

LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EPÓXIDO HIDROLASA SOLUBLE DURANTE EL DESARROLLO CEREBRAL INDUCE BENEFICIOS A LARGO PLAZO EN RATONES 5XFAD

Ainhoa Villoslada Fanega

TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: Dra. Ana Fernández Bravo, Ciencias Médicas Básicas, Unidad de Micología y Microbiología Ambiental (URV), Ana.fernandez@urv.cat

En colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC)

Supervisora: Dra. Coral Sanfeliu Pujol, Neurociencias y Terapéutica Experimental, Neurodegeneración y Envejecimiento (IIBB), Coral.sanfeliu@iibb.csic.es

Financiación: MICIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2019-106285RB-C22), AGAUR (2017-SGR-106) y CSIC (2019AEP038).

Septiembre 2022

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| DATOS DEL CENTRO | 1 |
| RESUMEN Y PALABRAS CLAVE | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| Enfermedades neurodegenerativas | 5 |
| La enfermedad del Alzheimer | 5 |
| Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer | 6 |
| Diagnóstico | 6 |
| Factores de riesgo | 10 |
| Envejecimiento | 10 |
| Genética | 10 |
| Factores ambientales | 11 |
| Patologías asociadas | 12 |
| La epóxido hidrolasa soluble (sEH) como diana terapéutica | 12 |
| Modelo de ratón 5xFAD | 13 |
| Antecedentes | 14 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS | 15 |
| MATERIALES Y METODOS | 17 |
| Pruebas moleculares | 17 |
| Western Blot (WB) | 17 |
| Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) | 18 |
| Estadística | 19 |
| RESULTADOS | 21 |
| Pruebas moleculares | 21 |
| Western Blot (WB) | 21 |
| qPCR | 24 |
| DISCUSIÓN | 27 |
| CONCLUSIONES | 31 |
| BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| AUTOEVALUACIÓN | 37 |

DATOS DEL CENTRO

El instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) es un centro de investigación propio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) situado en la calle Roselló, 161 planta 6ª y 7ª con código postal 08036. Está asociado al Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS) constituido por la Generalidad de Cataluña, la Universidad de Barcelona (UB) y el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona (*Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) | Delegaciones CSIC, n.d.*).

Este trabajo pertenece a un proyecto del grupo de investigación “Neurodegeneración y Envejecimiento” coordinado por Coral Sanfeliu y este grupo forma parte del departamento de “Neurociencias y Terapéutica Experimental”. Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, AGAUR y CSIC.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa (ND) que afecta a gran parte de la población anciana y se prevé que el número de casos aumente en las siguientes décadas.

A grandes rasgos, esta enfermedad produce cambios en la morfología del cerebro, pérdida de memoria y, en estados muy avanzados de la enfermedad, dependencia social. En cuanto a biomarcadores, predominan la patología tau y la formación de placas β amiloide ($A\beta$). Ambas moléculas generan un estado de inflamación y neurotoxicidad persistente.

Actualmente solo existen tratamientos para mejorar la sintomatología y, además, se caracteriza por ser una enfermedad multigénica y difícil de diagnosticar. También hay diferentes factores de riesgo que favorecen la aparición de la enfermedad. Por lo que, en este trabajo se estudia el efecto de un fármaco administrado de manera prenatal a ratones transgénicos 5xFAD. El fármaco, TPPU, es un inhibidor de la epóxido hidrolasa soluble (sEH). En consecuencia, el objetivo es inhibir la acción de esta enzima y evitar la formación de neuroinflamación. Para ello, se realizaron diferentes pruebas moleculares para analizar el efecto de TPPU. De hecho, se han estudiado diversas proteínas mediante la técnica Western Blot (WB) y la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Los resultados mostraron un efecto notable de TPPU en las proteínas tau y en la expresión de diferentes genes que tienen un impacto sobre la neuroinflamación. Estos resultados sugieren que TPPU tiene un efecto neuroprotector y que sEH es una prometedora diana farmacológica.

Palabras clave: epóxido hidrolasa soluble, inflamación, Tau, marcas epigenéticas, enfermedad de Alzheimer

INTRODUCCIÓN

Enfermedades neurodegenerativas

Las ND son un grupo de enfermedades relacionadas con la edad y un problema cada vez mayor debido al envejecimiento de la sociedad (Kaminska & Zoladek, 2021). Se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas y sus conexiones sinápticas, que dan lugar a una disminución funcional gradual (Kritsilis et al., 2018).

Encontramos diferentes enfermedades dentro de las ND como el Alzheimer, el Parkinson y el Huntington, y otras enfermedades poco frecuentes (Kaminska & Zoladek, 2021).

La enfermedad del Alzheimer

El Alzheimer es una ND lentamente progresiva (Breijyeh & Karaman, 2020) en el cual el estado de demencia es el resultado final de esta patología. Se caracteriza por su difícil diagnóstico, principalmente, si el paciente no muestra síntomas (Scheltens et al., 2021). De hecho, la enfermedad del Alzheimer (AD) se caracteriza por tener una larga fase preclínica asintomática (Deture & Dickson, 2019). Además, esta enfermedad depende de una multitud de factores genéticos, epigenéticos y ambientales que interactúan entre sí (Sherzai & Sherzai, 2019). Existe una variante minoritaria (<1%) que se denomina AD familiar (FAD) y es hereditaria (Nikolac Perkovic & Pivac, 2019); y por otro lado está la variante esporádica que abarca la mayoría de los casos de Alzheimer (Zhang, Chen, et al., 2020).

De entre todas las ND, la AD es la mayor causa de demencia, representando el 50-70% de los casos de demencia neurodegenerativa (Lashley et al., 2018). Dado que la población de más rápido crecimiento en los países desarrollados son los individuos de 65 años y más, es importante abordar este futuro problema que colapsará nuestro sistema de salud (Sherzai & Sherzai, 2019). De hecho, los datos informan que para el año 2050 la incidencia de casos de demencia será el doble en Europa y el triple a nivel mundial (Scheltens et al., 2021). También,

cabe destacar, que actualmente no hay una cura para esta enfermedad; solo existen tratamientos que mejoran la sintomatología (Breijyeh & Karaman, 2020). Asimismo, los costos personales y financieros tan altos exigen diagnósticos y tratamientos preclínicos efectivos para detener la progresión de la enfermedad antes del comienzo de los síntomas (Deture & Dickson, 2019).

Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

Diagnóstico

El Alzheimer es una proteinopatía (amