres de sang durant 10 min a 20800 g, s'ha separat el sobrenedant (plasma sanguini), s'ha congelat amb nitrogen líquid i s'ha emmagatzemat a -80°C.

Seguidament a la punció cardíaca, els ratolins han estat guillotinat i dissecats per extreure'n els òrgans següents: cervell, cerebel, bulb, fetge, ronyons, melsa i cor. La meitat de tots els òrgans extrets s'ha congelat directament en nitrogen líquid (i, posteriorment, emmagatzemat a -80°C) per poder realitzar homogenats dels teixits.

L'altra meitat, s'ha submergit en paraformaldehid al 4% en PBS i s'ha deixat durant 48h en agitació a 4°C, renovant el paraformaldehid a les 24h. Un cop passades les 48h, s'han realitzat 8 rentats de 15 min en tampó fosfat 0.1 M, 2 rentats de 30 min amb etanol 50% i 1 rentat de 1h amb etanol 70%, aquest últim a 4°C, temperatura a la qual es conserven les mostres fins al moment d'incloure-les en parafina.

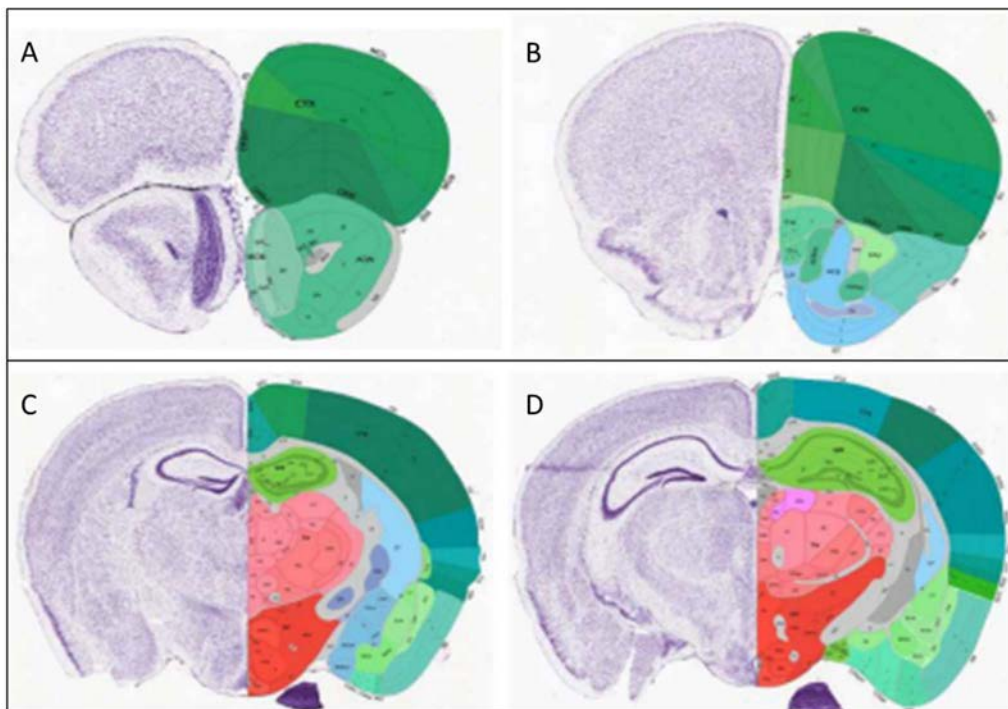
En el moment d'incloure les mostres ens blocs de parafina, s'han fet 2 rentats de 30 min amb etanol 96%, 2 rentats de 30 min amb etanol absolut i 3 rentats de 10 min amb xilè. Tot seguit, les mostres s'han deixat 2h a 60°C amb una solució de xilè i parafina en una relació 1:1,

2h més a 60°C amb parafina sola i, finalment, O/N a 60°C en parafina. Passades les 24h, les mostres s'han inclòs en parafina.

En el cas dels cervells, aquests s'han inclòs en blocs individuals i orientats per a poder obtenir, posteriorment, seccions coronals (el pla coronal de les mostres correspon al pla axial definit per ressonància magnètica).

### 3.3.6 Histologia

Els cervells corresponents als animals sotmesos a les sessions de ressonància magnètica (24, 6 grups amb N=4) s'han enviat a tallar al Laboratori d'Histologia de l'Institut de Neurociències de la UAB. Les seccions, de 10 µm de gruix, s'han realitzat en orientació coronal i se n'han col·locant dues de consecutives a cada portaobjectes. Per a delimitar les zones corresponents al còrtex pre-frontal (zona 1) i a l'hipocamp (zona 2), s'ha utilitzat l'atles de ratolí *on-line* de l'Allen Institute, tal com mostra la figura 24 (141).



**Figura 24. Límits de les zones tallades per histologia.** A la part superior, es mostren l'inici (A) i el final (B) de la zona 1, corresponent al còrtex pre-frontal. Es comença a tallar quan el tamany del bulb olfatori i el del còrtex és similar i s'acaba quan apareixen el cos callós i el ventricle lateral. A la part inferior, es mostren l'inici (C) i el final (D) de la zona 2, corresponent a l'hipocamp. Es comença a tallar quan s'observen les regions CA1, CA2 i CA3 de l'hipocamp i s'acaba quan el ventricle lateral i el propi hipocamp es desplacen ventralment. Figura adaptada de l'informe facilitat per la M<sup>a</sup> del Mar Castillo, del Laboratori d'Histologia de l'Institut de Neurociències de la UAB.

### 3.3.6.1 Immunofluorescència

#### 3.3.6.1.1 *Condicions experimentals*

Per a realitzar l'anàlisi per immunofluorescència s'han sotmès totes les mostres a una bateria de desparafinatge i rehidratació consistent en 3 rentats de 5 min en xilè, 2 rentats de 3 min en etanol absolut, 2 rentats de 3 min en etanol 96%, 1 rentat de 2 min en etanol 70% i finalment 1 rentat de 5 min en ddH<sub>2</sub>O.

Un cop hidratades, se'ls ha aplicat un pretractament per a què l'antigen quedi més exposat. Aquest pretractament consisteix en deixar les mostres 20 min en àcid fòrmic al 70% en ddH<sub>2</sub>O (v/v) i, seguidament, 5 min en ddH<sub>2</sub>O i agitació. A continuació, les mostres s'han posat en solució de bloqueig durant 1h a RT. Aquesta solució conté un 5% de BSA (p/v), un 5% de NGS (v/v) i un 0.1% de Tween (v/v) en PBS 1X.

Tot seguit, s'han incubat les mostres O/N a 4°C amb els anticossos primaris *Anti-NeuN rabbit polyclonal (Millipore)*, que s'uneix a la proteïna NeuN (un antigen dels nuclis neuronals que es fa servir com a biomarcador de neurones, ja que marca gairebé tots els tipus neuronals) i *Anti-A $\beta$ <sub>(1-16)</sub> mouse monoclonal (clon 6E10, BioLegend®)*, a una dilució 1:100 (v/v) en solució de bloqueig. Posteriorment, se'ls ha fet 3 rentats de 5 min amb PBS 1X Tween 0.1% i agitació.

Un cop fets els rentats, les mostres s'han incubat durant 1h a 37°C i fosc amb els anticossos secundaris *Goat Anti-Mouse IgG Cy3 Conjugate (Chemicon)* i *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (Abcam)* a una dilució 1:200 en solució de bloqueig i, s'han fet 3 rentats de 5 min amb PBS 1X Tween 0.1%, agitació i fosc.

Finalment s'ha aplicat el medi de muntatge, consistent en DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, *Sigma*) i Vectashield H-1000 (*Vector Laboratories*) en una relació 0.0125% (p/v) i 80% (v/v) en ddH<sub>2</sub>O, respectivament. S'ha col·locat el cobreobjectes, fent pressió per eliminar les restes d'aire, i s'han deixat assecar a RT i fosc abans d'observar-les al microscopi.

### 3.3.6.1.2 Adquisició d'imatges

L'adquisició de les imatges s'ha realitzat al microscopi òptic per fluorescència Leica DMRB (*Leica Microsystems*) del LLEB, el qual està equipat amb una càmera CCD Leica DFC 500 (*Leica Microsystems*), 4 filtres de fluorescència (corresponents, per aquest ordre, al DAPI o Hoescht, a la GFP (de l'anglès *green fluorescent protein*), a la fluoresceïna i a la rodamina o al iodur de propidi) i amb el programari associat LAS V4.9 (*Leica Microsystems*). Cada una de les imatges s'ha obtingut utilitzant els filtres 3 i 4, que han permès observar el marcatge del NeuN i de l'A $\beta$ , respectivament. Tant per l'hipocamp com per el còrtex s'han fet fotos seguint el camp de visió de la càmera, amb els paràmetres d'adquisició d'imatge següents: 40 augments (40X), temps d'exposició de 192 ms, guany de la càmera de 2.6X, saturació de 1.60 i gamma de color de 1.18.

Un cop identificada la zona de l'hipocamp, s'han realitzat fotos començant pel principi de la CA1 i fins al final de la CA3. En el cas del còrtex, un cop identificada la capa piramidal V, s'han adquirit imatges des de l'àrea post-parietal fins l'àrea temporal, a l'alçada de la fissura lateral.

### 3.3.6.1.3 Anàlisi de les imatges

De les imatges adquirides, s'ha analitzat tan la intensitat del marcatge de 6E10 com el número de neurones marcades amb aquest mAb, a la zona de l'hipocamp i a la del còrtex. A continuació es detallen els criteris que s'han seguit per a fer l'anàlisi, el qual ha estat realitzat amb el mateix programa ImageJ.

#### a) Imatges de l'hipocamp

A causa de les dificultats per delimitar individualment les neurones de l'hipocamp, per calcular la intensitat del marcatge de 6E10 en aquesta zona, s'ha seleccionat tota la capa conjuntament i se n'ha calculat la intensitat mitjana. Aquest valor s'ha dividit per la intensitat de marcatge de NeuN a la mateixa regió, per contrarestar les diferències de marcatge total existents entre les diferents mostres.

El recompte de neurones marcades amb 6E10 s'ha fet manualment a les mateixes imatges utilitzades per calcular la intensitat, amb l'ajuda del recurs que ofereix l'ImageJ de

passar les imatges a 16 bits, permetent un major contrast en el marcatge i, per tant, una identificació més clara. El valor s'ha representat en funció de l'àrea de la capa.

Cal remarcar que els dos paràmetres s'han calculat, també, per separat, a les regions *Cornu Ammonis* 1 (CA1) i CA2-CA3.

#### b) Imatges del còrtex

En aquest cas s'han delimitat les neurones piramidals de cada imatge a les imatges obtingudes amb el canal 3 (marcatge de NeuN) i, llavors, s'ha calculat la intensitat de la mateixa zona delimitada, però al canal 4 (marcatge de 6E10). Un cop obtingut el valor de intensitat mitjana de les neurones piramidals de la capa V del còrtex de totes les imatges, s'ha assignat el llindar de marcatge, és a dir, el valor a partir del s'han considerat les neurones com a marcades, en aquest cas 7.5 RFU (de l'anglès *Relative Fluorescence Units*). D'aquesta manera s'ha obtingut el percentatge de neurones marcades amb 6E10 respecte les totals.

### 3.3.6.2 Immunohistoquímica

#### 3.3.6.2.1 *Condicions experimentals*

Per a realitzar l'anàlisi immunohistoquímica s'han sotmès totes les mostres a una bateria de desparafinatge i hidratació consistent en 3 rentats de 5 min en xilè, 2 rentats de 3 min en etanol absolut, 2 rentats de 3 min en etanol 96%, 1 rentat de 2 min en etanol 70% i, finalment, 1 rentat de 5 min en ddH<sub>2</sub>O.

Un cop hidratades, se'ls ha aplicat un pretractament per a què l'antigen quedi més exposat. Aquest pretractament consisteix en deixar les mostres 20 min en àcid fòrmic al 70% en ddH<sub>2</sub>O (v/v) i, seguidament, 5 min en ddH<sub>2</sub>O i agitació.

A continuació, s'han posat 10 min en peròxid d'hidrogen al 3% (v/v) en metanol durant 10 min per bloquejar la peroxidasa endògena. Després de realitzar 3 rentats de 4 min en PBS 1X Tween 0.1% i agitació, les mostres s'han deixat en solució de bloqueig durant 1 hora a RT.



Tot seguit, s'han incubat les mostres O/N a 4°C amb l'anticòs primari *anti-A $\beta$ <sub>(1-16)</sub> mouse monoclonal* (clon 6E10, *BioLegend*®) a una dilució 1:100 (v/v) en solució de bloqueig i, posteriorment, se'ls ha fet 3 rentats de 2 min amb PBS 1X Tween 0.1% i agitació.

Un cop fets els rentats, les mostres s'han incubat durant 1h a 37°C amb l'anticòs secundari *Goat Anti-Mouse Immunoglobulins, Biotin Conjugate* (*Sigma*) a una dilució 1:50 en solució de bloqueig i s'han fet 3 rentats de 2 min amb PBS 1X Tween 0.1% i agitació. Seguidament, les mostres s'han incubat durant 1h a 37°C amb *Mouse Extravidin Peroxidase Conjugate* (*Sigma*) a una dilució 1:50 en solució de bloqueig i s'han rentat 3 vegades amb PBS 1X Tween 0.1% durant 2 min.

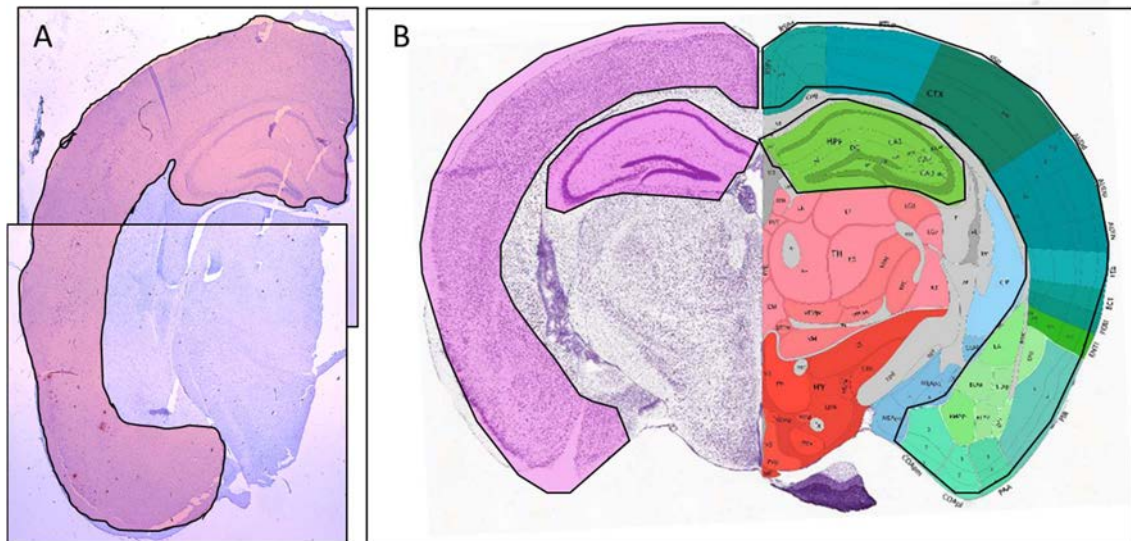
A continuació s'han incubat les mostres amb solució de DAB (3,3'-Diaminobenzidine) durant 10 min en fosc. La solució de DAB conté, per 15 mL de ddH<sub>2</sub>O, 100 mg de DAB, 1 tableta de TBS (de l'anglès *Tris Buffered Saline*) i 120  $\mu$ L de peròxid d'hidrogen al 3%.

Finalment s'ha realitzat un rentat de 5 min en aigua corrent, una contra-tinció amb hematoxilina de 0.5 min, un segon rentat amb aigua corrent de 5 min, una bateria de deshidratació (la mateixa que la de desparafinatge i hidratació però en sentit invers) i el muntatge, consistent en aplicar DPX (de l'anglès *Di-N-Butyle Phthalate in Xylene*) sobre la mostra, col·locar el cobreobjectes amb pressió per eliminar les restes d'aire i deixar-les assecar.

### 3.3.6.2.2 Adquisició i anàlisi d'imatges

L'adquisició de les imatges d'histoquímica s'ha fet al mateix microscopi i programa que les d'immunofluorescència (veure apartat 3.3.6.1.2) però, en aquest cas, s'ha utilitzat en la modalitat de camp clar. Els paràmetres d'adquisició d'imatges utilitzats han estat els següents: temps d'exposició de 4 ms, guany de la càmera de 2.0X, saturació de 1.40 i gamma de color de 0.65.

El recompte de les plaques s'ha fet al mateix microscopi i el valor obtingut s'ha dividit per l'àrea de la zona analitzada, que en aquest cas, correspon a les zones del neocòrtex (o isocòrtex), el còrtex entorrinal, el còrtex piriforme, l'hipocamp i bona part de l'amígdala, les quals s'engloben, de forma conjunta, dins el tall corresponent a l'anomenat còrtex cerebral sencer, tal com es descriu a l'altres *on-line* de l'Institut Allen (veure figura 25) (141). Per calcular l'àrea s'han adquirit imatges a 2.5X i, amb l'Image J, se n'ha delimitat la ROI.



**Figura 25. Àrea seleccionada per al recompte de plaques.** A la figura es comparen la imatge real (A) amb la de referència (B), obtinguda de l'atles de ratolí *on-line* de l'Institut Allen (141). Tan en una com en l'altra, es marca la zona seleccionada per a fer el recompte de plaques (marcada amb lila i encerclada amb negre), la qual és denominada, pel mateix Institut Allen, còrtex cerebral. Dins aquesta àrea s'hi inclouen les regions de l'hipocamp, el neocòrtex (o isocòrtex), els còrtexs entorrinal i piriforme i, finalment, bona part de l'amígdala.

### 3.3.7 Anàlisis bioquímiques

*Tan la preparació dels homogenats com l'assaig immunoabsorbent lligat a l'enzim (ELISA, de l'anglès Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) per a la quantificació de l'A $\beta$ , han estat duts a terme per la Laia Montoliu, investigadora del mateix grup de recerca.*

#### 3.3.7.1 Realització dels homogenats

A partir de les mostres congelades amb nitrogen líquid en el moment de sacrificar els animals i emmagatzemades a  $-80^{\circ}\text{C}$  (veure apartat 3.3.5), s'han preparat homogenats tan de l'hipocamp com del còrtex, els quals, posteriorment, permetran realitzar diferents anàlisis bioquímiques. El protocol seguit es detalla a continuació.

a) Pesar la mostra de teixit congelat i homogeneïtzar, mecànicament (homogeneïtzador manual, *Sigma*), en TBS (Tris 20 mM i NaCl 137 mM a pH 7.6) fred i suplementat amb inhibidors de proteases, en una relació de 8 µL de TBS per cada mg de teixit. Si hi ha poca quantitat de mostra, com és aquest cas, especialment per l'hipocamp, ajuntar els homogenats dels animals del mateix grup N= 6-8, de manera que es disposi d'una mostra per a cada grup i regió.

b) Sonicar suaument la mostra durant 35 segons amb cicles del 35% i a potencia 4 (*B.Baun, Labsonic*) i, tot seguit, centrifugar a 100000 g durant 1h a 4°C, utilitzant una micro-ultracentrífuga (*Sorvall MTX 150 Series Micro-Ultracentrifuge, Thermo Scientific*).

c) Congelar el sobrenedant, que correspon a la fracció extracel·lular, a -80°C, separant, prèviament, una alíquota de 10 µL per fer una quantificació de proteïna total mitjançant un assaig de BCA (de l'anglès *Bicinchoninic acid assay*).

d) Tornar a homogeneïtzar el pellet insoluble resultant, amb la mateixa relació de volum que al pas a), en una solució de Tritó 1 X-100 a l'1% en TBS fred i suplementat amb inhibidors de proteases.

e) Repetir el pas b) i congelar el sobrenedant, que correspon a la fracció intracel·lular, a -80°C, guardant, prèviament, una alíquota de 10 µL per l'assaig de BCA.

f) Realitzar l'assaig de BCA seguint les instruccions del kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific)* per obtenir la quantificació de proteïna total de cada una de les mostres.

### 3.3.7.2 Quantificació de l'Aβ<sub>1-42</sub>

#### 3.3.7.2.1 *Procediment experimental*

A partir dels homogenats preparats, s'han agafat 10 µL de les fraccions intra i extracel·lular tan de l'hipocamp com del còrtex de cada un dels grups. S'han fet tres rèpliques de cada mostra i, seguint les instruccions del fabricant, s'ha procedit a utilitzar el kit *Amyloid beta 42 ELISA kit Mouse (ThermoFisher)* fins a fer la lectura de l'absorbància de la placa a  $\lambda=450$  nm amb el Lector multitasca Victor 3-1420 (*Perkin Elmer*) del LLEB.

De forma breu, l'assaig ELISA consisteix en immobilitzar un antigen o un anticòs en una placa de 96 pous i detectar la unió antigen-anticòs per mitjà d'un anticòs marcat amb un enzim, de manera que, al afegir el substrat corresponent, es produirà un color visible a ull nu, fàcilment detectable i quantificable amb un colorímetre o espectrofotòmetre.

D'assaigs ELISA n'hi ha de diferents tipus segons la disposició de l'antigen i l'anticòs (o anticossos). En aquest cas, es tracta d'un ELISA sandvitx de fase sòlida, en el qual, de forma resumida, s'immobilitza un anticòs contra la regió N-terminal de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, a la placa i a continuació s'afegeix la mostra que conté el pèptid A $\beta$ , el qual queda unit a l'anticòs.

Llavors s'afegeix un anticòs primari (contra la regió C-terminal de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub>), el qual és detectat per un anticòs secundari conjugat a peroxidasa, de manera que, al afegir el substrat adequat, es produirà una reacció enzimàtica que donarà color a la mostra, proporcionalment a la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

#### 3.3.7.2.2 *Representació dels resultats*

Un cop obtingudes les absorbàncies, s'han representat les de la recta patró en funció de les concentracions conegudes corresponents i, amb l'equació de la recta resultant, i tenint en compte el factor de dilució, s'han obtingut les concentracions d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> de les diferents mostres. Finalment, s'ha calculat la mitjana de les tres rèpliques i s'ha representat el valor en funció de la concentració de proteïna total de la mostra, ajuntant les fraccions intra i extracel·lular en una única fracció soluble, ja que durant el procediment experimental es va detectar que la separació de fraccions no s'havia produït correctament.

#### 3.3.7.3 Anàlisi d'inflamació

##### 3.3.7.3.1 *Procediment experimental*

A partir dels homogenats preparats, s'han agafat 10  $\mu$ L de la fracció extracel·lular tan del còrtex com de l'hipocamp de cada un dels grups i s'han fet 5 rèpliques. Seguint les instruccions del fabricant, s'ha utilitzat el kit *Mouse IL-6 DuoSet*<sup>®</sup> (RD Systems) per a realitzar un ELISA de tipus sandvitx, amb els complements necessaris del kit *Ancillary Reagent kit 2* (RD Systems) fins a fer la lectura de l'absorbància de la placa a 450 nm amb el Lector multitasca Victor 3-1420 (Perkin Elmer) del LLEB. El tipus d'ELISA és el mateix que s'utilitza per quantificar l'A $\beta$  (veure apartat 3.3.7.2.1).

### 3.3.7.3.2 *Representació dels resultats*

Un cop obtingudes les absorbàncies, s'han representat les de la recta patró en funció de les concentracions conegudes corresponents i, aplicant el logaritme dels dos valors, s'ha obtingut una recta, l'equació de la qual s'ha utilitzat, juntament amb el factor de dilució, per calcular les concentracions finals de IL-6 en les diferents mostres. Per acabar, s'ha calculat la mitjana de les cinc rèpliques i s'ha representat el valor en funció de la concentració de proteïna total de la mostra.

### 3.3.7.4 Quantificació de colesterol i transaminases

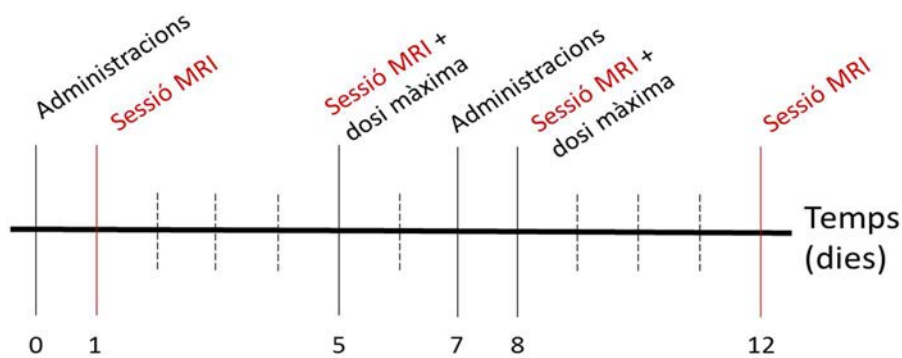
Tan l'anàlisi del colesterol com el de les transaminases s'ha dut a terme al Laboratori de Bioquímica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Barcelona associat a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Les mostres de plasma dels diferents animals emmagatzemades a -80°C van ser lliurades al Dr. José Luis Sánchez, prèvia extracció de 10 µl per fer un assaig de BCA per a determinar la concentració total de proteïna.

El colesterol s'ha determinat mitjançant el mètode enzimocolorimètric comercial CHO (*Roche Diagnostics*), en un auto-analitzador Cobas c501/6000, d'acord amb les instruccions del fabricant. Pel que fa a les transaminases, s'ha seguit el mateix procediment utilitzant els reactius ASLT i ALTL (*Roche Diagnostics*), específics per l'aspartat transaminasa (AST) i l'alanina transaminasa (ALT), respectivament.

### 3.4 Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic

#### 3.4.1 Disseny experimental

Aquest estudi pretén estudiar l'aparició d'edema vasogènic per MRI, mitjançant les imatges de difusió i els mapes d'ADC. Tal com s'ha explicat a l'apartat 1.4.2 de la introducció, l'aparició d'edema vasogènic va ser el principal efecte secundari observat en els estudis clínics realitzats amb el bapineuzumab (mAb-h3D6). Així doncs, es pretén, mitjançant l'administració de diferents dosis de mAb-m3D6, observar l'aparició d'edema.



**Figura 26. Pauta temporal de les administracions i les sessions d'imatge per ressonància magnètica (MRI).** Es realitzen dues administracions a tots els grups, excepte el grup amb la dosi màxima, el qual rep un total de 4 injeccions. Les sessions de MRI es duen a terme els dies 1 i 5 després de les administracions a tots els grups.

S'han realitzat 4 grups de ratolins amb N=2, als quals s'han administrat 4 dosis diferents amb la pauta temporal que mostra la figura 26. Per seleccionar les dosis a administrar, s'han pres de referència les utilitzades en el tractament longitudinal tenint en compte, però, que són molècules diferents i que, per tant, l'efecte que tindran també serà diferent.

Les dosis utilitzades han estat les següents:

1. Dosi mínima. Es fixa una quantitat mínima de 17 µg, una sisena part de la dosi utilitzada en el tractament longitudinal per els scFvs, que correspon a la relació entre les masses moleculars del scFv i el mAb (26 kDa i 150 kDa, respectivament).
2. Meitat de la dosi equivalent en massa (50 µg).

3. Dosi equivalent en massa (100 µg).
4. Dosi màxima. Es fixa una quantitat màxima de 450 µg ja que la concentració del mAb-m3D6 i l'existència d'un volum màxim a l'hora de realitzar les administracions als ratolins no permeten administrar una quantitat superior. De totes maneres, la pauta d'administració d'aquesta dosi serà més seguida en el temps que la resta (veure figura 26) per tal d'arribar a una major quantitat de proteïna injectada.

En qualsevol cas, s'ha de remarcar que aquestes molècules tenen diferències d'estabilitat, vida mitja, capacitat de travessar la BBB i mecanisme d'eliminació, raó per la qual aquests càlculs només pretenen seguir un criteri científic que, evidentment, no pot tenir en compte els paràmetres que finalment afecten l'eficiència dels tractaments.

### **3.4.2 Sessións MRI i anàlisi de les imatges**

Per a veure l'efecte que tenen les diferents dosis en els ratolins s'han realitzat sessions de MRI als dies 1 i 5 post administració, és a dir, un total de 4 sessions. Les seqüències utilitzades en cada sessió ja s'havien utilitzat en l'estudi longitudinal i els paràmetres en cada una d'elles han estat els mateixos. A continuació s'enumeren les seqüències utilitzades (per a una explicació més detallada, veure l'apartat 3.3.2.1).

1. Tripilot
2. Referència axial
3. Referència sagital
4. Referència coronal
5. Imatges per tensor de difusió
6. Imatges d'alta resolució ponderades en T<sub>2</sub>

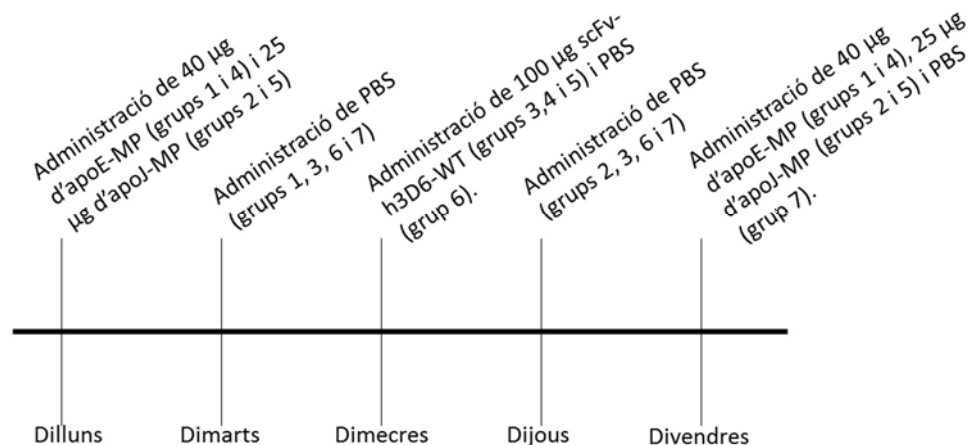
Per analitzar les imatges s'han seguit els mateixos passos que s'expliquen a l'apartat 3.3.3.3. En resum, les imatges de difusió s'han processat amb el Paravision 5.1 i s'han calculat els valors d'ADC de les regions d'interès marcades a la figura 23.

### 3.5 Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J.

Aquest estudi s'emmarca en el doctorat de la meua companya de grup, Laia Montoliu, raó per la qual, només es descriuen els experiments realitzats per l'autor d'aquest treball i els resultats obtinguts derivats d'aquests, exceptuant el disseny experimental que, per a facilitar la comprensió tan dels experiments com dels resultats, es presenta aquí, de forma resumida (per a més detalls caldrà dirigir-se a la tesi de la Laia Montoliu (142)).

#### 3.5.1 Disseny experimental

Amb l'objectiu de veure quin paper tenen l'apoE i l'apoJ en el mecanisme de neteja del pèptid A $\beta$  s'han administrat, durant 6 setmanes, diverses combinacions de pèptids mimètics (MP, de l'anglès *mimetic peptide*) d'aquestes dues proteïnes amb el scFv-h3D6-WT: apoE-MP, apoJ-MP, scFv-h3D6-WT, apoE-MP + scFv-h3D6-WT i apoJ-MP + scFv-h3D6-WT. A més, s'han utilitzat dos grups controls (PBS): un de la soca 3xTg-AD i un de la soca no transgènica B6129SF2/J. A la figura 27 es mostra la pauta de tractament pels diferents grups de l'estudi.



**Figura 27. Pauta temporal d'administració de les combinacions de scFv-h3D6-WT amb els pèptids mimètics (MP) de les apolipoproteïnes E i J.** La figura mostra el patró d'administracions seguit durant 1 setmana de tractament. Aquest patró es replica, setmanalment, durant 6 setmanes, quan l'experiment arriba al seu punt final. Els grups experimentals són: apoE-MP (1), apoJ-MP (2), scFv-h3D6-WT (3), apoE-MP + scFv-h3D6-WT (4), apoJ-MP + scFv-h3D6-WT (5) i PBS (6), pel que fa a ratolins 3xTg-AD i, el grup 7, que correspon a les femelles no transgèniques tractades amb PBS.



Setmanalment, doncs, els 7 grups (N=6) d'animals han rebut, intraperitonealment, les dosis següents:

- a) 80 µg apoE-MP repartits en dues administracions setmanals
- b) 50 µg d'apoJ-MP repartits en dues administracions setmanals
- c) 100 µg de scFv-h3D6-WT en una única administració setmanal

Al cap de 6 setmanes, als 6 mesos d'edat, els ratolins han estat sotmesos a una sessió de MRI/MRS i, a l'acabar, s'han sacrificat seguint el mateix mètode explicat a l'apartat 3.3.5.

### **3.5.2 Sessions MRI/MRS**

Les sessions de MRI/MRS han consistit, bàsicament, en llençar les seqüències necessàries per calcular el volum de les ROI, d'una banda, i obtenir el perfil metabòlic, de l'altra. Així doncs, les diferents seqüències llençades són:

1. Tripilot
2. Referència axial
3. Referència sagital
4. Referència coronal
5. Imatges d'alta resolució ponderades en  $T_2$
6. MRS a l'hipocamp (amb prèvia homogeneïtzació del camp i supressió de l'aigua)
7. MRS al còrtex (amb prèvia homogeneïtzació del camp i supressió de l'aigua)

Tan els paràmetres establerts per a cada seqüència, com els procediments utilitzats per analitzar les imatges i els espectres són, exactament, els mateixos que en l'estudi longitudinal (veure apartats 3.3.2, 3.3.3 i 3.3.4, respectivament). La única variació existent, es troba en la llista de metabòlits finals analitzats, ja que, seguint els mateixos criteris de selecció que en l'estudi longitudinal, els compostos amb  $CRLB \leq 20$ , han estat diferents.

D'aquesta manera, el llistat final està format per 13 compostos, ja siguin metabòlits, macromolècules, lípids o sumes de diferents molècules. Aquests es divideixen en 9 metabòlits, que són, per ordre alfabètic: l'alanina (Ala), l'aspartat (Asp), la fenilalanina (PAI), la glutamina (Gln), el glutamat (Glu), el glutatió (GSH), el mio-Inositol (mIns), el N-acetil-aspartat (NAA) i la taurina (Tau); la suma dels compostos de la colina, glicerofosfocolina i fosfocolina (GPC+PCh); i, finalment, 3 sumes de lípids i macromolècules: les macromolècules que ressonen al voltant de

0.9 ppm (MM09), les que ho fan al voltant de 2.0 ppm (MM20) i la suma de les macromolècules que ressonen al voltant de 1.4 ppm i els 2 principals pics de lípids que ho fan a 1.3 ppm (MM14+Lip13a+Lip13b).

### 3.6 Anàlisi estadístic

Finalment, tots els resultats presentats en aquest treball estan acompanyats d'un anàlisi estadístic, el qual ha estat realitzat amb el programa *GraphPad Prism 6*. Les dades dels diferents grups experimentals s'han analitzat utilitzant el test no paramètric, U de Mann-Whitney, per a dades desaparellades, el qual compara les dades dels diferents grups 2 a 2.

En termes estadístics, una N de 4, com la que tenim en gairebé totes les anàlisis realitzades, és una N molt petita, però el temps necessari per a realitzar els estudis per ressonància magnètica (4 animals per dia) ha estat el principal factor limitant de la grandària del grup. Aquest fet ens impedeix determinar amb claredat, si els valors que conformen un grup d'estudi, segueixen una distribució normal o no, de manera que no podem estar segurs que el test escollit sigui el que més s'ajusti en cada experiment, tot i ser el més adequat amb la informació que tenim.

Ara bé, l'avantatge d'aplicar un test no paramètric, com és el cas de la U de Mann-Whitney, és que ens evita obtenir falsos positius ja que, al fer menys suposicions, és molt més robust que un t-test, per exemple. Per tant, podem estar segurs que les significacions obtingudes, són reals. Pel mateix motiu però, és perd potència estadística i és més fàcil tenir falsos negatius, és a dir, que pot ser que algunes diferències quedin emmascarades pel tipus de test escollit.

Finalment cal remarcar que els gràfics que apareixen en aquest treball, presenten els valors, per a cada grup experimental, com a mitjana  $\pm$  el seu error estàndard (SEM, de l'anglès *standard error of the mean*).



## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6 WT i EL

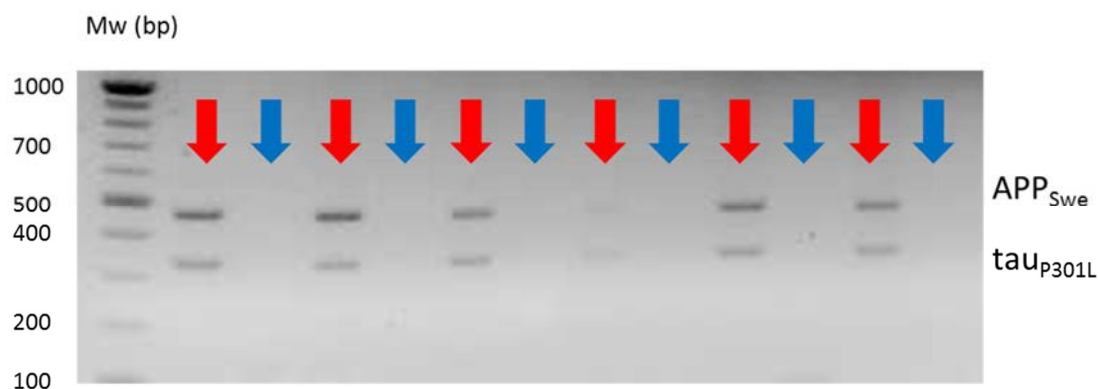
#### 4.1.1 Comprovacions prèvies

Abans de començar el tractament longitudinal que dóna lloc a l'àmplia majoria dels resultats d'aquest treball, s'han hagut de realitzar diverses comprovacions per a poder assegurar que el tractament s'apliqués amb garanties. A continuació es mostra, d'una banda, la comprovació que els diferents ratolins que han format part de l'estudi longitudinal corresponen, cada un d'ells, a la soca prevista i, de l'altra, la comprovació que les proteïnes a injectar han estat correctament purificades.

##### 4.1.1.1 Genotipat dels ratolins

A la figura 28 es mostra el resultat d'un gel d'agarosa en el qual s'observa que, en els carrils on hi havia carregades mostres de PCR corresponents a animals transgènics (marcats amb fletxes vermelles), apareixen dues bandes a l'alçada de 450 i 330 bp, aproximadament, que es corresponen amb els dos transgens incorporats, APP i tau, respectivament.

Per altra banda, en els carrils on hi havia carregades mostres corresponents a animals no transgènics (marcats amb fletxes blaves), no apareix cap banda de DNA amplificat, amb la qual cosa es pot afirmar que no contenen els transgens. Aquests experiments es van realitzar per a tots els ratolins utilitzats en l'estudi longitudinal. Els resultats obtinguts confirmen que els ratolins mantenen el genotip i que no hi ha hagut cap creuament entre colònies.

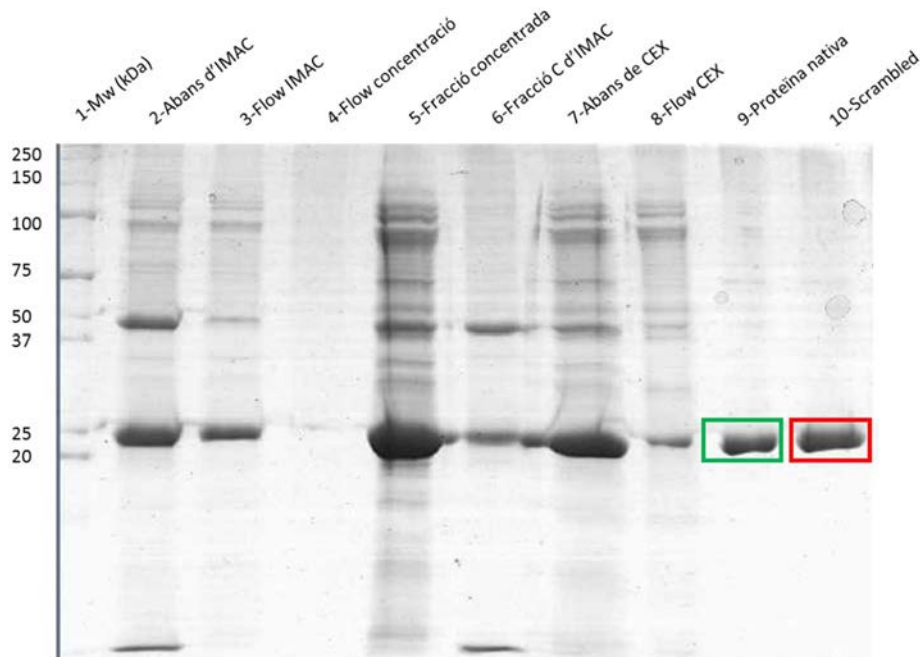


**Figura 28. Genotipat de diferents ratolins de l'estudi longitudinal.** A la figura es mostren les bandes que apareixen a un pes molecular (Mw) de 450 i 330 parells de bases (bp) (aproximadament) corresponents als transgens APP<sub>Swe</sub> i tau<sub>p301L</sub>, respectivament, en el cas dels carrils on hi ha mostres corresponents a ratolins transgènics (fletxes vermelles) i, en canvi, no es troben presents quan les mostres corresponen a ratolins control (fletxes blaves).

#### 4.1.1.2 Purificació dels scFvs h3D6-WT i EL

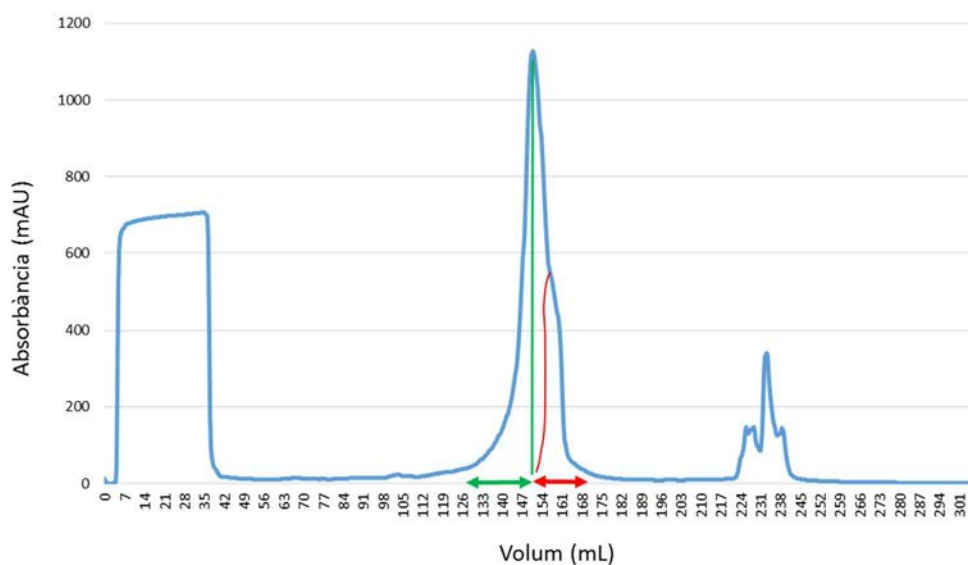
Per a tenir els tractaments a punt en el moment de començar l'estudi longitudinal, les proteïnes en qüestió (scFv h3D6-WT i scFv h3D6-EL) s'han hagut de sotmetre a un sèrie d'etapes de purificació (explicades a l'apartat 3.2.1). Com que en aquest treball, la purificació d'aquests scFvs s'ha concebut com a un procés productiu, l'objectiu del qual no era altre que obtenir la quantitat de proteïna pura suficient per a poder realitzar el tractament dels ratolins, en aquest apartat no es pretén fer un anàlisi detallat dels resultats obtinguts en cada pas de la purificació sinó que es mostren, simplement, els resultats que permeten assegurar que les proteïnes estan preparades per a ser administrades.

Per arribar a obtenir uns resultats satisfactoris, es fa un seguiment de tot el procés de purificació per mitjà d'electroforesis SDS-PAGE. A la figura 29 es mostra un gel d'acrilamida, els carrils del qual, reflecteixen diversos passos d'aquest procediment. Es pot comprovar, clarament, com la mostra passa de contenir moltes proteïnes diferents (carrils 5 i 7) abans d'entrar a la CEX, a tenir només la proteïna d'interès, ja sigui en la seva forma nativa (carril 9, en verd) o la *scrambled* (carril 10, en vermell).



**Figura 29. Anàlisi SDS-PAGE de les diferents etapes del procés de purificació.** Cada carril correspon a la mostra en diferents etapes de la purificació. En concret, el carril 2 conté la mostra abans d'entrar per la columna IMAC (cromatografia d'afinitat amb un metall immobilitzat, en aquest cas el níquel, que té afinitat per les histidines), on la part de la proteïna de fusió que conté el constructe TRX i la cua d'histidines (prèviament separades de la proteïna d'interès mitjançant la proteasa TEV) queda unida a la columna mentre la fracció amb el scFv-h3D6, la travessa (*flow* IMAC, carril 3). Aquesta proteïna és concentrada per centrifugació mitjançant centrífons, els quals tenen una membrana que deixa passar proteïnes més petites de 10 kDa (carril 4) i reté les més grans que, d'aquesta manera, queden més concentrades (carril 5). Posteriorment, la proteïna és dialitzada (carril 7) abans d'entrar a la CEX (cromatografia d'intercanvi catiònic) i, finalment, les fraccions on apareix el pic d'absorbància són seleccionades. Aquestes fraccions, que contenen la proteïna d'interès pura, separen la fracció nativa (carril 9, marcada amb verd) de la fracció *scrambled* (carril 10, marcada amb vermell).

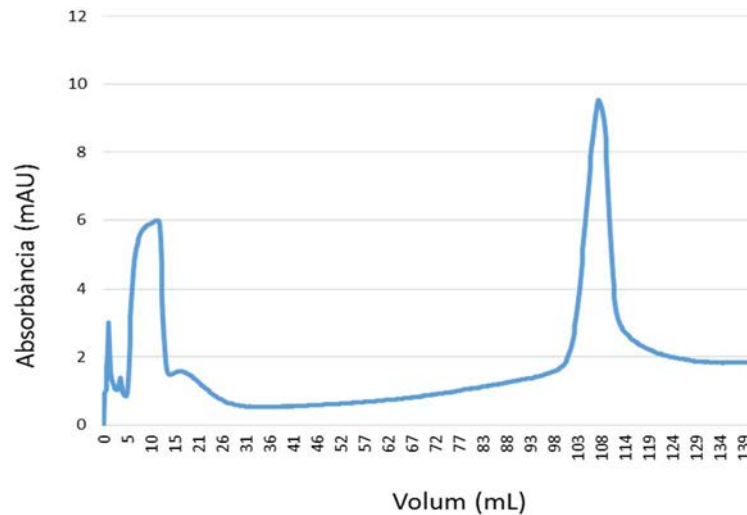
A la figura 30 es mostra un cromatograma resultant de la primera CEX d'una purificació de l'scFv-h3D6-WT. En el pic central, que correspon a la proteïna d'interès, es poden observar, de forma clara, la fracció nativa, per una banda (assenyalada amb una fletxa verda), i la fracció *scrambled*, per l'altra (assenyalada amb una fletxa vermella). La forma *scrambled* de la proteïna resulta d'una mala formació dels seus ponts disulfur, que es formen unint les cisteïnes erròniament, provocant així un plegament no natiu, fet que modifica el pI efectiu retardant, en aquest cas, l'aparició d'aquesta fracció en el cromatograma (87).



**Figura 30. Anàlisi mitjançant una cromatografia d'intercanvi catiònic (CEX).** La figura mostra com en el pic corresponent al scFv-h3D6-WT (entre 112 i 175 mL, aproximadament) es poden distingir dues fraccions diferents, les quals pertanyen a la forma nativa de la proteïna (fletxa verda) i a la forma *scrambled* (fletxa vermella).

Quan s'acaba la segona cromatografia CEX, es congela la proteïna i s'espera a obtenir-ne la quantitat suficient per ajuntar totes les mostres en un únic lot final de proteïna, la qual passarà per els últims processos (extracció de LPS, canvi de tampó, quantificació i emmagatzematge) abans de ser administrada. Prèviament a ajuntar els diferents lots però, cal assegurar-se que cap d'ells conté restes de fracció *scrambled* per, en cas que n'hi hagués, no contaminar els altres.

Això es duu a terme amb una CEX analítica, que no és més que el mateix programa que s'ha aplicat anteriorment però, en aquest cas, amb una quantitat de proteïna molt més reduïda (0.2 mg). El fet de reduir tant la quantitat de proteïna, permet separar, en dos pics diferents, la fracció nativa de la fracció *scrambled*. Així doncs, si la proteïna conté només la forma nativa, tal com s'observa en la figura 31, apareixerà un únic pic en el cromatograma i la mostra serà apta per contribuir al lot final.



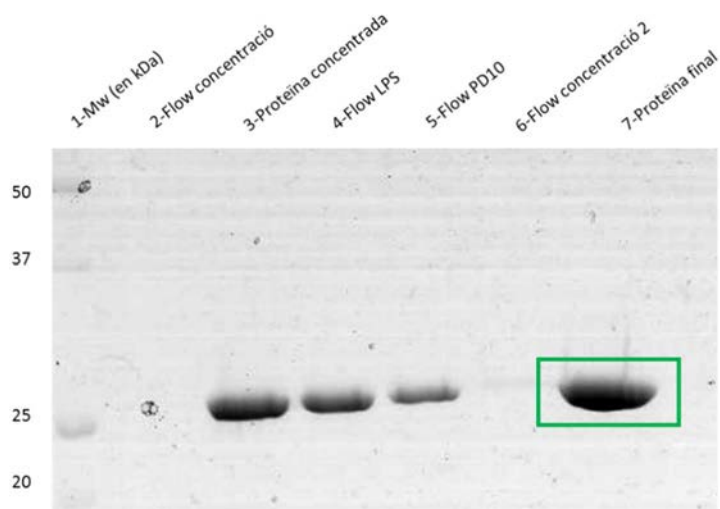
**Figura 31. Anàlisi analític mitjançant una cromatografia d'intercanvi de cations (CEX).** El cromatograma mostra un únic pic de proteïna corresponent al scFv-h3D6-EL, la qual cosa permet descartar la presència de fracció *scrambled*. El principal avantatge de la cromatografia analítica és que, utilitzant molt poca proteïna, permet separar clarament la fracció nativa de la *scrambled*.

Un cop juntats els diferents lots en un de sol, es procedeix a extreure els lipopolisacàrids (LPS), o endotoxines, que es troben a la membrana exterior de les bacteries gram negatives i són capaços de desencadenar una resposta immune en els animals. Un cop eliminats els LPS, s'analitza la mostra seguint les instruccions del kit *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Scientific)*, per veure si s'han eliminat del tot o si, en cas que quedin endotoxines, les quantitats estan dins de les acceptades per la FDA (143).

Els resultats obtinguts de la quantificació dels LPS han estat de 58.8 unitats d'endotoxines per mil·lilitre (EU/mL) en el cas del scFv-h3D6-WT i 28.5 EU/mL en el cas del scFv-h3D6-EL. Com que el volum que s'aplica en l'estudi longitudinal és de 0.2 mL a cada injecció, les dues quantitats de LPS estan dins les permeses ja que, la FDA, marca un valor de 20 EU per administració i les injeccions d'aquest treball contenen 11.76 EU pel WT i 5.7 EU per l'EL.

Per acabar, abans d'enviar la mostra al SepBioEs es comprova de nou que la proteïna no hagi patit cap degradació durant els últims processos mitjançant una altra electroforesi SDS-PAGE (veure figura 32).





**Figura 32. Anàlisi SDS-PAGE dels passos finals de preparació de la proteïna per a ser administrada.** En el carril 3 s'observa la proteïna concentrada, abans de ser sotmesa al procés d'extracció de lipopolisacàrids (LPS). En aquest procés, la mostra passa per una columna que reté les endotoxines i, per tant, la fracció que surt està neta (*flow* LPS, carril 4). A continuació, es fa un canvi de tampó a tampó fosfat salí (PBS) mitjançant una columna PD10 (*flow* PD10, carril 5) i, finalment, es porta a la concentració desitjada (proteïna final, carril 7, encerclada en verd) i s'emmagatzema fins al moment d'administrar-la als ratolins.

Finalment, com ja s'ha comentat, s'envia la mostra al SePBioEs per obtenir la confirmació que la proteïna que s'ha deixat preparada per a ser administrada, no conté fracció *scrambled*. El resultat s'obté en forma de taula (veure taula 1), la qual mostra tres macro-columnnes, on hi ha tots els fragments peptídics que es podrien observar, teòricament, combinant les tècniques de digestió trípica i MALDI-TOF, tenint en compte cada una de les combinacions de ponts disulfur. En blau, es ressalten els fragments observats després de les anàlisis. En aquest cas, s'observa com corresponen a la combinació de ponts disulfur natiu (primera columna), de manera que ens permet afirmar que la purificació de proteïna s'ha dut a terme amb èxit i que, aquesta, està preparada per a ser administrada.

TAULA DE MASSES MOLECULARS ESPERADES/OBSERVADES								
Disulfide Bonding: 23-97 + 158-228			Disulfide Bonding: 23-228 + 97-158			Disulfide Bonding: 23-158 + 97-228		
Linked Peptides	Expected Mass	Observed	Linked Peptides	Expected Mass	Observed	Linked Peptides	Expected Mass	Observed
21-39/89-99	3.373.757		21-39/218-236	4.340.796		89-99/218-236	3.545.873	
21-44/89-99	3.855.304		21-39/215-236	4.697.218		89-99/215-236	3.902.295	
21-39/78-99	4.708.304		21-44/218-236	4.822.343		89-99/218-243	4.265.661	
21-53/89-99	4.867.469		21-39/218-243	5.060.584		89-99/215-243	4.622.082	
21-39/74-99	5.152.745		21-44/215-236	5.178.765		89-99/218-247	4.735.237	
21-44/78-99	5.189.851		21-39/215-243	5.417.005		78-99/218-236	4.880.421	
1-39/89-99	5.383.049		21-39/218-247	5.530.160		89-99/202-236	5.187.656	
21-44/74-99	5.634.292		21-44/218-243	5.542.131		78-99/215-236	5.236.842	
1-44/89-99	5.864.596		21-53/218-236	5.834.508		74-99/218-236	5.324.861	
21-53/78-99	6.202.016		21-44/215-243	5.898.552		78-99/218-243	5.600.208	
21-53/74-99	6.646.457		21-39/202-236	5.982.579		74-99/215-236	5.681.283	
1-39/78-99	6.717.597		21-44/218-247	6.011.707		78-99/215-243	5.956.630	
1-39/74-99	7.162.038		21-53/215-236	6.190.930		74-99/218-243	6.044.649	
1-44/78-99	7.199.144		1-39/218-236	6.350.089		78-99/218-247	6.069.784	
1-44/74-99	7.643.585		21-44/202-236	6.464.126		74-99/215-243	6.401.070	
100-159/218-236	7.950.489		21-53/218-243	6.554.295		74-99/218-247	6.514.225	
100-159/215-236	8.306.911		1-39/215-236	6.706.510		78-99/202-236	6.522.204	
100-159/218-243	8.670.276		1-44/218-236	6.831.636		74-99/202-236	6.966.644	
100-159/215-243	9.026.698		21-53/215-243	6.910.717		21-39/100-159	7.778.373	
21-39/89-159	9.048.767		89-99/100-159	6.983.450		21-44/100-159	8.259.920	
100-170/218-236	9.068.643		21-53/218-247	7.023.871		21-39/100-170	8.896.527	
100-159/218-247	9.139.852		1-39/218-243	7.069.876		21-39/89-159	9.048.767	
89-159/218-236	9.220.883		1-44/215-236	7.188.057		89-159/218-236	9.220.883	
100-170/215-236	9.425.065		1-39/215-243	7.426.298		21-53/100-159	9.272.084	
21-44/89-159	9.530.314		21-53/202-236	7.476.291		21-44/100-170	9.378.074	
89-159/215-236	9.577.305		1-39/218-247	7.539.452		21-44/89-159	9.530.314	
100-159/202-236	9.592.272		1-44/218-243	7.551.423		89-159/215-236	9.577.305	
100-170/218-243	9.788.431		1-44/215-243	7.907.845		1-39/100-159	9.787.665	
89-159/218-243	9.940.671		1-39/202-236	7.991.872		89-159/218-243	9.940.671	
			1-44/218-247	8.020.999				
			89-99/100-170	8.101.604				
			78-99/100-159	8.317.997				
			1-44/202-236	8.473.419				

**Taula 1. Masses moleculars observades i esperades segons la formació dels ponts disulfur.** Cada columna representa una combinació diferent dels ponts disulfur que es poden formar essent, la primera, la forma nativa. En blau es ressalten els fragments peptídics observats que, en aquest cas, corresponen a la forma nativa del scFv h3D6-WT. Figura adaptada de l'informe facilitat per la Dra. Sílvia Bronsoms del SePBioES de la UAB.

A continuació es presenten, classificats segons la tècnica utilitzada, els resultats de l'estudi longitudinal en el qual s'han administrat les proteïnes purificades als ratolins nascuts a la pròpia colònia.

#### 4.1.2 MRI

##### 4.1.2.1 Volumetria

Tal com s'ha comentat a l'apartat 1.5 de la introducció, la MRI estructural és un dels mètodes que es fan servir a l'hora de diagnosticar fases prematures de l'Alzheimer. La determinació del volum de diferents regions del cervell s'utilitza per calcular el grau d'atròfia i es relaciona amb processos de neurodegeneració i pèrdua neuronal (93).

En aquest treball s'han calculat els volums de dues de les principals regions afectades en l'AD com són el còrtex i l'hipocamp (l'amígdala s'ha descartat per la impossibilitat de definir uns límits clars de la regió, utilitzant MRI) i, a més, s'ha calculat el volum del cervell total (mesura utilitzada també com a biomarcador en assajos clínics d'AD (144)), el cerebel i el bulb olfatori. En totes aquestes regions s'ha descrit la presència dels oligòmers d'A $\beta$ , el desencadenant inicial de la patologia d'Alzheimer (76). Finalment, s'ha calculat també el volum de l'encèfal, el qual inclou totes les regions anteriors.

### 4.1.2.1.1 Volum de l'hipocamp

Tal com s'observa a la figura 33, als diferents temps analitzats (5, 7, 9 i 12 mesos), la diferència entre el grup de ratolins no transgènics sense tractar (NTg PBS) i el grup de transgènics sense tractar (Tg PBS) és estadísticament significativa, tenint, aquest darrer grup, un volum molt més petit que el NTg PBS.

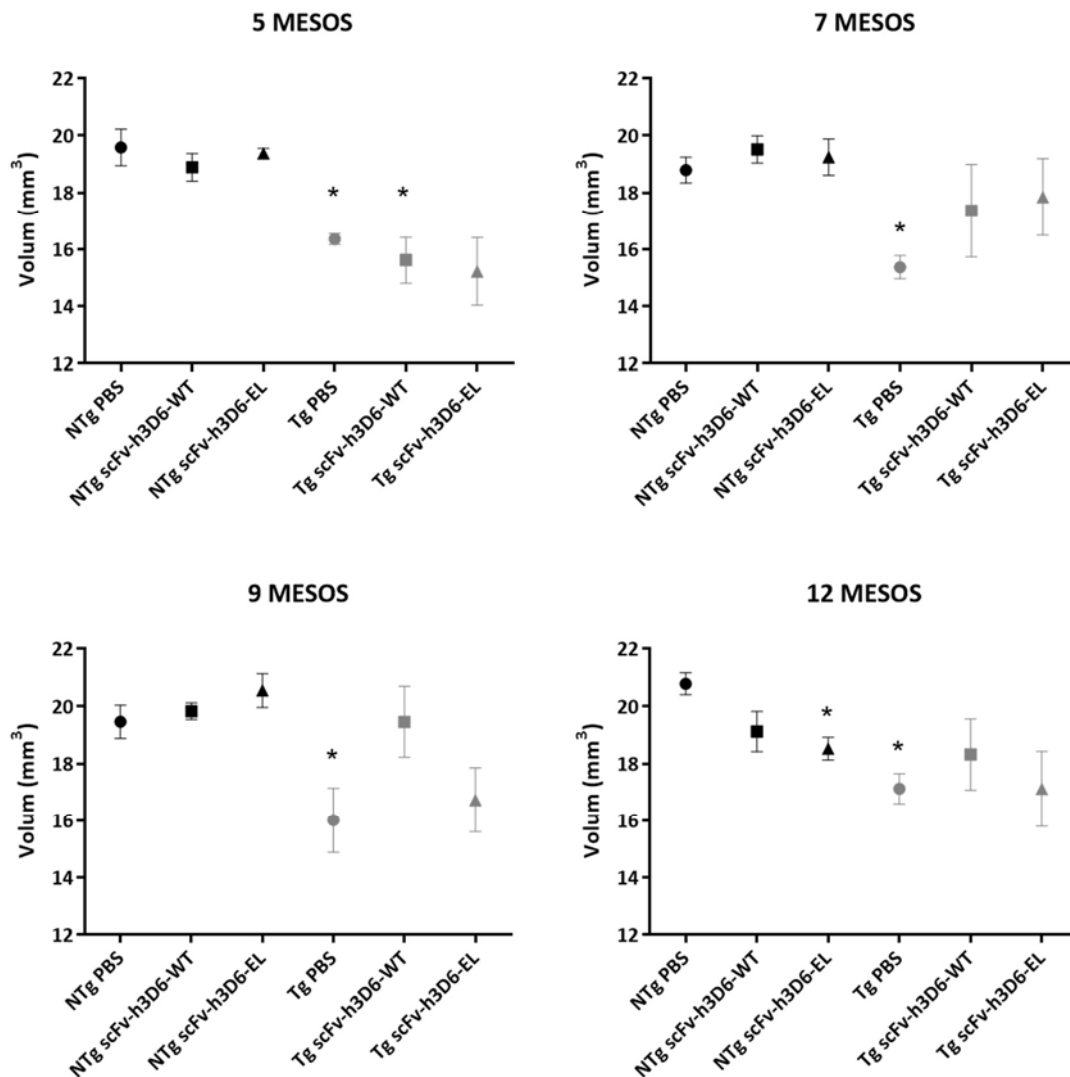
A la figura 34, que mostra l'evolució del volum de l'hipocamp dels diferents grups d'estudi al llarg del temps, s'observa com el patró d'evolució temporal que segueixen els dos grups no tractats (en blau; NTg línia discontinua i Tg línia contínua), és pràcticament idèntic, mantenint-se així, la diferència de volum entre genotips en tots els punts temporals analitzats. Aquests resultats ens porten a pensar que la diferència en el volum de l'hipocamp, es dona abans dels 5 mesos ja que, a partir de llavors, les dues soques es comporten de la mateixa manera.

Pel que fa a l'efecte que tenen els tractaments sobre els grups d'animals transgènics, aquest queda reflectit de manera diferent segons el temps que s'analitzi:

Als 5 mesos no hi ha cap efecte dels tractaments.

Als 7 mesos, tan el grup de transgènics tractat amb scFv-h3D6-WT (Tg WT) com el Tg EL tendeixen a tenir uns valors més elevats que el Tg PBS, anul·lant la significació existent entre el grup control i el 3xTg-AD sense tractar i, per tant, acostant-se als valors dels grups no transgènics, especialment en el cas del Tg EL.

## VOLUM DE L'HIPOCAMP



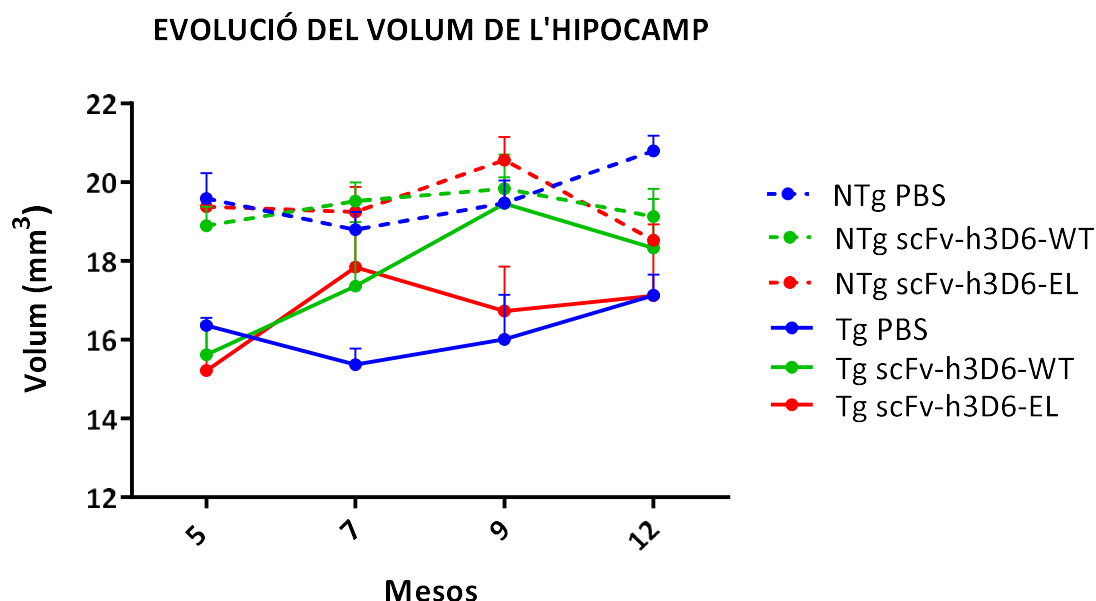
**Figura 33. Anàlisi del volum de l'hipocamp en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum de l'hipocamp està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS utilitzant la U de Mann-Whitney.

Als 9 mesos, les tendències varien i, mentre que el Tg WT segueix tenint un valor molt més alt que el Tg PBS (gairebé equiparable al del grup NTg PBS) el Tg EL perd la tendència que hi havia als 7 mesos i es queda, tan sols, amb un valor una mica més alt que el Tg PBS. De fet, si ens fixem en la figura 34, s'observa de forma clara com els valors dels grups de transgènics estan sempre per sota dels no transgènics, excepte als 9 mesos, on el valor del Tg WT arriba a ser igual que el NTg PBS ( $19.47 \text{ mm}^3$ ).

Finalment, als 12 mesos, s'observen les tendències que s'han descrit als 9 mesos però d'una manera molt menys marcada. Cal afegir també que, en aquest darrer temps, els grups NTg tractats tenen uns valors molt més baixos que el grup NTg PBS, essent, la diferència, significativa en el cas del NTg EL.

D'aquesta manera, es pot concloure que amb una sola administració dels tractaments (5 mesos) i amb 5 dies de marge per a què aquests facin efecte, no és suficient per observar diferències evidents en el volum de l'hipocamp. Tot i això, a mesura que avancen els tractaments, aquests semblen efectius però insuficients ja que, a partir d'un cert punt, es perd l'efecte observat.

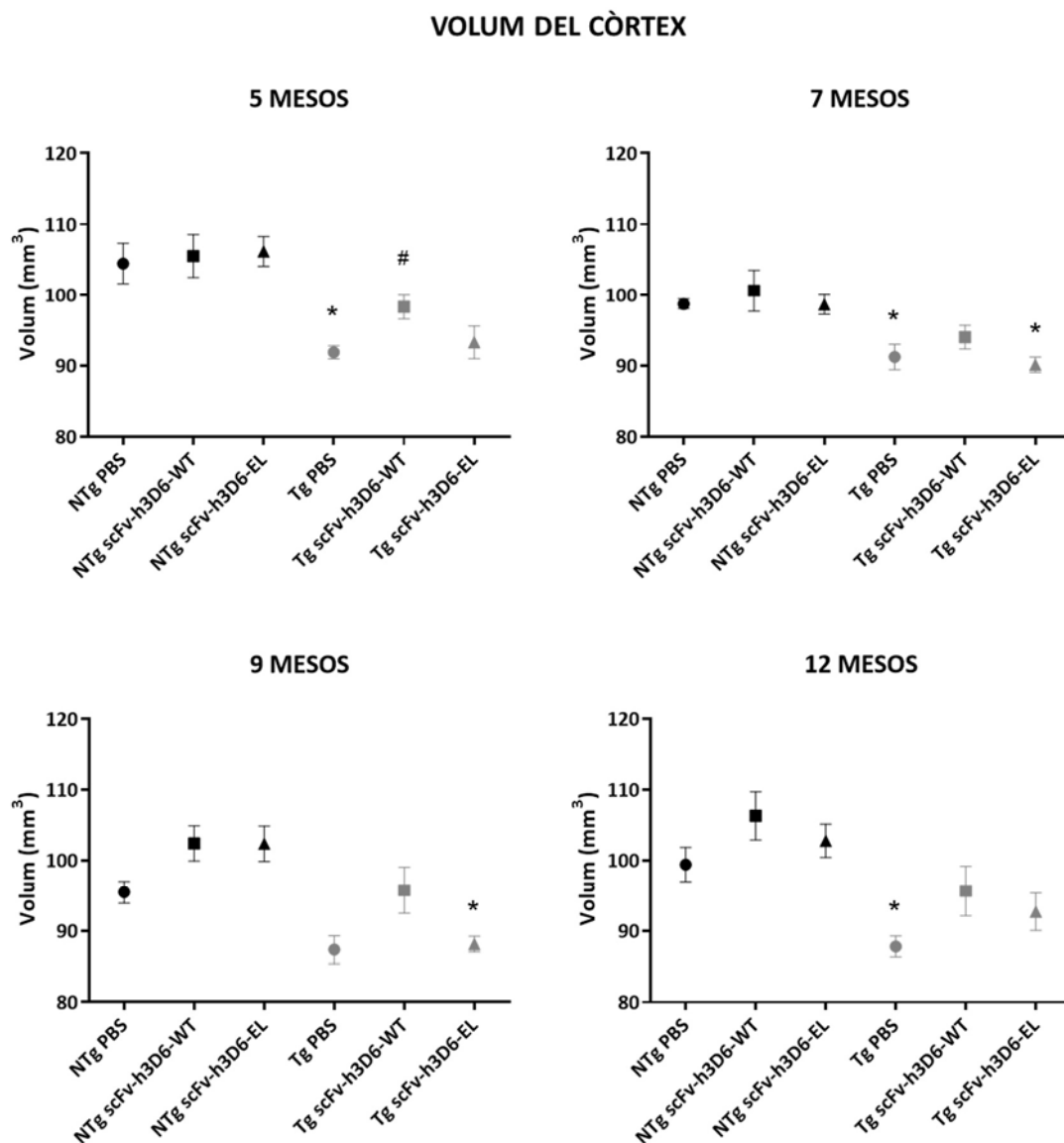
Aquest punt, que és diferent pels dos tractaments, es troba als 9 mesos pel scFv-h3D6-WT (WT) i als 7 pel scFv-h3D6-EL (EL), amb la qual cosa semblaria que el tractament amb EL no és tan efectiu com amb WT. Això no obstant, un augment de la dosi, (augmentant la periodicitat de les administracions, per exemple), podria solucionar la pèrdua d'efectivitat a mesura que avança l'edat (i, en conseqüència, la malaltia), i permetria discriminar millor les possibles diferències entre WT i EL .



**Figura 34. Anàlisi de l'evolució del volum de l'hipocamp al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum de l'hipocamp dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinúta. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana ± SEM.

## 4.1.2.1.2 Volum del còrtex

A la figura 35 es pot observar que, tal com passa a l'hipocamp, als diferents temps analitzats (5, 7, 9 i 12 mesos) la diferència entre NTg PBS i Tg PBS és evident tenint, aquest darrer grup, un volum molt més petit que el NTg PBS. En tots els temps aquesta diferència és estadísticament significativa excepte als 9 mesos, on el p-valor és marginalment significatiu (0.057).

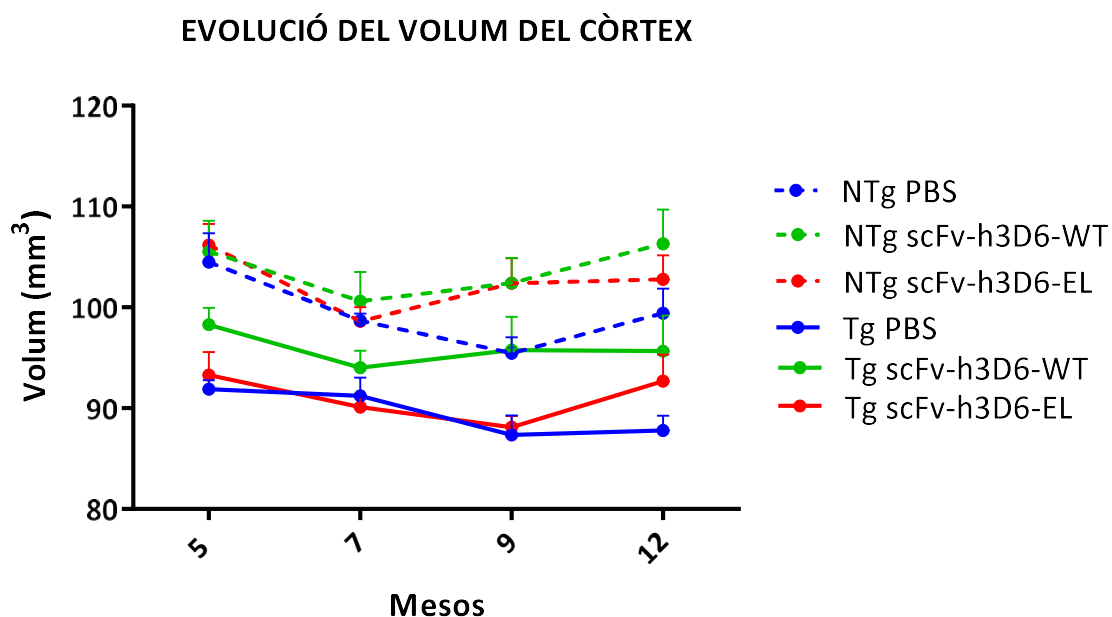


**Figura 35. Anàlisi del volum del còrtex en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum del còrtex està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Pel que fa a l'efecte dels tractaments, els valors del grup Tg WT tenen una tendència molt marcada a ser superiors als del grup Tg PBS essent, aquesta diferència, estadísticament significativa als 5 mesos. El grup Tg EL, en canvi, no mostra massa diferències respecte el Tg PBS, a excepció d'una tendència a l'alça als 12 mesos. Comparant aquests resultats amb els obtinguts a l'hipocamp, semblaria que l'efecte del tractament comença a detectar-se en el còrtex, ja que als 5 mesos ja s'observen diferències mentre que, a l'hipocamp, no s'observaven fins als 7. Si fos així l'efecte del tractament seguiria el mateix patró espacial que la malaltia, que comença afectant primer al còrtex i llavors a l'hipocamp.

Així doncs, es pot deduir que el tractament amb WT és efectiu des del primer moment (diferències significatives amb el Tg PBS als 5 mesos) i que és als 9 mesos, tal com passa a l'hipocamp, on sembla que aquest efecte és màxim. En aquest temps el volum del grup Tg WT és igual al NTg PBS (95,5 i 95,8 mm<sup>3</sup> respectivament), per la qual cosa podria ser el temps més adequat per fer mesures puntuals. Aquestes diferències s'observen, de forma més clara, a la figura 36, on es representa l'evolució dels valors dels diferents grups al llarg del temps.



**Figura 36. Anàlisi de l'evolució del volum del còrtex al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum del còrtex dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana ± SEM.

Per altra banda, el tractament amb EL sembla tenir un efecte molt poc marcat que es podria accentuar, tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, amb una pauta d'administració menys espaiada en el temps (administracions setmanals, per exemple).

Finalment, es pot observar tan a la figura 35 com a la 36 que els 2 tractaments tenen un efecte sobre els grups no transgènics, especialment en edats més avançades (9-12 mesos), fent que els valors dels no transgènics tractats siguin més elevats que els del grup NTg PBS.

Cal remarcar que, per esbrinar si les diferències observades en el volum del còrtex procedien d'alguna part concreta d'aquesta regió, s'han mirat els volums del còrtex frontal i del còrtex en la zona de l'hipocamp, per separat (resultats no mostrats), però en cap de les dues regions s'han observat diferències significatives, ni tan sols entre el grup NTg PBS i el Tg PBS.

#### 4.1.2.1.3 Volum del cervell

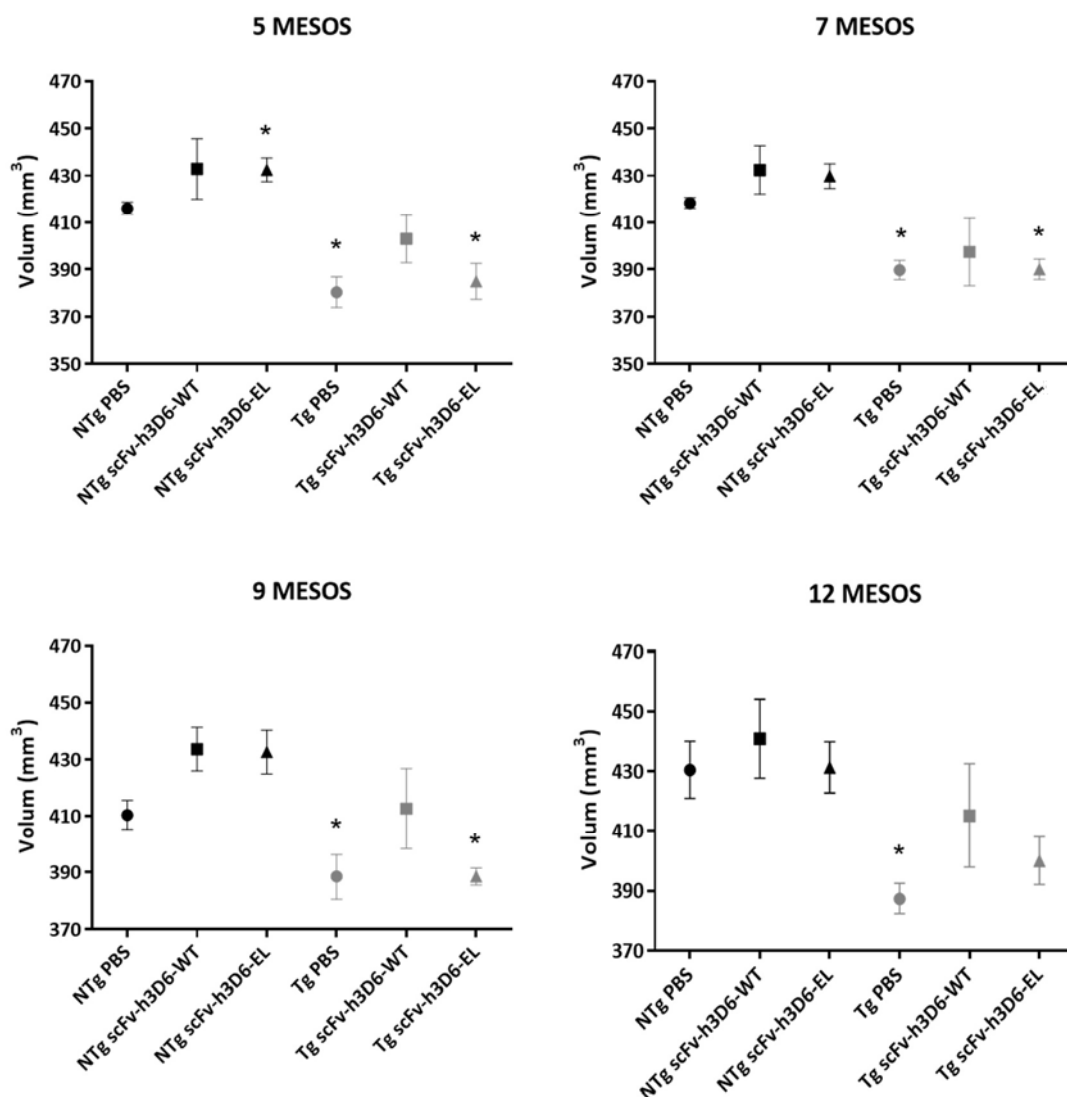
Tal com s'observa a la figura 37, els resultats són molt semblants als obtinguts al còrtex. El valor del grup Tg PBS és significativament diferent al del NTg PBS en tots els temps i els tractaments afecten tant als transgènics com als no transgènics.

En el cas dels no transgènics, els volums dels grups tractats són més elevats que el del NTg PBS i, en el cas dels transgènics, mentre que el tractament amb WT fa que el volum tingui una tendència a ser més elevat que el Tg PBS en tots els temps, amb una diferència màxima als 9 mesos, el tractament amb EL pràcticament no té cap efecte (exceptuant una petita tendència a l'alça als 12 mesos, que ja s'observava en el còrtex).

A més, a la figura 38, en la qual es representa l'evolució dels valors dels diferents grups al llarg del temps, es pot observar, d'una forma més visual, la gran similitud amb les evolucions de la zona del còrtex (veure figura 36, apartat anterior). L'única diferència destacable és que, en aquest cas, els valors dels grups no transgènics tractats són més elevats, des del començament, que els del grup NTg PBS.



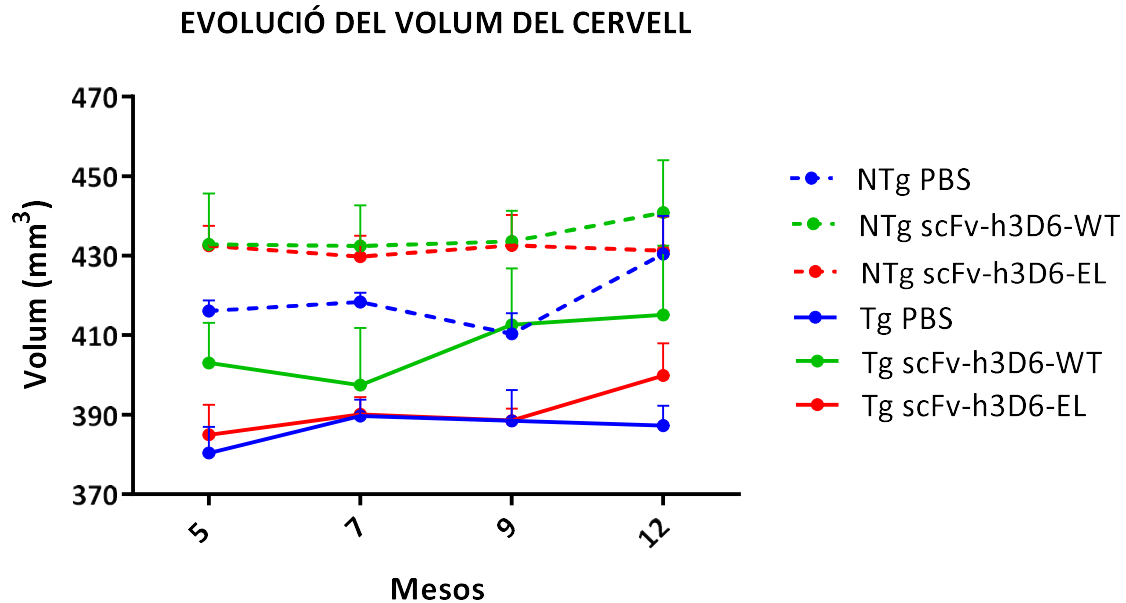
### VOLUM DEL CERVELL



**Figura 37. Anàlisi del volum del cervell en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum del cervell està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Per acabar, els resultats observats en el cervell estan en línia amb els obtinguts en l'hipocamp però, sobretot, confirmen els del còrtex, la qual cosa sembla lògica si tenim en compte que el volum del còrtex és molt més gran que el de l'hipocamp i, per tant, té una influència més elevada en els resultats finals del cervell. A més però, podem suposar que el volum de la resta de zones com l'amígdala, per exemple, no varia massa entre grups o ho fa en

la línia dels resultats observats o, en cas que variï respecte al còrtex, la zona en qüestió no és prou gran perquè els resultats quedin reflectits en el total del cervell.



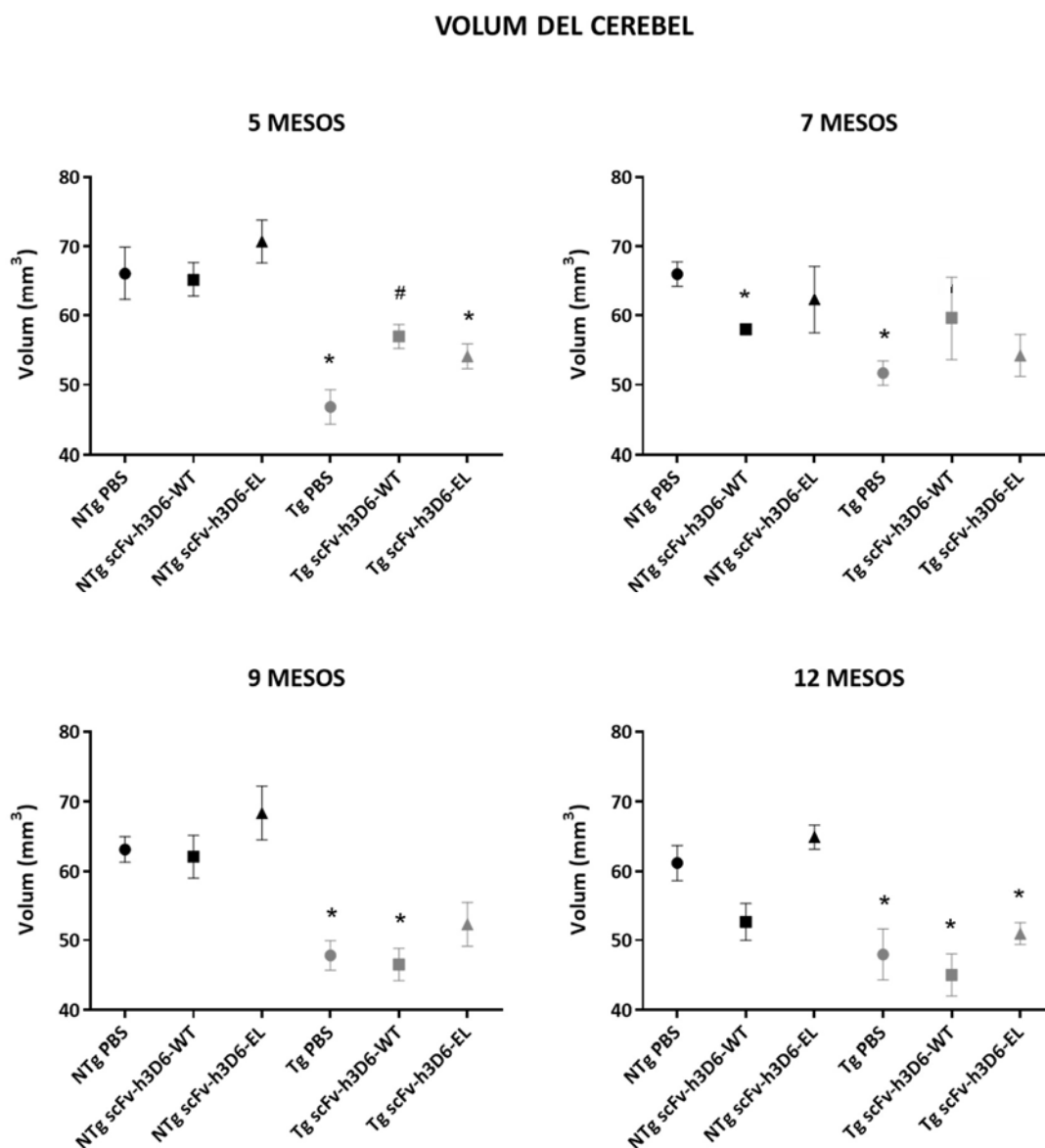
**Figura 38. Anàlisi de l'evolució del volum del cervell al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum del cervell dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

#### 4.1.2.1.4 Volum del cerebel

Tal com es pot observar a la figura 39, el volum del cerebel del grup transgènic PBS és significativament més petit que el del grup NTg PBS en tots els temps.

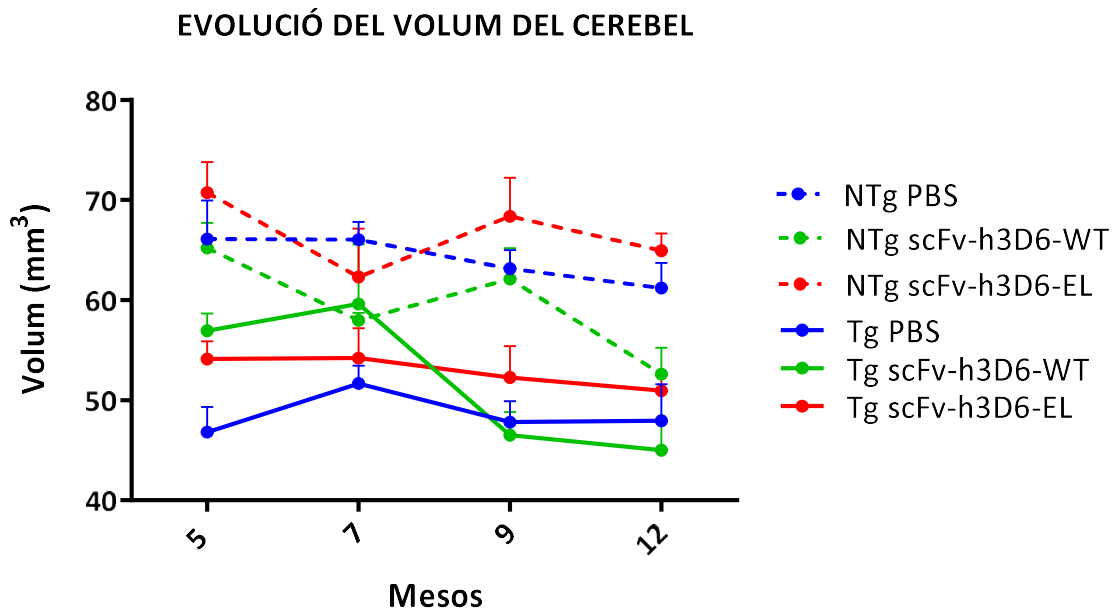
Pel que fa als tractaments, s'observa que l'efecte del WT sobre el transgènic és clar als 5 i als 7 mesos (essent estadísticament significatiu als 5 mesos) però, en canvi, als 9 i als 12 el volum tendeix a ser lleugerament més baix que el del grup Tg PBS. En referència al tractament amb EL, s'observa que el Tg EL té una tendència a tenir un volum superior al Tg PBS en tots els punts, especialment als 5 mesos, tot i que no tan alt com el Tg WT. Així doncs, sembla que el WT, en el cerebel, és efectiu només en edats primerenques mentre que, l'EL, té un efecte menys marcat però més constant en el temps, tal com reflecteix, de forma evident, la figura 40.

Finalment cal dir que els tractaments afecten també als grups d'animals no transgènics però, mentre que el grup NTg EL tendeix a tenir un volum superior al NTg PBS en tots els punts, excepte als 7 mesos, el grup NTg WT té un volum igual o, fins i tot inferior, al NTg PBS (sobretot als 7 mesos, on la diferència és estadísticament significativa). Aquesta particularitat del tractament WT al 7 mesos no concorda amb la resta de dades, que apunten a un efecte beneficiós del WT sobre els ratolins NTg.



**Figura 39. Anàlisi del volum del cerebel en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum del cerebel està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Els resultats obtinguts en el cerebel concorden, pel que fa als genotips, amb els observats en les altres regions analitzades. Ara bé, quan es miren els efectes dels tractaments, aquests difereixen dels descrits fins al moment. En aquest cas, el Tg WT té un volum més elevat que el Tg PBS als 5 i 7 mesos, però no als 9 i 12, com si deixés de fer efecte. El Tg EL, en canvi, tot i que té un volum més elevat que el Tg WT a edats primerenques, manté l'efecte fins als 12 mesos.



**Figura 40. Anàlisi de l'evolució del volum del cerebel al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum del cerebel dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

#### 4.1.2.1.5 Volum del bulb olfactori

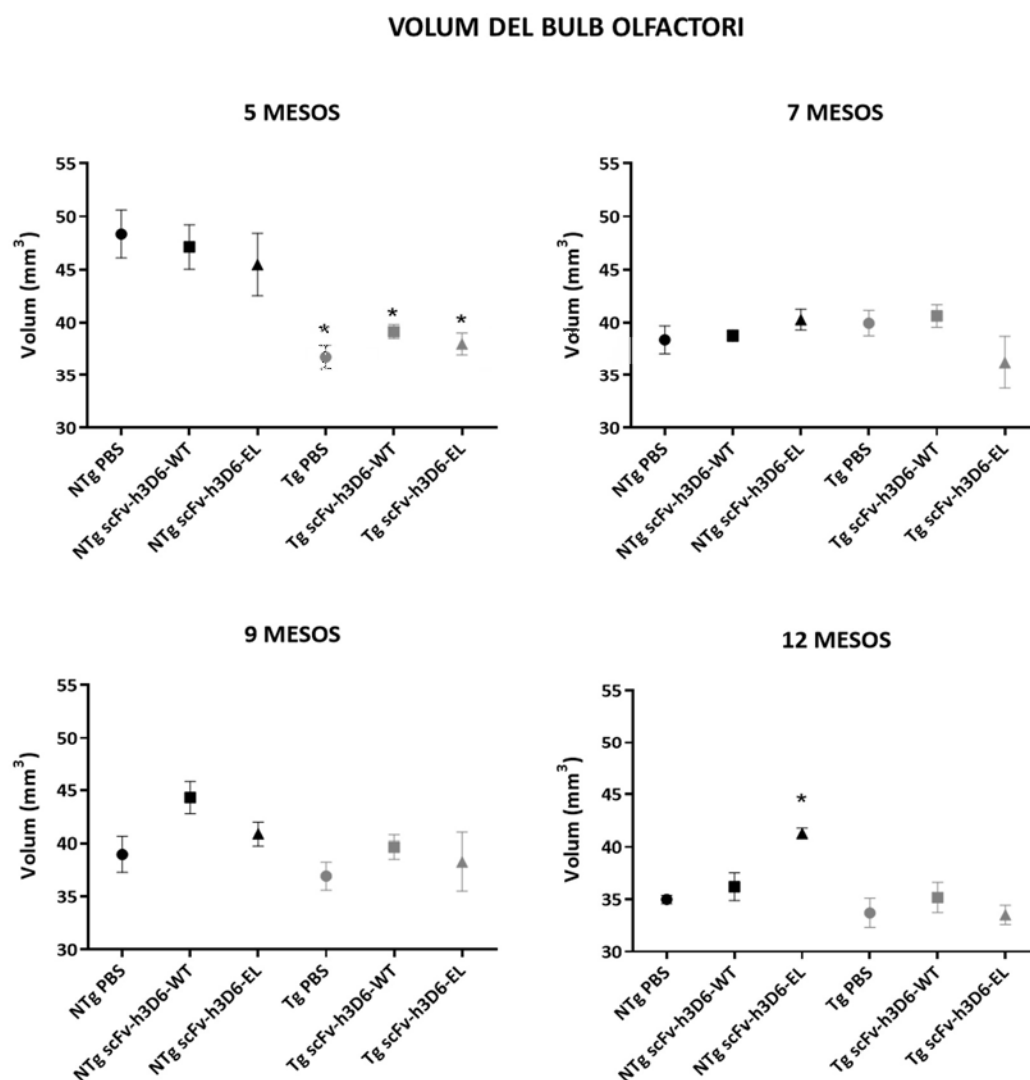
Tal com s'observa a la figura 41, les diferències entre genotips només existeixen als 5 mesos, on el valor del grup Tg sense tractar és significativament més baix que el NTg sense tractar.

Pel que fa als tractaments, tan el WT com l'EL tendeixen a generar uns valors lleugerament més elevats, especialment en el cas del WT. Excepcionalment, als 7 mesos, el Tg EL té un volum més baix que el Tg sense tractar.

Finalment, l'efecte dels tractaments sobre els grups NTg no està clar i depèn de l'edat en la qual es miri.

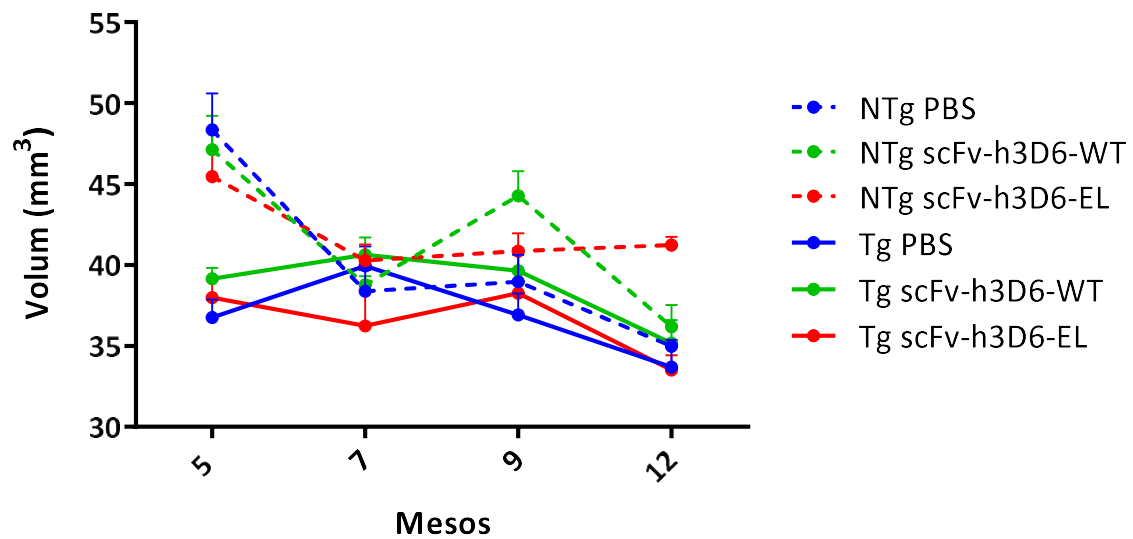
Pel que fa a l'evolució dels volums dels diferents grups (veure figura 42), s'observa com, de manera general, aquests van disminuint a mesura que avança l'edat, tot i que no ho fan de forma constant sinó que hi ha alts i baixos.

Veient aquestes dades, doncs, podem dir que el bulb olfatori del 3xTg-AD només està afectat als 5 mesos, contràriament al que passa a la resta de regions analitzades on, a totes les edats, es poden observar les diferències de genotip.



**Figura 41. Anàlisi del volum del bulb olfatori en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum del bulb olfatori està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS utilitzant la U de Mann-Whitney.

## EVOLUCIÓ DEL VOLUM DEL BULB OLFATORI



**Figura 42. Anàlisi de l'evolució del volum del bulb olfatori al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum del bulb olfatori dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

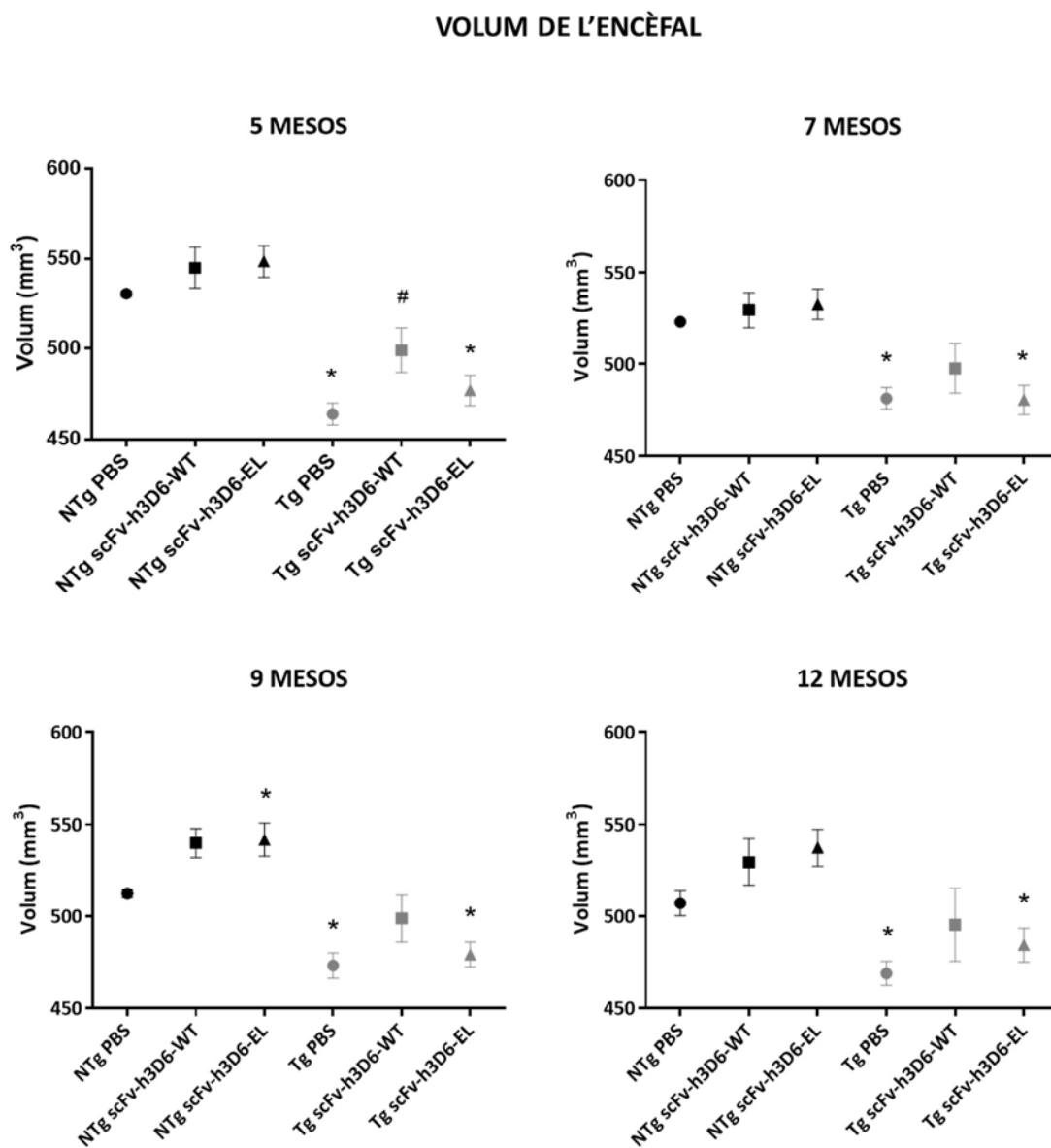
#### 4.1.2.1.6 Volum de l'encèfal

L'última regió analitzada per volumetria és l'encèfal total, el qual inclou el bulb olfatori, el cervell i el cerebel. A la figura 43, s'observa que les diferències entre el grup NTg PBS i el Tg PBS són estadísticament significatives a tots els temps, essent el volum d'aquests últims més petit.

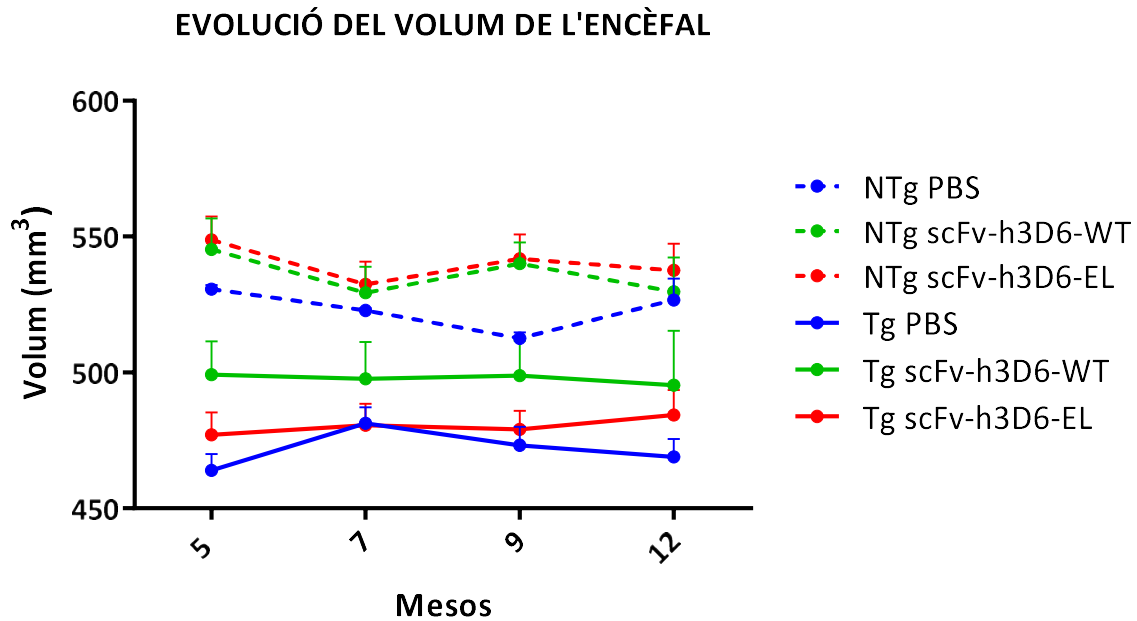
Pel que fa als tractaments, segueixen la mateixa dinàmica a les diferents edats. D'una banda, el grup Tg WT té una tendència clara a l'alça respecte el Tg PBS, situant-se la major diferència, als 5 mesos, on esdevé estadísticament significativa. D'altra banda, el grup Tg EL té una lleugera tendència a l'alça respecte el Tg PBS, a excepció dels 7 mesos.

Els animals no transgènics sembla que també es veuen afectats pels tractaments, amb una tendència clara dels grups NTg WT i NTg EL a tenir un volum superior al grup NTg PBS. Aquestes diferències tenen el seu punt màxim als 9 mesos, on la diferència de volum del grup NTg EL respecte el NTg PBS és estadísticament significativa.

Així doncs, es pot concloure que els resultats confirmen el que s'ha anat veient en les diferents parts de l'encèfal, en especial a la regió del còrtex, tal com reflecteix, clarament, la figura 44, on les evolucions dels volums de l'encèfal dels diferents grups són molt similars a les observades anteriorment.



**Figura 43. Anàlisi del volum de l'encèfal en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El volum de l'encèfal està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.



**Figura 44. Anàlisi de l'evolució del volum de l'encèfal al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del volum de l'encèfal dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

En conclusió:

- Existeix una diferència clara entre animals transgènics i no transgènics.
- S'observa un efecte del tractament sobre els grups no transgènics, donant indicis d'una certa acció dels scFv sobre l'A $\beta$  endogen.
- S'observa l'efecte dels tractaments en els animals transgènics, especialment en el cas del WT, tractament amb el qual les diferències respecte els no tractats són més evidents que en el cas de l'EL, i els valors del qual s'acosten als valors dels grups control.

Per finalitzar, cal afegir que s'ha analitzat la correlació dels resultats del volum de l'encèfal amb el pes de l'animal en els diferents punts temporals però els resultats no han estat positius, ja que no s'han observat diferències entre genotips (resultats no mostrats). Per tant, les diferències mostrades són degudes a una reducció real dels volums de les diferents parts analitzades, sense cap relació amb el pes de l'animal.



### 4.1.2.2 $T_2$

Com s'ha explicat als apartats 1.5.3.1.1 i 1.5.3.2.2 de la introducció, el  $T_2$  mesura la pèrdua de coherència de fase dels diferents espins, que és un tret característic de cada teixit. En aquest cas, s'analitza el  $T_2$  tan a l'hipocamp com a diferents zones del còrtex ja que la seva relació amb l'acumulació de càrrega amiloide s'ha demostrat en múltiples estudis en models d'AD (145). D'aquesta manera, la patologia amiloide del ratolí es pot diagnosticar *in vivo* i, a més, se'n pot seguir l'evolució a mesura que la malaltia avança.

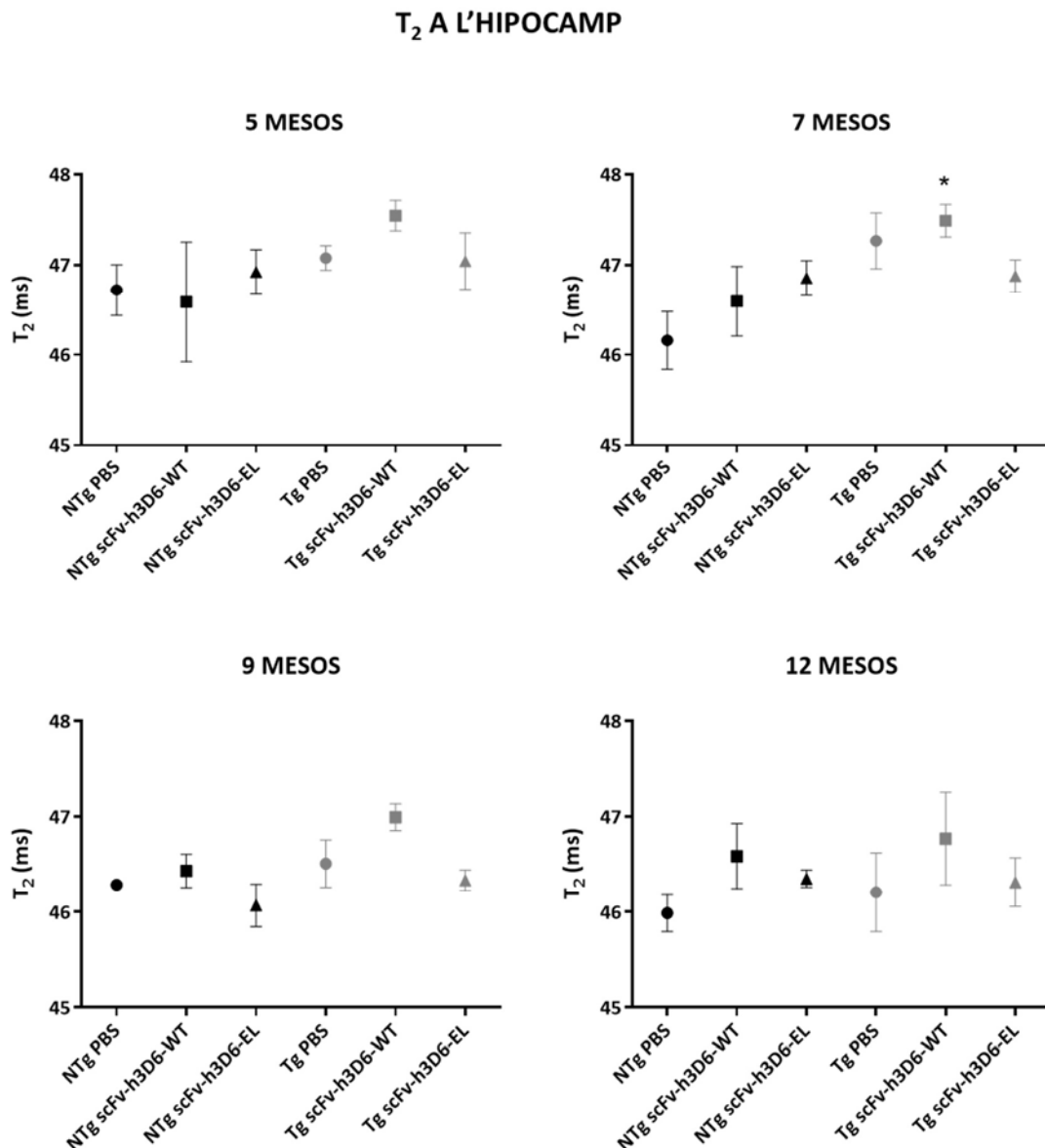
#### 4.1.2.2.1 $T_2$ a l'hipocamp

A la figura 45 s'observa que als diferents temps analitzats (5, 7, 9 i 12 mesos) les diferències entre els grups NTg PBS i Tg PBS són pràcticament inexistents, amb una lleugera tendència a l'alça per part d'aquest últim, excepte als 7 mesos, on sí que els valors del Tg PBS són més elevats. Això contradiu la hipòtesi plantejada, segons la qual els grups transgènics haurien de tenir un  $T_2$  més baix ja que acumulen càrrega amiloide (128).

Com s'ha observat en altres estudis més recents però, alteracions neuropatològiques, secundàries derivades de la patologia amiloide, com ara neuroinflamació, neurodegeneració o pèrdua neuronal, podrien incrementar el  $T_2$  d'un teixit (146). D'aquesta manera, podria donar-se el fet que, en els estadis de la malaltia que ens trobem, l'acumulació de càrrega amiloide no sigui suficientment elevada i, per tant, la seva influència en el  $T_2$  sigui menor que la influència d'altres factors com els esmentats anteriorment.

Pel que fa als tractaments, el grup Tg WT té una clara tendència a l'alça respecte el Tg PBS a tots els temps, mentre que el grup Tg EL es manté més o menys igual que el Tg PBS, excepte al punt dels 7 mesos, on tendeix a tenir un valor més baix. En referència als no transgènics, l'aplicació dels tractaments fa que els valors d'aquests variïn de manera diferent segons el punt temporal analitzat. En general però, tendeixen a ser una mica més elevats que el NTg PBS. El fet que els tractaments augmentin els valors de  $T_2$ , especialment en el cas de la forma WT, podria ser indicatiu tan de la disminució de la càrrega amiloide com d'un augment de la inflamació, entre d'altres; per tant, aquests paràmetres seran avaluats més endavant mitjançant altres metodologies (apartats 4.1.4 i 4.1.5).

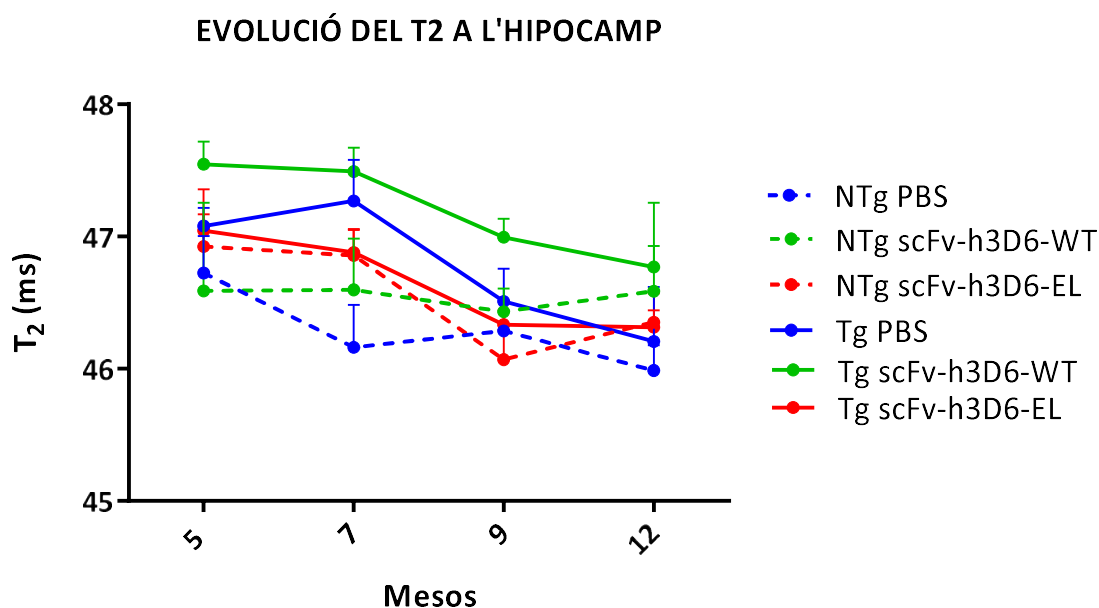
A la figura 46, que mostra com evoluciona el  $T_2$  dels diferents grups d'estudi al llarg del temps, es pot observar com el  $T_2$  va disminuint, especialment en el cas dels animals transgènics, la qual cosa sí que encaixa amb les hipòtesis formulades, ja que, tan si l'acumulació amiloide és l'únic factor que influeix en el  $T_2$ , com si no, aquesta augmenta al llarg del temps i, per tant, el  $T_2$  tendeix a disminuir a mesura que avança la malaltia.



**Figura 45. Anàlisi del  $T_2$  a l'hipocamp en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El  $T_2$  de l'hipocamp està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Així doncs es pot afirmar que no hi ha diferències clares entre genotips, la qual cosa fa que, a les edats analitzades, la mesura del  $T_2$  de l'hipocamp no sigui un bon marcador per a determinar el grau d'afectació de l'individu, en aquest model d'AD. Tot i així, cal apuntar que el fet que el tractament amb WT dels animals transgènics faci que el valor  $T_2$  sigui més elevat respecte als transgènics no tractats, pot indicar una acumulació menor d'A $\beta$ . Això no obstant, el fet que altres factors com la neurodegeneració influeixin en el valor final de  $T_2$ , fa que sigui impossible conèixer l'origen d'aquestes diferències i fer afirmacions concretes.



**Figura 46. Anàlisi de l'evolució del  $T_2$  a l'hipocamp al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del  $T_2$  de l'hipocamp dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

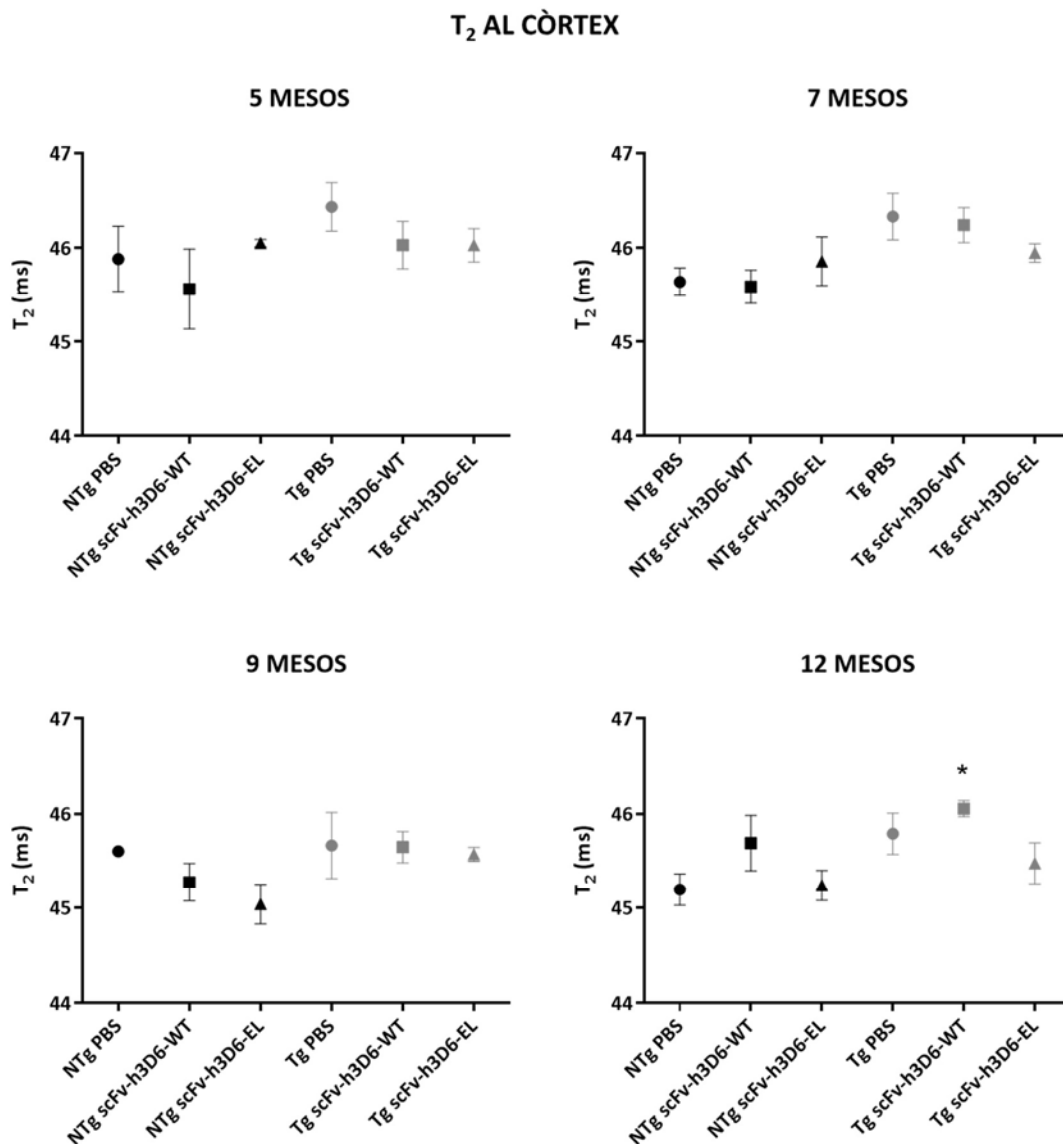
#### 4.1.2.2.2 $T_2$ al còrtex

Tal com s'observa a la figura 47, entre els grups NTg PBS i Tg PBS hi ha una tendència prou marcada d'aquests últims a tenir un valor de  $T_2$  superior, exceptuant els 9 mesos on aquestes diferències són pràcticament inexistent.

Amb els tractaments, els valors dels transgènics tendeixen a ser més baixos respecte el Tg PBS, sobretot en el cas de l'EL, exceptuant els 9 mesos on els valors dels tres grups transgènics

són gairebé iguals. A la resta de punts temporals, el Tg WT tendeix a l'alça als 12 mesos però, contràriament al que s'havia descrit fins ara, als 5 i 7 mesos tendeix ser més baix que el Tg PBS.

Finalment, pel que fa als grups d'animals no transgènics, com ja s'observava a l'hipocamp, varien en funció de l'edat analitzada. Pel grup NTg WT, els valors són més baixos que els del grup NTg PBS en tots els punts excepte als 12 mesos, mentre que, pel grup NTg EL, els valors són més elevats que els del NTg PBS als 5 i 7 mesos, més baixos als 9 i iguals als 12.

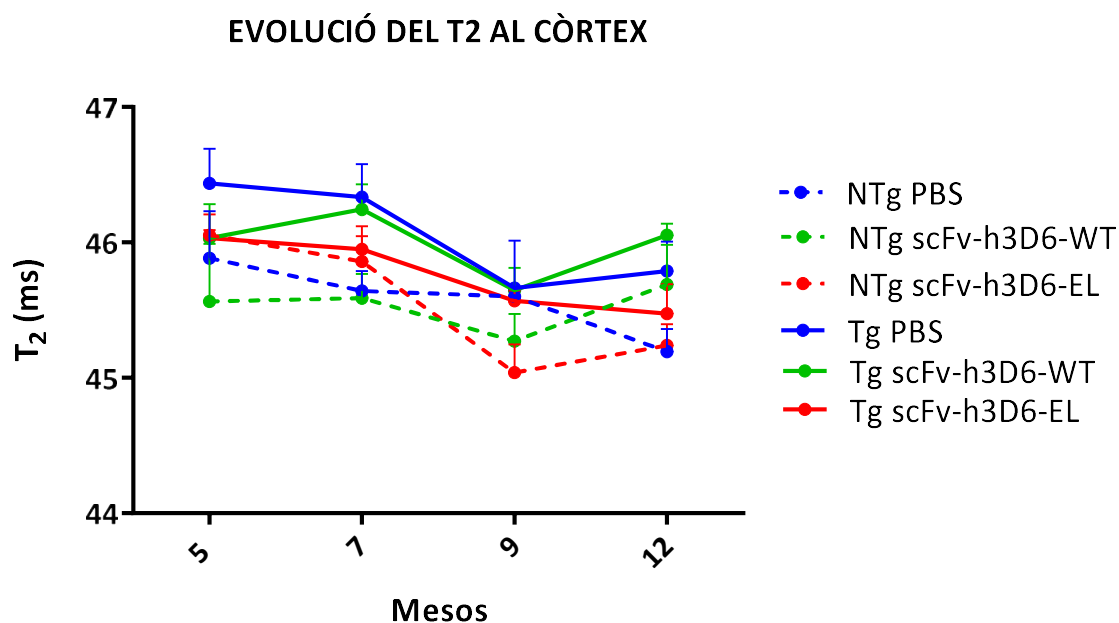


**Figura 47. Anàlisi del T<sub>2</sub> al còrtex en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El T<sub>2</sub> del còrtex està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana ± SEM.

\*p<0.05 respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

La figura 48, ens pot ajudar a veure més clares aquestes variacions ja que, al representar l'evolució del T<sub>2</sub> dels diferents grups al llarg del temps, s'observa com els grups NTg PBS, NTg EL, Tg PBS i Tg EL, disminueixen els seus valors de T<sub>2</sub> a mesura que avança el temps (no de forma contínua, però sí que als 12 mesos tenen un valor de T<sub>2</sub> clarament inferior que als 5 mesos).

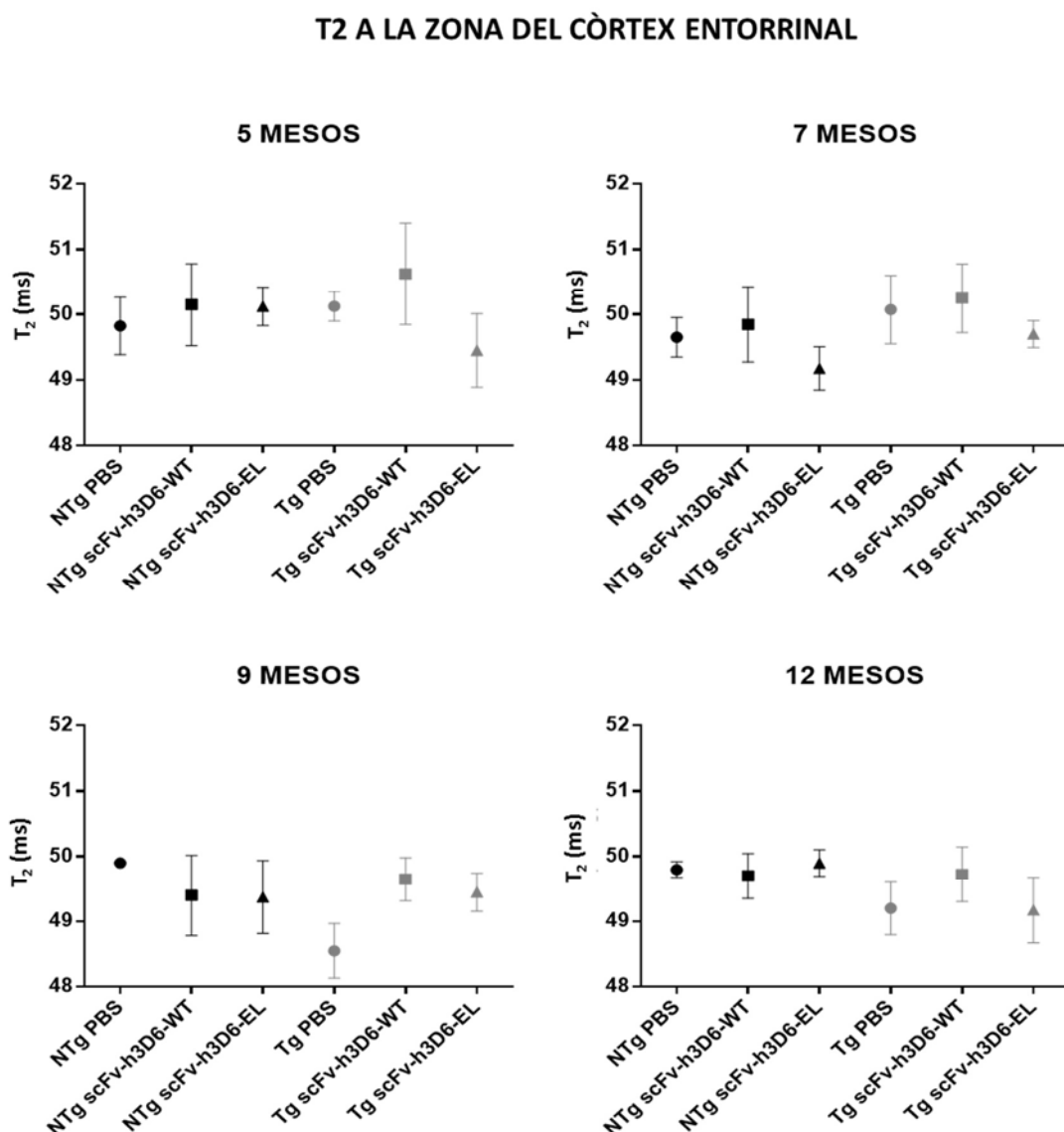
En canvi, els dos grups tractats amb WT (tan el transgènic com el no transgènic), tenen un valor molt similar als 12 i als 5 mesos, la qual cosa es podria explicar, com s'ha comentat en l'apartat anterior, per la influència de diversos factors en el T<sub>2</sub> resultant. Si a mesura que avança l'edat, la càrrega amiloide és superior i comença a contrarestar les alteracions neuropatològiques secundàries però el valor de T<sub>2</sub> dels grups tractats amb WT no disminueix, podria significar que, efectivament, aquest tractament està causant un efecte protector.



**Figura 48. Anàlisi de l'evolució del T<sub>2</sub> al còrtex al llarg del temps.** Es mostra l'evolució del T<sub>2</sub> del còrtex dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana ± SEM.

4.1.2.2.3  $T_2$  a la zona del còrtex entorrinal

De les diferents regions del còrtex analitzades (còrtex frontal, zona on també hi ha l'hipocamp i zona entorrinal), no n'hi ha cap on hi hagin diferències clares entre genotips o entre tractaments. Tot i això, s'han volgut mostrar els valors de  $T_2$  a la zona del còrtex entorrinal ja que, aquesta, és l'única zona on s'observen, a edats avançades, uns valors més baixos dels animals transgènics respecte els no transgènics, tal com mostra la figura 49. Així, el valor de  $T_2$  del grup Tg PBS és lleugerament més elevat que el del NTg PBS als 5 i 7 mesos, però menor als 12 i, sobretot, als 9.

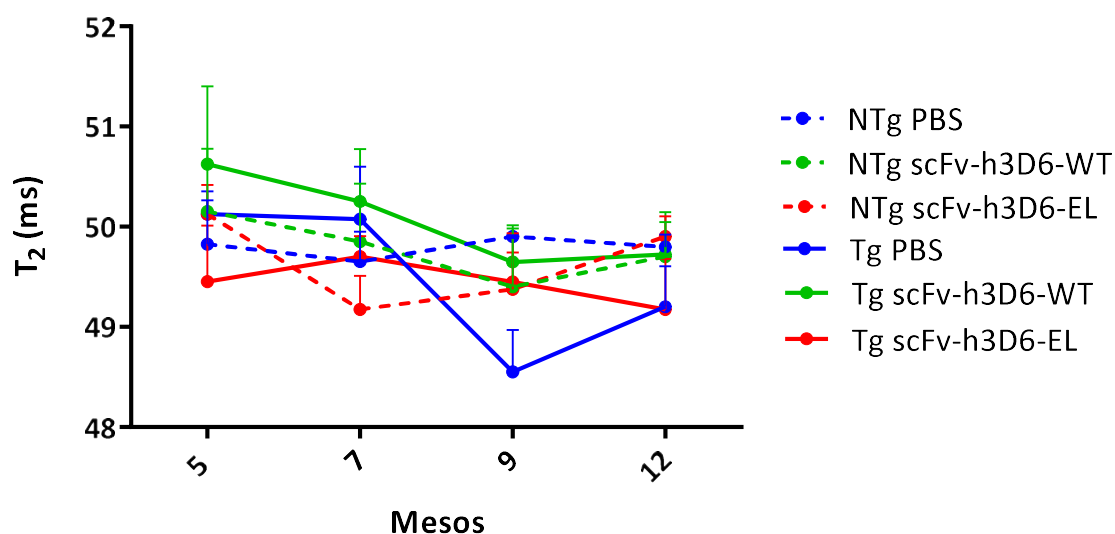


**Figura 49. Anàlisi del  $T_2$  a la zona del còrtex entorrinal en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. El  $T_2$  de la zona del còrtex entorrinal està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana ± SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Pel que fa als tractaments, mentre que el Tg WT tendeix a tenir uns valors més elevats respecte el Tg PBS en tots els temps, el Tg EL tendeix a tenir-los més baixos, excepte al punt dels 9 mesos. Els tractaments també semblen tenir efecte sobre els grups no transgènics i, mentre que el NTg WT tendeix a tenir valors més elevats en edats primerenques (5 i 7 mesos) i més baixos en edats avançades (9 i 12), el NTg EL només sembla estar més elevat als 5 mesos. Per contra, als 7 i als 9 tendeix a tenir uns valors més baixos i, als 12 mesos, sembla estar igual que el NTg PBS.

En l'evolució dels valors de  $T_2$  al llarg del temps que mostra la figura 50, s'observa com els valors dels grups no transgènics són bastant semblants als 12 mesos i als 5 (tot i que fluctuen en els punts intermedis), mentre que els transgènics tendeixen a disminuir amb l'edat. En aquest cas, el Tg EL és el que es manté més estable mentre que, el Tg WT i, sobretot, el Tg PBS, disminueixen considerablement.

### EVOLUCIÓ DEL $T_2$ A LA ZONA DEL CÒRTEX ENTORRINAL



**Figura 50.** Anàlisi de l'evolució del  $T_2$  a la zona del còrtex entorrinal al llarg del temps. Es mostra l'evolució del  $T_2$  de la zona del còrtex entorrinal dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontínua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

El fet interessant és que, en edats avançades, els valors dels transgènics estiguin per sota dels no transgènics, tal com preveia la hipòtesi inicial. Aquests resultats podrien tenir a veure

amb el fet que la zona del còrtex entorrinal és on més plaques s'observen en les anàlisis histològiques (veure apartat 4.1.4.2). A més, diferents estudis apunten a aquesta zona com una de les primeres que es veu afectades per la patologia amiloide, amb la qual cosa, el fet que sigui la única zona en la que veiem uns valors de  $T_2$  més baixos en els 3xTg-AD que en els controls, ens podria estar indicant que la malaltia es troba, encara, en un estadi primerenc (147,148).

#### 4.1.2.3 ADC

Com s'explica a l'apartat 1.5.3.2.4 de la introducció, en un mapa d'ADC, la intensitat de cada píxel és proporcional a la difusió aparent en el vòxel corresponent i, per tant, les zones hiperintenses indiquen un coeficient de difusió més gran. En aquest treball, s'analitzen els valors d'ADC de l'hipocamp i el còrtex per tal detectar la presència de possibles edemes vasogènics provocats per l'administració dels scFvs ja que, en un edema vasogènic, hi ha un augment de líquid lliure que es tradueix en un augment de l'ADC.

La hipòtesi plantejada és que, a diferència de l'anticòs mAb-h3D6 sencer, els scFvs-h3D6 no són capaços de provocar edema vasogènic ja que els manca el Fc, que seria la part responsable de desencadenar la resposta de la micròglia, la qual sembla que va causar l'edema en els assajos clínics del bapineuzumab (83,84). D'aquesta manera, no s'esperaria veure augments significatius en l'ADC dels grups tractats amb els scFv.

##### 4.1.2.3.1 *ADC a l'hipocamp*

Com s'observa a la figura 51, no hi ha gaires diferències entre els grups NTg PBS i Tg PBS, exceptuant els 7 mesos, on aquest darrer grup té un valor d'ADC significativament superior.

Pel que fa els tractaments, el Tg WT tendeix a tenir uns valors d'ADC més alts que el Tg PBS en tots els temps analitzats mentre que, el Tg EL, en canvi, no té un efecte clar ja que als 5 i 9 mesos tendeix a tenir un valor més elevat que el Tg PBS, però als 7 i als 12 passa just el contrari.

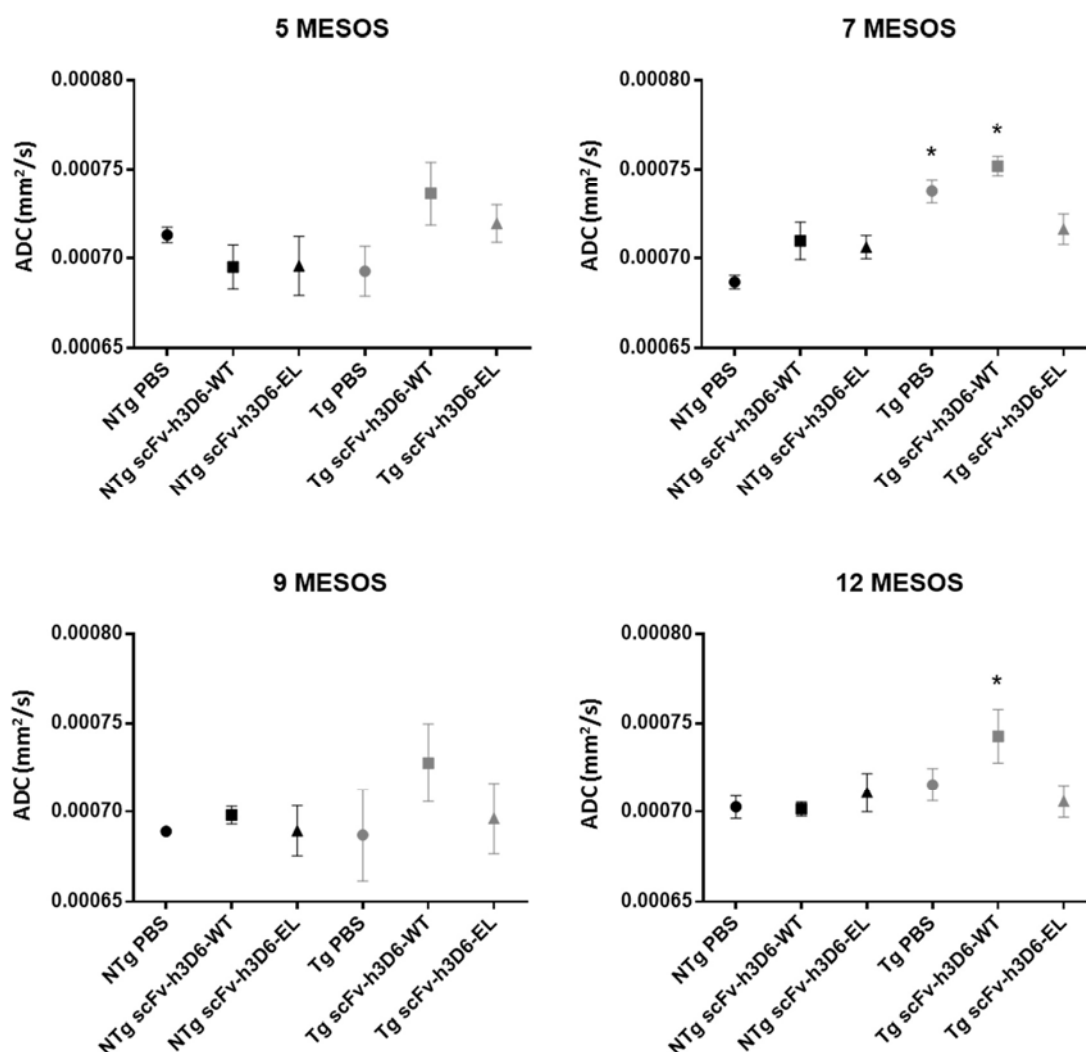
A més, els grups no transgènics tractats varien de forma diferent segons el punt temporal que es miri. Així, mentre que el NTg WT tendeix a tenir un valor inferior als 5 mesos i superior als 7 i als 9, el NTg EL tendeix a ser inferior als 5 i superior als 7 i als 12.



Si ens fixem en l'evolució dels valors d'ADC al llarg del temps (figura 52), s'observa que, dins de cada grup, els valors no varien gaire dels 5 als 12 mesos. Tot i que és cert que conforme avança l'edat, aquests van fluctuant, es podria dir que, de forma general no varien amb el temps.

Així doncs, el fet que el grup Tg WT tendeixi a tenir uns valors d'ADC més elevats que el Tg PBS en tots els temps, ens pot portar a pensar que està tenint algun efecte sobre l'organisme, tot i que, al mantenir-se més o menys estable al llarg del temps, ens indica que aquest efecte no és acumulatiu.

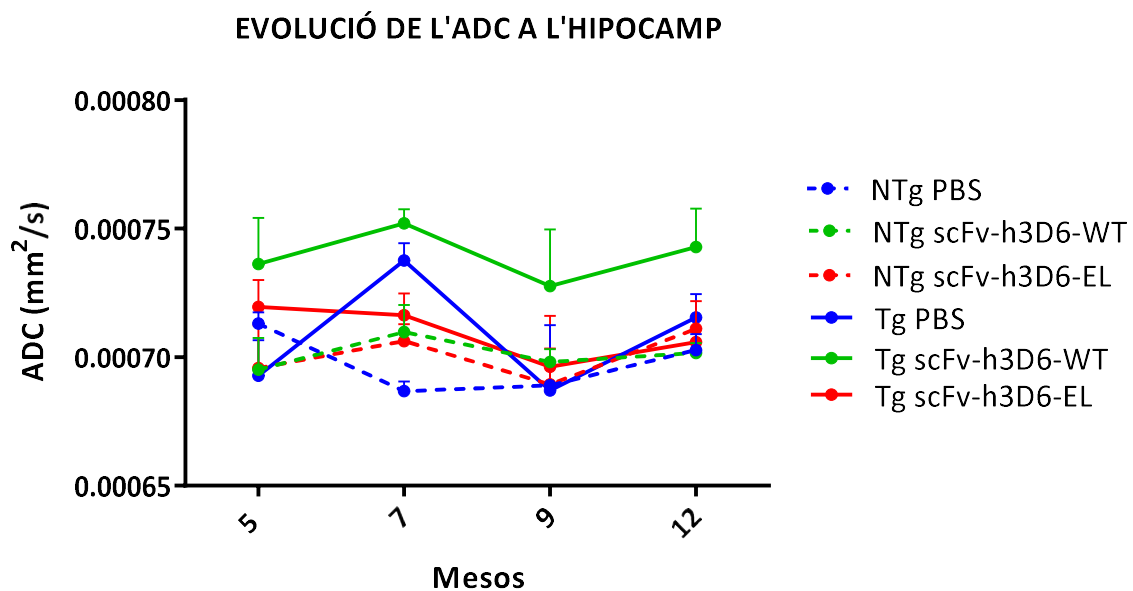
### ADC A L'HIPOCAMP



**Figura 51. Anàlisi del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp en el temps.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. L'ADC de l'hipocamp està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

De fet, tan a l'anàlisi de volums com al de  $T_2$ , també ens trobem uns valors més elevats al grup Tg WT, de manera que podrien estar relacionats amb l'obtingut en l'ADC. Una possible explicació seria que el fet que el tractament amb scFv-h3D6-WT estigui tenint algun efecte (com mostren els resultats de volumetria i sugereixen els de  $T_2$ ), produeix alguns canvis en el cervell (hipocamp i còrtex) que d'alguna manera influencien el valor d'ADC.

Aquesta influència, podria ser deguda a una inflamació, produïda per l'activació de la micròglia o algun altre mecanisme de neteja de l'A $\beta$ , o bé, podria ser que aquesta influència no fos deguda a la inflamació sinó a algun altre factor que afecta el valor d'ADC.



**Figura 52. Anàlisi de l'evolució del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp al llarg del temps.**

Es mostra l'evolució de l'ADC de l'hipocamp dels diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

De totes maneres, cal tenir en compte que les diferències obtingudes en els valors d'ADC tampoc són significatives i que, de fet, no tenim cap control positiu d'edema vasogènic per poder-li assignar un valor determinat d'ADC i, per tant, podria ser que els valors lleugerament elevats que observem, estiguin dins el rang de la normalitat.

Precisament, en l'apartat 4.2 s'intenta aconseguir l'aparició d'edema vasogènic per aquest motiu, entre d'altres. Com s'explica però, tot i administrar dosis elevades de l'anticòs mAb-m3D6, no s'aconsegueix visualitzar edema, i els valors que s'obtenen estan dins el mateix rang que els del present estudi. Aquests resultats ens porten a pensar que, difícilment, administrant scFv en dosis menors i molt més espaciades en el temps, tal com s'està fent ara, es pot provocar un edema vasogènic.

### 4.1.2.3.2 ADC al còrtex

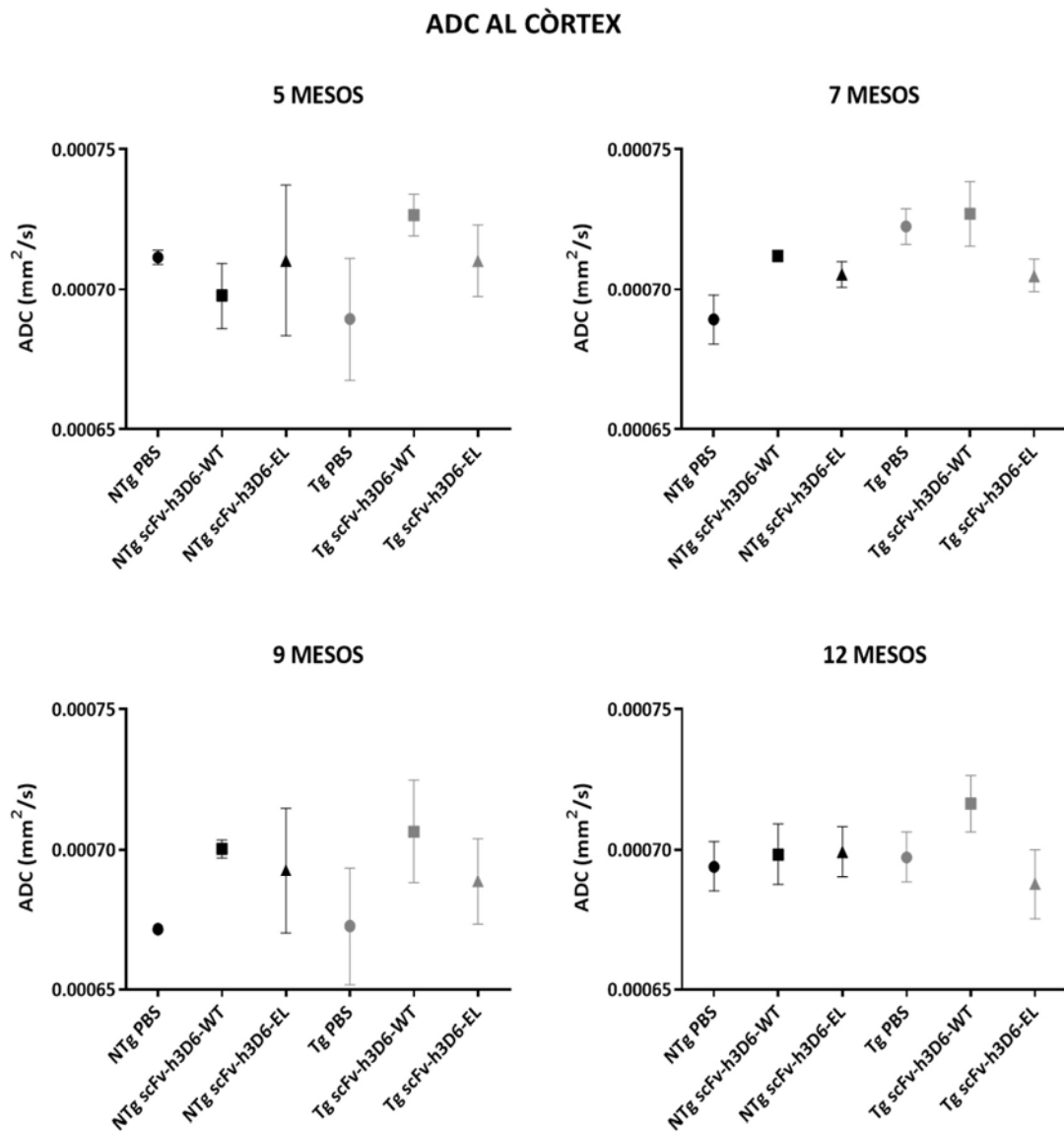
Pel que fa al còrtex, a la figura 53 s'observa que no hi ha diferències clares entre transgènics i no transgènics. En el cas dels no tractats, mentre que als 5 mesos sembla que el transgènic tendeix a tenir un valor d'ADC més baix, als 7 aquest tendeix a ser més elevat i, a edats més avançades, els valors són molt similars entre els dos grups. La gran variabilitat que existeix entre els animals d'un mateix grup impedeix fer un anàlisi més acurat dels resultats.

En el cas dels tractaments, aquests actuen d'una manera molt semblant a com ho fan a l'hipocamp. El Tg WT tendeix a tenir sempre un valor més elevat que el Tg PBS, especialment als 5 i 9 mesos. En canvi, les diferències amb el Tg EL, són molt més petites i, en unes edats el valor d'aquest grup tendeix a ser més elevat que el del Tg PBS (5 i 9 mesos), però en d'altres tendeix a ser més baix (7 i 12 mesos). Els tractaments tampoc afecten d'una forma clara als no transgènics i, mentre que el NTg WT sembla que té uns valors més alts que el NTg PBS als 7 i als 9 mesos i un valor més baix als 5, el NTg EL també té un valor superior als 7 i als 9 mesos.

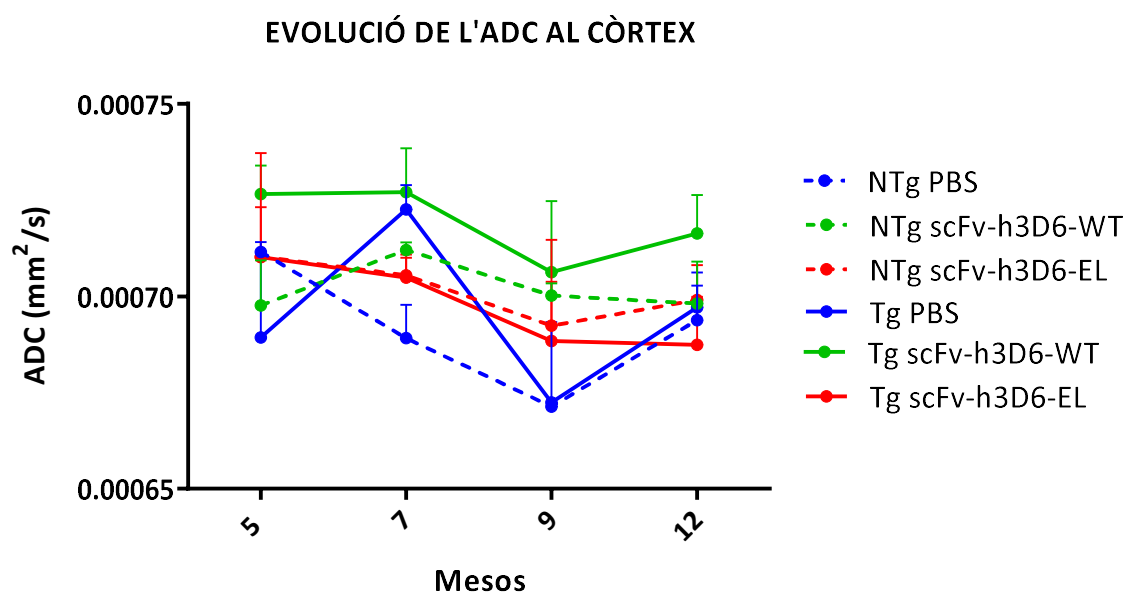
Pel que fa a l'evolució dels valors d'ADC al llarg del temps (figura 54), s'observa que, tot i les variacions que té cada un dels grups en els diferents punts temporals, de manera general no es veuen massa influenciats per l'edat, és a dir, que els valors als 12 mesos no difereixen gaire dels obtinguts als 5 mesos.

Així doncs, tot i la impossibilitat de fer un anàlisi acurat dels resultats per l'elevada variabilitat dins de cada grup, es pot afirmar, com passava en l'hipocamp, que no hi ha diferències entre genotips i que el grup Tg WT és el que mostra uns valors d'ADC més elevats, amb la qual cosa es repetirien els raonaments fets en l'apartat anterior.

Per últim, cal remarcar que s'han analitzat les diferents regions del còrtex per separat, però cap d'elles aporta uns resultats diferents als obtinguts en l'anàlisi del còrtex total.



**Figura 53.** Anàlisi del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex en el temps. La imatge mostra 4 gràfics corresponents als 4 punts temporals analitzats. L'ADC de l'hipocamp està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. Per fer l'anàlisi estadístic s'ha aplicat la U de Mann-Whitney.



**Figura 54.** Anàlisi de l'evolució del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex al llarg del temps. Es mostra l'evolució de l'ADC del còrtex els diferents grups al llarg del temps. Els grups transgènics es representen amb una línia contínua i els no transgènics amb una de discontinua. En blau es marquen els grups sense tractar (PBS), en verd els tractats amb scFv-h3D6-WT i en vermell els tractats amb scFv-h3D6-EL. Els valors dels diferents grups es representen com a mitjana  $\pm$  SEM.

#### 4.1.3 MRS

En aquest estudi s'ha analitzat el perfil metabòlic de dues zones concretes que corresponen a l'hipocamp i al còrtex frontal (veure col·locació dels vòxels a la figura 20 de l'apartat 3.3.2.2.4 de materials i mètodes). Amb aquestes anàlisis es pretén observar la variació de diferents metabòlits que, com s'ha explicat en l'apartat 1.5.3.3 de la introducció, s'utilitzen com a biomarcadors per detectar la patologia *in vivo*.

##### 4.1.3.1 Perfil metabòlic de l'hipocamp

A la taula 2, situada al final d'aquest apartat, apareixen reflectits els valors de cada grup experimental (representats com a mitjana  $\pm$  SD) a cada un dels temps analitzats, per a tots els metabòlits que han passat els criteris de selecció descrits en l'apartat 3.3.4.2. Les diferències estadísticament significatives estan marcades amb un \* o un #, depenent de si les diferències són respecte el grup NTg PBS o el Tg PBS, respectivament.

A continuació es presenten, de forma més detallada, els metabòlits més estudiats en la malaltia de l'AD que són el NAA i el mIns (veure figura 55) i els quals gaudeixen d'un consens bastant ampli a la bibliografia. Posteriorment, es detallen els resultats d'altres metabòlits com la Gln, la Tau i la PAI, on s'han observat diferències a tenir en compte (veure figura 56). Finalment, es fan algunes observacions sobre la resta de metabòlits.

#### 4.1.3.1.1 *N-acetil aspartat (NAA)*

Pel que fa a les diferències entre genotips, s'observa que els valors del grup NTg PBS i els del Tg PBS són molt similars en tots els temps, essent una mica més elevat, aquest últim, als 7 i 9 mesos i, una mica més baix, als 5.

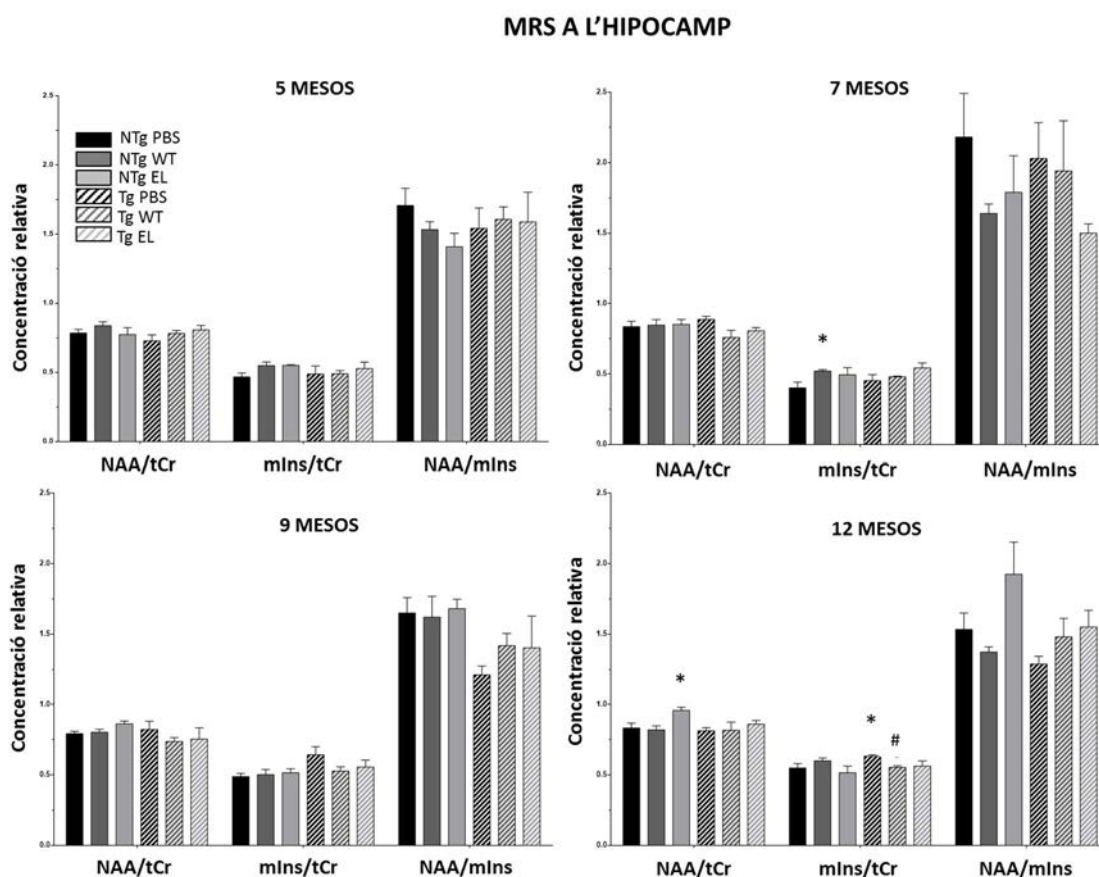
En referència als tractaments, aquests tendeixen a tenir uns valors més elevats (igualant els obtinguts pels individus no transgènics) en els punts dels 5 i 12 mesos, mentre que, als 7 i 9 mesos, es mostren més baixos. En qualsevol cas, el tractament amb EL tendeix a tenir els valors una mica per sobre del tractament amb WT.

Finalment, pel que fa a l'efecte dels tractaments sobre els grups no transgènics, el WT no varia massa respecte el valor del NTg PBS (excepte un petit augment als 5 mesos) però, l'EL, sí que tendeix a tenir valors més elevats en les edats més avançades (9 i 12 mesos), especialment en el cas dels 12 mesos, on la diferència respecte el grup NTg PBS és, estadísticament, significativa.

Com s'ha explicat a l'apartat 1.5.3.3 de la introducció, el NAA és un marcador de viabilitat neuronal, i està descrit que disminueix en individus amb AD (112). Si bé és cert que les diferències observades en el nostre cas són molt petites, aquestes tendrien a contradir el que s'ha observat fins ara, excepte en el cas dels 5 mesos, on sí que el nivell de NAA és una mica més baix en el grup transgènic i, amb els tractaments, es recupera.

#### 4.1.3.1.2 *Mio-Inositol (mIns)*

A diferència del NAA, el mio-Inositol es considera un marcador glial, i s'ha trobat augmentat en individus amb AD. La majoria dels estudis descriuen aquestes diferències en models murins, però n'hi ha alguns que no, de manera que existeix certa controvèrsia (149,150).



**Figura 55. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns a l'hipocamp.** Es mostren les diferents concentracions de N-acetil-aspartat (NAA)/creatina total (tCr), mio-inositol (mIns)/tCr i la relació entre ells (NAA/mIns) en els diferents punts temporals analitzats. Els valors s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

En el cas d'aquest treball, tal com mostra la figura 55, la diferència entre el grup NTg PBS i el Tg PBS va en augment a mesura que avança el temps, arribant a ser, significativament més elevat, el valor del Tg PBS als 12 mesos.

Pel que fa als tractaments, sembla que els valors dels grups transgènics tractats es mantenen força estables al llarg del temps de manera que, a edats primerenques (5-7 mesos), quan el valor del Tg PBS no és massa elevat, els tractaments tenen valors superiors a aquest grup. Ara bé, en edats més avançades (9-12 mesos), quan el valor de mIns del Tg PBS augmenta, els tractaments mantenen els valors baixos, essent estadísticament significativa la diferència, als 12 mesos, del

grup tractat amb WT, respecte el no tractat, apuntant a un efecte de reversió d'aquest paràmetre.

Finalment, en referència a l'efecte del tractament en els grups no transgènics, sembla que tendeixen a tenir valors més elevats que el NTg PBS, especialment en el cas del tractament amb WT que, fins i tot, dóna una diferència significativa als 7 mesos. Per tant, a jutjar pels resultats, semblaria que els tractaments actuen en sentit contrari respecte els grups transgènics. D'aquesta manera semblaria que, al transgènic, on la glia es troba activada, els tractaments ajuden a revertir-ne els nivells mentre que, en els no transgènics, on la glia no està activada, el fet d'aplicar els tractaments en produiria l'activació.

#### 4.1.3.1.3 NAA/mIns

El fet que a la malaltia de l'Alzheimer estigui descrita una disminució de NAA i un augment de mIns de forma tan generalitzada fa que, en molts casos, s'utilitzi la relació entre aquests dos metabòlits (NAA/mIns) per veure augmentades les diferències entre els múltiples grups d'estudi (124). En el cas d'aquest treball, s'ha cregut oportú analitzar també aquesta relació ja que, com s'ha vist un cop analitzats els resultats d'aquests dos metabòlits, les diferències observades no estan massa marcades.

Així doncs, analitzant la relació NAA/mIns (figura 55), s'observen més clarament les diferències existents entre genotips, essent el valor del Tg PBS més baix, especialment en edats avançades, que el del NTg PBS. A aquestes edats, també, és on més es veu l'efecte dels tractaments sobre els grups transgènics, mostrant valors més elevats que el Tg PBS, arribant a assolir el valor del NTg PBS en el cas del grup Tg EL als 12 mesos.

En referència a l'efecte dels tractaments sobre els grups no transgènics, en canvi, no es pot dir que els efectes siguin clars ja que, a edats primerenques tenen uns valors més baixos que el grup NTg PBS mentre que, a edats avançades es comporten de manera diferent l'un de l'altre: mentre que el tractament amb WT té un valor més baix que el NTg PBS als 12 mesos, el tractament amb EL, a aquesta mateixa edat, té un valor molt més elevat.

Resumint una mica el que hem anat observant, les diferències entre genotips no queden clares pel que fa al NAA, mentre que són evidents en el cas del mIns, confirmant l'augment d'aquest metabòlit en els ratolins transgènics. La relació entre els dos metabòlits (NAA/mIns), serveix per confirmar el patró observat en el cas del mIns més que l'obtingut pel NAA, amb



diferències entre genotips, sempre en el mateix sentit, encara que en alguns punts estiguin més marcades que en d'altres.

Parlant dels tractaments, el seu efecte sobre els animals transgènics sembla evident en edats avançades mentre que, en etapes inicials, els resultats són més confusos. També confús és el possible efecte dels tractaments en els animals no transgènics, el qual varia depenent del metabòlit i el punt temporal, estudiats.

#### 4.1.3.1.4 Taurina (Tau)

Tal com mostra la figura 56, als 5 i 9 mesos, les diferències entre genotips són clares, amb el valor de taurina del Tg PBS força més baix que el NTg PBS (significatiu als 5 mesos). Als 7 i als 12 mesos però, gairebé no hi ha diferències entre els dos grups.

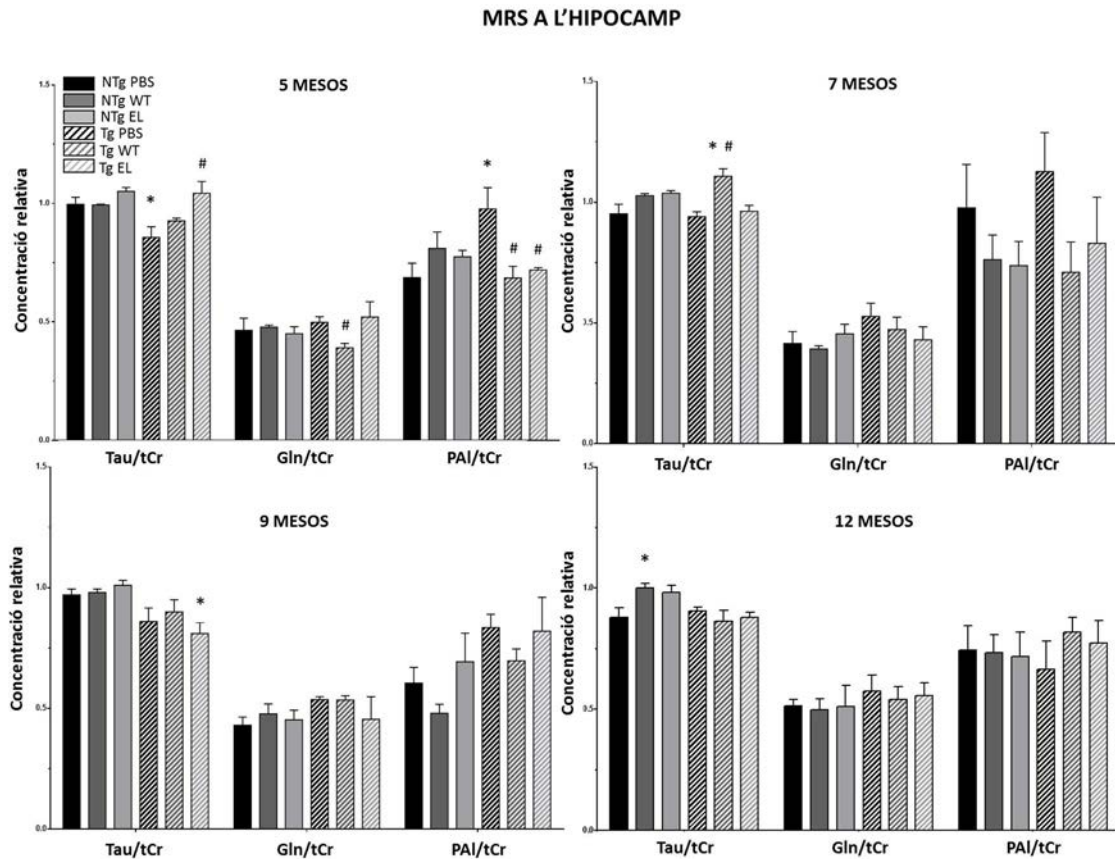
Pel que fa als tractaments, el grup Tg WT tendeix a tenir un valor superior que el Tg PBS en tots els temps, excepte als 12 mesos, arribant al seu màxim exponent als 7 mesos, on la diferència respecte el Tg PBS és significativa. El grup Tg EL, en canvi, només mostra una diferència clara respecte el Tg PBS als 5 mesos, on té un valor significativament més elevat.

Finalment, sobre els grups no transgènics, els tractaments tendeixen a tenir uns valors més elevats que el NTg PBS en tots els temps, essent significativa la diferència amb el NTg WT als 12 mesos.

Així doncs, aquest metabòlit sembla tenir una certa tendència a trobar-se disminuït en els transgènics i, els tractaments, depenent de l'edat i del grup experimental tendeixen, generalment, a produir valors més elevats.

Aquests resultats (encara que són poc contundents) semblen contradir la hipòtesi d'alguns articles on es postula que la taurina podria tenir, en ratolins, el paper d'osmoregulador que té el mInS en humans i que, per tant, la concentració d'aquest metabòlit augmentaria en l'AD (123). De fet, argumenten que la taurina, que es troba molt més concentrada en ratolins que en humans, podria ser un indicador millor que el mio-Inositol.

Els resultats observats aquí però, sí que mostren una tendència del mInS a estar elevat en els transgènics mentre que, en canvi, la taurina sembla tendir a trobar-s'hi en menor quantitat. Si es té en compte que els resultats d'uns i altres estudis, estan obtinguts en ratolins de models diferents, podria ser que el 3xTg-AD repliqués millor el perfil neuroquímic que s'observa en humans.



**Figura 56. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de la Tau, la Gln i la PAI, a l'hipocamp.** Es mostren les diferents concentracions de de taurina (Tau), glutamina (Gln) i fenilalanina (PAI) en els diferents punts temporals analitzats. Els valors s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### 4.1.3.1.5 Glutamina (Gln)

Pel que fa a la glutamina, a la figura 56 s'observa que hi ha una diferència entre genotips tenint, el grup Tg PBS, un valor més elevat en tots els temps analitzats.

Els grups de transgènics tractats, per la seva banda, tenen un valor més baix que el Tg PBS en 3 de les 4 edats analitzades, remarcant la diferència significativa que dona el Tg WT als 5 mesos. En referència a l'efecte dels tractaments sobre els no transgènics, aquest no està clar ja que, el grup NTg WT, té un valor lleugerament inferior als 7 i als 12 mesos, però superior als 5 i als 9 i, en canvi, el grup NTg EL, té un valor lleugerament superior als 7 i als 9 mesos.

La glutamina, que participa en el metabolisme del glutamat, servint de precursor i de magatzem, està situada en els astròcits i s'ha relacionat poc amb l'AD ja que, molts cops, es determina juntament amb el Glu. Ara bé, com es comenta en la introducció, s'ha descrit que un augment d'aquest metabòlit està relacionat amb fallades hepàtiques i amb la hiperfosforilació de tau (117,118).

### 4.1.3.1.6 Fenilalanina (PAI)

Tal com s'observa a la figura 56, la diferència entre genotips és clara i significativa als 5 mesos essent, el valor del grup Tg PBS, molt més elevat que el del NTg PBS. Aquesta diferència es va perdent de mica en mica fins que, als 12 mesos, els valors estan lleugerament invertits.

Pel que fa als tractaments, als 5 mesos les diferències dels transgènics tractats respecte el Tg PBS són clares i significatives, amb valors del Tg WT i Tg EL al nivell dels ratolins no transgènics. Com passava amb els genotips, l'efecte del tractament es va perdent fins a estar, als 12 mesos, per sobre del Tg PBS (a causa de la forta baixada d'aquest). Respecte els no transgènics, sembla que l'efecte és més confús tot i que, en general, els grups tractats tenen valors més petits que el NTg PBS (excepte als 5 mesos).

Aquest metabòlit no ha estat massa relacionat amb l'AD i, de fet, a causa de la baixa intensitat de la seva senyal, és un metabòlit que no es sol tenir en compte. La fenilalanina però, és un aminoàcid present al CNS, conegut per la malaltia fenilcetonúria en la qual, la falta d'enzims que degradin correctament la PAI, fa que aquesta segueixi la via del fenilpiruvat, un potent agent neurotòxic que afecta al cervell durant el creixement i el desenvolupament (151).

Un elevat contingut de PAI podria indicar, doncs, un problema en la degradació d'aquest enzim que podria derivar en efectes neurotòxics. Si fos així, es podria dir que els tractaments tenen un efecte de protecció respecte aquesta toxicitat.

PERFIL METABÒLIC DE L'HIPOCAMP (valors expressats en mitjana  $\pm$  desviació estàndard)

		NAA/tCr	mIns/tCr	NAA/mIns	Tau/tCr	GPC+PCh/tCr	Gln/tCr	
5	NTg	PBS	0.78 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.06	1.71 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.10
		scFv-h3D6-WT	0.84 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.05	1.53 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.02
		scFv-h3D6-EL	0.77 $\pm$ 0.09*	0.55 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.05
	Tg	PBS	0.73 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.30	0.86 $\pm$ 0.09*	0.21 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.05
		scFv-h3D6-WT	0.78 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.05	1.61 $\pm$ 0.18	0.93 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.04#
		scFv-h3D6-EL	0.81 $\pm$ 0.07	0.53 $\pm$ 0.09	1.59 $\pm$ 0.43	1.04 $\pm$ 0.10#	0.22 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.13
7	NTg	PBS	0.84 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.08	2.18 $\pm$ 0.62	0.95 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.10
		scFv-h3D6-WT	0.85 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.02*	1.64 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.02
		scFv-h3D6-EL	0.85 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.10	1.79 $\pm$ 0.52	1.04 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.08
	Tg	PBS	0.89 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.09	2.03 $\pm$ 0.51	0.94 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.11
		scFv-h3D6-WT	0.76 $\pm$ 0.10	0.48 $\pm$ 0.01	1.94 $\pm$ 0.71	1.11 $\pm$ 0.06* #	0.24 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.10
		scFv-h3D6-EL	0.81 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.07	1.50 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.11
9	NTg	PBS	0.79 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.22	0.97 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.07
		scFv-h3D6-WT	0.80 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.07	1.62 $\pm$ 0.30	0.98 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.08
		scFv-h3D6-EL	0.86 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.06	1.68 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.08
	Tg	PBS	0.82 $\pm$ 0.12	0.64 $\pm$ 0.10	1.21 $\pm$ 0.11	0.86 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.02
		scFv-h3D6-WT	0.74 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.06	1.42 $\pm$ 0.17	0.90 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.04
		scFv-h3D6-EL	0.75 $\pm$ 0.16	0.55 $\pm$ 0.10	1.40 $\pm$ 0.45	0.81 $\pm$ 0.09*	0.22 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.19
12	NTg	PBS	0.83 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.23	0.88 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.05
		scFv-h3D6-WT	0.82 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.09
		scFv-h3D6-EL	0.96 $\pm$ 0.04*	0.51 $\pm$ 0.10	1.93 $\pm$ 0.46	0.98 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.17
	Tg	PBS	0.81 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.02*	1.29 $\pm$ 0.11	0.90 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.13
		scFv-h3D6-WT	0.82 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.02#	1.48 $\pm$ 0.26	0.86 $\pm$ 0.10	0.23 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.11
		scFv-h3D6-EL	0.86 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.08	1.55 $\pm$ 0.24	0.88 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.10
5	NTg	PBS	1.04 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.25	1.87 $\pm$ 0.38	1.04 $\pm$ 0.36
		scFv-h3D6-WT	1.02 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.14	1.04 $\pm$ 0.23	1.62 $\pm$ 0.29	1.07 $\pm$ 0.40
		scFv-h3D6-EL	0.97 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.05	1.09 $\pm$ 0.34	1.48 $\pm$ 0.45	0.86 $\pm$ 0.18
	Tg	PBS	1.02 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.18*	0.75 $\pm$ 0.20	2.73 $\pm$ 0.90	1.43 $\pm$ 0.45
		scFv-h3D6-WT	0.99 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.10#	0.90 $\pm$ 0.25	2.78 $\pm$ 0.78	1.43 $\pm$ 0.31
		scFv-h3D6-EL	1.13 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.02#	1.05 $\pm$ 0.07#	2.12 $\pm$ 0.89	1.18 $\pm$ 0.10
7	NTg	PBS	0.99 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.31	0.88 $\pm$ 0.11	1.87 $\pm$ 0.38	1.07 $\pm$ 0.22
		scFv-h3D6-WT	1.02 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.20	1.03 $\pm$ 0.23	1.67 $\pm$ 0.92	1.19 $\pm$ 0.14
		scFv-h3D6-EL	1.10 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.20	0.93 $\pm$ 0.24	1.89 $\pm$ 1.09	0.94 $\pm$ 0.24
	Tg	PBS	1.23 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.28	0.93 $\pm$ 0.14	2.07 $\pm$ 0.50	0.97 $\pm$ 0.23
		scFv-h3D6-WT	1.09 $\pm$ 0.09	0.27 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.38	2.13 $\pm$ 0.35	1.08 $\pm$ 0.34
		scFv-h3D6-EL	1.06 $\pm$ 0.15	0.23 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.38	0.88 $\pm$ 0.29	2.57 $\pm$ 0.42	1.13 $\pm$ 0.28
9	NTg	PBS	0.95 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.13	0.92 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.41	0.78 $\pm$ 0.18
		scFv-h3D6-WT	1.07 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.07	1.09 $\pm$ 0.13	1.29 $\pm$ 0.36	0.86 $\pm$ 0.28
		scFv-h3D6-EL	0.99 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.20	1.03 $\pm$ 0.17	1.71 $\pm$ 0.83	0.97 $\pm$ 0.30
	Tg	PBS	0.98 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.33	1.54 $\pm$ 1.11	0.80 $\pm$ 0.21
		scFv-h3D6-WT	1.02 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.25	1.42 $\pm$ 0.53	0.83 $\pm$ 0.39
		scFv-h3D6-EL	0.93 $\pm$ 0.18	0.20 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.20	0.76 $\pm$ 0.23	3.11 $\pm$ 1.24	1.51 $\pm$ 0.34
12	NTg	PBS	1.11 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.20	1.18 $\pm$ 0.11	1.55 $\pm$ 0.17	1.22 $\pm$ 0.35
		scFv-h3D6-WT	1.09 $\pm$ 0.10	0.23 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.17	1.42 $\pm$ 0.42	1.06 $\pm$ 0.40
		scFv-h3D6-EL	1.16 $\pm$ 0.18	0.23 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.29	1.93 $\pm$ 0.52	1.11 $\pm$ 0.21
	Tg	PBS	1.05 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.23	1.09 $\pm$ 0.09	2.22 $\pm$ 0.37*	1.31 $\pm$ 0.13
		scFv-h3D6-WT	1.05 $\pm$ 0.18	0.24 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.21	1.73 $\pm$ 0.27	1.19 $\pm$ 0.43
		scFv-h3D6-EL	1.14 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.19	1.10 $\pm$ 0.15	1.93 $\pm$ 0.14*	1.28 $\pm$ 0.29

**Taula 2. Quantificació dels nivells de diferents metabòlits a l'hipocamp, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).** La taula mostra, per a cada punt temporal analitzat, els nivells dels diferents metabòlits que han passat els criteris de selecció establerts. Els valors, que es troben normalitzats per la creatina total (tCr), s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM.

\*p<0.05 respecte al NTg PBS; #p<0.05 respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### 4.1.3.1.7 *Altres metabòlits*

En aquest apartat es comenten, succintament, alguns dels trets observats de la resta de metabòlits:

- a) Glutamat (Glu). Igual que passa amb el NAA, una disminució del glutamat s'ha associat a cervells amb l'AD. En aquest estudi, no hi ha diferències clares i/o constants ni entre genotips, ni entre tractaments. En tot cas, destacar que en les edats en què el valor de Glu del Tg PBS és baix (més petit que el del NTg PBS, als 5 i 12 mesos), el Tg EL mostra uns valors molt per sobre, fins i tot, del NTg PBS.
- b) En els derivats de la colina (GPC+PCh), sobre els quals alguns estudis deien que estaven incrementats en AD ja que marcaven una disrupció de la membrana cel·lular, no s'observen diferències destacables.

#### 4.1.3.2 Perfil metabòlic del còrtex

De la mateixa manera que s'ha explicat en el cas de l'hipocamp, la taula 3, situada al final d'aquest apartat, mostra els valors de cada grup experimental (representats com a mitjana  $\pm$  SD) a cada un dels temps analitzats, per a tots els metabòlits que han passat els criteris de selecció descrits a l'apartat 3.3.4.2. Com es pot observar, de manera general no hi ha massa diferències estadísticament significatives respecte al NTg PBS (marcades amb un \*). Aquest és un fet comprensible si tenim en compte que la N inicial de cada grup és de 4 animals, però que, segons les SD dels diferents metabòlits en cada espectre analitzat, pot ser que, per alguns metabòlits, en algun grup concret, la N disminueixi, amb la qual cosa és molt complicat fer un bon anàlisi estadístic.

Posteriorment, es representen amb més detalls els valors obtinguts per el NAA, el mIns i la relació entre els dos (figura 57) i, un cop comentats aquests resultats, s'analitzen la Tau, la Gln i la PAI (figura 58), que s'han mirat també en la zona de l'hipocamp. Finalment es destaca el més rellevant de la resta de metabòlits.

#### 4.1.3.2.1 *N-acetil aspartat (NAA)*

Pel que fa a les diferències entre NTg PBS i Tg PBS, a la figura 57 s'observa com, als 5 mesos, el Tg PBS està un pèl més elevat però, a mesura que avança el temps, la diferència entre els dos s'inverteix (menys NAA al Tg PBS) i es fa cada cop més evident, sense ser, en cap cas, estadísticament significativa.

Així doncs, excepte als 5 mesos, els resultats encaixarien amb els resultats descrits a la bibliografia, on la disminució de NAA en individus amb AD és un fet bastant acceptat. També és veritat que les diferències no estan massa marcades i que, potser, s'esperarien unes diferències més evidents, sobretot als 12 mesos.

En referència als tractaments, no hi ha un efecte continu al llarg del temps ni pel WT ni per l'EL. En alguns punts temporals els valors dels grups transgènics tractats són més alts que el del no tractat (7 i 12 mesos pel WT, i 5, 9 i 12 per l'EL), essent el tractament amb EL, als 9 mesos, el que provoca una diferència més gran amb el grup Tg PBS, arribant als nivells del NTg PBS.

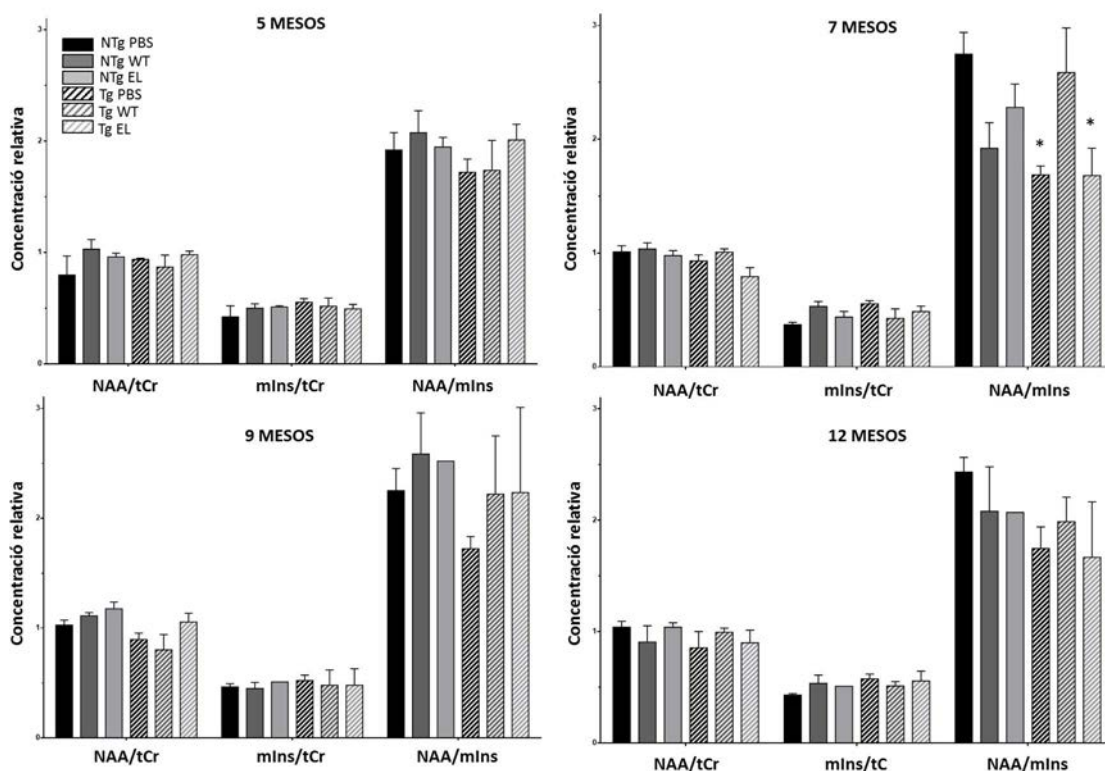
Finalment, els tractaments tampoc tenen un efecte clar en els grups no tractats, si bé és cert que, en aquest cas, els valors dels grups tractats són més elevats que els del grup NTg PBS en l'àmplia majoria de punts temporals.

#### 4.1.3.2.2 *Mio-Inositol (mIns)*

Tal com s'observa a la figura 57, el grup Tg PBS té un valor més elevat, a tots els punts temporals, que el NTg PBS, tot i que, a causa de la mala resolució del pic de mIns en diversos espectres, s'han hagut de descartar molts valors que han impedit realitzar un anàlisi estadístic de garanties

Pel que fa als tractaments, a tots els punts temporals, tan el WT com l'EL, tenen tendència a tenir uns valors més baixos que el Tg PBS i, per tant, més a prop dels grups no transgènics. La diferència més marcada la produeix el WT als 7 mesos. Tal com passava a l'hipocamp, sembla que en els grups no transgènics ambdós tractaments tenen un efecte contrari, obtenint uns valors lleugerament més elevats que el grup NTg PBS.

## MRS AL CÒRTEX



**Figura 57. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns al còrtex.** Es mostren les diferents concentracions de N-acetil-aspartat (NAA)/creatina total (tCr), mioinositol (mIns)/tCr i la relació entre ells (NAA/mIns) en els diferents punts temporals analitzats. Els valors s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### 4.1.3.2.3 NAA/mIns

Finalment, pel que fa a la relació entre els dos metabòlits (NAA/mIns), la qual s'utilitza per maximitzar les possibles diferències existents, a la figura 57 s'observen com, les diferències entre el grup NTg PBS i el Tg PBS, són bastant més marcades, arribant a ser estadísticament significatives en el cas dels 7 mesos. Cal tenir en compte però, com ja s'ha dit abans, que s'han hagut de descartar diversos valors perquè l'ajust realitzat no era prou fiable, amb la qual cosa s'ha perdut qualitat estadística.

En referència als tractaments, s'observa com el Tg WT presenta uns valors més elevats que el Tg PBS en tots els casos, especialment als 7 i 9 mesos, on els valors obtinguts s'apropen molt als del grup NTg PBS. Pel que fa a l'EL, el seu efecte no és constant en el temps i, mentre que als

5 i 9 mesos mostra uns valors molt més elevats que el Tg PBS (similars als del NTg PBS), als 7 i als 12, pràcticament no s'observen diferències.

Finalment, pel que fa a l'efecte dels tractaments sobre els grups no transgènics, es pot dir que no queda clar, ja que als 5 i 9 mesos aquests mostren uns valors més elevats que el NTg PBS però, als 7 i 12, tenen uns valors molt més petits.

Resumint, la representació de la relació entre els metabòlits NAA i mIns, ens permet maximitzar les diferències que, per separat, només s'observen lleugerament (fet que s'accentua en el cas del mIns per l'eliminació de diversos valors a causa de la poca fiabilitat dels espectres obtinguts per aquest pic).

De totes maneres, les diferències entre genotips són clares i estan en consonància amb la bibliografia descrita fins ara, excepte pel cas del NAA als 5 mesos, on el Tg PBS té un valor més elevat que el NTg PBS. El fet que en aquesta etapa primerenca no s'observin les diferències esperades pel NAA, però sí pel mIns, pot indicar que hi ha una relació de temporalitat entre els dos metabòlits i que, per tant, l'alteració de la glia es produeix abans que els dèficits neuronals (152).

En els grups transgènics, els tractaments tenen un efecte més clar sobre el mIns que sobre el NAA i, en representar la relació entre els dos valors, queda clar que el WT reverteix, en part, els valors del grup transgènic sense tractar. Per la seva banda, l'EL, només ho aconsegueix en 2 dels 4 punts temporals analitzats. En els no transgènics, en canvi, no queda clar quin efecte té cap dels dos tractaments.

#### 4.1.3.2.4 *Taurina (Tau)*

A diferència del que passava a l'hipocamp, al còrtex no hi ha una diferència clara entre genotips. Tal com mostra la figura 58, als 5 mesos, el grup Tg PBS té un valor més elevat que el NTg PBS, als 9 mesos és més baix i, als 7 i als 12 mesos, pràcticament igual, amb la qual cosa és difícil veure-hi cap tendència.

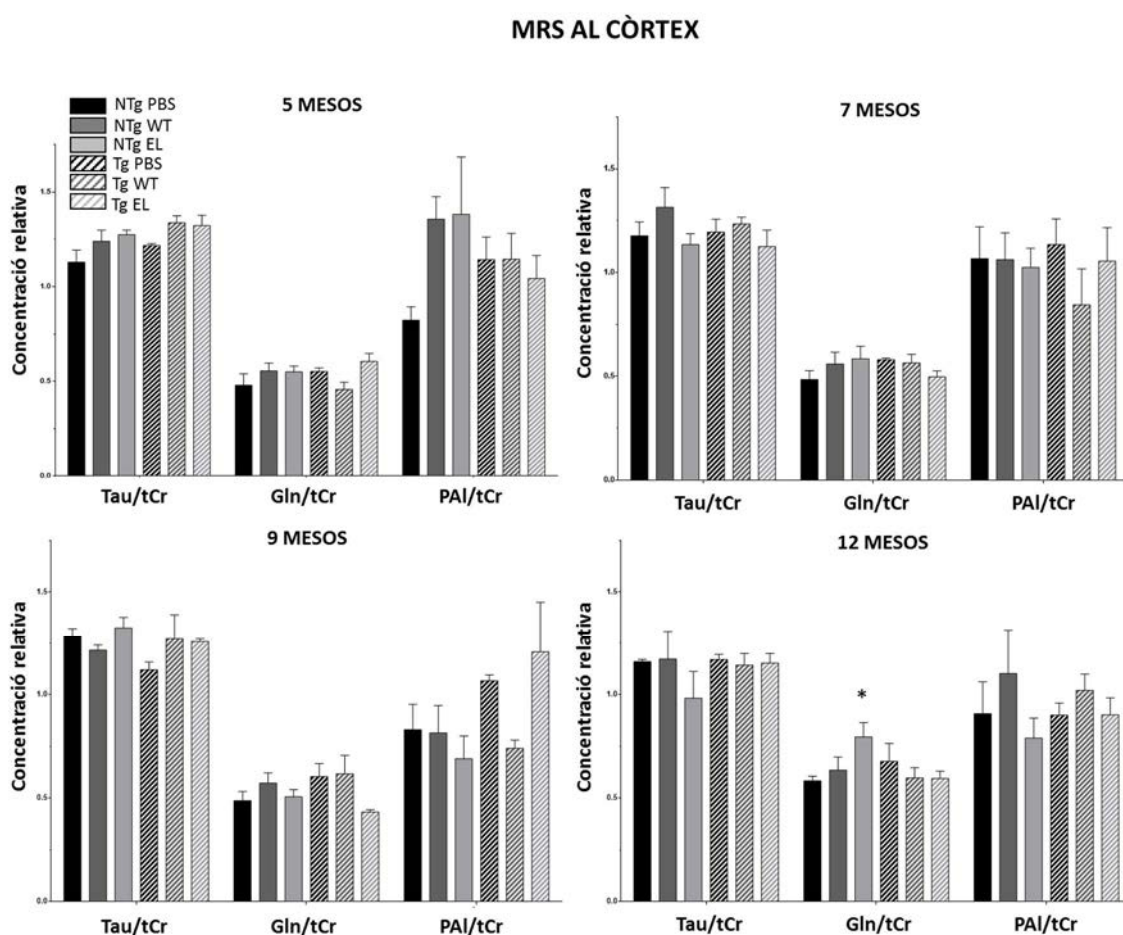
Pel que fa als tractaments, tampoc està massa clar l'efecte que tenen ja que, el Tg WT té valors més elevats en tots les edats, excepte als 12 mesos, que disminueix i, el Tg EL, està elevat als 5 i als 9 i disminuït als 7 i als 12. Finalment, respecte als no transgènics, el tractament amb WT té valors més elevats que el NTg PBS als 5 i 7 mesos i, el tractament amb EL als 5 i als 9.



#### 4.1.3.2.5 Glutamina (Gln)

En el cas de la glutamina sí que hi ha una diferència entre genotips que es repeteix en tots els punt temporals analitzats, tenint el grup Tg PBS, uns valors més elevats que el NTg PBS (veure figura 58).

Pel que fa als tractaments, el Tg WT té uns valors més baixos que el Tg PBS als 5 i als 12 mesos, arribant als valors del NTg PBS, mentre que, als 7 i 9 mesos, no s'observa cap efecte. Per la seva banda, el Tg EL té un valor més elevat als 5 mesos però, a partir de llavors, la resta de valors són més baixos (nivells del NTg PBS).



**Figura 58. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de la Tau, la Gln i la PAI, al còrtex.** Es mostren les diferents concentracions de de taurina (Tau), glutamina (Gln) i fenilalanina (PAI) en els diferents punts temporals analitzats. Els valors s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Finalment, pel que fa als no transgènics, els tractaments fan l'efecte contrari i mostren valors més elevats a totes les edats analitzades, essent estadísticament significativa, la diferència del grup Tg EL respecte el Tg PBS, als 12 mesos. Aquest efecte contrari ja l'hem observat en el cas del mlns, tan al hipocamp (4.1.1.1.2) com al còrtex (4.1.1.2.2).

Així doncs, es repeteixen les diferències observades a l'hipocamp pel que fa als genotips mentre que, pels tractaments, no es repeteixen del tot, però tenen una tendència similar ja que mostren uns valors inferiors al Tg PBS en la majoria dels temps analitzats.

#### 4.1.3.2.6 Fenilalanina (PAI)

Pel que fa a la fenilalanina, aquesta es troba augmentada en el grup Tg PBS respecte el NTg PBS en totes les edats excepte als 12 mesos, com ja passava a l'hipocamp (veure figura 58).

Pel que fa als tractaments, el Tg WT té un valor similar al Tg PBS als 5 mesos, bastant més baix als 7 i als 9 (més, fins i tot, que els grups d'animals no transgènics) i, en canvi, més elevat als 12. El tractament amb EL també té valors més baixos que el Tg PBS a edats primerenques (5 i 7 mesos) però, en canvi, als 9 és més elevat i, als 12, pràcticament igual. Per tant, s'observa un efecte positiu dels tractaments en etapes primerenques.

En referència als animals no tractats, el NTg WT presenta valors més elevats als 5 i 12 mesos i similars a la resta d'edats mentre que, el NTg EL, és més baix a tots els punts temporals, excepte als 5 mesos, edat on és molt més gran que tota la resta de grups.

#### 4.1.3.2.7 Altres metabòlits

En aquest apartat es comenten alguns dels trets observats de la resta de metabòlits:

- a) Per les macromolècules que ressonen a 0.9 ppm, tot i que les diferències entre genotips no es mantenen en el temps (valor més baix del Tg PBS als 5 i 12 mesos i més alt als 7 i 9, en comparació amb el NTg PBS), els tractaments tendeixen, de forma general, a produir uns valors més baixos que el Tg PBS, especialment l'EL, que als 12 mesos, és significativament més petit. La heterogenicitat en la composició d'aquesta ressonància fa que les seves variacions siguin de difícil interpretació.

b) Tan en el glutamat (Glu), com en els derivats de la colina (GPC+PCh), no s'observen diferències massa clares, com ja passava a l'hipocamp.

Així doncs, de manera general podem dir que tan a l'hipocamp com al còrtex, el mIns i la Gln estan més elevades en el grup Tg PBS que al control i que els tractaments són capaços de revertir, parcialment, aquestes diferències a totes les edats, en el cas de la Gln i, a edats avançades, en el cas del mIns.

L'efecte de l'edat també es nota en la mesura de la PAI, que als 5 mesos està significativament més elevada al Tg PBS respecte al NTg PBS però, a mesura que avança el temps, la diferència es va perdent fins que, als 12 mesos, el valor de PAI és més baix al Tg PBS que al NTg PBS. A edats primerenques, els tractaments són capaços d'acostar els seus valors als dels grups control.

La relació NAA/mIns té un valor més baix al 3xTg-AD sense tractar, especialment en edats avançades. Tot i que el NAA no mostra un patró de variació constant i, de fet, no sembla estar en consonància amb la bibliografia, la relació entre aquests dos metabòlits ens permet observar diferències entre genotips i, a més, observar com els tractaments són capaços de revertir parcialment aquets valors, amb excepció dels 5 mesos a l'hipocamp i els 7 i 9 mesos al còrtex.

PERFIL METABÒLIC DEL CÒRTEX (valors expressats en mitjana  $\pm$  desviació estàndard)

		NAA/tCr	mIns/tCr	NAA/mIns	Tau/tCr	GPC+PCh/tCr	Gln/tCr
5	PBS	0.80 $\pm$ 0.34	0.42 $\pm$ 0.20	1.92 $\pm$ 0.32	1.13 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.12
	NTg scFv-h3D6-WT	1.03 $\pm$ 0.17	0.50 $\pm$ 0.08	2.08 $\pm$ 0.40	1.24 $\pm$ 0.12	0.20 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.08
	scFv-h3D6-EL	0.96 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.02	1.95 $\pm$ 0.15	1.27 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.06
	PBS	0.94 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.07	1.72 $\pm$ 0.23	1.22 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.04
	Tg scFv-h3D6-WT	0.87 $\pm$ 0.21	0.52 $\pm$ 0.15	1.74 $\pm$ 0.54	1.34 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.08
	scFv-h3D6-EL	0.98 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.08	2.01 $\pm$ 0.28	1.32 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.08
7	PBS	1.01 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.04	2.75 $\pm$ 0.38	1.18 $\pm$ 0.13	0.21 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.08
	NTg scFv-h3D6-WT	1.03 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.07	1.92 $\pm$ 0.39	1.31 $\pm$ 0.19	0.22 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.11
	scFv-h3D6-EL	0.98 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.08	2.28 $\pm$ 0.35	1.13 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.12
	PBS	0.93 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.05*	1.69 $\pm$ 0.15*	1.19 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.02
	Tg scFv-h3D6-WT	1.01 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.17	2.59 $\pm$ 0.79	1.24 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.08
	scFv-h3D6-EL	0.79 $\pm$ 0.16	0.49 $\pm$ 0.10	1.68 $\pm$ 0.49*	1.12 $\pm$ 0.16	0.20 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.06
9	PBS	1.03 $\pm$ 0.09	0.46 $\pm$ 0.06	2.25 $\pm$ 0.40	1.28 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.09
	NTg scFv-h3D6-WT	1.11 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.11	2.59 $\pm$ 0.75	1.21 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.10
	scFv-h3D6-EL	1.18 $\pm$ 0.10	0.51 -	2.52 -	1.33 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.06
	PBS	0.89 $\pm$ 0.10	0.52 $\pm$ 0.09	1.72 $\pm$ 0.19	1.12 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.11
	Tg scFv-h3D6-WT	0.80 $\pm$ 0.28	0.48 $\pm$ 0.20	2.22 $\pm$ 0.75	1.27 $\pm$ 0.24	0.22 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.18
	scFv-h3D6-EL	1.06 $\pm$ 0.16	0.48 $\pm$ 0.21	2.24 $\pm$ 1.09	1.26 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.02
12	PBS	1.04 $\pm$ 0.11	0.43 $\pm$ 0.03	2.43 $\pm$ 0.27	1.16 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.00	0.58 $\pm$ 0.05
	NTg scFv-h3D6-WT	0.91 $\pm$ 0.29	0.53 $\pm$ 0.11	2.08 $\pm$ 0.56	1.17 $\pm$ 0.27	0.25 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.13
	scFv-h3D6-EL	1.04 $\pm$ 0.07	0.51 -	2.07 -	0.98 $\pm$ 0.26	0.25 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.14*
	PBS	0.85 $\pm$ 0.29	0.58 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.34	1.17 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.17
	Tg scFv-h3D6-WT	0.99 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.08	1.99 $\pm$ 0.44	1.14 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.02	0.60 $\pm$ 0.10
	scFv-h3D6-EL	0.90 $\pm$ 0.22	0.56 $\pm$ 0.16	1.67 $\pm$ 0.86	1.15 $\pm$ 0.09	0.22 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.07
		Glu/tCr	GSH/tCr	PAI/tCr	MM09/tCr	MM14+Lip13a+Lip13/tCr	MM20+Lip20/tCr
5	PBS	1.30 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.14	1.51 $\pm$ 0.45	9.38 $\pm$ 10.76	2.96 $\pm$ 1.95
	NTg scFv-h3D6-WT	1.31 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.04	1.36 $\pm$ 0.21	0.72 $\pm$ 0.10	1.87 $\pm$ 1.30	1.38 $\pm$ 0.45
	scFv-h3D6-EL	1.34 $\pm$ 0.27	0.30 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.60	0.83 $\pm$ 0.48	8.59 $\pm$ 6.47	1.53 $\pm$ 1.22
	PBS	1.25 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.00	1.14 $\pm$ 0.21	1.31 $\pm$ 1.04	7.25 $\pm$ 6.09	1.77 $\pm$ 0.24
	Tg scFv-h3D6-WT	1.28 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.04	1.14 $\pm$ 0.27	1.39 $\pm$ 0.95	12.34 $\pm$ 14.14	1.49 $\pm$ 0.33
	scFv-h3D6-EL	1.33 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.06	1.04 $\pm$ 0.21	0.95 $\pm$ 0.27	4.83 $\pm$ 3.38	1.44 $\pm$ 0.26
7	PBS	1.21 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.31	1.03 $\pm$ 0.54	4.48 $\pm$ 0.70	1.99 $\pm$ 0.50
	NTg scFv-h3D6-WT	1.35 $\pm$ 0.23	0.27 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.26	1.33 $\pm$ 0.43	2.91 $\pm$ 2.56	1.82 $\pm$ 0.69*
	scFv-h3D6-EL	1.22 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.19	1.28 $\pm$ 0.60	2.14 $\pm$ 1.22	1.45 $\pm$ 0.51
	PBS	1.27 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.05	1.14 $\pm$ 0.25	1.21 $\pm$ 0.35	3.02 $\pm$ 2.32	1.30 $\pm$ 0.33
	Tg scFv-h3D6-WT	1.35 $\pm$ 0.15	0.30 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.35	1.09 $\pm$ 0.40	1.89 $\pm$ 0.69	1.27 $\pm$ 0.53
	scFv-h3D6-EL	1.12 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.32	0.92 $\pm$ 0.48	3.14 $\pm$ 0.82	1.61 $\pm$ 1.23
9	PBS	1.23 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.24	0.90 $\pm$ 0.20	1.44 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.34
	NTg scFv-h3D6-WT	1.33 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.06	0.81 $\pm$ 0.27	1.20 $\pm$ 0.41	2.97 $\pm$ 2.35	1.53 $\pm$ 0.18
	scFv-h3D6-EL	1.39 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.16	1.16 $\pm$ 0.33	2.59 $\pm$ 1.12	1.37 $\pm$ 0.21
	PBS	1.20 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.05	1.18 $\pm$ 0.16	1.74 $\pm$ 0.47	1.82 $\pm$ 0.32
	Tg scFv-h3D6-WT	1.25 $\pm$ 0.22	0.31 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.20	4.35 $\pm$ 2.68	1.13 $\pm$ 0.64
	scFv-h3D6-EL	1.16 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.49	1.08 $\pm$ 0.73	5.30 $\pm$ 1.96	1.70 $\pm$ 0.31
12	PBS	1.24 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.31	1.51 $\pm$ 0.22	1.89 $\pm$ 0.69	1.81 $\pm$ 0.18
	NTg scFv-h3D6-WT	1.46 $\pm$ 0.14	0.31 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.42	1.30 $\pm$ 0.43	1.87 $\pm$ 0.29	2.00 $\pm$ 0.33
	scFv-h3D6-EL	1.41 $\pm$ 0.16	0.36 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.19	2.32 $\pm$ 0.53	1.42 $\pm$ 0.31
	PBS	1.25 $\pm$ 0.11	0.28 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.10	1.27 $\pm$ 0.21	2.11 $\pm$ 0.75	1.76 $\pm$ 0.18
	Tg scFv-h3D6-WT	1.21 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.16	1.17 $\pm$ 0.35	2.10 $\pm$ 0.49	1.96 $\pm$ 0.43
	scFv-h3D6-EL	1.23 $\pm$ 0.11	0.30 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.17	0.92 $\pm$ 0.29*	2.76 $\pm$ 0.77	1.56 $\pm$ 0.53

**Taula 3. Quantificació dels nivells de diferents metabòlits al còrtes, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).** La taula mostra, per a cada punt temporal analitzat, els nivells dels diferents metabòlits que han passat els criteris de selecció establerts. Els valors, que es troben normalitzats per la creatina total (tCr), s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM.

\*p<0.05 respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### **4.1.4 Histologia**

Les anàlisis histològiques han estat, tradicionalment, l'única forma de confirmar el diagnòstic de l'Alzheimer, un cop el pacient havia mort, a partir de l'observació de les plaques amiloides i els cabdells neurofibril·lars. Des de l'existència de nous biomarcadors i mètodes de diagnòstic que permeten determinar si una persona pateix AD molt abans de la seva mort (veure apartat 1.5 de la introducció) però, les anàlisis histològiques tenen, més aviat, un paper de confirmació del diagnòstic, a més de seguir essent utilitzades, àmpliament, en estudis preclínic.

En aquest treball doncs, les anàlisis s'utilitzen per estudiar, més acuradament, l'afectació de la patologia amiloide tan a l'hipocamp com al còrtex i l'efecte que els tractaments tenen sobre aquesta. Al mateix temps, aquests estudis ens serveixen per contrastar els resultats obtinguts *in vivo* mitjançant MRI i MRS, i poder determinar, així, si aquests paràmetres són uns bons biomarcadors de l'AD.

A continuació es mostren, d'una banda, els resultats obtinguts per immunofluorescència que ens permeten quantificar tan el nombre neurones que contenen el pèptid A $\beta$ , com el grau d'afectació que aquestes tenen, a partir de la intensitat del marcatge.

D'altra banda, es mostren els resultats obtinguts per immunohistoquímica que ens permeten quantificar el nombre de plaques amiloides existents en els cervells del diferents grups d'estudi.

##### **4.1.4.1 Anàlisi del marcatge d'A $\beta$**

L'acumulació intraneuronal d'A $\beta$  és un tema clau en el mecanisme patològic de l'AD, però l'especificitat del mAb-6E10, àmpliament utilitzat per detectar el pèptid, encara roman controvertida (153). Tot i que el mAb-6E10 està dirigit contra el N-terminal del pèptid A $\beta$  (amb l'epítip entre els residus 3 i 10) també detecta l'APP i el primer producte del processament amiloidogènic amb la  $\beta$ -secretasa, el  $\beta$ CTF (C99), que tenen el mateix N-terminal que el pèptid A $\beta$  (veure apartat 5.5 de la discussió) (154).

Encara que les dades d'aquest treball indiquen que la senyal obtinguda amb el mAb-6E10 correspon majoritàriament a la detecció del pèptid A $\beta$ , ja que aquest senyal disminueix quan es tracta el ratolí 3xTg-AD amb els scFv-h3D6-WT i EL, derivats de bapineuzumab i, per tant,

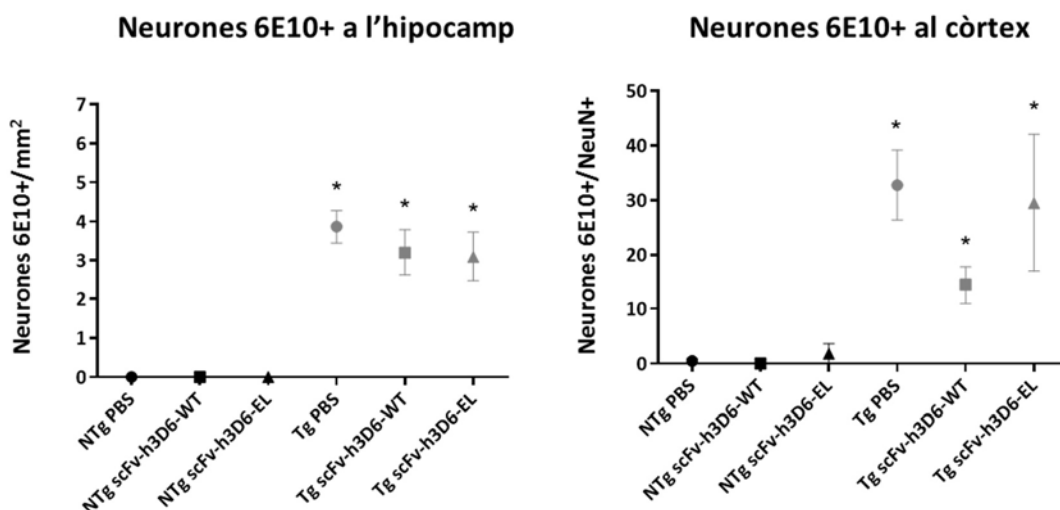
específics del pèptid A $\beta$ , s'ha optat per anomenar aquest marcatge com a 6E10+, en comptes d'A $\beta$ +, per no donar lloc a interpretacions errònies.

#### 4.1.4.1.1 Recompte de neurones mAb-6E10 positives (6E10+)

Tal com s'observa a la figura 59, la diferència en el nombre de neurones marcades amb 6E10 entre els grups transgènics i els no transgènics és evident i significativa tan a l'hipocamp com al còrtex.

Pel que fa als tractaments, s'observa que tan el grup Tg WT com el Tg EL tendeixen a tenir uns valors més baixos que el Tg PBS, tot i que aquestes diferències són petites, a excepció del Tg WT al còrtex, on el valor és molt més baix (aproximadament la meitat del Tg PBS).

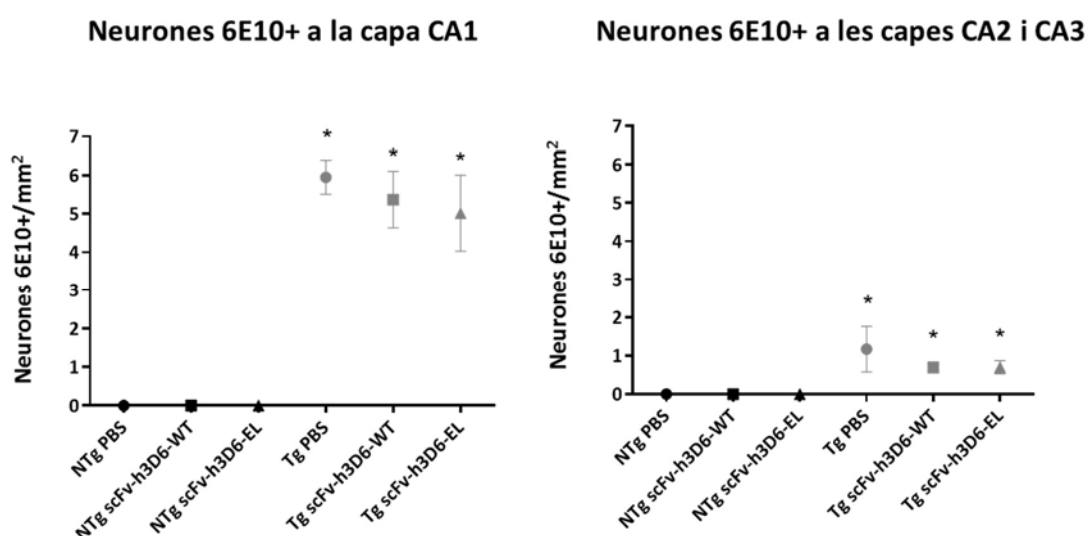
El fet que el valor del grup Tg WT sigui molt més baix, respecte el Tg PBS, al còrtex que a l'hipocamp, ens fa pensar en un major efecte del tractament en aquesta zona, la qual cosa tindria lògica si el fàrmac seguís el patró regional basat en les anàlisis de volumetria i de T<sub>2</sub>, on s'apuntava que els tractaments, especialment el WT, tenia efectes al còrtex primer i, a l'hipocamp, després.



**Figura 59. Recompte del número de neurones 6E10+ a l'hipocamp i al còrtex.** La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues regions analitzades. Tal com s'indica a l'eix d'ordenades, les unitats en què es donen els resultats són diferents a les dues regions ja que, els mètodes utilitzats per a fer el recompte, també són diferents. El número de neurones 6E10+ està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

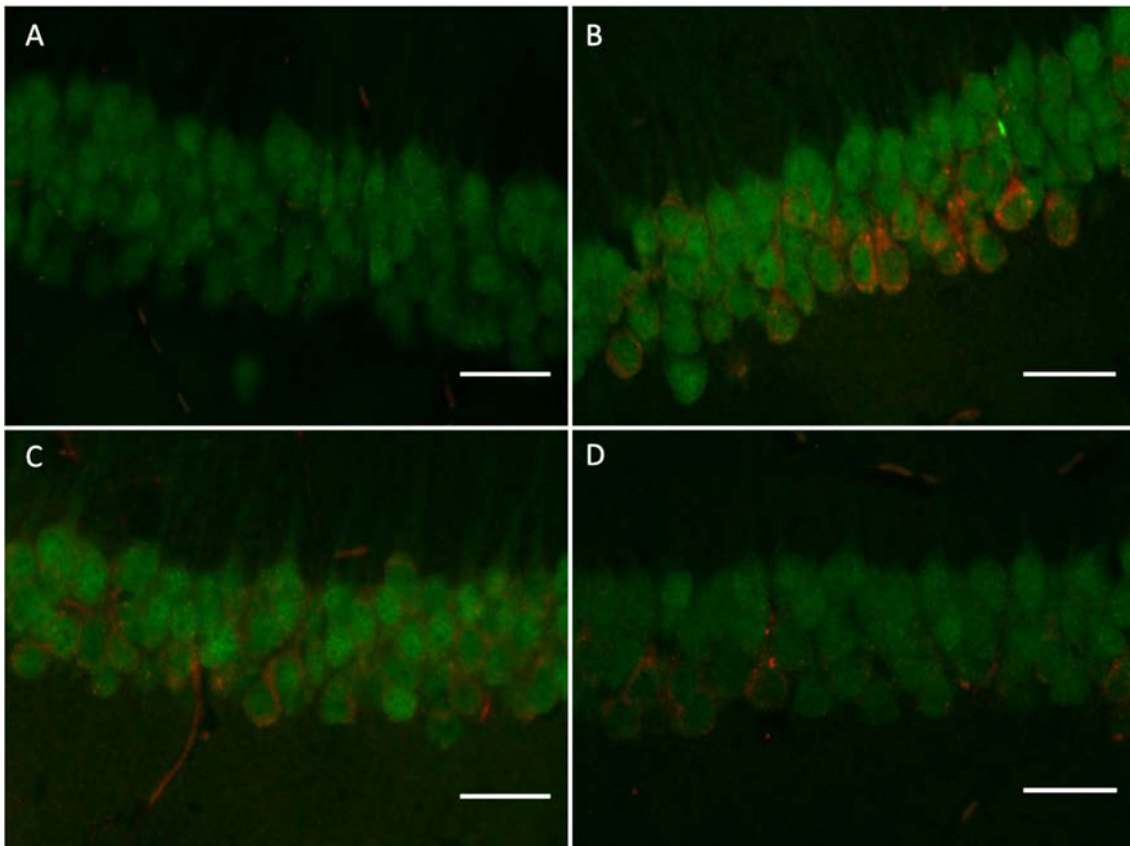
Cal remarcar que el mètode utilitzat per a fer el recompte no ha estat el mateix en les dues regions ja que, com s'explica en l'apartat 3.3.6.1.3 de materials i mètodes, els nuclis neuronals de l'hipocamp estan molt junts, amb la qual cosa és molt complicat distingir unes neurones de les altres i poder fer el recompte del nombre de neurones tan NeuN+ com 6E10+.

Per aprofundir en l'anàlisi de l'hipocamp i veure si les diferències observades es magnifiquen en alguna zona determinada, s'han analitzat per separat les regions CA1 i CA2-CA3, ja que tenen funcions i connexions diferents. De fet, s'ha descrit que la CA1 és l'àrea més afectada en el cas de l'AD i és la que més s'utilitza per a realitzar estudis d'electrofisiologia i mesurar la LTP (155).



**Figura 60. Recompte del número de neurones 6E10+ a les capes CA1 i CA2/CA3 de l'hipocamp.** La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues regions analitzades. El número de neurones 6E10+ està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana ± SEM. \*p<0.05 respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Com es pot observar a la figura 60, les diferències entre genotips són molt més marcades a la CA1 mentre que, les diferències amb els tractaments, no varien gaire d'una regió a l'altra. Així doncs, les diferències a l'hipocamp, venen donades, en gran mesura, per les diferències en aquesta capa, tal com s'esperava. La figura 61 mostra la doble immunofluorescència (anti-NeuN i 6E10) a la capa CA1, comparant el grup NTg PBS (A) amb els 3 grups de ratolins transgènics: PBS (B), WT (C) i EL (D).



**Figura 61. Imatge de la doble immunofluorescència (NeuN i 6E10) a la capa CA1 de l'hipocamp.** La figura mostra 4 imatges de referència d'una zona de la CA1 de l'hipocamp, pels grups d'estudi NTg PBS (A), Tg PBS (B), Tg WT (C) i Tg EL (D). Marcades en verd hi ha les neurones NeuN+ i en vermell les 6E10+. La barra d'escala equival a 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4.1.2 Intensitat del marcatge del mAb-6E10

Pel que fa a la intensitat del marcatge, la figura 63 mostra com les diferències entre els grups NTg PBS i Tg PBS són clares tan a l'hipocamp com al còrtex, essent estadísticament significatives en aquest segon cas, amb uns valors d'intensitat en el Tg PBS que gairebé doblen els del NTg PBS.

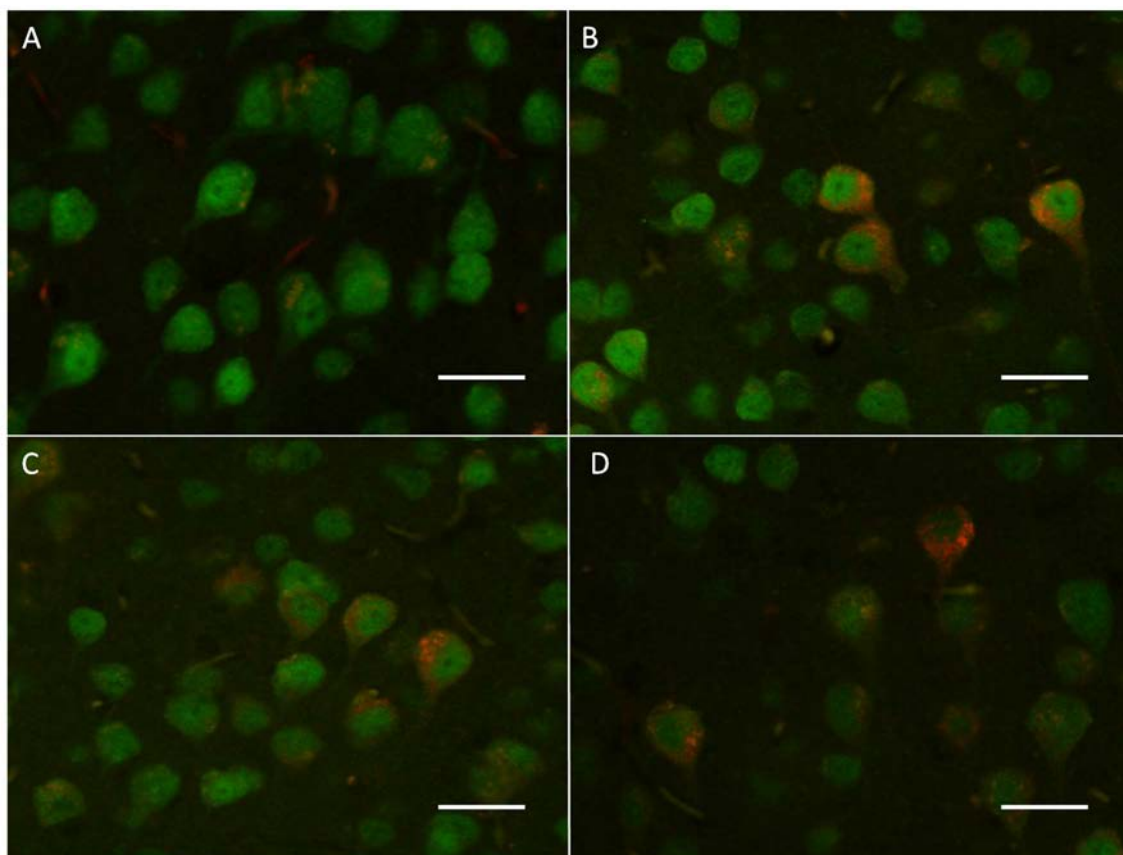
En referència a l'efecte dels tractaments en els grups transgènics, s'observa com en tots els casos aquests tendeixen a tenir un valor més baix que el Tg PBS. Ara bé, mentre que a l'hipocamp és el Tg EL el que té un valor més baix, al còrtex és el Tg WT, amb una diferència molt marcada.

Finalment, sembla que els tractaments tenen un lleuger efecte en els grups no transgènics, especialment el tractament amb WT, que té valors lleugerament més baixos que el NTg PBS tan



a l'hipocamp com al còrtex, suggerint així, un possible efecte del tractament sobre l'A $\beta$  endogen dels ratolins control, que també s'observa en altres paràmetres analitzats.

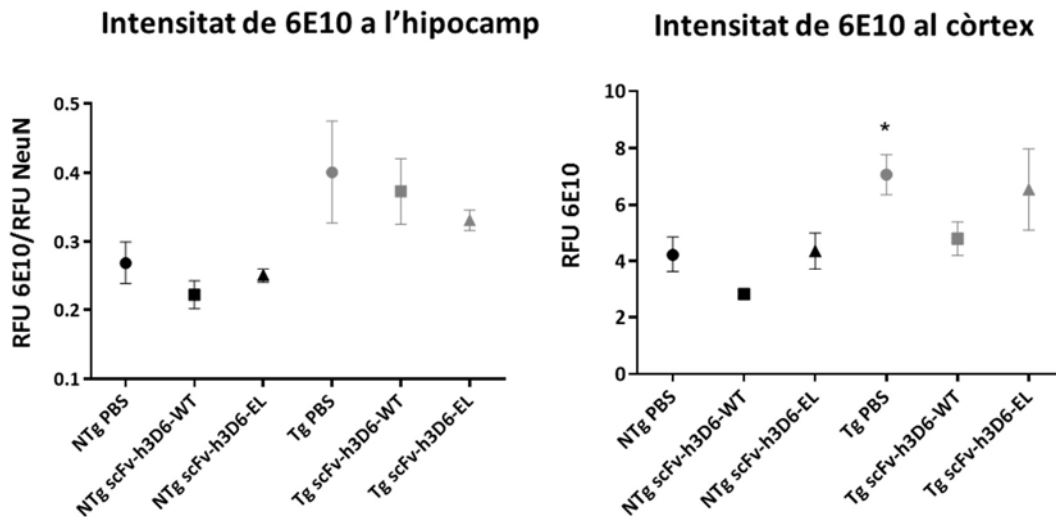
La figura 62 mostra la doble immunofluorescència (anti-NeuN i 6E10) a la capa piramidal V del còrtex, comparant el grup NTg PBS (A) amb els 3 grups de ratolins transgènics: PBS (B), WT (C) i EL (D).



**Figura 62. Imatge de la doble immunofluorescència (NeuN i 6E10) a la capa piramidal V del còrtex.** La figura mostra 4 imatges de referència d'una zona de la capa piramidal V del còrtex, pels grups d'estudi NTg PBS (A), Tg PBS (B), Tg WT (C) i Tg EL (D). Marcades en verd hi ha les neurones NeuN+ i en vermell les 6E10+. La barra d'escala equival a 50  $\mu$ m.

Cal remarcar que el mètode utilitzat per a fer el recompte no ha estat el mateix en les dues regions ja que, com s'explica en l'apartat 3.3.6.1.3 de materials i mètodes, els nuclis neuronals de l'hipocamp estan molt junts, amb la qual cosa és molt complicat distingir unes neurones de les altres. Així doncs, s'ha seleccionat tota la capa, de manera que el marcatge del 6E10 no es regeix, només, al marcatge dins de cada nucli, sinó que agafa també espai extracel·lular. Això fa

que el soroll de fons augmenti i s'hagi de normalitzar pel soroll de fons obtingut amb el marcatge de NeuN. A el còrtex, en canvi, no cal fer aquesta normalització ja que la intensitat de 6E10 calculada correspon, exclusivament, al marcatge intracel·lular.

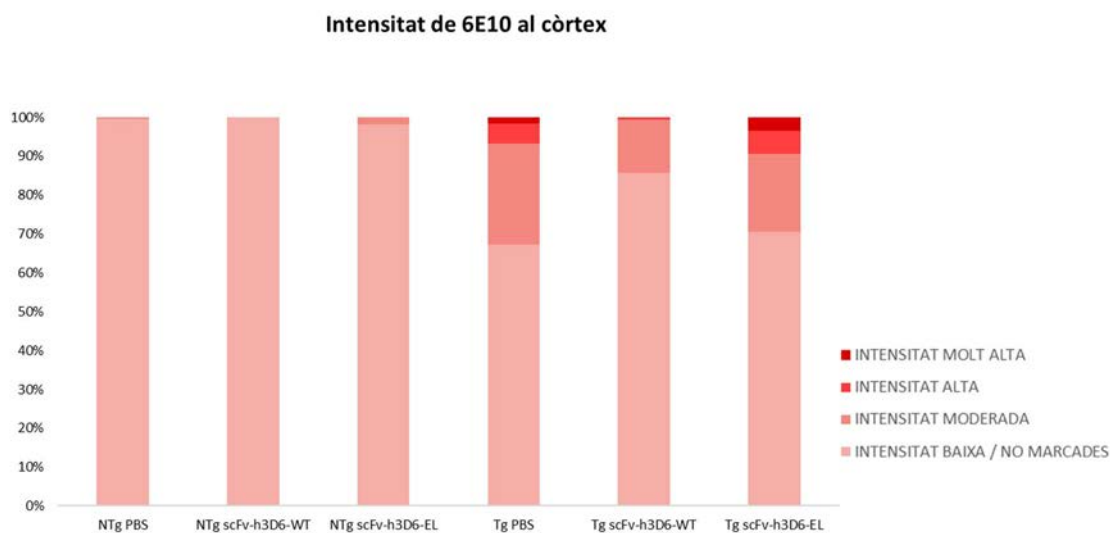


**Figura 63. Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 a l'hipocamp i al còrtex.** La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues regions analitzades. Tal com s'indica a l'eix d'ordenades, les unitats en què es donen els resultats són diferents a les dues regions ja que, els mètodes utilitzats per a fer el recompte, també són diferents. La intensitat del marcatge de 6E10 està representada, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Per analitzar més detalladament la intensitat del marcatge de les neurones del còrtex, aquesta es divideix en 4 categories (baixa o no marcades, moderada, alta i molt alta) i es representa el % de cada categoria respecte el total de neurones, per a cada grup d'estudi (veure figura 64). D'aquesta manera, s'observa d'una forma molt més visual, les diferències existents entre genotips i, a més, queda palès com el tractament amb WT redueix el nombre de neurones marcades així com la intensitat d'aquestes. El grup tractat amb EL, en canvi, tot i que té menys neurones marcades, aquestes són d'una intensitat més elevada.

D'altra banda, en l'anàlisi per separat de les diferents capes de l'hipocamp (figura 65), s'observa que, tot i que les diferències estan una mica més marcades a la CA1, els valors segueixen el mateix patró a les dues capes, amb l'única excepció del grup Tg WT que, en el cas de les capes CA2 i CA3, té un valor més baix que el Tg PBS, igualant el valor del Tg EL.

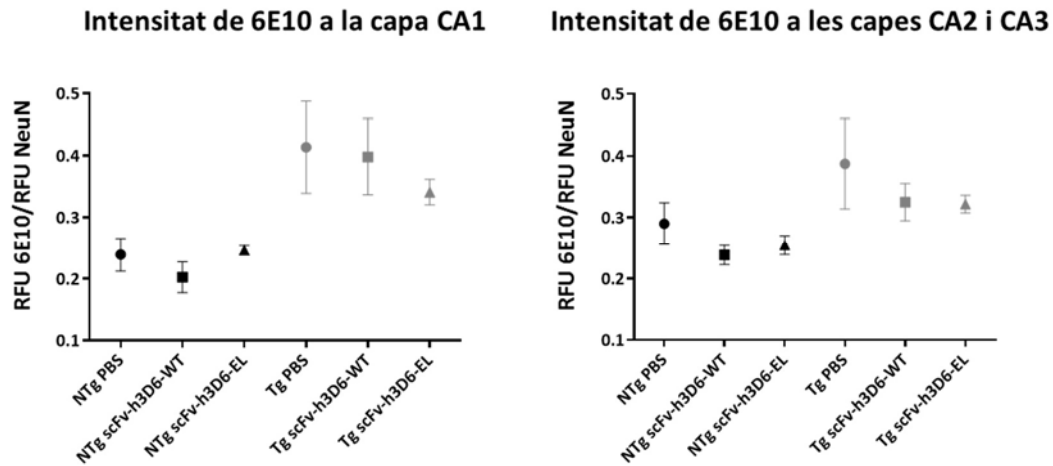
Així doncs, un cop analitzats els resultats del marcatge del 6E10, tan pel que fa a nombre de neurones marcades, com a la intensitat d'aquest marcatge, es pot concloure que la diferència entre genotips és evident i, tot i que hi ha cert marcatge en els individus no transgènics, aquest està clarament per sota del que s'observa en els individus transgènics.



**Figura 64. Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 al còrtex distribuïda per categories.** El gràfic mostra, per a cada grup d'estudi, el % de neurones que formen part de cada una de les categories establertes, marcades en tonalitat ascendent (intensitat baixa o neurones no marcades, intensitat moderada, intensitat alta i intensitat molt alta).

En referència al tractament, el grup Tg WT tendeix a tenir uns valors més baixos que el Tg PBS, especialment en el cas del còrtex, on és capaç d'apropar els valors als obtinguts en els grups no transgènics. A més, sembla que també té un cert efecte sobre l'A $\beta$  endogen, ja que els valors del NTg WT solen estar per sota dels del NTg PBS.

Per la seva banda l'EL sembla que té un efecte més marcat a l'hipocamp on tendeix a tenir uns valors més baixos que el Tg PBS i el Tg WT.



**Figura 65. Quantificació de la intensitat del marcatge de 6E10 a les capes CA1 i CA2/CA3 de l'hipocamp.**

La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues regions analitzades. La intensitat del marcatge de 6E10 està representada, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Comparant aquests resultats amb els observats *in vivo*, s'observa com, de manera general, encaixen millor els obtinguts en la regió del còrtex que no els de l'hipocamp:

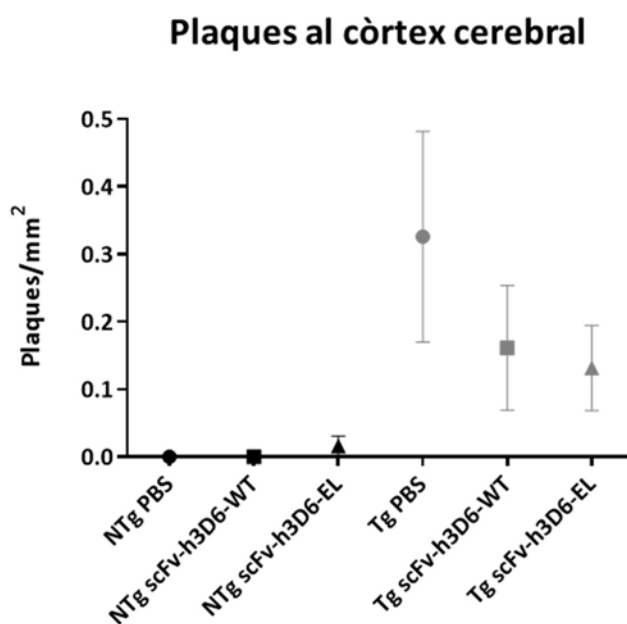
A l'hipocamp, el patró de resultats observat és una diferència evident entre genotips amb un lleuger efecte del tractament WT en ambdós genotips, i un efecte una mica més marcat de l'EL sobre els transgènics. Als resultats de volumetria de l'hipocamp també s'observa la diferència entre genotips i el lleuger efecte del tractament amb WT, en el cas dels transgènics. En canvi, l'efecte de l'EL, no es veu tan marcat i l'efecte dels dos tractaments sobre els transgènics no queda clar. L'únic punt temporal on el patró de resultats és exactament el mateix, és als 7 mesos.

Al còrtex, el patró de resultats observats és pràcticament idèntic que a les anàlisis de volumetria i de  $T_2$ , amb una diferència clara i evident entre genotips, amb un efecte bastant marcat del tractament amb WT (sobretot als transgènics però també als no transgènics) i un efecte molt menor de l'EL. Especialment similar és la comparació amb la volumetria als 12 mesos.

Aquests resultats doncs, ens farien inclinar per la segona opció, en el dilema sobre quins dels dos paràmetres volumètrics feia millor les funcions de biomarcador: si el de l'hipocamp o el del còrtex (que es replicava en el cas del cervell i de l'encèfal total, també).

4.1.4.2 *Anàlisi de plaques amiloides*

Com s'ha explicat àmpliament en la introducció, les plaques amiloides són el gran tret diferencial de la malaltia de l'AD, provocades directament per l'acumulació del pèptid A $\beta$ . En aquest apartat, s'analitzen de forma quantitativa i qualitativa els resultats obtinguts en referència a les plaques amiloides.



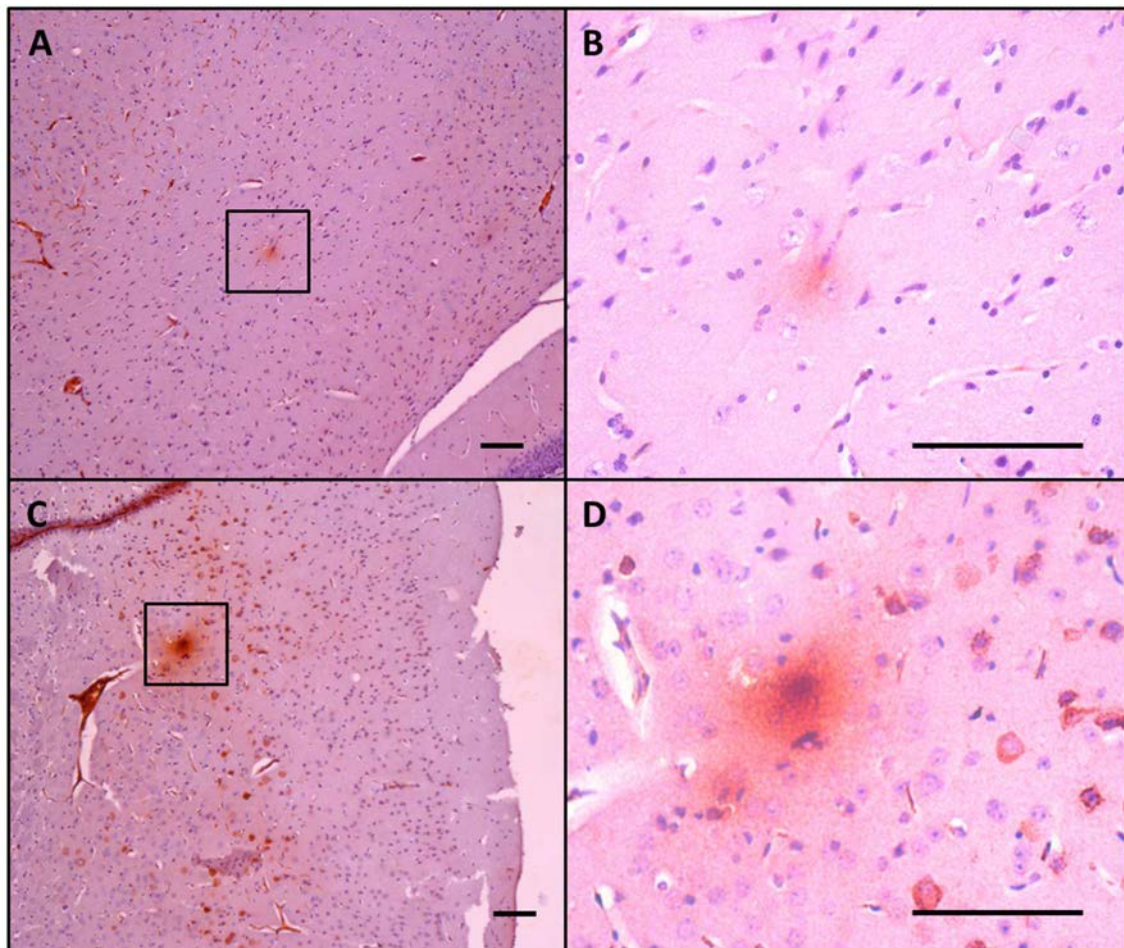
**Figura 66. Quantificació de les plaques d'A $\beta$  a tot el còrtex cerebral.** El gràfic mostra el número de plaques d'A $\beta$  observades a tota la zona del còrtex cerebral que, segons l'atles de ratolí *on-line* de l'Institut Allen inclou l'hipocamp, el neocòrtex, àrees olfactivas com, per exemple, l'àrea piriforme i, finalment, l'amígdala. El número de plaques està representat, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. El test estadístic utilitzat ha estat la U de Mann-Whitney.

Com s'observa a la figura 66, hi ha una clara diferència entre els genotips, havent-hi moltes més plaques als ratolins transgènics que als no transgènics. De fet, als ratolins no transgènics no s'observen plaques amiloides denses ben formades. Tot i així, s'observen algunes plaques difuses, encara que la quantitat és gairebé menyspreable si es compara amb el número de plaques observades als animals transgènics.

La figura 67 mostra dues imatges representatives de les plaques observades als animals no transgènics (A i B) i transgènics (C i D). La part fosca, la del nucli, no s'ha identificat en cap de les plaques existents en individus no transgènics mentre que sí que s'ha trobat a la majoria de

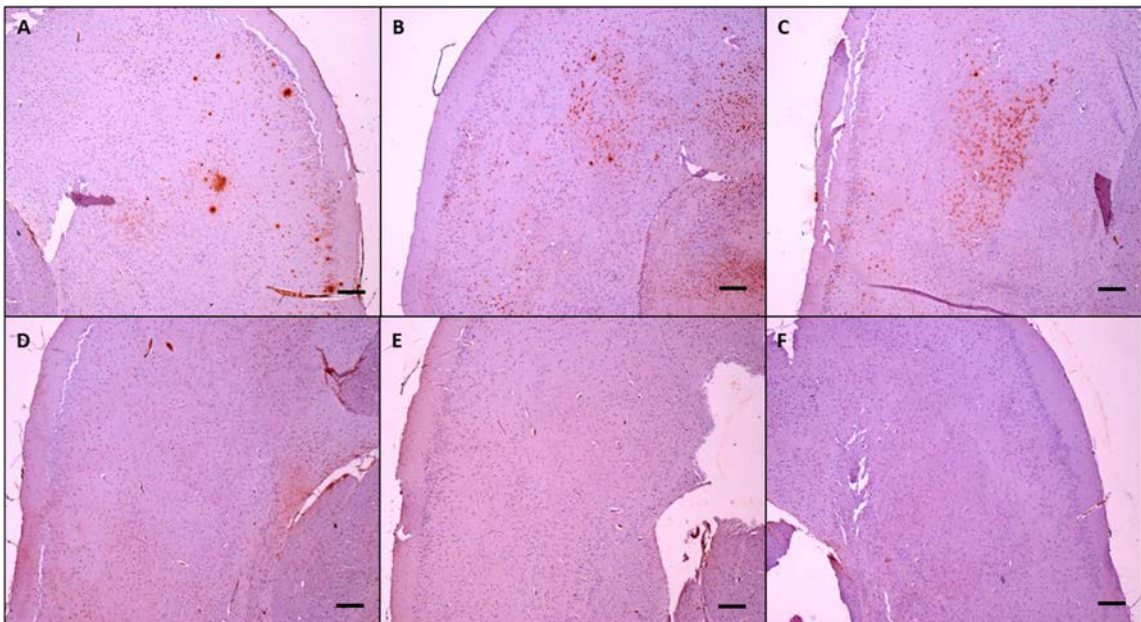
plaques dels animals transgènics. Les plaques difuses, que solen ser amorfes, no estan relacionades amb l'activació de la micròglia ni amb la pèrdua de sinapsis, amb la qual cosa no es consideren una patologia a l'hora de diagnosticar l'AD (156).

Pel que fa als tractaments, s'observa que tan el grup Tg WT, com el Tg EL, tendeixen a tenir uns valors més baixos que el Tg PBS, especialment en el cas del Tg EL. Aquest resultat no encaixa amb els observats *in vivo*, on sembla que el WT té un efecte més pronunciat que l'EL, ara bé, tenint en compte la gran variabilitat existent entre individus del mateix grup i la no-correspondència de les zones d'observació, no podem fer comparacions quantitatives entre resultats ni treure'n conclusions definitives.



**Figura 67. Diferència del tipus de placa amiloide existent entre genotips.** La figura mostra 4 imatges de plaques amiloides obtingudes mitjançant immunohistoquímica amb l'anticòs 6E10. A la part superior, es mostra una placa amiloide difusa (A) i la seva ampliació (B), representativa de les observacions en animals no transgènics. A la part inferior, es mostra una placa amiloide densa (C) i la seva ampliació (D), representativa de les observacions en animals transgènics. La barra d'escala equival a 100  $\mu\text{m}$ .

Precisament, en referència a la distribució de les plaques a les diferents zones del cervell, la majoria es concentren a les regions corresponents al còrtex piriforme, al còrtex entorrinal i a l'amígdala. Per tant, és en l'àrea que engloba aquestes tres regions on apareixen les principals diferències entre genotips i, també, entre tractaments, tal com mostra la figura 68. Si donem per representativa aquesta distribució, es podria entendre que els paràmetres analitzats que es solen relacionar amb la formació de plaques com, per exemple, el T<sub>2</sub>, no donin diferències a les àrees en les qual s'ha fet l'anàlisi, bàsicament, hipocamp i neocòrtex. Així doncs, les anàlisis histològiques en les quals ens hem de fixar per comparar els resultats obtinguts *in vivo*, són les que resulten de les anàlisis d'immunofluorescència ja que, aquestes sí, s'han dut a terme en les mateixes zones.



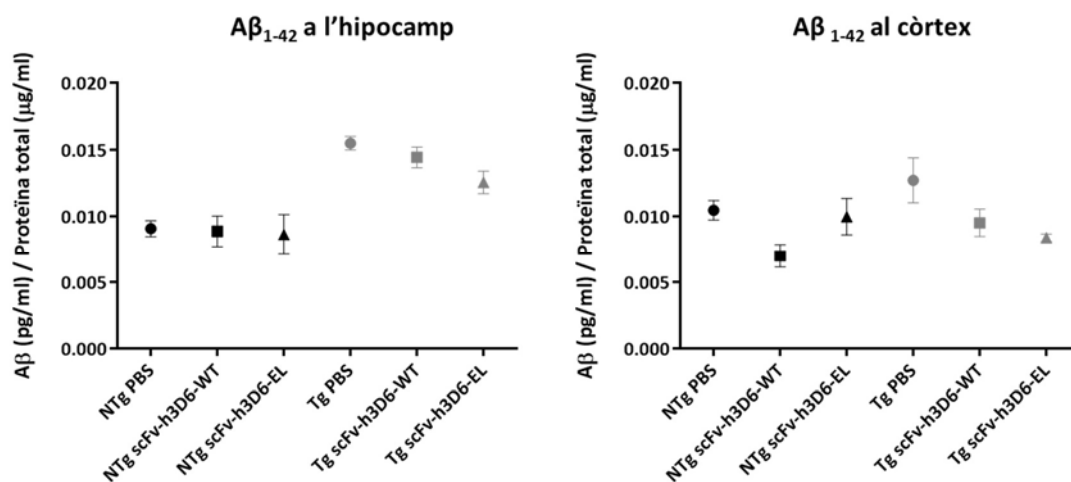
**Figura 68. Imatge de plaques amiloides a les zones dels còrtexs entorrinal i piriforme.** La figura mostra 6 imatges corresponents a la zones dels còrtexs entorrinal i piriforme obtingudes mitjançant immunohistoquímica amb l'anticòs 6E10. A la part superior, es mostren les fotos corresponents als animals transgènics tractats amb PBS (A), scFv-h3D6-WT (B) i EL (C). A la part inferior, les fotos corresponen a animals no transgènics tractats amb PBS (D), WT (E) i EL (F). La barra d'escala equival a 200 µm.

#### 4.1.5 Anàlisis bioquímiques

##### 4.1.5.1 Quantificació d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Amb l'objectiu de seguir caracteritzant la patologia amiloide s'ha analitzat la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> existent tan a l'hipocamp com al còrtex per ELISA, a partir d'homogenats d'aquests teixits. Després d'analitzar els resultats per a les fraccions extracel·lulars i intracel·lulars, es va arribar a la conclusió que les diferències s'observen millor ajuntant els resultats de les dues fraccions solubles, i per tant aquest resultat és el que s'ha utilitzat.

Tal com s'observa a la figura 69, les diferències entre els grups NTg PBS i Tg PBS són molt clares a l'hipocamp, però no tant al còrtex, tot i que el grup Tg PBS té un valor més alt que els 3 grups de ratolins no transgènics.



**Figura 69. Quantificació de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> a partir d'homogenats de teixit.** Els dos gràfics mostren la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> corresponent a l'hipocamp i al còrtex, per a cada grup estudiat. El valor està representat, com a mitjana de les diferents rèpliques  $\pm$  SEM. El test estadístic utilitzat ha estat la U de Mann-Whitney.

Pel que fa als tractaments, aquests tendeixen a tenir uns valors més baixos als transgènics, especialment els tractats amb EL. Contràriament al que passa amb els genotips, les diferències són superiors al còrtex que a l'hipocamp. En referència a l'efecte dels tractaments sobre els no transgènics, l'única diferència notable és el grup NTg WT al còrtex, amb un valor més baix que el NTg PBS i el NTg EL.



Els resultats obtinguts a la zona de l'hipocamp estan en consonància amb els observats per histologia ja que, tan el número de neurones marcades com la intensitat del marcatge segueixen aquest mateix patró, amb l'única diferència que no es detecta cap efecte dels tractaments sobre els animals no transgènics.

En canvi, pel que fa al còrtex, sí que s'observa un efecte del tractament amb WT tan en els ratolins transgènics com en els no transgènics, en consonància amb els resultats obtinguts tan per histologia com *in vivo*. Ara bé, en aquest cas, el tractament EL, sembla que té un efecte una mica més pronunciat que el WT, contràriament el que havíem anat comentant. Cal detallar, però, que a l'hora de seleccionar la regió del còrtex per a realitzar l'homogenat, aquest s'agafa tot sencer (a diferència de les anàlisis *in vivo* o de la immunofluorescència) i, a més, també s'agafa l'amígdala ja que, com s'ha dit anteriorment, els límits d'aquesta zona són molt difícils de delimitar.

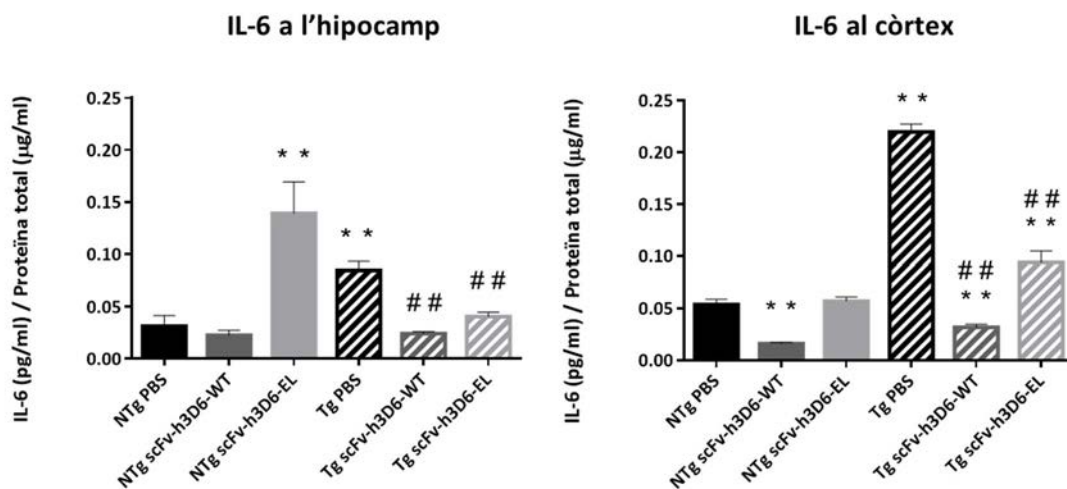
Així doncs, la zona del còrtex utilitzada per fer homogenats és més semblant a la utilitzada per mesurar el nombre de plaques, on sí que s'observa que el tractament amb EL és una mica més efectiu que el WT. Per tant, podria ser que els tractaments afectessin de forma diferent aquestes zones i, com a conseqüència, veiéssim aquest patró que difereix de l'observat a la resta d'anàlisis.

De totes maneres, s'ha de tenir en compte que tan aquí com a les diferents anàlisis realitzades a partir de les mostres de teixit homogenat, es treballa amb la barreja de les mostres de tots els animals d'un mateix grup, amb la qual cosa les desviacions observades es deuen, únicament, a les diferències entre les rèpliques de la mateixa mostra, fet que impedeix conèixer la variabilitat real de les dades dins un mateix grup. Aquest procediment metodològic, necessari per obtenir mostra suficient per a realitzar les anàlisis, és un impediment a l'hora de valorar-ne els resultats.

#### 4.1.5.2 Anàlisi d'inflamació

Com ja s'ha explicat a l'apartat 1.3.2 de la introducció, la neuroinflamació és un dels trets característics de l'AD, tot i que els mecanismes que segueix no estan clars del tot (49). Per a estudiar la inflamació que es dona en el 3xTg-AD, i per veure com es veu influenciada pels tractaments, en aquest treball es quantifica la interleucina 6 (IL-6) a partir de la fracció extracel·lular. Alteracions en els nivells d'IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  (de l'anglès, tumor necrosis factor) han estat relacionats amb l'AD (157).

Com es pot observar a la figura 70, les diferències entre els grups NTg PBS i Tg PBS són clares, trobant-se una major quantitat de IL-6 en aquest darrer grup, especialment en el cas del còrtex. Pel que fa als tractaments, tan el grup Tg WT com el Tg EL tenen uns valors significativament més baixos que el Tg PBS, especialment, el Tg WT. El tractament amb WT també sembla afectar als animals no transgènics, sobretot en el cas del còrtex, on té un valor més petit. Per últim, cal remarcar que el grup NTg EL, té un valor significativament més alt que el NTg PBS en el cas de l'hipocamp on, fins i tot, és més elevat que els grups de transgènics.



**Figura 70. Quantificació de l'interleucina 6 (IL-6) a l'hipocamp i al còrtex.** La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues zones analitzades. La quantitat d'IL-6 està representada, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  respecte al NTg PBS; ## $p < 0.01$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Si interpretem aquests resultats en clau d'inflamació, podem afirmar que els 3xTg-AD pateixen un evident procés inflamatori i que l'aplicació dels scFv, especialment del WT, és capaç de revertir la situació fins a obtenir valors d'IL-6 similars als dels grups no transgènics. De fet, sembla que el WT presenta un cert efecte sobre l'IL-6 endògena mentre que, per la seva banda, l'EL desencadena uns valors extremadament elevats d'IL-6 a l'hipocamp.

Aquesta anomalia no té, *a priori*, cap sentit, i no s'ha observat en cap dels paràmetres analitzats anteriorment. Sí que és veritat que dels 3 grups controls, el tractat amb EL dona un valor lleugerament més elevat de plaques amiloides, però en la quantificació d'A $\beta_{1-42}$  a partir dels homogenats, els valors obtinguts són completament normals. A més, tot i donar nivells una

mica més elevats que els altres dos grups control a les anàlisis histològiques, aquests no són, ni de bon tros, semblants als obtinguts pels grups transgènics. Per tant, seria necessari realitzar un altre experiment *in vivo* per a poder repetir la determinació de IL-6 i treure'n més conclusions.

Aquest anàlisi d'inflamació ens permet també, descartar la hipòtesi plantejada a partir dels resultats obtinguts a l'anàlisi de l'ADC segons la qual, un procés d'inflamació provocat pel scFv-h3D6-WT, seria el responsable que el grup Tg WT donés uns valors més alts d'ADC i, fins i tot, de T<sub>2</sub>. Amb la quantificació de l'IL-6 però, aquesta teoria queda descartada ja que, precisament, els grups tractats amb WT són els que tenen uns valors més baixos tan a l'hipocamp, com al còrtex.

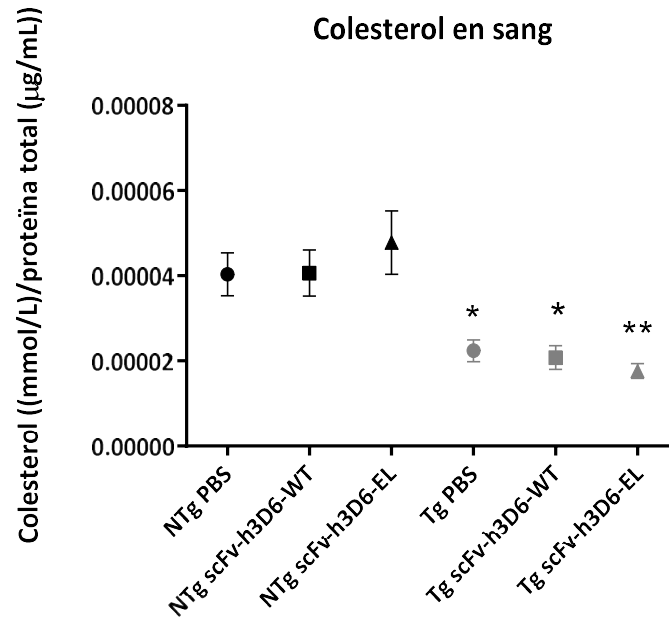
### 4.1.5.3 Anàlisi de colesterol i transaminases

#### *4.1.5.3.1 Colesterol*

Com s'explica a l'apartat 1.3.2 de la introducció, el metabolisme del colesterol està afectat en individus amb AD. Tot i que molts estudis apunten a la hipercolesterolèmia com a factor de risc pel desenvolupament de la malaltia, aquesta hipòtesi no gaudeix d'un consens total i, a més, els mecanismes que relacionen patologia i malaltia no acaben d'estar clars (158,159).

Per veure com el colesterol està relacionat, en aquest cas, amb la patologia de l'AD en el 3xTg-AD, i quina influència tenen els tractaments sobre aquest paràmetre, s'analitzen els nivells de colesterol en sang a partir de les mostres de plasma obtingudes en el moment de sacrificar els ratolins.

Com s'observa a la figura 71, existeix una diferència significativa entre els grups control i els grups transgènics obtenint, en aquests últims, uns valors més baixos. Pel que fa als tractaments s'observa que, tot i que les variacions són petites (sobretot en el cas del tractament amb WT), aquests tenen un valor més baix que el Tg PBS. L'efecte contrari s'observa en els no transgènics, on el NTg EL té un valor més elevat que el NTg PBS.



**Figura 71. Quantificació dels nivells de colesterol en sang.** El gràfic mostra els nivells de colesterol en sang dels 6 grups d'estudi (N=6), representats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$  respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

Aquests resultats ens indiquen que la patologia amiloide observada en el model 3xTg-AD no es deu (ni es veu influenciada) a una possible hipercolesterolèmia. A part d'això, es fa difícil treure cap més conclusió ja que, la majoria dels estudis que relacionen colesterol i AD en animals model ho fan a partir d'una dieta rica en colesterol i mirant com aquesta influeix en el desenvolupament de la patologia amiloide (160). A més, els estudis que miren diferències entre una soca transgènica i controls sense la influència de la dieta, es centren en l'estudi del colesterol cerebral i els mecanismes cel·lulars i moleculars que poden relacionar-lo amb el pèptid A $\beta$  (161).

#### 4.1.5.3.2 Transaminases

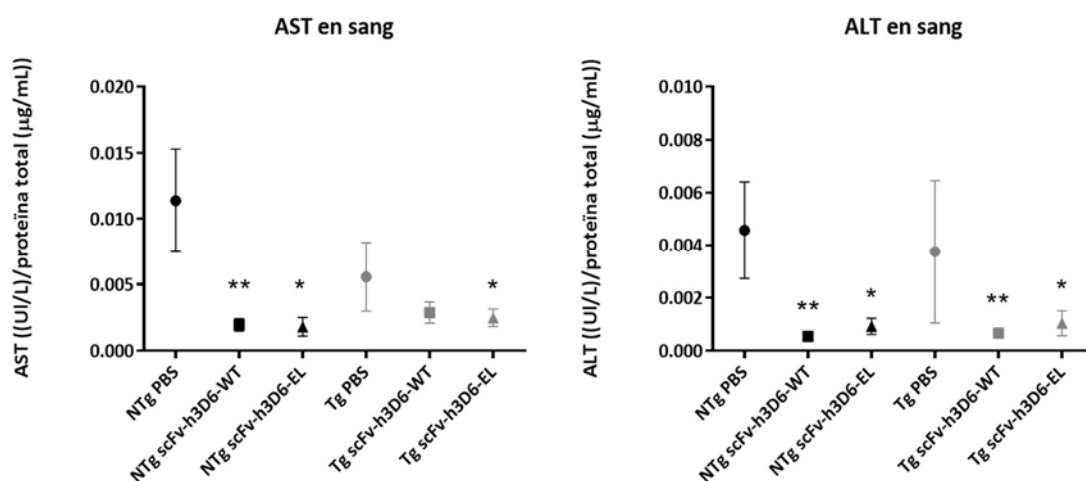
Per acabar, s'han analitzat els nivells de transaminases en sang a partir, també, de les mostres de plasma extretes en el moment de sacrificar els ratolins. Les transaminases (o aminotransferases) més utilitzades són l'AST i ALT, els nivells en sang de les quals, s'utilitzen com a marcadors d'anomalies hepàtiques. Patologies com l'hepatitis, la cirrosi hepàtica o tumors en el fetge, poden causar l'elevació dels nivells d'aquestes dues transaminases.

Com que és sabut que un dels principals problemes dels tractaments, en general, és la disfunció hepàtica que provoquen, es podria emmarcar aquest estudi en les proves de seguretat dels fàrmacs, ja que pretén demostrar que el tractament longitudinal amb scFvs no provoca dany hepàtic.

Tal com mostra la figura 72, s'observen diferències entre genotips, especialment per a l'AST, tenint el grup NTg PBS uns valors més elevats que el Tg PBS. Tot i així, la variabilitat dins de cada grup és molt elevada i no es pot afirmar amb certesa. Pel que fa als tractaments, sí que s'observa un efecte clar tan sobre els transgènics, com sobre els no transgènics amb uns valors significativament més baixos pels grups tractats, tan d'AST com d'ALT.

Amb aquests resultats queda descartada una possible afectació del fetge a causa dels tractaments. De fet, el que s'observa és un efecte contrari indicant, un cop més, els efectes beneficiosos dels tractaments tan en els grups Tg com en els NTg.

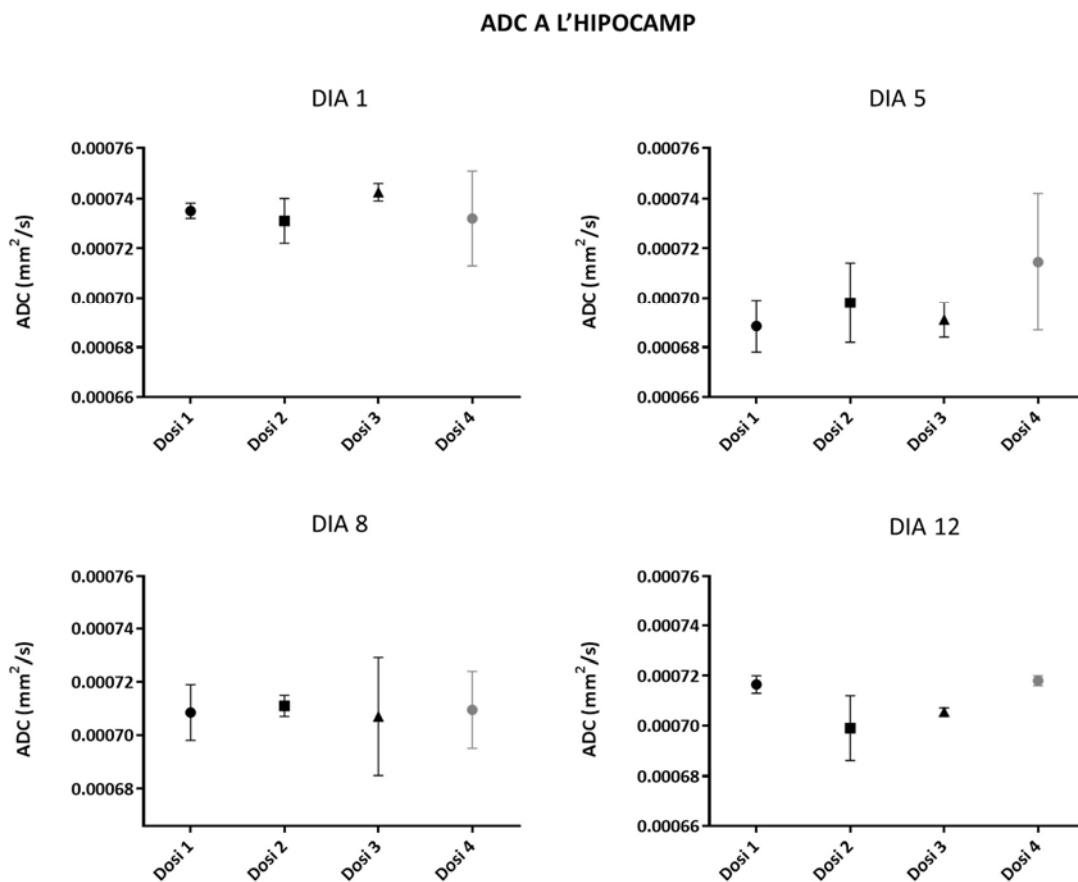
Encara que les dues transaminases es comporten de manera similar, cal remarcar que, metodològicament, els resultats d'ALT són bastant més fiables que els d'AST ja que, aquests últims, es veuen afectats per l'hemòlisi ocorreguda al separar el plasma sanguini de la resta de components de la sang.



**Figura 72. Quantificació dels nivells de transaminases aspartat (AST) i alanina (ALT) en sang.** La imatge mostra 2 gràfics corresponents a les dues transaminases analitzades. Les quantitats d'AST i la d'ALT estan representades, per a cada grup d'estudi (N=4-6), com a mitjana ± SEM. \*p<0.05 i \*\*p<0.01 respecte al NTg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### 4.2 Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic

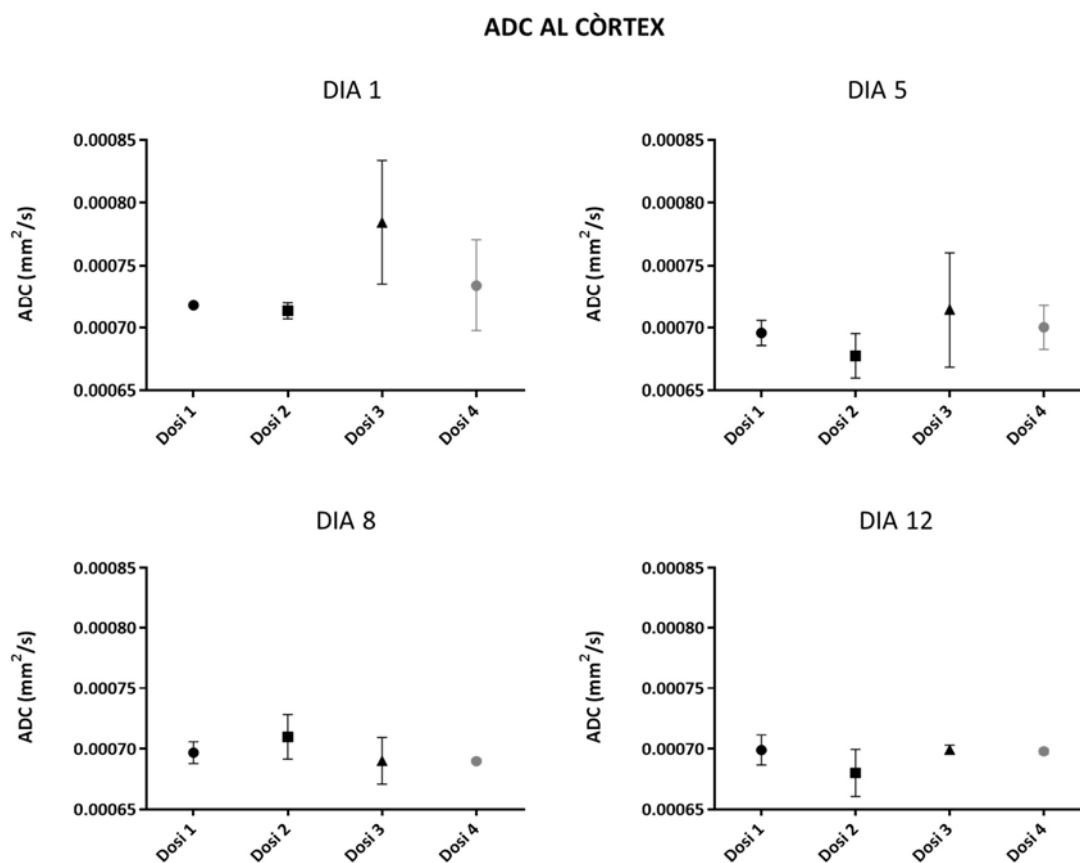
El principal objectiu d'aquest estudi era observar l'aparició d'edema vasogènic mitjançant els mapes d'ADC obtinguts a partir de les imatges de difusió. Com es pot observar en les figures 73 i 74, que representen els valors d'ADC a l'hipocamp i al còrtex, respectivament, aquests no varien massa entre les diferents dosis de l'anticòs mAb-m3D6 sencer.



**Figura 73. Valors del coeficient de difusió aparent (ADC) a l'hipocamp.** Es mostren els valors d'ADC, obtinguts a les 4 sessions de ressonància, dels animals als quals se'ls ha administrat diferents dosis de mAb-m3D6. Les dosis es mostren en ordre ascendent, de manera que la dosi 1 correspon a la dosi mínima mentre que, la dosi 4, correspon a la màxima. En cap de les sessions hi ha diferències clares que es puguin atribuir a l'efecte dosi i, per tant, no s'aprecia l'aparició d'edema vasogènic.

Sí que es pot apreciar com la dosi màxima (dosi 4), té els valors d'ADC una mica més elevats que la resta o, en tot cas, està sempre en el rang alt de valors. Per a aquest estudi, al ser una primera aproximació a la visualització d'edema, s'ha utilitzat una N=2, per la qual cosa no era

possible veure diferències significatives, estadísticament parlant, la qual cosa tampoc era l'objectiu principal. Ara bé, sí que s'esperava observar que almenys, la dosi màxima, tingués uns valors d'ADC molt més elevats que la resta, indicant la possibilitat d'aparició d'edema vasogènic o, si més no, una tendència en la distribució dels valors que suggerís un efecte-dosi i donés pistes de la dosi necessària per observar aquesta anomalia.



**Figura 74. Valors del coeficient de difusió aparent (ADC) al còrtex.** Es mostren els valors d'ADC, obtinguts a les 4 sessions de ressonància, dels animals als quals se'ls ha administrat diferents dosis de mAb-m3D6. Les dosis es mostren en ordre ascendent, de manera que la dosi 1 correspon a la dosi mínima mentre que, la dosi 4, correspon a la màxima. En cap de les sessions hi ha diferències clares que es puguin atribuir a l'efecte dosi i, per tant, no s'aprecia l'aparició d'edema vasogènic.

Un altre dels motius pels quals era desitjable visualitzar l'aparició d'edema, era per assignar uns determinats valors d'ADC a aquest fet, de manera que, aquests valors, fessin la funció de control positiu dels que s'han obtingut a l'estudi longitudinal. Si s'observen les figures 51 i 53 (corresponents als valors d'ADC de l'estudi longitudinal en les zones de l'hipocamp i el còrtex, respectivament), es pot comprovar que els valors màxims, en el primer cas es situen al voltant

dels  $0.00075 \text{ mm}^2/\text{s}$  i, en el segon cas, al voltant dels  $0.00073 \text{ mm}^2/\text{s}$ . Si es comparen amb els obtinguts en l'estudi actual, només hi ha un cas (dosi 3 al còrtex, al dia 1) on els valors actuals superin els observats en l'estudi longitudinal, de manera que conviden a pensar que tan uns, com els altres, estan dins la normalitat.

El fet que no s'hagi aconseguit la visualització d'edema en aquesta primera aproximació podria ser atribuït a que el model 3xTg-AD no mostra una CAA (angiopatia amiloide cerebral) massa desenvolupada (162). La CAA és una patologia més resistent als mecanismes de neteja comparada amb l'amiloide parenquimal, i està associada a microhemorràgies i altres ARIA com els edemes vasogènics (163). El fet que aquestes anomalies s'hagin descrit en models murins d'AD que desenvolupen una CAA molt més marcada podria ser una raó per la qual no som capaços de visualitzar l'edema vasogènic en el 3xTg-AD utilitzant MRI (164).





### **4.3 Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6-WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J**

#### **4.3.1 MRI: Volumetria**

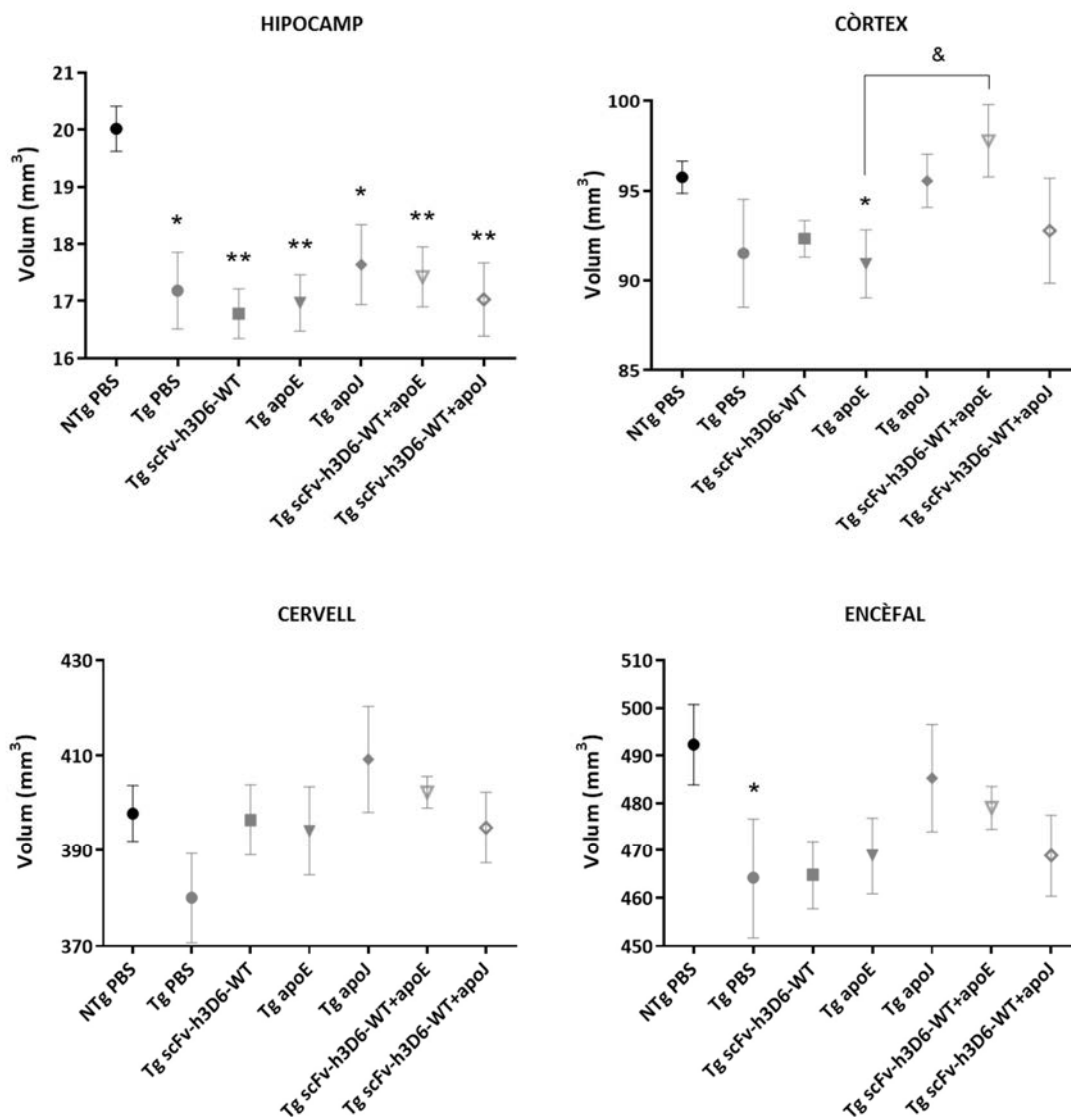
La figura 75 mostra els volums dels diferents grups d'estudi en les diverses regions analitzades. Com es pot observar, a l'hipocamp, la diferència entre genotips és molt clara, ja que tots els grups transgènics, tractats i sense tractar, tenen un hipocamp significativament més petit que el grup de ratolins no transgènics. Els tractaments, però, no tenen un efecte clar i, mentre que els grups tractats amb scFv, apoE-MP o la combinació de scFv i apoJ-MP, tenen uns valors més baixos que el Tg PBS, l'apoJ-MP sol i la combinació de scFv amb apoE-MP, tendeixen a tenir uns valors més alts.

Una interpretació possible seria que abans que comencés el tractament (4.5 mesos), els hipocamps de les diferents soques, han tingut temps de créixer de manera diferent. Ara bé, el temps que passa des que s'inicien els tractaments fins que s'analitzen els ratolins per MRI (6 setmanes), no és suficient per veure els efectes que aquests puguin tenir. Un fet similar s'observava en el cas de l'estudi longitudinal, on la diferència entre genotips era clara als 5 mesos, però no era fins als 7 que es començava a veure un efecte del tractament.

Pel que fa al còrtex, les diferències entre genotips són clares, tot i que no significatives. Ara bé, amb l'aplicació dels tractaments, especialment en el cas de l'apoJ-MP i de la combinació entre el scFv i l'apoE-MP, els valors tendeixen a augmentar. En aquest últim grup, el valor obtingut és més elevat, fins i tot, que el del grup de ratolins no transgènics. D'aquesta manera, es podria dir que l'efecte dels tractaments provoca canvis abans en el còrtex que en l'hipocamp, en consonància amb l'observat en l'estudi longitudinal on, als 5 mesos d'edat, ja s'observava un efecte del tractament amb scFv-h3D6-WT. En l'estudi actual però, sembla que l'efecte d'aquest tractament és molt menys pronunciat, tot i haver injectat, en menys de dos mesos, una dosi equivalent als 10 mesos del longitudinal.

A part d'aquestes dues regions, també s'han analitzat els volums totals del cervell i de l'encèfal (cervell, cerebel i bulb olfactori) i s'ha observat, tal com mostra la figura 75, que la diferència entre genotips es manté en ambdós casos, essent significativa a l'encèfal però no al cervell.

## ANÀLISI DE VOLUMETRIA



**Figura 75. Anàlisi del volum de les diferents zones seleccionades.** La imatge mostra 4 gràfics corresponents a les 4 zones seleccionades. Els valors del volum estan representats, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p > 0.01$  respecte al NTg PBS; &  $p < 0.05$ , respecte al pèptid mimètic corresponent, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.

Pel que fa als tractaments, analitzant el cervell, s'observa com tots els valors dels grups tractats són capaços d'igualar el del grup NTg PBS, essent doncs, més elevats que el grup transgènic sense tractar. A més, tan la combinació de scFV i apoE-MP com l'apoJ-MP sol, tenen un valor més elevat que el NTg PBS, replicant així els resultats observats en el còrTEX. A l'encèfal, en canvi, tot i que els valors dels grups tractats són més elevats que el Tg PBS, cap arriba a igualar

el dels no transgènics. També es mostren especialment elevats, els valors dels grups tractats amb la combinació de scFv i apoE-MP i, sobretot, amb l'apoJ-MP sol.

Així doncs, aquests resultats porten a la conclusió que la diferència de volums entre genotips existeix, es miri la regió que es miri, essent estadísticament significativa tan en el cas de l'hipocamp com en el de l'encèfal.

A més, sembla que els tractaments no afecten al volum de l'hipocamp mentre sí que ho fan a la resta de zones, mostrant una tendència a tenir volums més grans que els transgènics no tractats, especialment en el cas dels grups tractats amb apoJ-MP sol o amb la combinació de scFv i apoE-MP. Sobre les diferències entre els diferents tractaments, s'observa que quan es combina el scFv amb un pèptid mimètic, l'efecte és major, sobretot en el cas de la combinació amb l'apoE-MP.

Ara bé, si es comparen aquests valors amb els obtinguts en els grups tractats només amb un pèptid mimètic, en el cas de l'apoE-MP els valors són més elevats si s'administra en combinació amb el scFv, mentre que, en el cas de l'apoJ-MP, els valors són més alts quan s'administra sola. La diferència de comportament entre els dos pèptids mimètics, tan sols, com en combinació amb el scFv, podria ser deguda a les diferents vies que utilitzen per relacionar-se amb l'A $\beta$ , encara que els mecanismes moleculars que utilitzen es desconeixen (22). Així, aquests resultats apuntarien a que els efectes de l'apoE-MP sobre l'A $\beta$  es veurien afavorits al combinar-lo amb el scFv mentre que, per l'apoJ-MP, aquests es veurien perjudicats.

De totes maneres, aquests resultats caldria contrastar-los amb els obtinguts en les anàlisis histològiques i bioquímiques que formen part de la tesi de la Laia Montoliu (142).

### **4.3.2 MRS**

#### *4.3.2.1 Perfil metabòlic de l'hipocamp*

A la taula 4, situada al final d'aquest apartat, apareixen reflectits els valors de cada grup experimental (representats com a mitjana  $\pm$  SD) per a tots els metabòlits que han passat els criteris de selecció descrits a l'apartat 3.3.4.2. Les diferències estadísticament significatives es marquen amb \*, si són respecte el grup NTg PBS; amb #, si són respecte el grup Tg PBS; amb  $\lambda$ , si són respecte el tractament amb scFv-h3D6-WT sol i, finalment, amb &, si són respecte el tractament amb el pèptid mimètic corresponent, tot sol.

A continuació s'analitzen, de forma més detallada, els resultats corresponents al NAA i al mIns que, com s'ha dit anteriorment, són els dos metabòlits més utilitzats com a biomarcadors a l'AD. A més, es representa també la relació NAA/mIns, la qual també s'utilitza molt, ja que permet maximitzar les diferències que s'observen en aquests metabòlits.

Per acabar, s'analitzen els canvis més interessants de la resta de metabòlits.

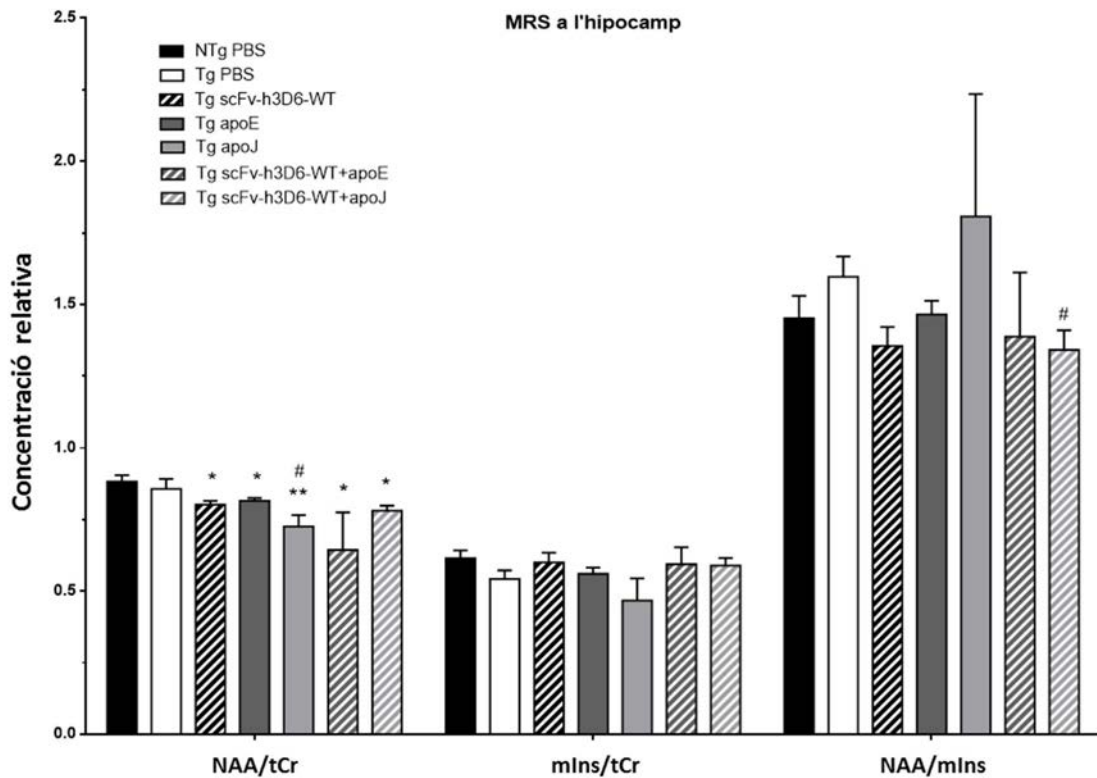
### 4.3.2.1.1 *N-acetil aspartat (NAA)*

A la figura 76 s'observa com el grup Tg PBS té un valor de NAA més baix que el NTg PBS, tot i que la diferència no és gaire gran. Al aplicar els diferents tractaments, els valors encara són més baixos, donant diferències significatives, respecte el NTg PBS, en tots els casos, especialment en l'aplicació de l'apoJ-MP sol, que també dona diferències significatives respecte el Tg PBS.

Aquests resultats, indicarien que a tots els grups transgènics la viabilitat neuronal està perjudicada i que, cap dels tractaments aplicats, és capaç d'impedir-ho. De totes maneres, com ja s'ha vist a l'estudi longitudinal, en les condicions experimentals utilitzades, la quantificació de NAA no és capaç de reflectir la patologia real.

### 4.3.2.1.2 *Mio-inositol (mIns)*

Pel que fa al mio-Inositol, s'observa com el Tg PBS té un valor una mica més baix que el no transgènic i que, els grups tractats, en general, tendeixen a tenir un valor més elevat (excepte el grup tractat amb apoJ-MP sol). Aquestes diferències, tot i que són petites i, en cap cas significatives, van en sentit contrari a l'esperat, ja que el mIns, com a marcador d'activació de la glia, hauria d'estar més elevat en els grups transgènics que en els no transgènics. Aquests resultats, estarien en línia amb els estudis que argumenten la no variació del mIns en ratolins, però són contraris als que havíem observat a l'estudi longitudinal (150).



**Figura 76. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns a l'hipocamp.** Es mostren les diferents concentracions de N-acetil-aspartat (NAA)/creatina total (tCr), mioinositol (mIns)/tCr i la relació entre ells (NAA/mIns), expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

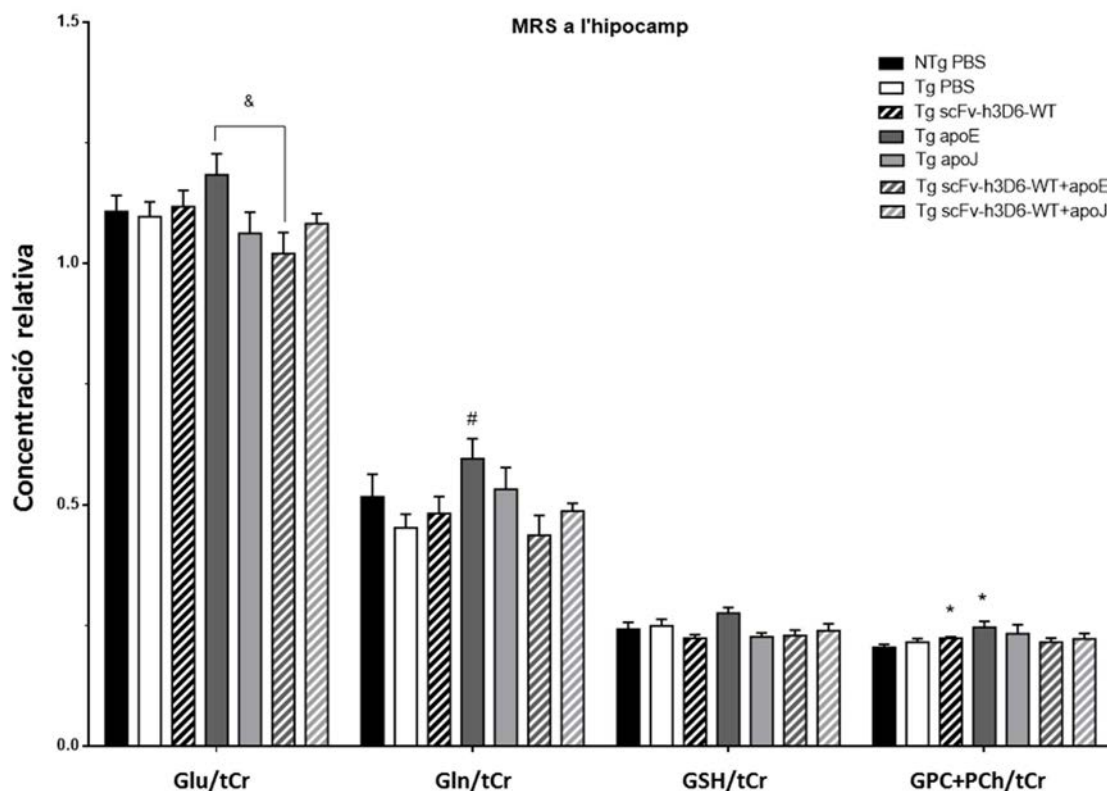
#### 4.3.2.1.3 NAA/mIns

Com s'ha explicat anteriorment, la relació NAA/mIns permet maximitzar les diferències existents entre els diversos grups d'estudi. En aquest cas, s'observa com es replica el patró que s'observava en el cas del mIns, on la diferència existent entre genotips (no significativa), va en sentit contrari a l'esperat.

Tenint en compte aquest fet, es fa difícil interpretar el paper que juguen els tractaments. Si entenem que els valors més elevats corresponen a millors relacions de NAA/mIns, (NAA elevat i mIns disminuït), es pot veure com el tractament amb apoJ-MP sol, és l'únic que té efecte, donant un valor més elevat que el grup Tg PBS. De totes maneres, el fet que la diferència entre genotips no concordi, invalida qualsevol interpretació.

4.3.2.1.4 Altres metabòlits

Pel que fa a les variacions de la resta de metabòlits, alguns d'ells representats a la figura 77, es pot destacar que el tractament amb apoE-MP sol dona valors bastant més elevats que la resta de grups pels metabòlits següents: glutamat, glutamina, glutatió i derivats de la colina.

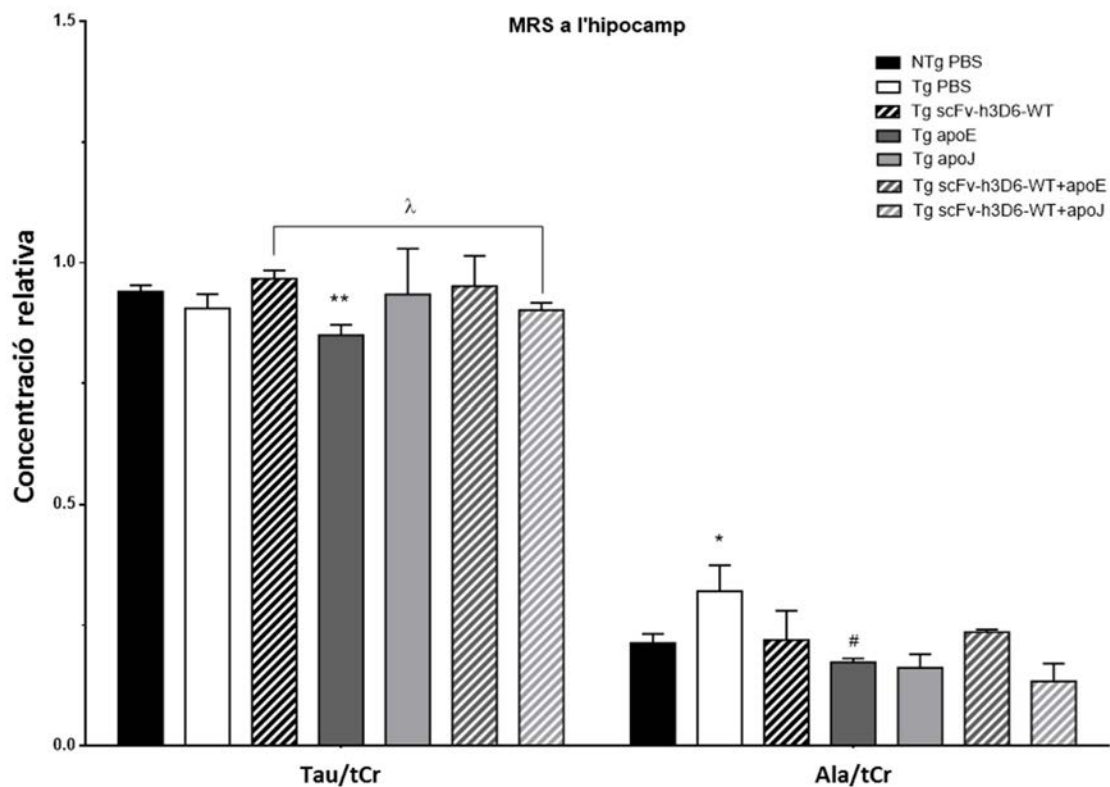


**Figura 77. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Glu, Gln, GSH i GPC+PCh, a l'hipocamp.** Es mostren les diferents concentracions de glutamat (Glu)/creatina total, glutamina (Gln)/tCr, glutatió (GSH)/tCr i derivats de la colina (GPC+PCh)/tCr, expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS i &  $p < 0.05$  respecte el tractament amb el pèptid mimètic corresponent, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.

D'una banda, els augments de glutamat i de glutatió es podrien considerar positius. El primer a causa d'una recuperació del major neurotransmissor d'excitació, la disminució del qual s'ha relacionat amb diferents patologies d'AD com la pèrdua neuronal i de sinapsis (165). El segon, ja que s'ha relacionat amb funcions de protecció respecte les espècies reactives de l'oxigen

(apartat 1.3.2) i s'ha descrit que el mal funcionament del cicle del glutatió, és un esdeveniment clau per a la toxicitat cel·lular induïda per l'A $\beta$ , de manera que, en cervells amb AD, es sol trobar una disminució de glutatió (123).

D'altra banda, els augments en glutamina i en derivats de la colina, podrien no ser tan positius. L'increment de glutamina no està massa estudiat en AD, tot i que es sap que intervé en el cicle metabòlic del glutamat i que es troba als astròcits. A més, s'ha relacionat més amb danys hepàtics i amb la tau hiperfosforilada. Pel que fa als derivats de la colina, tampoc s'han relacionat en massa ocasions amb l'AD, però sí amb altres malalties neuronals i es creu que un augment en aquest metabòlit és indicatiu de problemes en les membranes cel·lulars com la seva disrupció (120).



**Figura 78. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Tau i Ala, a l'hipocamp.** Es mostren les diferents concentracions de taurina (Tau)/creatina total (tCr) i alanina (Ala)/tCr, expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS i  $\lambda$   $p < 0.05$  respecte el tractament amb el scFv, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.



A part, a la figura 78, s'observa una diferència significativa entre genotips, en el cas de l'alanina (Ala), essent més elevat, aquest valor, en el Tg PBS. Pel que fa als tractaments, tots són capaços d'igualar el valor del grup no transgènic, distanciant-se així del Tg PBS, especialment en el cas de l'administració d'apoE-MP sol, on s'observa un valor significativament més baix que el Tg PBS. L'alanina, que té un paper clau en el cicle de l'alanina-glucosa (en el qual també participa l'ALT) s'ha trobat incrementada en cervells amb AD (166).

Finalment, el valor de la taurina disminueix en el grup Tg PBS (com ja s'observava en l'estudi longitudinal) i sembla que el tractament amb scFv és el que millor recupera el valor del NTg PBS. Destacar, a més, que el tractament amb el pèptid mimètic d'apoE, dóna un valor significativament més baix que el Tg PBS.

En resum, aquests resultats apunten a que l'apoE juga un rol important en el modulació del perfil metabòlic en l'hipocamp dels ratolins 3xTg-AD, però no queda clar el seu paper, ni tan sols si aquest és beneficiós o perjudicial pels animals. Aquestes contradiccions però, no sorprenen ja que, com s'explica en l'apartat 1.2.3 de la introducció, no està clar el paper de l'apoE en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer malgrat els molts estudis existents a la bibliografia.

PERFIL METABÒLIC DE L'HIPOCAMP (valors expressats en mitjana ± desviació estàndard)

	NAA/tCr	mIns/tCr	NAA/mIns	Tau/tCr	GPC+PCh/tCr	Gln/tCr	Glu/tCr
NTg PBS	0.88 ± 0.05	0.61 ± 0.07	1.45 ± 0.19	0.94 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.52 ± 0.12	1.11 ± 0.08
Tg PBS	0.86 ± 0.08	0.54 ± 0.07	1.60 ± 0.18	0.91 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.45 ± 0.07	1.10 ± 0.08
Tg scFv-h3D6-WT	0.80 ± 0.03*	0.60 ± 0.08	1.35 ± 0.16	0.97 ± 0.04	0.22 ± 0.01*	0.48 ± 0.09	1.12 ± 0.08
Tg apo E	0.82 ± 0.03*	0.56 ± 0.06	1.46 ± 0.12	0.85 ± 0.05**	0.25 ± 0.03*	0.60 ± 0.10#	1.18 ± 0.11
Tg apo J	0.73 ± 0.09**#	0.47 ± 0.17	1.81 ± 0.96	0.93 ± 0.21	0.23 ± 0.04	0.53 ± 0.10	1.06 ± 0.10
Tg scFv-h3D6-WT+apoE	0.77 ± 0.08*	0.59 ± 0.13	1.39 ± 0.50	0.95 ± 0.14	0.22 ± 0.02	0.44 ± 0.09	1.02 ± 0.10 <sup>λ</sup>
Tg scFv-h3D6-WT+apoj	0.78 ± 0.04*	0.59 ± 0.07	1.34 ± 0.17#	0.90 ± 0.04 <sup>λ</sup>	0.22 ± 0.03	0.49 ± 0.04	1.08 ± 0.05

	GSH/tCr	Ala/tCr	Asp/tCr	PAI/tCr	MM09/tCr	MM20/tCr	MM14+Lip13a+Lip13/tCr
NTg PBS	0.24 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.37 ± 0.09	0.71 ± 0.10	1.09 ± 0.07	0.95 ± 0.15	1.56 ± 0.28
Tg PBS	0.25 ± 0.03	0.32 ± 0.11*	0.40 ± 0.14	0.72 ± 0.26	0.93 ± 0.21	1.08 ± 0.50	1.73 ± 0.81
Tg scFv-h3D6-WT	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.12	0.42 ± 0.06	0.74 ± 0.24	1.03 ± 0.23	0.88 ± 0.25	1.63 ± 0.82
Tg apo E	0.28 ± 0.03	0.17 ± 0.01#	0.46 ± 0.07	0.76 ± 0.12	0.92 ± 0.22	0.92 ± 0.52	1.72 ± 0.29
Tg apo J	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.36 ± 0.02	0.58 ± 0.30	0.99 ± 0.13	0.92 ± 0.32	1.57 ± 0.42
Tg scFv-h3D6-WT+apoE	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.36 ± 0.08	0.80 ± 0.12	1.00 ± 0.21	0.81 ± 0.49	1.54 ± 0.81
Tg scFv-h3D6-WT+apoj	0.24 ± 0.04	0.13 ± 0.06	0.41 ± 0.11	0.70 ± 0.19	0.94 ± 0.36	0.66 ± 0.17*	1.37 ± 0.47

**Taula 4. Quantificació dels nivells de diferents metabòlits a l'hipocamp, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).** La taula mostra, per a cada punt temporal analitzat, els nivells dels diferents metabòlits que han passat els criteris de selecció establerts. Els valors, que es troben normalitzats per la creatina total (tCr), s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, respecte al NTg PBS; #p<0.05 respecte al Tg PBS; λ p<0.05, respecte al Tg-scFv-h3D6 sol i & p<0.05, respecte al pèptid mimètic corresponent, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.

#### 4.3.2.2 *Perfil metabòlic del còrtex*

A la taula 5, situada al final d'aquest apartat, apareixen reflectits els valors de cada grup experimental (representats com a mitjana  $\pm$  SD) per a tots els metabòlits que han passat els criteris de selecció descrits a l'apartat 3.3.4.2. Les diferències estadísticament significatives es marquen amb \* si són respecte el grup NTg PBS, amb # si són respecte el grup Tg PBS, amb  $\lambda$  si són respecte el tractament amb scFv-h3D6-WT sol i, finalment, amb & si són respecte el tractament amb el pèptid mimètic corresponent, tot sol.

Com en el cas de l'hipocamp, primer es detallen els resultats del NAA i el mIns, que són els metabòlits més utilitzats com a marcadors en AD i, posteriorment, s'analitzen les principals diferències de la resta de metabòlits.

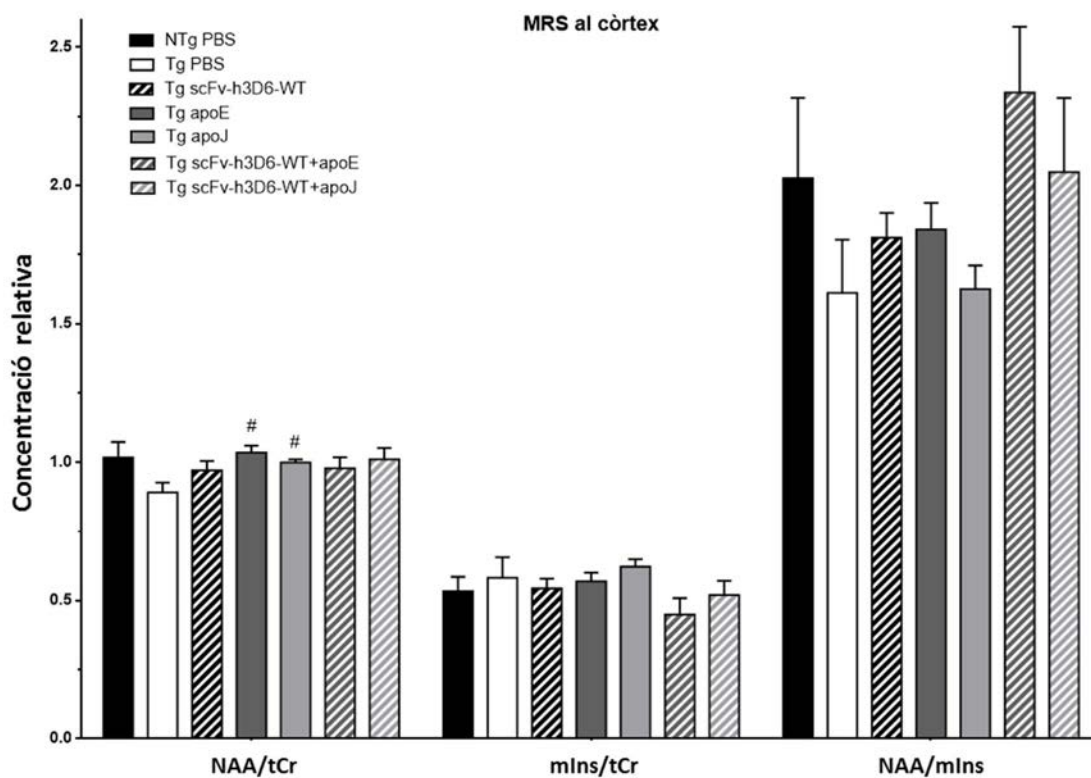
##### 4.3.2.2.1 *N-acetil aspartat (NAA)*

A la figura 79 s'observa que el valor de NAA en el grup transgènic sense tractar és més baix que el del grup no transgènic, d'acord amb el que està descrit en la bibliografia (112). Al aplicar els diferents tractaments, els valors tendeixen a ser més elevats, especialment en el cas de l'aplicació de l'apoE-MP i l'apoJ-MP sols, on les diferències respecte el Tg PBS són, estadísticament, significatives.

##### 4.3.2.2.2 *Mio-Inositol (mIns)*

Pel que fa al mio-Inositol, el valor del Tg PBS és lleugerament més alt que el del NTg PBS, tal com es podia esperar, tot i que a l'hipocamp fos al revés. En referència als tractaments, contràriament al que s'observa pel NAA, els tractaments amb pèptids mimètics sols no tenen efecte, mentre que el grup tractat amb scFv, la combinació d'aquest amb l'apoJ i, sobretot, la combinació de scFv i apoE, tendeixen a tenir uns valors més baixos, arribant, en el cas d'aquest últim grup, a ser inferior, fins i tot, al grup de ratolins no transgènics.

Aquests resultats, indicarien que el fet d'afegir pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J, al tractament amb scFv-h3D6-WT, en potencia l'efecte terapèutic.



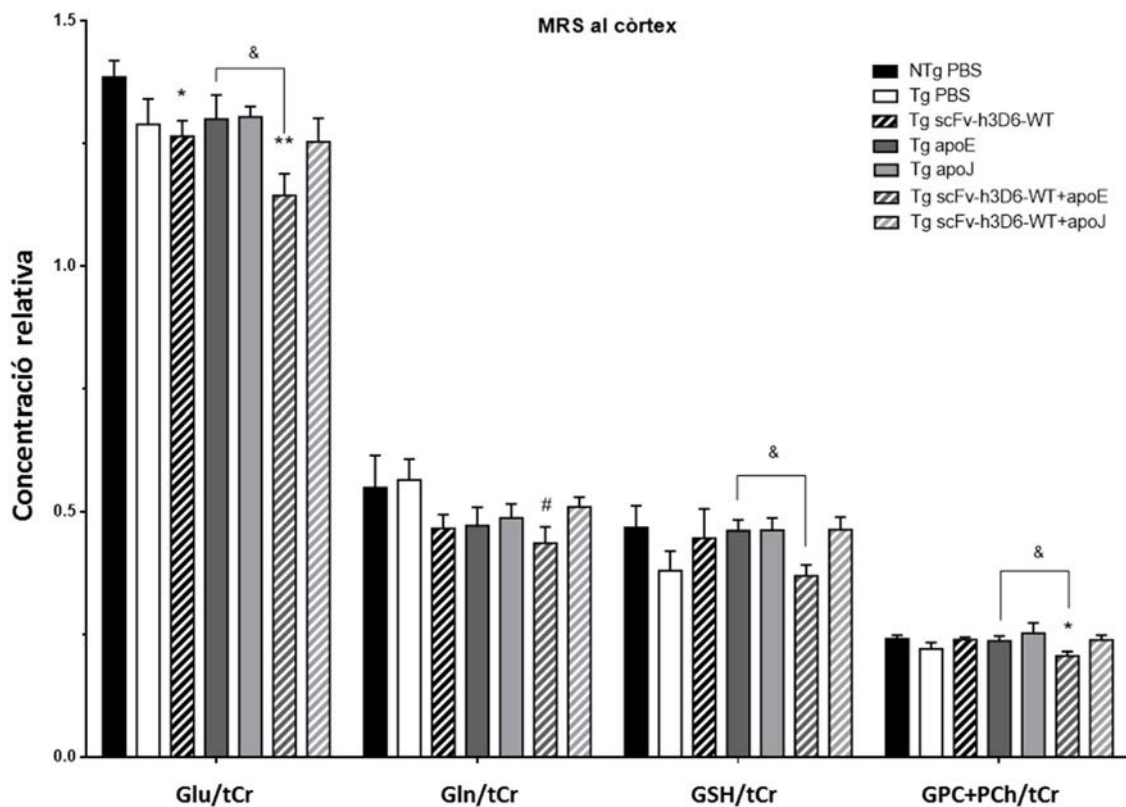
**Figura 79. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) del NAA i el mIns al còrtex.** Es mostren les diferents concentracions de N-acetil-aspartat (NAA)/creatina total (tCr), mio-inositol (mIns)/tCr i la relació entre ells (NAA/mIns), expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS, utilitzant la U de Mann-Whitney.

#### 4.3.2.2.3 NAA/mIns

En aquest cas s'observen, d'una manera més clara, les diferències ja esmentades en el cas del mIns. Ara, però, el Tg PBS té un valor clarament més baix que el NTg PBS. Els tractaments amb apoE-MP i scFv, per separat, tendeixen a tenir un valor més elevat però, quan es combinen les dues molècules en un sol tractament, el valor és molt més alt, fins i tot, que el dels ratolins no transgènics. Per la seva banda, el tractament amb apoJ-MP sol té un valor similar al Tg PBS però, quan es combina amb el scFv, aquest valor és més elevat; més, fins i tot, que el del tractament amb scFv sol, posant de manifest, altra vegada, el valor de combinar tractaments.

## 4.3.2.2.4 Altres metabòlits

De la mateixa manera que a l'hipocamp s'observa com el tractament amb apoE-MP sol, augmenta el valor d'uns quants metabòlits, en el cas del còrtex, el tractament combinat de scFv i apoE-MP, dona uns valors més baixos pels metabòlits següents: glutamat, glutamina, derivats de la colina i aspartat (figura 80).



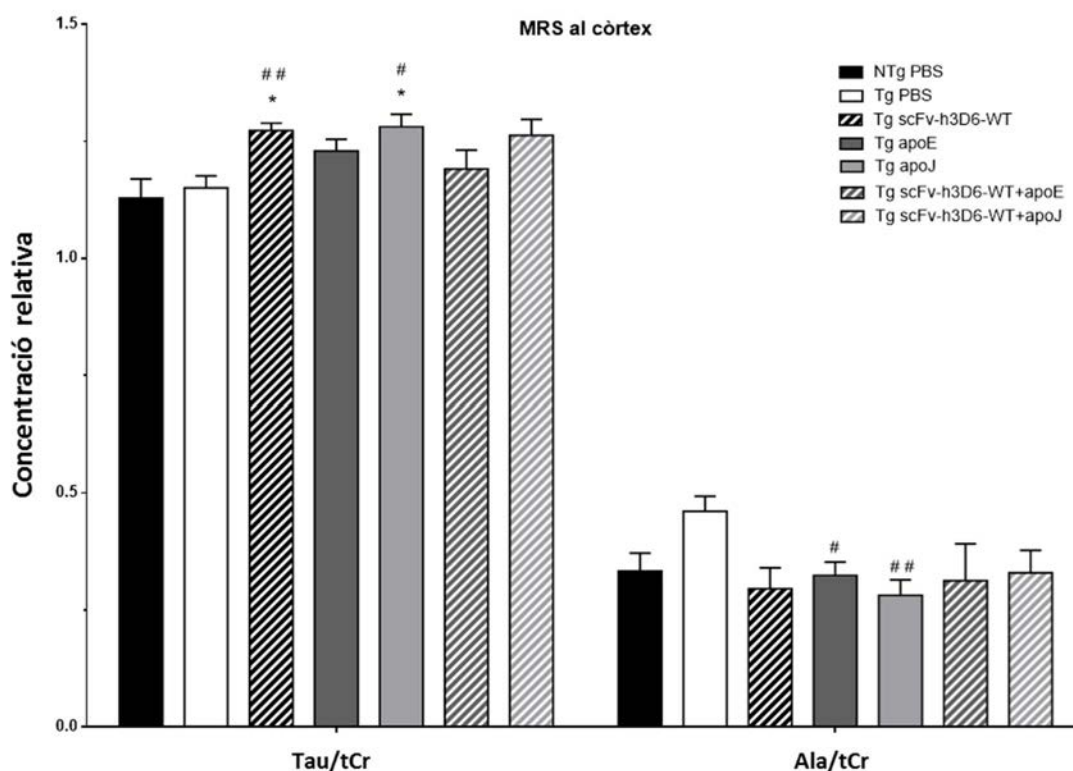
**Figura 80.** Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Glu, Gln, Asp i GPC+PCh, al còrtex. Es mostren les diferents concentracions de glutamat (Glu)/creatina total (tCr), glutamina (Gln)/tCr, aspartat (Asp)/tCr i derivats de la colina (GPC+PCh)/tCr, expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecte al NTg PBS; # $p < 0.05$  respecte al Tg PBS i &  $p < 0.05$  respecte el tractament amb el pèptid mimètic corresponent, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.

En el cas del glutamat, els derivats de la colina i l'aspartat, el Tg PBS ja té un valor més baix que el NTg PBS, i la combinació dels tractaments disminueix encara més aquest valor. Això seria, a priori, negatiu en el cas del glutamat i l'aspartat (neurotransmissor que, com el glutamat, és

un estimulador dels receptors NMDA, tot i que menys potent) ja que reforçaria la pèrdua observada en AD, però positiu en el dels derivats de la colina, tot i que el fet que el Tg sigui més baix que el NTg en complica la interpretació.

Per la glutamina, en canvi, el Tg PBS té un valor més elevat que el NTg PBS i els tractaments reverteixen aquest increment, especialment en el cas de combinar scFv i apoE-MP, suggerint un efecte molt positiu en aquest sentit.

D'altra banda, a la figura 81, s'observa com en el cas de la taurina, no hi ha diferències entre genotips, però tots els tractaments tenen valors més elevats que els grups amb PBS, especialment en el cas de l'administració de scFv i apoJ-MP, per separat.



**Figura 81. Valors obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS) de Tau i Ala, al còrtex.** Es mostren les diferents concentracions de taurina (Tau)/creatina total (tCr), i alanina (Ala)/tCr, expressades, per a cada grup d'estudi, com a mitjana ± SEM. \*p<0.05 respecte al NTg PBS; #p<0.05, ##p<0.01 respecte al Tg PBS. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.

Finalment, com ja passava a l'hipocamp, hi ha una diferència en el valor d'alanina entre genotips, essent més alt en el cas del transgènic. En aquest cas, els tractaments també són capaços de revertir aquest valor.

PERFIL METABÒLIC DEL CÒRTEX (valors expressats en mitjana  $\pm$  desviació estàndard)

	NAA/tCr	mIns/tCr	NAA/mIns	Tau/tCr	GPC+PCh/tCr	Gln/tCr	Glu/tCr
NTg PBS	1.02 $\pm$ 0.14	0.53 $\pm$ 0.13	2.03 $\pm$ 0.71	1.13 $\pm$ 0.10	0.24 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.16	1.39 $\pm$ 0.08
Tg PBS	0.89 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.15	1.61 $\pm$ 0.39	1.15 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.10	1.29 $\pm$ 0.13
Tg scFv-h3D6-WT	0.97 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.09	1.81 $\pm$ 0.22	1.27 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	0.24 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.08*
Tg apo E	1.04 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.57 $\pm$ 0.08	1.84 $\pm$ 0.23	1.23 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.09	1.30 $\pm$ 0.12
Tg apo J	1.00 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.62 $\pm$ 0.06	1.62 $\pm$ 0.19	1.28 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.25 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.07	1.30 $\pm$ 0.05
Tg scFv-h3D6-WT+apoE	0.98 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.12	2.34 $\pm$ 0.48	1.19 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>*λ</sup>	0.44 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.14 $\pm$ 0.10 <sup>*λ</sup>
Tg scFv-h3D6-WT+apoJ	1.01 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.12	2.05 $\pm$ 0.60	1.26 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.04	1.25 $\pm$ 0.11

	GSH/tCr	Ala/tCr	Asp/tCr	PAI/tCr	MM09/tCr	MM20/tCr	MM14+Lip13a+Lip13/tCr
NTg PBS	0.27 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.34	1.29 $\pm$ 0.18	1.86 $\pm$ 0.43	3.49 $\pm$ 2.19
Tg PBS	0.27 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.25	0.80 $\pm$ 0.56	1.24 $\pm$ 0.33 <sup>**</sup>	9.44 $\pm$ 10.11
Tg scFv-h3D6-WT	0.24 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.14	0.93 $\pm$ 0.21	1.15 $\pm$ 0.41	1.27 $\pm$ 0.40	5.84 $\pm$ 4.84
Tg apo E	0.26 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.46 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.22	1.14 $\pm$ 0.37	1.72 $\pm$ 0.54	4.08 $\pm$ 1.49
Tg apo J	0.26 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.08 <sup>##</sup>	0.46 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.18	1.33 $\pm$ 0.41	1.43 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>	2.58 $\pm$ 1.37
Tg scFv-h3D6-WT+apoE	0.25 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>&amp;</sup>	1.14 $\pm$ 0.54	0.99 $\pm$ 0.27	1.13 $\pm$ 0.47	4.93 $\pm$ 2.77
Tg scFv-h3D6-WT+apoJ	0.26 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.11	0.46 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.37	1.53 $\pm$ 0.34	2.92 $\pm$ 0.77

**Taula 5. Quantificació dels nivells de diferents metabòlits al còrtes, obtinguts amb espectroscòpia per ressonància magnètica (MRS).** La taula mostra, per a cada punt temporal analitzat, els nivells dels diferents metabòlits que han passat els criteris de selecció establerts. Els valors, que es troben normalitzats per la creatina total (tCr), s'expressen, per a cada grup d'estudi, com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, respecte al NTg PBS; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 respecte al Tg PBS;  $\lambda$   $p$ <0.05, respecte al Tg-scFv-h3D6 sol i &  $p$ <0.05, respecte al pèptid mimètic corresponent, sol. S'ha utilitzat el test estadístic U de Mann-Whitney.



## 5. DISCUSSIÓ GENERAL

Tot i que els resultats s'han anat discutint a mesura que s'anaven presentant, en aquest apartat s'analitza, des d'un punt de vista més global, la informació que ens aporta la suma de tots ells, intentant respondre a les qüestions que es plantejaven a l'inici d'aquest treball.

### 5.1 Posada a punt del mètode de diagnòstic d'AD en el model 3xTg-AD

#### 5.1.1 *Caracterització del model 3xTg-AD als 12 mesos*

En primer lloc, abans de discutir l'efecte dels tractaments en les diferents zones i punts temporals analitzats, cal establir en quins paràmetres hi ha diferències entre els ratolins transgènics i els no transgènics i, per fer-ho, començarem a discutir els resultats obtinguts als 12 mesos, ja que és on es situa el punt final de l'experiment i, per tant, podem afegir a la discussió les anàlisis bioquímiques i histològiques. Recordem que, aquestes últimes, són les que corroboren el diagnòstic de la malaltia i, per tant, les que utilitzem per decidir si la resta de paràmetres són bons marcadors, en aquest cas, de la patologia amiloide.

Segons descriuen Oddo *et al.* en la primera publicació sobre el 3xTg-AD, aquest mimetitzava la patologia de l'A $\beta$  com la de tau, les quals caracteritzen histològicament la malaltia d'Alzheimer en humans. A més, la desenvolupa en funció de l'edat i amb el mateix patró regional. Tot i que en el següent apartat se'n parla més detalladament, de forma resumida consisteix en l'aparició d'A $\beta$  intracel·lular al neocòrtex als 3 mesos i a l'hipocamp a partir dels 6. Les plaques extracel·lulars també apareixen primer al còrtex frontal (a partir dels 6 mesos) i, més tard, a l'hipocamp, on la seva presència és evident a partir dels 12 mesos. És en aquesta edat, també, quan es comença a desenvolupar la patologia de la proteïna tau a l'hipocamp la qual, posteriorment, passa al còrtex (128).

Així doncs, els 12 mesos, sembla una bon punt temporal per analitzar la patologia de l'A $\beta$ , ja que aquesta està ben desenvolupada. A aquesta edat, la descripció del model 3xTg-AD que es pot fer, segons els paràmetres que s'han analitzat en aquest treball, és la següent:



- Pel que fa a l'hipocamp, el 3xTg-AD té un número de neurones 6E10+ significativament més alt que el control, tan a la CA1 com a la CA2/CA3. A més, la intensitat d'aquest marcatge també és més elevada, especialment a la CA1. Al mesurar la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> de tot l'hipocamp (mitjançant ELISA), aquesta també es veu augmentada. Aquests resultats encaixen bé amb la disminució significativa del volum de l'hipocamp mesurat *in vivo* per MRI, tècnica amb la qual també s'observa un augment en els valors de T<sub>2</sub> i d'ADC, que no és evident a què responen. Per MRS, s'han detectat diverses alteracions en el perfil metabòlic entre les que destaquen un augment significatiu del mio-Inositol i un augment, també, de la glutamina. A part, s'ha detectat un augment d'IL-6 en el teixit homogenat.
- Pel que fa al còrtex, el 3xTg-AD presenta un augment significatiu tan del número de neurones 6E10+ com de la intensitat d'aquest marcatge, respecte el no transgènic. També s'ha detectat un augment en la quantitat total d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, als extractes del còrtex i l'amígdala (mesurats conjuntament). Aquests resultats encaixen amb la disminució significativa de volum del còrtex mesurat per MRI i, mentre que l'ADC no varia, el T<sub>2</sub> augmenta amb l'excepció del còrtex entorrinal, on el valor de T<sub>2</sub> del transgènic és més baix que el del no transgènic. Pel que fa a la MRS, s'ha vist una lleugera disminució del NAA i un augment del mio-Inositol i la glutamina, tot i que cap és estadísticament significatiu. Finalment s'ha observat, també, un augment de la IL-6 en els homogenats de teixit (còrtex i amígdala).
- A part de les anàlisis a les regions de l'hipocamp i el còrtex, als 12 mesos s'ha descrit un augment del nombre de plaques amiloides a les àrees que integren el còrtex cerebral i una disminució significativa dels volums del cervell total, del cerebel i de l'encèfal total i, també, del colesterol en sang. En les anàlisis de la sang per les transaminases s'han trobat disminucions en l'AST i l'ALT.

Un dels trets que més sobta és que, encara que s'han observat en la majoria de regions, el número de plaques quantificades no és gaire elevat i, de fet, les diferències entre genotips no són significatives tot i l'evidència del desenvolupament de la patologia d'A $\beta$  que ens donen tan la resta d'anàlisis histològiques com la quantificació d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> en els extractes. D'aquesta manera, les nostres observacions estarien en la línia dels estudis que han apuntat una aparició de les plaques molt més tardana a la descrita originalment (148,167). Al 12 mesos doncs, ens trobaríem

a l'inici d'aquesta etapa d'aparició de plaques amiloides, amb la qual cosa no podríem veure'n l'evolució ni associar-hi biomarcadors *in vivo*.

Precisament, un dels marcadors que esperàvem que ens indiqués la presència de plaques era la disminució del  $T_2$ , que no només no disminueix sinó que augmenta. Aquests resultats prenen sentit si argumentem que el desenvolupament de les plaques no està gaire avançat, especialment, en les regions d'interès analitzades *in vivo*. Com s'ha descrit a l'apartat 4.1.4.2, la majoria de les plaques s'han observat a la zona dels còrtexs piriforme i entorrinal (on sí que hi ha el  $T_2$  disminuït), amb la qual cosa les diferències observades fora d'aquesta zona han de tenir a veure amb algun altre fenomen.

Alguns autors han descrit que el valor de  $T_2$  no està associat, només, a la presència de plaques, i han proposat altres factors que influenciarrien aquest valor en sentit contrari, com són la neuroinflamació, la neurodegeneració, la desmielinització, l'edema o altres patologies de la matèria blanca (168,169). De fet, la relació entre la presència de plaques i la disminució de  $T_2$  no se sap ben bé a què es deu. Una hipòtesi apunta a que un dels principals factors podria ser el ferro que s'acumula a la vora de les plaques, tot i que existeix certa controvèrsia en com es correlaciona amb el valor de  $T_2$  (145). De totes maneres, sembla que no seria fins a partir dels 12 mesos que, aquest, tindria un pes important en el valor de  $T_2$  del teixit en qüestió (170).

Dos dels paràmetres que s'han analitzat en aquest treball, la IL-6 a partir d'extractes de teixit i el mIns mitjançant MRS, estan relacionats amb inflamació i, per tant, els seus resultats ens aporten informació sobre aquest fenomen que, com s'ha dit, podria afectar al valor de  $T_2$  dels diferents teixits. Ambdós paràmetres són més elevats al 3xTg-AD que al grup control tan a l'hipocamp com al còrtex, indicant, de forma clara, que en aquest model existeix algun tipus de procés inflamatori que implica l'activació de la glia.

Diferents estudis han determinat que a partir dels 2-3 mesos ja es comença a donar la resposta inflamatòria en el 3xTg-AD, amb l'activació de micròglia, astròcits i diferents marcadors d'inflamació i, de fet, Janelsins *et al.* observen un major increment d'aquests marcadors als 6 mesos, al còrtex entorrinal (148,171). Aquests processos inflamatoris semblen precedir l'aparició de plaques de manera que, als 12 mesos, té sentit que aquesta patologia ja es trobi desenvolupada (171).

El fet que observem un increment tan a elevat de la IL-6 i del mIns, però que aquest no es reflecteixi en la mesura dels valors de  $T_2$ , on la variació entre el 3xTg-AD i el control, és pràcticament nul·la (en el cas de l'hipocamp), ens indica que els resultats de  $T_2$  no són conseqüència directa dels processos inflamatoris i, per tant, hi ha d'haver algun factor més

que influeixi aquest paràmetre. A més, si s'agafen els valors obtinguts amb els tractaments (comentats més endavant, apartat 5.2), la falta de correlació entre inflamació i  $T_2$  es fa encara més evident.

D'aquesta manera, queda palès el camí que encara queda per recórrer abans no es pugui fer servir el valor de  $T_2$  com a marcador de la patologia amiloide. Especialment desaconsellable sembla utilitzar-lo com a marcador de diagnòstic precoç ja que, per observar-ne una disminució important, requereix d'una elevada acumulació amiloide i això no es dona fins a estadis avançats de la malaltia.

D'altra banda, cal remarcar que gairebé la totalitat dels estudis que parlen del  $T_2$  s'han fet en models d'Alzheimer diferents al 3xTg-AD ja que, sorprenentment, els estudis que utilitzen les tècniques de MRI en aquest model són, fins el moment, molt escassos, havent trobat, només, un estudi sobre els valors de  $T_2$  descrivint, precisament, l'absència de variacions (169).

Pel que fa als altres dos paràmetres analitzats per MRI, tenim uns resultats molt diferents i, mentre que amb els valors d'ADC, pràcticament no s'observen diferències entre genotips (només un petit augment a l'hipocamp dels transgènics), a les anàlisis de volumetria les diferències són evidents, amb una disminució estadísticament significativa dels volums dels animals transgènics en totes les zones analitzades, excepte el bulb olfatori.

Sembla doncs, que la volumetria, sigui de la regió que sigui (amb la possible excepció del bulb olfatori), és un bon indicador del grau de patologia que presenta el 3xTg-AD als 12 mesos d'edat. En aquest model, els 3 únics estudis de volumetria realitzats fins ara, s'han realitzat a edats molt avançades i no han coincidit en els resultats. El que s'ha descrit és (1) una atrofia a la zona del còrtex sense variacions de volum intracranial, als 18 mesos (172); (2) l'augment del volum en els ventricles laterals als 14 i 20 mesos (173); i, finalment, (3) l'absència de canvis de volum en el còrtex i l'hipocamp als 22 mesos (174). Així doncs, els nostres resultats són els primers en reportar una disminució del volum en gairebé totes les zones del cervell en aquest model. En altres però, la disminució de volum està prou establerta i, de fet, es relaciona amb neurodegeneració tan en models animals com en pacients d'AD (175,176).

Per altra banda, en les mesures d'ADC no s'observen gaires diferències, amb la qual cosa no sembla un paràmetre que ens expliqui el que observem per histologia. Els valors d'ADC, que mesuren la difusió de l'aigua en el teixit, estan molt relacionats amb inflamació i edemes, però també es poden veure afectats per desajustaments neuronals o per canvis en la matèria blanca que derivin en una expansió de l'espai extracel·lular (177,178). De fet, tot i que s'han descrit increments dels valors d'ADC en pacients d'AD lligats a aquests fenòmens, en el 3xTg-AD només

un estudi ha analitzat imatges de difusió, reportant l'absència de canvis en la matèria blanca (169). Els nostres resultats doncs, confirmarien que els possibles canvis neuronals que pateix 3xTg-AD respecte als controls no alteren els valors d'ADC.

En referència als anàlisi per MRS, només s'han descrit un parell d'estudis *ex vivo* en el 3xTg-AD basats en la ressonància dels nuclis de  $^{13}\text{C}$  i un en la de  $^1\text{H}$  (118,179,180). Així doncs, que nosaltres sapiguem, som els primers a descriure el perfil metabòlic d'aquest model, *in vivo*.

Als 12 mesos veiem com, a part de les diferències significatives pel mio-Inositol a l'hipocamp ja comentades, la glutamina augmenta en el 3xTg-AD tan a l'hipocamp com al còrtex i i el NAA disminueix en el còrtex, indicant mort cel·lular.

Soprèn que el NAA només estigui lleugerament disminuït al còrtex ja que és el metabòlit més utilitzat en malalties neurodegeneratives, AD inclòs. En diferents models murins d'AD s'ha trobat una disminució de NAA, que es relaciona amb una pèrdua de la viabilitat neuronal, la qual sembla que també tenim al 3xTg-AD (pel volum, per la patologia amiloide, etc.) (176). De fet està descrit que aquest model replica especialment bé la disfunció sinàptica (128). Tot i així, a jutjar pels resultats, no recomanaríem utilitzar aquest metabòlit com a marcador de la malaltia en aquest model, almenys, fins als 12 mesos d'edat.

Ara bé, la relació d'aquest marcador amb el mio-inositol (que està descrit que augmenta en AD (124)) s'utilitza bastant, ja que sol maximitzar les diferències existents. La relació NAA/mIns, tot i no aconseguir diferències significatives, té un valor més baix tan a l'hipocamp com al còrtex.

L'altre metabòlit que veiem augmentat, la glutamina, no està tant estudiat pel que fa a la seva relació amb l'AD. Aquest metabòlit, que s'ha relacionat, sobretot, amb anomalies hepàtiques (117), s'ha trobat augmentat en aquest mateix model, en l'únic estudi que s'ha fet amb ressonància de nuclis d'hidrogen (*ex vivo*) (118). En aquest mateix estudi s'ha observat una correlació de la glutamina amb la tau hiperfosforilada, de manera que aquest metabòlit podria ser un indicador de la patologia de tau. A més, s'apunta que, tan la glutamina com el glutamat, podrien ser els marcadors de ressonància magnètica més primerencs, mostrant una correlació amb el dèficit cognitiu.

A més, hi ha diversos metabòlits que, tot i no variar de forma clara, val la pena esmentar, ja que diferents estudis els han proposat com a marcadors de fenòmens relacionats amb la malaltia. Són els casos de la taurina, a la qual se li atribueix un paper similar al que té el mIns en humans i se n'ha descrit el seu augment en models d'AD (123); del glutamat, que és el principal neurotransmissor d'excitació i s'ha trobat disminuït en AD (181); i dels derivats de la colina, que

alguns estudis apunten al seu increment en AD a causa d'una disrupció de la membrana cel·lular (120).

Finalment, les anàlisis de plasma han donat una disminució clara del colesterol al 3xTg-AD i una disminució, no tan marcada, de les transaminases AST i ALT.

Per una banda, el metabolisme del colesterol està clarament relacionat amb l'AD situant-se, l'apoE, com a principal nexa entre la patologia del colesterol i la malaltia. Fins ara s'ha associat la hipercolesterolèmia amb l'AD però els mecanismes pels quals es produeix aquesta relació no estan clars, de manera que tot i que s'esperarien uns nivells de colesterol més alts al 3xTg-AD, s'haurien de fer més estudis per assegurar que els resultats obtinguts contradiuen la bibliografia (47,160).

Per altra banda, la disminució de les transaminases no és tan clara ja que la variabilitat dins de cada grup és molt elevada. Tot i així, la disminució o el no augment de les transaminases al 3xTg-AD ens podria indicar que la funció hepàtica no està afectada, al menys fins als 12 mesos.

### **5.1.2 Desenvolupament regional i temporal de la malaltia**

El fet d'haver desenvolupat un estudi *in vivo* i longitudinal en el temps, ens permet veure l'evolució dels diferents paràmetres analitzats en els mateixos individus, de manera que evitem la variabilitat que es dona en el cas dels estudis transversals, on l'evolució dels paràmetres s'extreu a partir d'individus diferents. Això no obstant, no tenim anàlisis histològiques i bioquímiques a tots els temps (només als 12 mesos) de manera que, en aquest apartat, analitzarem les diferències entre genotips als 5, 7 i 9 mesos, pels paràmetres següents: volumetria, T<sub>2</sub>, ADC i perfil metabòlic. Un estudi longitudinal on s'haguessin sacrificat uns quants animals a cada punt temporal, ens podria haver permès realitzar unes anàlisis més completes.

Cal afegir que la interpretació biològica de cada un dels paràmetres mesurats ja s'ha realitzat en l'apartat anterior i, per tant, aquí no es repetirà per no caure en la redundància. En canvi, el que s'analitzarà en aquest apartat és l'evolució dels diferents paràmetres al llarg del temps, comparant-los amb les diferents etapes de la malaltia descrites a la bibliografia.

Als 5 mesos, el 3xTg-AD ja té un volum significativament més petit que el no transgènic en totes les àrees analitzades. Aquestes diferències, excepte en el cas del bulb olfatori, es mantenen al llarg del temps fins als 12 mesos, especialment en el cas de l'hipocamp on les diferències sempre són significatives. Així doncs, podem conjecturar que aquestes diferències

de volum, que hem comentat que es relacionen sovint amb neurodegeneració, o bé es desenvolupen des del naixement, o bé ho fan a partir d'algun moment anterior als 5 mesos, probablement com a conseqüència de la patologia d'AD. El fet que s'hagi descrit la presència d'A $\beta$  intracel·lular als 2-3 mesos, podria ser una explicació plausible de l'observació d'aquestes diferències als 5 mesos (128,148). Respecte la controvèrsia de l'edat de detecció d'A $\beta$  intracel·lular en l'hipocamp, Oddo *et al.* descriuen a l'article de presentació del model 3xTg-AD (125), que l'A $\beta$  intracel·lular no apareix a l'hipocamp fins als 6 mesos, però altres estudis posteriors, com el de Mastrangelo *et al.* (148), ja l'observaven als 2-3 mesos. Els nostres resultats advocarien per uns canvis anteriors als 5 mesos d'edat també a l'hipocamp, que podrien encaixar amb els descrits per Mastrangelo *et al.* (148). Per comprovar si la disminució de volum que observem en el 3xTg-AD es correlaciona amb la presència d'A $\beta$  intracel·lular, caldria iniciar les sessions de MRI molt abans dels 5 mesos. De fet, el més aconsellable seria realitzar un seguiment a partir del naixement (o deslletament) dels ratolins.

Pel que fa als altres dos paràmetres mesurats per MRI, els valors de T<sub>2</sub> i els d'ADC evolucionen de manera diferent al llarg del temps. D'una banda, el T<sub>2</sub> es manté, sempre, més elevat en el 3xTg-AD, tan a l'hipocamp com al còrtex, amb excepció de la zona del còrtex entorrinal, on el 3xTg-AD té un valor de T<sub>2</sub> més baix als 9 i 12 mesos. Seguint el raonament que fèiem a l'apartat 5.1.1, sembla clar que ens trobem en una fase de la malaltia en què encara no s'han desenvolupat la majoria de les plaques d'A $\beta$  i que algun altre factor influeix perquè els valors de T<sub>2</sub> del 3xTg-AD siguin més elevats que els del control.

Hi ha dos fets però, que val la pena comentar: el primer, és que els valors de T<sub>2</sub> van disminuint a mesura que avança el temps, especialment en el 3xTg-AD, de manera que sembla evident que algun mecanisme relacionat amb l'envelliment està afectant el valor de T<sub>2</sub>. Aquest mecanisme, que no és suficient per veure diferències significatives entre els diferents genotips, almenys fins als 12 mesos, podria ser l'acumulació del pèptid A $\beta$ .

El segon fet és que justament a la zona del còrtex entorrinal, que és on trobem més plaques als 12 mesos, els valors de T<sub>2</sub> del 3xTg-AD són més baixos que els del control a partir dels 9 mesos, amb la qual cosa podríem hipotetitzar que és l'edat en què s'accelera l'acumulació d'A $\beta$  extracel·lular. Aquests resultats ens portarien a afirmar que a la zona del còrtex entorrinal (i zones limítrofes, ja que és difícil de delimitar exactament aquestes estructures) és on comença la formació de plaques, en contraposició a Oddo *et al.* que afirmen que aquestes es donen, en primer lloc, al còrtex frontal (128). Altres autors com Mastrangelo *et al.* però, ja postulen el

còrtex entorrinal com un dels primers punts on apareixen plaques d'A $\beta$ , en consonància amb el paper que s'atribueix a aquesta regió en les fases inicials de la malaltia (148,171).

Per tant, potser sí que es pot utilitzar el T<sub>2</sub> com a marcador *in vivo* de plaques (tenint en compte que segueix estant influït per altres factors) o de possibles llocs on apareixeran plaques, però, en tot cas, seria un marcador per estadis avançats de la malaltia. A més, per determinar què precedeix a què, si la disminució de T<sub>2</sub> o l'aparició de plaques, caldria disposar de talls histològics als 7, 8, 9 i 10 mesos, com a mínim.

D'altra banda, els valors d'ADC no tenen una tendència constant en el temps. La interpretació d'aquest resultat no és obvia, ja que no tenim un control positiu d'edema vasogènic. De totes maneres, tal com s'ha mencionat a l'apartat 5.1.1., els nostres resultats a 12 mesos indicarien que els canvis neuronals que pateix el 3xTg-AD respecte als controls, que inclouen inflamació tal com mostra l'increment de IL-6 i mIns, no alteren els valors d'ADC.

Analitzant l'evolució del mIns, que com hem comentat prèviament està relacionat amb l'activació de les cèl·lules glials, veiem com a mesura que avança el temps, les diferències entre 3xTg-AD i control són més evidents, des dels 5 mesos on el mIns està lleugerament més elevat en el 3xTg-AD fins a edats avançades (9 i 12 mesos), on aquestes diferències són més grans, especialment als 12 mesos, a l'hipocamp, on aquestes són significatives. Encara que al còrtex el màxim de mIns el trobem a 7 mesos, la conclusió general es que es dona una resposta progressiva de la glia, almenys fins als 12 mesos d'edat. Aquests resultats reafirmen la hipòtesi que descarta la relació directa entre inflamació i T<sub>2</sub> ja que, com acabem d'explicar, mentre que la resposta de la glia és progressiva, augmentant els valors de mIns a mesura que avança l'edat, els valors de T<sub>2</sub> fan el contrari i disminueixen. Com ja s'ha mencionat, el fet que la càrrega amiloide també augmenti progressivament fa que els valors de T<sub>2</sub> disminueixin i, per tant, la interpretació dels valors de T<sub>2</sub> esdevé molt complicada.

Els resultats de mIns els trobem sovint expressats juntament amb el NAA, en la relació NAA/mIns. El NAA, que a priori marca viabilitat neuronal, no segueix un patró clar i és difícil formular cap hipòtesi amb un mínim de fonament, com també passa en el cas de la Tau. En la relació NAA/mIns però, sí que veiem que aquesta es manté constant, essent més baixa en tots els punts i obtenint la diferència màxima als 7 mesos al còrtex, on és significativa i, als 9-12, a l'hipocamp, seguint el patró del mIns.

D'altra banda, la PAI es troba bastant més elevada al 3xTg-AD als 5 mesos (significativament en el cas de l'hipocamp) però aquesta diferència es va perdent i, de fet, als 12 mesos ja no existeix al còrtex i es troba invertida a l'hipocamp. Si reprenem la hipòtesi que un increment de

PAI pot tenir un efecte neurotòxic (151), el que ens dirien aquests resultats és que la via utilitzada per produir aquesta toxicitat està molt activa als primers mesos però va desapareixent a mesura que avança l'edat. Aquest fet podria tenir alguna cosa a veure amb l'A $\beta$  intracel·lular ja que s'ha observat que, aquest, apareix d'una forma evident en fases primerenques de la malaltia però que, a partir de cert punt (especialment en edats avançades, que és quan incrementa el nombre de plaques extracel·lulars), hi ha una mena d'intercanvi intra-extracel·lular que provoca una disminució del primer en benefici del darrer (182).

Per últim, la glutamina es troba més elevada tan a l'hipocamp com al còrtex del 3xTg-AD, a totes les edats estudiades. Aquest metabòlit, que ha estat tradicionalment lligat a disfuncions hepàtiques, també s'ha relacionat amb la patologia de tau, com ja s'ha dit anteriorment (118). En el nostre cas, aquest augment ja es dona als 5 mesos, mentre que fins ara no s'ha descrit que la hiperfosforilació de tau aparegui abans dels 6 mesos (128,148). A més, les diferències es mantenen en el temps, i no augmenten com s'esperaria que passés si fos una conseqüència directa del desenvolupament de la patologia de tau. De totes maneres, no podem descartar del tot cap hipòtesi ja que no hem realitzat anàlisis hepàtiques en etapes primerenques ni hem analitzat la patologia de tau.

## **5.2 Eficàcia i seguretat dels tractaments amb scFv-h3D6-WT i scFv-h3D6-EL**

Un cop caracteritzat el model i analitzats els diferents paràmetres al llarg del temps és moment de veure com els tractaments aplicats modifiquen aquests paràmetres i si són capaços de millorar la patofisiologia de la malaltia.

### **5.2.1 *scFv-h3D6-WT***

El scFv-h3D6-WT ja s'havia administrat en ratolins anteriorment (76). Els resultats obtinguts suggerien beneficis tan a nivell cel·lular com molecular, ja que després d'una sola dosi als 5 mesos, el scFv-h3D6-WT era capaç de recuperar la velocitat de natació del 3xTg-AD, millorar els dèficits de memòria i aprenentatge, disminuir la quantitat d'oligòmers d'A $\beta$  al còrtex i al bulb olfactori i retornar a nivells normals les apolipoproteïnes E i J, les quals estaven incrementades al model. Aquest, però, és el primer estudi en què s'aplica una teràpia consistent en diverses



administracions del fragment d'anticòs i es fa una monitorització *in vivo* dels ratolins al llarg del temps.

En primer lloc analitzem els efectes que té en la volumetria de les diferents regions ja que, com hem comentat, és un dels paràmetres que ha donat unes diferències més clares entre genotips. Tractant els 3xTg-AD amb scFv-h3D6-WT observem com el volum de les diferents regions no és tant petit com amb absència del tractament, de manera que podem considerar que té un cert efecte protector. A l'hipocamp, sembla que amb la primera administració als 5 mesos no n'hi ha prou perquè aquest efecte es manifesti, un efecte que és màxim al punt dels 9 mesos. Al còrtex en canvi, als 5 mesos el volum del grup tractat és significativament més elevat que el 3xTg-WT sense tractar, de manera que sembla que l'efecte és immediat. Aquest volum superior es manté en el temps, tot i perdre la significació. Els volums del cervell, l'encèfal i el bulb olfatori (en menor mesura) segueixen aquest mateix patró, mentre que el del cerebel, tot i ser significativament més elevat als 5 mesos, s'igualava amb el del grup no tractat als 9 i 12 mesos, com si es perdés l'efecte del tractament. Aquesta possible pèrdua pot ser deguda a que l'increment en càrrega amiloide que comporta l'edat fa necessària l'administració de dosis més altes.

En general doncs, sembla que els efectes del tractament es detecten amb el mateix patró regional de la malaltia, actuant primer sobre el còrtex i, posteriorment, sobre l'hipocamp. A més, l'efecte observat per volumetria als 5 mesos encaixa bastant bé amb la capacitat de retirar oligòmers d'A $\beta$  que havien descrit Giménez-Llort *et al.* (85), capacitat que s'observava al còrtex però no a l'hipocamp. En el seu estudi, però, descrivien efecte al bulb olfatori però no al cerebel mentre que, en el nostre cas, sí que observem un efecte clar al cerebel i només una lleugera tendència al bulb olfatori. El cerebel és una regió que juga un paper en l'AD humana en fases avançades de la malaltia però, Esquerda-Canals *et al.*, ja descrivien diferències en el 3xTg-AD als 5 mesos i, de fet, observaven com el scFv-h3D6-WT tenia un efecte protector en les neurones del nucli cerebel·lar profund (86). Per identificar a què és deguda la diferència de resultats en el cerebel, caldria fer més estudis d'aquesta zona considerada secundària a l'hora de tractar el desenvolupament de la malaltia.

Cal afegir que el tractament també té un cert efecte sobre el volum dels ratolins control, de manera que, en general, es repliquen les variacions que s'obtenen en els 3xTg-AD, tot i que menys marcades. Això ens suggereix un efecte del scFv-h3D6-WT sobre l'A $\beta$  endogen dels ratolins, la qual cosa ja va ser suggerida al primer estudi del grup als 5 mesos (87).

D'altra banda, les anàlisis histològiques als 12 mesos confirmen l'efecte que té el tractament sobre els 3xTg-AD, disminuint tan el nombre de neurones 6E10+ com la intensitat d'aquest marcatge (ambdós paràmetres accentuats en el cas del còrtex). A més, disminueix també el nombre de plaques d'A $\beta$  dels grups tractats respecte els no tractats i la quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> tan a l'hipocamp com, sobretot al còrtex. El fet que en els resultats *post-mortem* es demostrï que el tractament té més efecte al còrtex que a l'hipocamp podria estar relacionat amb el fet que el tractament sembla que tardi més a actuar a l'hipocamp que al còrtex, de manera que als 5 mesos tindriem, a partir de la volumetria de les diferents zones, un indicador del futur desenvolupament de la malaltia d'AD.

Pel que fa als altres paràmetres analitzats per MRI, les diferències entre genotips no són tan clares com en el cas de la volumetria. Tot i així, hi ha alguns aspectes generals que val la pena comentar.

Per exemple, pel que fa al T<sub>2</sub>, a l'hipocamp el valor és més elevat en els 3xTg-AD tractats amb WT que en els no tractats, allunyant-se així, dels ratolins control. Al còrtex, en canvi, als 5 i 7 mesos el valor del grup tractat és més petit però, als 9 i 12, no. Això podria significar dues coses: o bé que a l'hipocamp, i en edats avançades, també al còrtex, el tractament disminueix la càrrega amiloide, de manera que el T<sub>2</sub> augmenta, o bé, que el tractament en aquestes zones desencadena alguna reacció (inflamatòria, per exemple) que fa que augmenti, encara més, l'espai extracel·lular.

A més, els valors d'ADC són més elevats quan s'aplica el tractament, en tots els temps i regions analitzades, allunyant-se del valor obtingut pels ratolins control, en comptes d'acostar-s'hi. Tot i que les diferències no són significatives, sembla evident que el tractament amb scFv-h3D6-WT està desencadenant algun tipus de fenomen que afecta als tan als valors de T<sub>2</sub> com als d'ADC. Si comparem aquests resultats amb els obtinguts per la IL-6 en les anàlisis d'inflamació, on els grups tractats tenen nivells de IL-6 molt més baixos que els no tractats, podríem descartar que aquest fenomen tingui una relació directa amb la inflamació. A més, en la quantificació del mIns per MRS, també s'observa com el tractament obté uns valors més baixos que el 3xTg-AD sense tractar, acostant-se als valors dels ratolins control, reforçant la idea que els valors alts de T<sub>2</sub> no es deriven, directament, d'un procés inflamatori. Aquesta disminució en mIns l'observem al còrtex a totes les edats però a l'hipocamp només a edats avançades, com passava en el cas de la volumetria. Per tant, caldran més estudis per determinar què està fent variar els valors de T<sub>2</sub> i d'ADC, a part de la pròpia patologia amiloide.

Finalment, el tractament amb scFv-h3D6-WT també modifica el perfil metabòlic dels ratolins, tot i que en pocs casos les diferències són estadísticament significatives. A part de l'efecte ja comentat sobre els valors de mIns, el tractament augmenta la relació NAA/mIns en gairebé tots els temps analitzats, reflectint la seva eficàcia. En referència a la Gln i la PAI, el tractament sí que és capaç d'apropar els valors del 3xTg-AD als dels ratolins control, especialment en edats primerenques on les diferències són significatives (a l'hipocamp). Que tinguin efecte als 5 mesos a l'hipocamp és contradictori amb el que havíem vist fins ara, de manera que podria ser que el tractament sí que tingués algun efecte a edats prematures que, tot i no fer-se evident en la patologia amiloide, sí que es pogués detectar amb altres marcadors. El que sí que té lògica és que, a mesura que avanci l'edat, aquest efecte es vagi perdent, ja que hi ha un consens bastant ampli en què el poder de la immunoteràpia rau en aplicar-la en els primers estadis de la malaltia. Així doncs seria interessant realitzar estudis longitudinals començant a administrar el scFv-h3D6-WT abans dels 5 mesos per tal d'incrementar les possibilitats d'èxit.

Per últim, esmentar que el tractament amb scFv-h3D6-WT no modifica els nivells de colesterol en sang però sí que disminueix els valors de transaminases AST i ALT de forma clara. L'estudi del nivell de les transaminases s'emmarca dins els estudis de seguretat dels fàrmac de manera que, amb aquests resultats, sembla que no provoca una afectació del fetge sinó que, al contrari, apunta als efectes beneficiosos del tractament amb scFv-h3D6-WT. És temptador plantejar que la disminució de l'A $\beta$  endogen als ratolins NTg relaxa la funció hepàtica, ja que l'A $\beta$  s'ha tobat al fetge (162). De totes maneres, amb els resultats obtinguts, només podem afirmar que els tractaments no han provocat hepatotoxicitat.

Així doncs, tot i que el tractament amb el scFv-h3D6-WT sembla tenir un efecte beneficiós en els ratolins 3xTg-AD i és capaç d'acostar la majoria de paràmetres analitzats cap als valors no patològics, aquest efecte és parcial, de manera que els individus semblen desenvolupar la malaltia igualment, encara que sigui amb menys virulència. Un inici de la immunoteràpia a edats menys avançades i unes dosis més altes o més contínues en el temps, podrien potenciar l'efecte del fàrmac i ajudar a assolir l'objectiu d'aturar i/o revertir el desenvolupament de l'AD al 3xTg-AD.

### **5.2.2 scFv-h3D6-EL**

El scFv-h3D6-EL és una modificació del scFv-h3D6-WT que incorpora dos residus aminoacídics al seu extrem C-terminal (R108 i T109), els quals en milloren l'estabilitat i en

disminueixen la tendència a l'agregació *in vitro* (89), a més de ser més eficient en cultius de neuroblastoma SH-SY5Y (90). Aquest és, doncs, el primer estudi on la variant scFv-h3D6-EL es prova *in vivo*.

Repetint l'esquema seguit en l'apartat anterior per explicar l'efecte del scFv-h3D6-WT començarem analitzant els resultats obtinguts en volumetria. En aquest cas, el tractament sembla que no té el mateix efecte que tenia el scFv-h3D6-WT ja que observem com els volums dels grups tractats i els del 3xTg-AD sense tractar són, en la majoria de casos, pràcticament iguals. Una excepció és el volum de l'hipocamp als 7 mesos, on el volum del grup tractat és més elevat, però aquest efecte es perd als 9 mesos, contràriament al que passava en el cas de la variant WT. En la resta de regions, els volums només augmenten molt lleugerament als 12 mesos. L'única regió on sembla que hi ha un efecte que es manté en el temps és el cerebel.

Si comparem aquests resultats amb els obtinguts a les anàlisis histològiques i bioquímiques als 12 mesos veiem que no acaben d'encaixar ja que, aquí, sí que sembla que el tractament tingui un cert efecte. Si bé és veritat que al còrtex l'efecte és menys marcat que amb la variant WT, en el cas de l'hipocamp, especialment a la CA1, l'efecte és superior a l'observat amb el WT. Aquest resultat es repeteix a l'anàlisi de les plaques amiloides i en la quantificació d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> a partir d'extractes de teixit, tan de l'hipocamp com del còrtex. Aquesta falta de correlació entre els resultats de volumetria i els d'histologia és desconcertant ja que fins ara havíem observat una relació bastant evident entre aquest marcador de neurodegeneració i la patologia amiloide. En el cas del còrtex, l'efecte que s'observa a les anàlisis histològiques està molt poc marcat, de manera que es podria entendre que no fóssim capaços de detectar-lo *in vivo*. Ara bé, a l'hipocamp, on l'efecte és lleugerament més clar que el de la variant WT, hauria de produir-se un canvi de volum que, per algun motiu que se'ns escapa, no s'està detectant.

Pel que fa als altres marcadors de MRI, sembla que recolzen els resultats obtinguts per volumetria ja que, en la majoria de casos, els valors del grup tractat amb scFv-h3D6-EL no difereixen gaire del 3xTg-AD sense tractar. Això no obstant, alguns dels valors de T<sub>2</sub> dels 3xTg-AD tractats amb el scFv-h3D6-EL s'acosten més als dels ratolins control ja que tendeixen a ser inferiors als 3xTg-AD sense tractar.

Els valors d'ADC encara són més difícils d'analitzar ja que no segueixen cap patró concret ni a l'hipocamp ni al còrtex. A més, les variacions d'aquest paràmetre amb el tractament WT tampoc s'han pogut interpretar (5.2.1.). Com ja s'ha mencionat anteriorment, no tenim un control positiu d'edema vasogènic, encara que l'hem intentat induir amb mAb-m3D6, raó per la qual podem concloure que les mesures d'ADC no han estat informatives.

En referència al perfil metabòlic, el scFv-h3D6-EL modifica els valors del mIns exactament igual que ho fa la variant WT: disminuint-los (acostant-los als valors dels ratolins control) al còrtex a totes les edats i, a l'hipocamp, a partir dels 9 mesos. En consonància, el grup tractat amb EL té nivells de IL-6 molt més baixos als 12 mesos, tan a l'hipocamp com al còrtex, que el 3xTg-AD sense tractar, tot i que l'efecte no és tant pronunciat com amb el WT.

A diferència del que passava amb el tractament WT, en aquest cas, ni el NAA ni la relació NAA/mIns segueixen cap patró constant. D'altra banda, la Gln i la PAI semblen tenir afectacions diferents depenent si es tracta d'edats primerenques o tardanes, i també segueixen un patró diferent del WT. El patró observat amb el WT, a on un efecte de millora és clar als primers mesos, es consistent i lògic. Això implica que s'haurien de repetir aquestes determinacions amb la variant EL (i amb la WT com a control), però a amb unes dosis més elevades i una freqüència d'administració més constant per poder treure'n alguna conclusió clara.

Per últim, esmentar que el tractament amb scFv-h3D6-EL sembla disminuir lleugerament els nivells de colesterol en sang i sí que disminueix, d'una forma clara, els valors de transaminases AST i ALT. Com hem comentat en el cas del scFv-h3D6-WT, el tractament no provoca una afectació del fetge.

En el cas del tractament amb el scFv-h3D6-EL, doncs, no acabem de veure una correlació entre els paràmetres *in vivo* i els *ex vivo*. De manera general, tot i que el tractament sembla tenir un efecte beneficiós en els ratolins 3xTg-AD si ens basem en les anàlisis histològiques on la majoria de paràmetres analitzats s'acosten als valors no patològics, fins i tot d'una forma més marcada que el scFv-h3D6-WT a el zona de l'hipocamp, aquest efecte no queda reflectit en els paràmetres *in vivo* com la volumetria. Com hem comentat anteriorment per la variant WT, els possibles efectes beneficiosos del tractament són parcials i els individus semblen desenvolupar la malaltia igualment, de manera que un inici de la immunoteràpia a edats menys avançades i unes dosis més altes o més contínues en el temps, podrien potenciar l'efecte del fàrmac i ajudar a assolir l'objectiu d'aturar i/o revertir el desenvolupament de l'AD al 3xTg-AD.

### 5.3 Aproximació a la visualització d'edema vasogènic

Com ja s'ha comentat a l'apartat de resultats corresponent a aquest estudi (apartat 4.2), no hem estat capaços de visualitzar un edema vasogènic tot i provar diferents dosis de l'anticòs mAb-m3D6 complet. Al ser una primera aproximació, el fet que no aconseguíem assolir

l'objectiu plantejat entrava dins de les possibilitats. Ara bé, sí que esperàvem observar que almenys, la dosi màxima, tingués uns valors d'ADC molt més elevats que la resta, indicant la possibilitat d'aparició d'edema vasogènic o, si més no, una tendència en la distribució dels valors que suggerís un efecte-dosi i donés pistes de la dosi necessària per observar aquesta anomalia.

Els valors d'ADC obtinguts però, no s'allunyen gaire dels obtinguts a l'estudi longitudinal i de fet, són semblants als exposats a la bibliografia per Takahashi *et al.* i per Kantarci *et al.*, els quals miren variacions d'ADC en humans (178,183). Els primers observen uns valors d'ADC a l'hipocamp de  $1000-1100 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$  per pacients amb AD i de  $800-900 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$  per pacients sense AD mentre que, els segons, observen uns valors d'ADC a l'hipocamp de  $850 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$  per pacients amb AD i de  $900 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$  per pacients sense AD. Tot i que aquests valors es refereixen a humans, els podem fer servir de referència (relativa) per veure que, en el nostre cas, no es superen els  $800 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$  en cap dels grups analitzats. A més, en el nostre estudi, les diferències entre els grups amb AD i sense són més petites.

Més enllà d'analitzar si els mapes d'ADC són la millor manera de detectar un edema vasogènic o per quins altres motius pot estar influït aquest paràmetre (la qual cosa ja s'ha discutit anteriorment), aquests resultats ens porten a valorar el fet que el 3xTg-AD no és un bon model per mesurar aquest tipus d'esdeveniments ja que, tal com s'explica a l'apartat 4.2 de resultats, al no desenvolupar CAA és menys propens a generar edema (162).

Provar la molècula en diferents models de ratolí com, per exemple, el Tg-SwDI o el Tg2576, els quals s'ha demostrat que desenvolupen la patologia de CAA, ens podria servir per a veure si el nostre fàrmac actua amb seguretat (184,185). De fet, en una revisió recent sobre els diferents models murins d'Alzheimer existents, Esquerda-Canals *et al.* ja apunten a un replantejament dels assajos preclínic, en el quals s'hauria d'incloure el fet de testar les molècules en diferents models ja que cap d'ells és capaç de reproduir al 100% la malaltia en humans i, per tant, el salt de model murí a humà és complicat (10).

Finalment, ens havíem plantejat que aquest experiment ens servís de control positiu per l'experiment longitudinal i, precisament el fet de no obtenir valors que ens indiquin edema ens suggereix que les diferències que haguem pogut observar a l'estudi longitudinal no estan relacionades amb aquest fenomen.

#### 5.4 Combinació del tractament amb scFv-h3D6-WT i els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J

Amb aquest estudi, es pretenia, d'una banda, demostrar l'aplicabilitat del mètode de diagnòstic posat a punt per a realitzar l'estudi longitudinal, en altres tipus d'estudis i, de l'altra, aportar informació *in vivo* de la combinació del tractament amb el scFv-h3D6-WT amb pèptids mimètics de l'apoE i l'apoJ.

Així doncs, en aquest apartat es farà una breu discussió dels resultats per veure com s'han assolit els objectius plantejats però, al ser només una part de tot l'estudi realitzat per la Laia Montoliu, la discussió completa dels resultats, amb la comparativa amb les anàlisis histològiques i bioquímiques a punt final i, sobretot, pel que fa a la relació de les apolipoproteïnes amb el tractament, es trobarà a la seva tesi (142).

Els únics resultats que podem comparar amb el longitudinal són les diferències entre els grups 3xTg-AD sense tractar i el grup control, ja que la resta de grups segueixen tractaments diferents i, per tant, els resultats no són comparables. Cal tenir en compte, però, que l'edat és de 6 mesos, punt que no tenim al longitudinal, tot i que ens en podem fer una idea comparant-ho amb els valors dels 5 i 7 mesos. Si analitzem els resultats de volumetria observem com la diferència entre genotips és molt clara en totes les regions analitzades i, a més, a l'hipocamp i a l'encèfal, aquesta és estadísticament significativa. Aquests resultats estan en consonància amb el que observem en l'estudi longitudinal.

Pel que fa al perfil metabòlic, a l'hipocamp veiem com, tan el NAA com el mIns, tenen valors inferiors en el grup 3xTg-AD i que, la relació entre els dos té un valor més elevat que el grup control, contràriament al que seria d'esperar i que passava al longitudinal. Això és degut a la disminució del valor de mIns que fins ara sempre estava augmentat al grup 3xTg-AD respecte al control. En aquest cas no el podem comparar amb altres paràmetres relacionats amb inflamació com el T<sub>2</sub> o l'ADC, ja que no es van mirar per la poca claredat de la informació que ens aporten.

De la resta de metabòlits analitzats, destacar la disminució de la Gln al 3xTg-AD, metabòlit que fins ara sempre havíem descrit que estava elevat i que es relaciona amb fallades hepàtiques i amb el desenvolupament de la patologia de tau. Destacar també el valor significativament elevat d'Ala que té el grup 3xTg-AD respecte al control. Aquest metabòlit, que no complia els criteris de selecció per ser analitzat en l'estudi longitudinal, s'ha trobat elevat en cervells amb AD i s'ha relacionat amb el cicle de l'alanina-glucosa.

Pel que fa al còrtex, el NAA disminueix i el mIns augmenta en el 3xTg-AD, amb la qual cosa la relació entre els dos disminueix, tal com s'esperaria. La glutamina i l'alanina també segueixen la lògica i estan més elevades al 3xTg-AD. Tot i que cap dels metabòlits dóna unes diferències significatives entre genotips observem com, al còrtex, les variacions que hi ha estan en consonància amb la bibliografia i amb el que observem a l'estudi longitudinal. A l'hipocamp, en canvi, algun factor ens està alterant el perfil metabòlic.

En referència als tractaments aplicats en aquest estudi, no està clar quin és la interacció que es produeix entre el scFv-h3D6-WT i l'apoE-MP o l'apoJ-MP. A la tesi de la Laia Montoliu (142), l'apoE-MP desenvolupa un paper antiinflamatori en el cultiu cel·lular i en el model del ratolí 3xTg-AD, mentre que l'apoJ-MP mostra un perfil antiinflamatori només quan es combina amb scFv-h3D6. No només el scFv-h3D6 no induïx l'activació microglial, contràriament al que havia passat anteriorment amb anticossos complets, sinó que la redueix.

A jutjar pels resultats obtinguts en aquesta tesi podem dir que depèn de quin paràmetre es miri, sembla que una o altra combinació té més efecte. En general però, tan l'apoJ-MP com l'apoE-MP sols i, la combinació d'aquest últim amb el scFv-h3D6-WT són els grups que més reverteixen els valors del 3xTg-AD sense tractar, acostant-los cap als valors dels grups control.

Així doncs, tot i que és molt complicat treure'n cap conclusió clara, semblaria que la combinació de tractaments té més efecte que no el scFv-h3D6 sol però, en canvi, comparant-ho amb l'aplicació d'un dels dos pèptids mimètics sols, aquest increment de l'efecte no estaria tant clar. De fet, aquesta observació es reincident a la tesi de la Laia Montoliu i mostra que els mecanismes d'actuació dels pèptids mimètics i el scFv-h3D6 són diferents i, d'alguna manera, antagònics (142).

### **5.5 Limitacions de l'estudi i possibles millores de cares a futurs estudis**

Abans de passar a les conclusions d'aquesta tesi, he cregut convenient fer un apartat on poder, d'una banda, relativitzar els resultats obtinguts i les conclusions extretes segons la metodologia utilitzada i, de l'altra, proposar noves vies per a poder continuar aquests estudis.

Massa sovint, en el sistema de recerca actual es tendeix a generalitzar els resultats obtinguts, a fer teories amb fonaments pocs sòlids o a no explicar els resultats negatius. Això sumat a la pressa per publicar i per traslladar els resultats obtinguts a la societat precipiten, massa vegades, fracassos en aquestes aplicacions, com passa en la investigació contra la malaltia d'Alzheimer.



Per no caure en aquests errors, a continuació anomeno algunes de les limitacions de cada tècnica i plantejo possibles solucions o alternatives per a futurs estudis (a part de les que s'han anat plantejant conforme avançava la discussió dels resultats):

a) En primer lloc, la gran majoria d'estudis realitzats en aquest treball s'ha fet amb una  $N=4$ . Tot i ser una  $N$  prou utilitzada en estudis *in vivo*, és difícil obtenir diferències significatives, sobretot en el cas de pèrdua d'algun valor, com passa en les anàlisis del metabòlits amb el programa LC Model quan no hi ha un bon ajust i s'ha de descartar el valor. A més impedeix, en certa manera, descartar les *outliers* existents a causa de l'elevada variabilitat existent dins de cada grup de ratolins ja que, en cas de fer-ho, ens quedaríem amb  $N=3$  o  $N=2$ , perdent tota potència estadística. Aquest fet sumat a la utilització del test U de Mann-Whitney (explicat a l'apartat 3.6) fa que haguem de comentar els resultats basant-nos amb tendències, principalment. En molts casos, augmentar la  $N$  seria suficient perquè les diferències observades fossin estadísticament significatives. Això no obstant, cal tenir sempre en compte que, quan parlem de tendències, les diferències poden ser donades a l'atzar i, per tant, els resultats s'han d'interpretar amb cura.

b) Un altre tema a tenir en compte són les poques rèpliques dels resultats obtinguts i amb això em refereixo tan la impossibilitat de repetir un estudi longitudinal com a la dificultat d'arribar al mateix resultat utilitzant diferents mètodes. En el primer cas, el problema ve causat per la particularitat de l'estudi i no té massa solució, a part de repetir-lo de nou, a partir dels resultats de l'anterior. En l'estudi actual això suposa anys, de manera que és difícil encabir-ho en el període de doctorat. En el segon cas, tot i que existeixen paràmetres que estan molt relacionats entre ells, com per exemple la mesura d'A $\beta$  en una mostra histològica i la quantificació del mateix pèptid d'un extracte de teixit, gairebé sempre hi ha algun factor que pot influir de manera que els resultats no tenen perquè ser exactament els mateixos. Si ens fixem en l'exemple anterior, la mostra histològica és un tall molt concret d'una regió cerebral mentre que l'extracte prové de tota la regió sencera. A més, els marcadors utilitzats per detectar el pèptid no són els mateixos. Aquestes diferències poden ser suficients per obtenir resultats diferents i, d'aquesta manera, es fa difícil generalitzar qualsevol observació.

c) Un altre exemple seria la dificultat d'analitzar exactament la mateixa zona per MRI, MRS i histologia. Tot i que durant la discussió s'intenta veure com encaixen els resultats obtinguts pels diferents paràmetres, s'ha d'anar en compte a l'hora de fer comparacions i s'ha d'entendre la metodologia utilitzada, en cada cas, per arribar a aquell resultat concret de manera que, quan es discuteixen aquests resultats, es sigui conscient de les limitacions tècniques existents.

d) La influència de l'anestèsia. L'anestèsia amb isofluorà pot influir en el desenvolupament de la patologia amiloide en ratolins model d'AD, tal com observen *Perucho et al.* després de tractar ratolins Tg2576 i els respectius controls amb isofluorà dues vegades per setmana durant 3 mesos (186). En el nostre cas, caldria analitzar, histològicament, els animals que no s'han sotmès a les sessions de MRI/MRS i comparar-los amb els que sí que s'hi han sotmès, per saber si aquestes diferències existeixen al 3xTg-AD.

e) Tot i que existeix algun programari per automatitzar la delimitació de les regions, aquests no són massa sensibles i solen deixar escapar diferències. La delimitació de les ROI a mà, en canvi, és un mètode acurat i precís, però que requereix temps i té un component de subjectivitat que es pot fer més gran quan el nombre d'imatges a analitzar és elevat. El problema principal és que, tot i que en teoria les imatges s'agafen sempre a la mateixa zona, no hi ha dos animals iguals, i a vegades les referències agafades no són fàcils de seguir. Així, s'assumeix que hi pot haver error humà però que, en tot cas, aquest s'arrossega al llarg de tot l'anàlisi de manera que no influeix en les diferències entre grups, però sí que podria influir en la comparació de valors amb altres estudis.

f) Un altre punt de subjectivitat és l'absència del doble-cec, la qual cosa significa que ni l'investigador ni el subjecte saben a quin grup pertany la mostra. En estudis amb ratolins, és obvi que el subjecte no sap al grup que pertany però, el fet de mantenir l'investigador desinformat, sovint és difícil o, fins i tot, impossible d'aconseguir. Això no vol dir que els experiments s'esbiaixin de forma conscient, però sí que hi pot haver un biaix inconscient per part de l'investigador. Una manera d'evitar, en part, aquest biaix, que és el que s'ha intentat fer en aquest estudi, consisteix en no avançar l'anàlisi dels resultats (calcular mitjanes, fer les gràfiques, realitzar testos estadístics) ni interpretar-los, fins al final, quan totes les imatges estan analitzades i els comptatges fets, per tal de no influir, encara que sigui de manera inconscient, en els resultats.

g) Reduir els volums dels vòxels per fer una espectroscòpia més localitzada i augmentar la relació senyal/soroll. D'aquesta manera obtindríem senyals més bons, ajustos millors i, per tant, un perfil metabòlic més fiable. El problema és que quan es fan els vòxels més petits s'ha d'augmentar el número d'escanejos de manera que el temps experimental augmenta. Així, s'hauria de buscar un equilibri entre la relació senyal-soroll i el tamany del vòxel que permetés obtenir uns bons espectres sense perjudicar l'animal.

h) Alternatives pel sacrifici dels animals i l'emmagatzematge de les mostres. Els mètodes que s'utilitzen depenen, bàsicament, de les mostres i els recursos de què es disposi. Per

exemple, utilitzar la perfusió dels ratolins amb paraformaldehid a l'hora de sacrificar-los, de manera que els teixits quedin fixats des del primer moment, milloraria la qualitat de les mostres histològiques i, segurament, no hi hauria tant soroll de fons. Això té un inconvenient i és que llavors aquestes no es podrien utilitzar per fer anàlisis bioquímiques. En tot cas, s'hauria d'ampliar la N per poder tenir mostres per anàlisis tan histològiques com bioquímiques, solucionant, a més, el problema d'haver d'ajuntar els homogenats dels diferents animals d'un mateix grup, ja que tindríem el cervell sencer i, per tant, disposaríem del doble de teixit. Si no es pot ampliar la N i es segueix dividint el cervell en dos hemisferis, caldria procurar enviar sempre els mateixos hemisferis a les diferents proves, de manera que eliminéssim les diferències que hi pugui haver entre els dos. Finalment el processament de les mostres amb el mètode de la parafina (que arriba a posar els teixits a 60°C) es podria evitar si se'n fa una criopreservació des del moment en què els ratolins són sacrificats.

i) La controvèrsia existent amb l'anticòs mAb-6E10. Tal com s'explica a l'apartat 4.1.4.1 de resultats, existeix certa controvèrsia en l'especificitat del mAb-6E10 pel pèptid A $\beta$ , ja que sembla que també s'uneix a l'APP i al pèptid C99 (154). De fet, el 2011 es va dir que el senyal intraneuronal detectat en els ratolins 3xTg-AD amb aquest mAb corresponia a l'APP, no al pèptid A $\beta$ , però l'article va ser retractat pels editors l'any 2015 per l'evidència de falsificació de dades (187). L'acord més recent és que l'acumulació intraneuronal del pèptid A $\beta$  en aquest model, tal com es detecta amb el mAb-6E10 i primerament descrit pel grup de LaFerla (125,188,189), és real (190). El senyal de 6E10 és el mateix que l'obtingut amb el mAb-MOAB-2, específic pel pèptid A $\beta$ , i col·localitza amb la catepsina-D, un marcador d'òrgànuls àcids, que evidencia que la presència intraneuronal d'A $\beta$  és diferent de l'A $\beta$  associat a la membrana cel·lular.

j) Allargar l'estudi longitudinal. La idea de l'estudi era que tingués el punt final als 15 mesos per tal d'observar millor les plaques amiloides. Ara bé, a causa de la mort d'alguns animals al llarg de l'estudi vam preferir parar-lo als 12 mesos i assegurar-nos de poder realitzar anàlisi amb una mínima potència estadística que no seguir i arriscar-nos a que la N disminuís més. Un punt final a edats més avançades ens permetria, també, estudiar la patologia de tau i com aquesta es veu afectada amb l'administració dels scFv-h3D6. Altres estudis que es podrien realitzar per tal d'ampliar la informació obtinguda en l'estudi realitzat són els relacionats amb la inflamació, ja que hem vist que està relacionada amb la patologia amiloide i que el tractament amb scFv-h3D6 la disminueix.

Per a finalitzar la discussió d'aquesta tesi, podem dir que els nostres estudis han servit per ampliar la informació existent sobre el desenvolupament de la malaltia d'AD en un model àmpliament utilitzat en la recerca preclínica com és el 3xTg-AD, contrastant la validesa de diferents marcadors, alguns d'ells *in vivo*. A més, ha servit per aportar nova informació al desenvolupament dels scFv-h3D6-WT i EL com a possibles tractaments per aquesta devastadora malaltia.



## 6. CONCLUSIONS

Les conclusions generals, que contesten directament als dos objectius principals d'aquesta tesi, són:

1. El model 3xTg-AD presenta un volum més petit en gairebé totes les regions cerebrals i edats analitzades, un increment de l'A $\beta$  tan intra com extracel·lular als 12 mesos i un increment en la inflamació a aquesta mateixa edat, tan a l'hipocamp (IL-6 i mIns) com al còrtex (IL-6).
2. El tractament amb scFv-h3D6-WT recupera els valors de volumetria, A $\beta$ , IL-6 i mIns, entre d'altres. La variant EL, en canvi, no sembla tenir efectes en volumetria, però sí en les anàlisis histològiques, especialment a l'hipocamp on, fins i tot, aquest efecte sembla superior al del WT.

Les conclusions específiques de cada apartat són:

### 6.1 Estudi longitudinal del tractament de ratolins 3xTg-AD amb els scFv-h3D6 WT i EL

- El volum del 3xTg-AD analitzat per MRI és clarament més petit que el del grup control a gairebé totes les regions i edats analitzades.
- El tractament amb scFv-h3D6-WT resulta en un volum més elevat de l'hipocamp del 3xTg-AD a partir dels 7 mesos. Al còrtex, la diferència existeix des dels 5 mesos i, de fet, és a aquesta edat on és més clara. Aquest tractament també resulta en un volum més elevat del cervell, el cerebel (als 5 i 7 mesos) i l'encèfal.
- El tractament amb scFv-h3D6-EL no fa variar el volum del 3xTg-AD en gairebé cap de les regions i edats analitzades.
- L'aplicació dels tractaments té cert efecte sobre el volum de les diferents regions dels ratolins control.

- Els valors de  $T_2$  a l'hipocamp i al còrtex del 3xTg-AD són més elevats que els dels grups control, amb excepció de la zona del còrtex entorrinal, on als 9 i als 12 mesos el valor de  $T_2$  és més baix.
- El tractament amb scFv-h3D6-WT resulta en uns valors de  $T_2$  i d'ADC més elevats a l'hipocamp del 3xTg-AD. Al còrtex, el valor d'ADC també és més alt.
- Als perfils metabòlics obtinguts per MRS de l'hipocamp i el còrtex del 3xTg-AD, el mIns i la Gln estan més elevades que al grup control i la relació NAA/mIns és més petita. Les diferències en els valors de mIns i NAA/mIns són més marcades en edats avançades, al contrari que la PAI, que està molt més elevada als 5 mesos però va disminuint fins a tenir un valor inferior als 12 mesos.
- El tractament amb scFv-h3D6-WT és capaç de compensar, parcialment, les diferències que hi ha entre el 3xTg-AD i el grup control de mIns (a edats avançades), NAA/mIns (excepte als 7 mesos, Gln i PAI (excepte als 12 mesos) a l'hipocamp, i les de mIns, NAA/mIns i Gln (als 5 i 12 mesos) al còrtex.
- El tractament amb scFv-h3D6-EL és capaç de compensar, parcialment, les diferències que hi ha entre el 3xTg-AD i el grup control de mIns (a edats avançades), NAA/mIns (excepte als 7 mesos), Gln (excepte als 5 mesos) i PAI (excepte als 12 mesos) a l'hipocamp, i les de mIns, NAA/mIns (als 5 i 7 mesos), Gln (excepte als 5) i PAI a edats primerenques al còrtex.
- El 3xTg-AD té un número de neurones 6E10+ molt més elevat que el grup control, on és gairebé zero, tal com reflecteixen les anàlisis histològiques. En el cas de l'hipocamp, les diferències són molt més marcades a la CA1 que a la CA2/CA3. La intensitat del marcatge amb 6E10 també és molt superior tan a l'hipocamp com al còrtex del 3xTg-AD.
- Els tractaments amb scFv redueixen tan el número de neurones 6E10+ com la intensitat del marcatge. Mentre que a l'hipocamp l'efecte del scFv-h3D6-WT és més marcat, al còrtex es marca més l'efecte del scFv-h3D6-EL.
- El 3xTg-AD té un número de plaques amiloides molt més elevat que el grup control, en el qual aquest número és gairebé zero. Les poques plaques observades als grups no transgènics són plaques difuses, mentre que la majoria de plaques observades als grups

transgènics són de nucli dens i es situen a la zona del còrtex entorrinal, piriforme i l'amígdala.

- Els tractaments amb scFvs redueixen el nombre de plaques del 3xTg-AD, sobretot amb el scFv-h3D6-EL.
- El 3xTg-AD té una quantitat d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> superior al grup control tan a l'hipocamp com al còrtex, tal com mostren els resultats de l'ELISA. Els tractaments amb scFvs són capaços de disminuir aquests nivells, sobretot en el cas del tractament amb scFv-h3D6-EL.
- El 3xTg-AD té una quantitat d'IL-6 molt superior al grup control tan a l'hipocamp com, sobretot, al còrtex, tal com reflecteixen els resultats de l'ELISA. Els tractaments amb scFvs són capaços de disminuir aquests nivells, sobretot en el cas del tractament amb scFv-h3D6-WT.
- El 3xTg-AD té menys colesterol en sang que el grup control i uns nivells més baixos de transaminases. Els tractaments amb scFvs són capaços de disminuir els nivells de transaminases tan en els grups transgènics com als no transgènics, però no el nivell de colesterol.

## 6.2 Estudi d'aproximació a la visualització d'edema vasogènic

- Les dosis de mAb-m3D6 administrades al 3xTg-AD no són capaces de provocar edema vasogènic ni a l'hipocamp ni al còrtex.
- Les dosis de mAb-m3D6 administrades al 3xTg-AD generen valors d'ADC molt semblants als generats pels scFv-h3D6 WT i EL, i per sota dels valors de referència que indiquen patogenicitat en humans.

## 6.3 Estudi del tractament de ratolins 3xTg-AD amb el scFv-h3D6 WT en combinació amb els pèptids mimètics de les apolipoproteïnes E i J

- El volum del 3xTg-AD analitzat per MRI és clarament més petit que el del grup control a totes les regions analitzades.



- El tractament del 3xTg-AD amb apoJ-MP sol i amb la combinació de scFv-h3D6-WT i apoE-MP són les teràpies que donen uns volums més elevats en totes les zones analitzades.
- Les diferències més marcades entre el perfil metabòlic de l'hipocamp del 3xTg-AD i el del grup control són la disminució del mIns i la Gln i l'augment de l'Ala i del NAA/mIns. En aquesta regió, el tractament que fa variar més els valors dels metabòlits és el d'apoE-MP sol.
- Les diferències més marcades entre el perfil metabòlic del còrtex del 3xTg-AD i el del grup control són la disminució del NAA, de la relació NAA/mIns, del Glu i de l'Asp i l'augment de l'Ala. En aquesta regió, el tractament que fa variar més els valors dels metabòlits és la combinació de scFv-h3D6-WT i apoE-MP.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, quality and costs now and in the future. 2016. 1-140 p.
2. Stahl SM. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2: illustrating their mechanisms of action. *J Clin Psychiatry*. 2000 Nov;61(11):813–4.
3. Wilkinson D. A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2012 Aug;27(8):769–76.
4. Hunting P. Alois Alzheimer (1864–1915). *J Med Biogr*. 2015 Nov;23(4):238–9.
5. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 May 16;120(3):885–90.
6. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun;82(12):4245–9.
7. Jarrett JT, Lansbury PT. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*. 1993 Jun 18;73(6):1055–8.
8. Cruts M. AD&FTD Mutation Database [Internet]. [cited 2017 Jun 2]. Available from: <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/default.cfm?MT=1&ML=0&Page=ADMDB>
9. Guell-Bosch J, Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Villegas S. Prospective Therapies for Alzheimer Disease: Biomarkers, Clinical Trials and Preclinical Research. In: ATTA-UR-RAHMAN., editor. *Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS; 2016. p. 114–91.
10. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2017 Apr 19;57(4):1171–83.
11. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun;375(6534):754–60.

12. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995 Aug 18;269(5226):973–7.
13. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):486–8.
14. Shen J, Kelleher RJ. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan;104(2):403–9.
15. Hoenicka J. [Genes in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol*. 2006 Jan;42(5):302–5.
16. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res*. 2011 Jan;50(1):62–74.
17. Winkler K, Scharnagl H, Tisljar U, Hoschützky H, Friedrich I, Hoffmann MM, et al. Competition of Abeta amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. 1999 Mar;40(3):447–55.
18. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*. 1994 Nov 3;372(6501):92–4.
19. Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron*. 2014 Feb 19;81(4):740–54.
20. Wood SJ, Chan W, Wetzel R. An ApoE-Abeta inhibition complex in Abeta fibril extension. *Chem Biol*. 1996 Nov;3(11):949–56.
21. Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2014 May;6:93.
22. Montoliu-Gaya L, Villegas S. Protein structures in Alzheimer's disease: The basis for rationale therapeutic design. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Dec 15;588:1–14.
23. Poirier J, Miron J, Picard C, Gormley P, Thérout L, Breitner J, et al. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Sep;35 Suppl 2:S3-10.
24. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184–5.

25. Armstrong RA. A critical analysis of the “amyloid cascade hypothesis”. *Folia Neuropathol.* 2014 Jan;52(3):211–25.
26. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2006 Jul 5;26(27):7212–21.
27. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer’s disease. *Nat Rev Neurosci. Nature Publishing Group*; 2007 Jul 1;8(7):499–509.
28. De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol. NIH Public Access*; 2010 Feb 1;6(2):99–107.
29. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer’s disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Sep;10(9):698–712.
30. Lu J-X, Qiang W, Yau W-M, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in Alzheimer’s disease brain tissue. *Cell. NIH Public Access*; 2013 Sep 12;154(6):1257–68.
31. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol. Nature Publishing Group*; 2007 Feb;8(2):101–12.
32. Lu J-X, Qiang W, Yau W-M, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in Alzheimer’s disease brain tissue. *Cell.* 2013 Sep 12;154(6):1257–68.
33. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007 Jun;101(5):1172–84.
34. Lambracht-Washington D, Rosenberg RN. Anti-amyloid beta to tau - based immunization: Developments in immunotherapy for Alzheimer disease. *ImmunoTargets Ther.* 2013 Aug 1;2013(2):105–14.
35. Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2006 Dec 22;281(51):39413–23.
36. Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis.

- JAMA Neurol. 2014 Apr;71(4):505–8.
37. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990 May;27(5):457–64.
  38. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. 2005 Aug;8(8):1051–8.
  39. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 2006 Dec 7;52(5):831–43.
  40. Wang H-Y. Beta-amyloid(1-42) binds to alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25;275(8):5626–32.
  41. Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*. 1996 Jul 11;382(6587):120–1.
  42. Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA. Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem*. 2006 Sep 22;281(38):27916–23.
  43. Popugaeva E, Bezprozvanny I. Can the calcium hypothesis explain synaptic loss in Alzheimer's disease? *Neurodegener Dis*. 2014 Jan;13(2–3):139–41.
  44. Messier C, Teutenberg K. The role of insulin, insulin growth factor, and insulin-degrading enzyme in brain aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast*. 2005 Jan;12(4):311–28.
  45. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):329–44.
  46. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2013 Mar;15(3):307.
  47. Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, et al. Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*. 2012 Dec;64(12):931–5.
  48. Deane R, Zlokovic B V. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2007 Apr;4(2):191-7.

49. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*. 2002 Aug;35(3):419–32.
50. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):685–91.
51. Frölich L, Ashwood T, Nilsson J, Eckerwall G. Effects of AZD3480 on cognition in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase IIb dose-finding study. *J Alzheimers Dis*. 2011 Jan;24(2):363–74.
52. Arnt J, Bang-Andersen B, Grayson B, Bymaster FP, Cohen MP, DeLapp NW, et al. Lu AE58054, a 5-HT6 antagonist, reverses cognitive impairment induced by subchronic phencyclidine in a novel object recognition test in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010 Sep;13(8):1021–33.
53. Wischik CM, Harrington CR, Storey JMD. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014 Apr 15;88(4):529–39.
54. Shah RC, Matthews DC, Andrews RD, Capuano AW, Fleischman DA, VanderLugt JT, et al. An evaluation of MSDC-0160, a prototype mTOT modulating insulin sensitizer, in patients with mild Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2014 Jul;11(6):564-73.
55. Ghosh AK, Bilcer G, Harwood C, Kawahama R, Shin D, Hussain KA, et al. Structure-Based Design: Potent Inhibitors of Human Brain Memapsin 2 ( $\beta$ -Secretase). *J Med Chem*. American Chemical Society; 2001 Aug;44(18):2865–8.
56. Nimmrich V, Eckert A. Calcium channel blockers and dementia. *Br J Pharmacol*. Wiley-Blackwell; 2013 Jul;169(6):1203–10.
57. Mouchiroud L, Molin L, Dallièrè N, Solari F. Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for an healthy aging. *Biofactors*. 2010 Jan;36(5):377–82.
58. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5892–901.
59. Durand D, Carniglia L, Beauquis J, Caruso C, Saravia F, Lasaga M. Astroglial mGlu3 receptors promote alpha-secretase-mediated amyloid precursor protein cleavage. *Neuropharmacology*. 2014 Apr;79:180–9.

60. Ager RR, Davis JL, Agazaryan A, Benavente F, Poon WW, LaFerla FM, et al. Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer's disease and neuronal loss. *Hippocampus*. 2014;25(7):813–26.
61. Güell-Bosch J, Montoliu-Gaya L, Esquerda-Canals G, Villegas S. A $\beta$  immunotherapy for Alzheimer's disease: where are we? *Neurodegener Dis Manag*. 2016 Jun;6(3):179–81.
62. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid- b attenuates Alzheimer- disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999 Jul;400(6740):173–7.
63. Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, et al. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol*. 2003 Apr;15(4):505–14.
64. Lambracht-Washington D, Qu B-X, Fu M, Anderson LD, Stüve O, Eagar TN, et al. DNA immunization against amyloid beta 42 has high potential as safe therapy for Alzheimer's disease as it diminishes antigen-specific Th1 and Th17 cell proliferation. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 Aug;31(6):867–74.
65. Montoliu-Gaya L, Villegas S. A $\beta$ -Immunotherapeutic strategies: a wide range of approaches for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Mol Med*. 2016 Jun 30;18:e13.
66. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8850–5.
67. Home - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2017 Jun 2]. Available from: <http://clinicaltrials.gov>
68. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al. Gantenerumab: a novel human anti-A $\beta$  antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- $\beta$  binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis*. 2012 Jan;28(1):49–69.
69. Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, et al. An effector-reduced anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) antibody with unique a $\beta$  binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A $\beta$ . *J Neurosci*. 2012 Jul 11;32(28):9677–89.

70. Dunstan R, Bussiere T, Rhodes K, Engber T, Maier M, Weinreb P, et al. Molecular characterization and preclinical efficacy. *Alzheimer's Dement.* Elsevier; 2011 Jul 7;7(4):S457.
71. Lannfelt L, Möller C, Basun H, Osswald G, Sehlin D, Satlin A, et al. Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- $\beta$  protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2014 Jan;6(2):16.
72. Ravetch J, Fukuyama H. Antibodies specific for the Protofibrillar Form of Beta- Amyloid Protein. US; 2009. WO 200906505472.
73. Relkin N. Clinical trials of intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *J Clin Immunol.* Springer US; 2014 Jul 1;34 Suppl 1(1):S74-9.
74. Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs.* Taylor & Francis; 2010;2(1):77–83.
75. Tamura Y, Hamajima K, Matsui K, Yanoma S, Narita M, Tajima N, et al. The F(ab)'2 fragment of an Abeta-specific monoclonal antibody reduces Abeta deposits in the brain. *Neurobiol Dis.* 2005 Nov;20(2):541–9.
76. Giménez-Llort L, Rivera-Hernández G, Marin-Argany M, Sánchez-Quesada JL, Villegas S. Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid  $\beta$ -antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease. *MAbs.* 2013;5(5):665–77.
77. Yang J, Pattanayak A, Song M, Kou J, Taguchi H, Paul S, et al. Muscle-directed anti-A $\beta$  single-chain antibody delivery via AAV1 reduces cerebral A $\beta$  load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Mol Neurosci.* 2013 Feb;49(2):277–88.
78. Medecigo M, Manoutcharian K, Vasilevko V, Govezensky T, Munguia ME, Becerril B, et al. Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries. *J Neuroimmunol.* 2010 Jun;223(1–2):104–14.
79. Hanenberg M, McAfoose J, Kulic L, Welt T, Wirth F, Parizek P, et al. Amyloid- $\beta$  peptide-specific DARPin as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2014 Sep 26;289(39):27080–9.
80. Boutajangout A, Ingadottir J, Davies P, Sigurdsson EM. Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *J Neurochem.* 2011 Aug;118(4):658–67.



81. Atwal JK, Chen Y, Chiu C, Mortensen DL, Meilandt WJ, Liu Y, et al. A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid- $\beta$  production in vivo. *Sci Transl Med*. 2011 May 25;3(84):84ra43.
82. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2000 Aug 1;6(8):916–9.
83. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014 Jan 23;370(4):322–33.
84. Marín-Argany M, Rivera-Hernández G, Martí J, Villegas S. An anti-A $\beta$  (amyloid  $\beta$ ) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing A $\beta$  oligomers from the amyloid pathway. *Biochem J*. Portland Press Ltd.; 2011 Jul 1;437(1):25–34.
85. Giménez-Llort L, Rivera-Hernández G, Cervera L, Marín-Argany M, Blasco-Moreno B, Villegas S. In vivo effects of scFv-h3D6 on 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Conferences*. 2011 (Nature, editor. Abstract Book P41. Madrid; 2011. p. 22–23/09.
86. Esquerda-Canals G, Martí J, Rivera-Hernández G, Giménez-Llort L, Villegas S. Loss of deep cerebellar nuclei neurons in the 3xTg-AD mice and protection by an anti-amyloid  $\beta$  antibody fragment. *MAbs*. 2013 Jan;5(5):660–4.
87. Rivera Hernández G. Obtención de un fragmento de anticuerpo específico contra oligómeros de A $\beta$  como agente inmunoterapéutico de la enfermedad de Alzheimer: demostración de su eficacia en el modelo murino 3xTg-AD y mejora de su estabilidad termodinámica. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona; 2014.
88. Villegas S. [Alzheimer's disease: New therapeutic strategies.]. *Med Clin (Barc)*. 2014;145(2):76–83.
89. Rivera-Hernández G, Marin-Argany M, Blasco-Moreno B, Bonet J, Oliva B, Villegas S. Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid  $\beta$  single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency. *MAbs*. 2013 Jan;5(5):678–89.

90. Montoliu-Gaya, L., Murciano-Calles J, Martínez, J.C., Villegas S. Towards the improvement in stability of an anti-A $\beta$  single chain variable fragment, scFv-h3D6, as a way to enhance its therapeutic potential. *Amyloid*. 2017;In press (.)
91. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society ; 2012 Aug 30;367(9):795–804.
92. Visser PJ, Vos S, van Rossum I, Scheltens P. Comparison of International Working Group criteria and National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012 Nov;8(6):560–3.
93. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):119–28.
94. Strozzyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology*. 2003 Feb 25;60(4):652–6.
95. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol*. 2013 Feb;12(2):207–16.
96. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006 Nov;129(Pt 11):3035–41.
97. Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M, Helisalme S, Ramberg J, Alafuzoff I, et al. The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1997 Dec 22;8(18):3961–3.
98. Shafaati M, Solomon A, Kivipelto M, Björkhem I, Leoni V. Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders. *Neurosci Lett*. 2007 Sep;425(2):78–82.
99. Lleó A, Cavedo E, Parnetti L, Vanderstichele H, Herukka SK, Andreasen N, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat Rev Neurol*. 2014 Dec 16;11(1):41-55.
100. Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, Henriksen K, Jeromin A, Lovestone S, et al.

- Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014 Jan;10(1):109–14.
101. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 2004 Mar;55(3):306–19.
102. Tolboom N, van der Flier WM, Yaquub M, Boellaard R, Verwey NA, Blankenstein MA, et al. Relationship of cerebrospinal fluid markers to 11C-PiB and 18F-FDDNP binding. *J Nucl Med.* 2009 Sep 1;50(9):1464–70.
103. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Jan;777:380–7.
104. Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA.* 2001 Nov;286(17):2120–7.
105. Klunk WE, Lopresti BJ, Ikonovic MD, Lefterov IM, Koldamova RP, Abrahamson EE, et al. Binding of the Positron Emission Tomography Tracer Pittsburgh Compound-B Reflects the Amount of Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease Brain But Not in Transgenic Mouse Brain. *J Neurosci.* 2005;25(46).
106. Weishaupt D, Kochli VD, Marincek B, Kim EE. How Does MRI Work? An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Nuclear Medicine.* 2007.48(11): 1910-1910 p.
107. Jiménez Xarrié E. Caracterización de la proliferación celular en las zonas subventriculares y de la evolución del infarto mediante espectroscopía de resonancia magnética en un modelo preclínico de isquemia cerebral. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
108. Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging.* 2001 Apr;13(4):534–46.
109. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med.* 1993 Dec;30(6):672–9.
110. Forster D, Davies K, Williams S. Magnetic resonance spectroscopy in vivo of neurochemicals in a transgenic model of Alzheimer's disease: A longitudinal study of

- metabolites, relaxation time, and behavioral analysis in TASTPM and wild-type mice. *Magn Reson Med*. 2013 Apr;69(4):944–55.
111. Birken DL, Oldendorf WH. N-Acetyl-L-Aspartic acid: A literature review of a compound prominent in <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 1989;13(1):23–31.
  112. Zhu X, Schuff N, Kornak J, Soher B, Yaffe K, Kramer JH, et al. Effects of Alzheimer disease on fronto-parietal brain N-acetyl aspartate and myo-inositol using magnetic resonance spectroscopic imaging. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Jan;20(2):77–85.
  113. Bates TE, Strangward M, Keelan J, Davey GP, Munro PM, Clark JB. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for <sup>1</sup>H MRS studies in vivo. *Neuroreport*. 1996 May;7(8):1397–400.
  114. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci*. 1993;15(3–5):289–98.
  115. Shonk TK, Moats RA, Gifford P, Michaelis T, Mandigo JC, Izumi J, et al. Probable Alzheimer disease: diagnosis with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1995 Apr;195(1):65–72.
  116. Haris M, Nath K, Cai K, Singh A, Crescenzi R, Kogan F, et al. Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer's disease. *NMR Biomed*. 2013 Apr;26(4):386–91.
  117. Ross B, Michaelis T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q*. 1994 Dec;10(4):191–247.
  118. Carreras I, McKee AC, Choi J-K, Aytan N, Kowall NW, Jenkins BG, et al. R-flurbiprofen improves tau, but not A $\beta$  pathology in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2013 Dec 6;1541:115–27.
  119. Zhu H, Barker PB. MR spectroscopy and spectroscopic imaging of the brain. *Methods Mol Biol*. NIH Public Access; 2011;711:203–26.
  120. Wang H, Tan L, Wang H-F, Liu Y, Yin R-H, Wang W-Y, et al. Magnetic Resonance Spectroscopy in Alzheimer's Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. Baglio F, editor. *J Alzheimer's Dis*. 2015 Jun 26;46(4):1049–70.
  121. Hakumäki JM, Kauppinen RA. <sup>1</sup>H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci*. 2000 Aug;25(8):357–62.

122. Westman E, Spenger C, Oberg J, Reyer H, Pahnke J, Wahlund L-O. In vivo <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy can detect metabolic changes in APP/PS1 mice after donepezil treatment. *BMC Neurosci. BioMed Central*; 2009 Apr 7;10:33.
123. Dedeoglu A, Choi J-K, Cormier K, Kowall NW, Jenkins BG. Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res.* 2004;1012(1):60–5.
124. Marjanska M, Curran GL, Wengenack TM, Henry P-G, Bliss RL, Poduslo JF, et al. Monitoring disease progression in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Aug 16;102(33):11906–10.
125. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Dec;24(8):1063–70.
126. The Jackson Laboratory [Internet]. [cited 2017 Jun 2]. Available from: <https://www.jax.org/strain/004807>
127. Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentschein E, Stanczyk FZ, et al. Sex differences in  $\beta$ -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: Role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res.* 2010 Dec;1366:233–45.
128. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003 Jul 31;39(3):409–21.
129. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
130. Marín-Argany M. Estudi de la via d'agregació de tres proteïnes implicades en diferents malalties conformacionals humanes : scFv-h3D6 com agent terapèutic per a la malaltia d'Alzheimer, AL-12 com a causa d'amiloïdosi de cadena lleugera, i PDZ3 com a organitzador del proteoma. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
131. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986 May 5;189(1):113–30.
132. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463–7.
133. Neville DM. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem.* 1971 Oct 25;246(20):6328–34.
  134. Villegas S, Rivera-Hernández G, Marín-Argany M, Blasco-Moreno B. Single chain variable fragment (scFv) elongation mutants. PCT/EP2014/060047, 2014.
  135. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCMoDel. *NMR Biomed.* 2001 Jun;14(4):260–4.
  136. Pfeuffer J, Tkáč I, Provencher SW, Gruetter R. Toward an in Vivo Neurochemical Profile: Quantification of 18 Metabolites in Short-Echo-Time 1H NMR Spectra of the Rat Brain. *J Magn Reson.* 1999 Nov;141(1):104–20.
  137. Provencher S. LCMoDel User Manual. 2016;184.
  138. Orije J, Kara F, Guglielmetti C, Praet J, Van der Linden A, Ponsaerts P, et al. Longitudinal monitoring of metabolic alterations in cuprizone mouse model of multiple sclerosis using 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Neuroimage.* 2015 Jul 1;114:128–35.
  139. Ackl N, Ising M, Schreiber YA, Atiya M, Sonntag A, Auer DP. Hippocampal metabolic abnormalities in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett.* 2005 Aug;384(1–2):23–8.
  140. Oz G, Tkáč I, Charnas LR, Choi IY, Bjoraker KJ, Shapiro EG, et al. Assessment of adrenoleukodystrophy lesions by high field MRS in non-sedated pediatric patients. *Neurology.* 2005 Feb 8;64(3):434–41.
  141. Allen brain atlas [Internet]. [cited 2017 Jun 2]. Available from: <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>
  142. Montoliu-Gaya L. Immunotherapy for Alzheimer’s disease: from antibody engineering to combined therapy with apolipoproteins. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona; 2017.
  143. U.S. Department of Health and Human Services, Administration F and D. Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. 2012. p. 1–10.
  144. Turner RS, Thomas RG, Craft S, van Dyck CH, Mintzer J, Reynolds BA, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology.*

- 2015 Oct 20;85(16):1383–91.
145. Adlard PA, Tran BA, Finkelstein DI, Desmond PM, Johnston LA, Bush AI, et al. A review of  $\beta$ -amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2014 Oct 31;8:327.
  146. Li L, Wang X-Y, Gao F-B, Wang L, Xia R, Li Z-X, et al. Magnetic resonance T2 relaxation time at 7 Tesla associated with amyloid  $\beta$  pathology and age in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2016;610:92–7.
  147. Gandy S, DeKosky ST. Toward the treatment and prevention of Alzheimer's disease: rational strategies and recent progress. *Annu Rev Med*. 2013 Jan;64:367–83.
  148. Mastrangelo MA, Bowers WJ. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci*. BioMed Central; 2008 Jan;9:81.
  149. van Duijn S, Nabuurs RJ a, van Duinen SG, Natté R, van Buchem M a, Alia a. Longitudinal monitoring of sex-related in vivo metabolic changes in the brain of Alzheimer's disease transgenic mouse using magnetic resonance spectroscopy. *J Alzheimers Dis*. 2013 Jan;34(4):1051–9.
  150. von Kienlin M, Künnecke B, Metzger F, Steiner G, Richards JG, Ozmen L, et al. Altered metabolic profile in the frontal cortex of PS2APP transgenic mice, monitored throughout their life span. *Neurobiol Dis*. 2005 Feb;18(1):32–9.
  151. Kreis R, Pietz J, Penzien J, Herschkowitz N, Boesch C. Identification and quantitation of phenylalanine in the brain of patients with phenylketonuria by means of localized in vivo <sup>1</sup>H magnetic-resonance spectroscopy. *J Magn Reson B*. 1995 Jun;107(3):242–51.
  152. Lin Y, Yao J, Chen Y, Pang L, Li H, Cao Z, et al. Hippocampal Neurochemical Changes in Senescent Mice Induced with Chronic Injection of D-Galactose and NaNO<sub>2</sub>: An In Vitro High-Resolution NMR Spectroscopy Study at 9.4T. Borlongan C V., editor. *PLoS One*. 2014 Feb 12;9(2):e88562.
  153. Wirths O, Dins A, Bayer TA. A $\beta$ PP accumulation and/or intraneuronal amyloid- $\beta$  accumulation? The 3xTg-AD mouse model revisited. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(4):897–904.
  154. Horikoshi Y, Sakaguchi G, Becker AG, Gray AJ, Duff K, Aisen PS, et al. Development of Abeta terminal end-specific antibodies and sensitive ELISA for Abeta variant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 2;319(3):733–7.

155. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, et al. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature*. 1997 May;387(6632):500–5.
156. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011 Sep;1(1): a006189.
157. Montacute R, Foley K, Forman R, Else KJ, Cruickshank SM, Allan SM. Enhanced susceptibility of triple transgenic Alzheimer's disease (3xTg-AD) mice to acute infection. *J Neuroinflammation*. *BioMed Central*; 2017 Mar 11;14(1):50.
158. Gamba P, Testa G, Sottero B, Gargiulo S, Poli G, Leonarduzzi G. The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1259(1):54–64.
159. Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem*. *NIH Public Access*; 2014 May;129(4):559–72.
160. Hohsfield LA, Daschil N, Orädd G, Strömberg I, Humpel C. Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic and APPSwDI Alzheimer's disease mouse models. *Mol Cell Neurosci*. 2014 Nov;63:83–95.
161. Do TM, Dodacki A, Alata W, Calon F, Nicolic S, Scherrmann J-M, et al. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). Ghribi O, editor. *J Alzheimer's Dis*. 2015 Oct 9;49(2):287–300.
162. Goñi F, Herline K, Peyser D, Wong K, Ji Y, Sun Y, et al. Immunomodulation targeting of both A $\beta$  and tau pathological conformers ameliorates Alzheimer's disease pathology in TgSwDI and 3xTg mouse models. *J Neuroinflammation*. *BioMed Central*; 2013 Dec 13;10:150.
163. Scholtzova H, Do E, Dhakal S, Sun Y, Liu S, Mehta PD, et al. Innate Immunity Stimulation via Toll-Like Receptor 9 Ameliorates Vascular Amyloid Pathology in Tg-SwDI Mice with Associated Cognitive Benefits. *J Neurosci*. 2017 Jan 25;37(4):936–59.
164. Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, et al. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and



- microhemorrhage. *J Neuroinflammation*. BioMed Central; 2004 Dec 8;1(1):24.
165. Crescenzi R, DeBrosse C, Nanga RPR, Reddy S, Haris M, Hariharan H, et al. In vivo measurement of glutamate loss is associated with synapse loss in a mouse model of tauopathy. *Neuroimage*. 2014 Nov 1;101:185–92.
166. Klunk WE, Xu C, Panchalingam K, McClure RJ, Pettegrew JW. Quantitative <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P MRS of PCA extracts of postmortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*. 1996;17(3):349–57.
167. España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, et al. Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 15;67(6):513–21.
168. Li L, Wang X-Y, Gao F-B, Wang L, Xia R, Li Z-X, et al. Magnetic resonance T2 relaxation time at 7 Tesla associated with amyloid  $\beta$  pathology and age in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2016;610:92–7.
169. Kastyak-Ibrahim MZ, Di Curzio DL, Buist R, Herrera SL, Albensi BC, Del Bigio MR, et al. Neurofibrillary tangles and plaques are not accompanied by white matter pathology in aged triple transgenic-Alzheimer disease mice. *Magn Reson Imaging*. 2013 Nov;31(9):1515–21.
170. Falangola MF, Dyakin V V, Lee SP, Bogart A, Babb JS, Duff K, et al. Quantitative MRI reveals aging-associated T2 changes in mouse models of Alzheimer's disease. *NMR Biomed*. 2007 May;20(3):343–51.
171. Janelins MC, Mastrangelo MA, Oddo S, LaFerla FM, Federoff HJ, Bowers WJ. Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation*. 2005 Oct 18;2(1):23.
172. Algarzae N, Hebron M, Miessau M, Moussa CE-H. Parkin prevents cortical atrophy and A $\beta$ -induced alterations of brain metabolism: <sup>13</sup>C NMR and magnetic resonance imaging studies in AD models. *Neuroscience*. NIH Public Access; 2012 Dec 6;225:22–34.
173. Hohsfield LA, Daschil N, Orädd G, Strömberg I, Humpel C. Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic and APPSwDI Alzheimer's disease mouse models. *Mol Cell Neurosci*. Europe PMC Funders; 2014 Nov;63:83–95.

174. Wu Z, Yang B, Liu C, Liang G, Liu W, Pickup S, et al. Long-term dantrolene treatment reduced intraneuronal amyloid in aged Alzheimer triple transgenic mice. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. NIH Public Access; 2015;29(3):184–91.
175. Ramos Bernardes da Silva Filho S, Oliveira Barbosa JH, Rondinoni C, dos Santos AC, Garrido Salmon CE, da Costa Lima NK, et al. Neuro-degeneration profile of Alzheimer's patients: A brain morphometry study. *NeuroImage Clin*. 2017;15:15–24.
176. Esteras N, Alquézar C, Bartolomé F, Antequera D, Barrios L, Carro E, et al. Systematic evaluation of magnetic resonance imaging and spectroscopy techniques for imaging a transgenic model of Alzheimer's disease (A $\beta$ PP/PS1). *J Alzheimers Dis*. IOS Press; 2012 Jan 1;30(2):337–53.
177. Altamura C, Scrascia F, Quattrocchi CC, Errante Y, Gangemi E, Curcio G, et al. Regional MRI Diffusion, White-Matter Hyperintensities, and Cognitive Function in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *J Clin Neurol*. Korean Neurological Association; 2016 Apr;12(2):201–8.
178. Takahashi H, Ishii K, Kashiwagi N, Watanabe Y, Tanaka H, Murakami T, et al. Clinical application of apparent diffusion coefficient mapping in voxel-based morphometry in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clin Radiol*. 2017 Feb;72(2):108–15.
179. Sancheti H, Patil I, Kanamori K, Brinton RD, Zhang W, Lin A-L, et al. Hypermetabolic State in the 7-Month-Old Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease and the Effect of Lipoic Acid: A <sup>13</sup>C-NMR Study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Nov;34(11):1749–60.
180. Sancheti H, Kanamori K, Patil I, Díaz Brinton R, Ross BD, Cadenas E. Reversal of metabolic deficits by lipoic acid in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a <sup>13</sup>C NMR study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Feb;34(2):288–96.
181. Oberg J, Spenger C, Wang F-H, Andersson A, Westman E, Skoglund P, et al. Age related changes in brain metabolites observed by <sup>1</sup>H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*. 2008 Sep;29(9):1423–33.
182. Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM. A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of A $\beta$ . *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 2006;168(1):184.
183. Kantarci K, Jack CR, Xu YC, Campeau NG, O'Brien PC, Smith GE, et al. Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease: Regional Diffusivity of Water. *Radiology*. 2001

- Apr;219(1):101–7.
184. Miao J, Xu F, Davis J, Otte-Höller I, Verbeek MM, Van Nostrand WE. Cerebral microvascular amyloid beta protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid beta precursor protein. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2005 Aug;167(2):505–15.
  185. Han BH, Zhou M-L, Johnson AW, Singh I, Liao F, Vellimana AK, et al. Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 2015 Feb 24;112(8):E881-90.
  186. Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, et al. Anesthesia with Isoflurane Increases Amyloid Pathology in Mice Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis. 2010 Mar 11;19(4):1245–57.*
  187. Winton MJ, Lee EB, Sun E, Wong MM, Leight S, Zhang B, et al. Intraneuronal APP, Not Free A $\beta$  Peptides in 3xTg-AD Mice: Implications for Tau versus A $\beta$ -Mediated Alzheimer Neurodegeneration. *J Neurosci. 2011 May 25;31(21):7691–9.*
  188. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron. 2005 Mar 3;45(5):675–88.*
  189. Soejima N, Ohyagi Y, Nakamura N, Himeno E, Iinuma KM, Sakae N, et al. Intracellular accumulation of toxic turn amyloid- $\beta$  is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res. 2013 Jan;10(1):11–20.*
  190. Youmans KL, Tai LM, Kanekiyo T, Stine WB, Michon S-C, Nwabuisi-Heath E, et al. Intraneuronal A $\beta$  detection in 5xFAD mice by a new A $\beta$ -specific antibody. *Mol Neurodegener. 2012 Mar 16;7(1):8.*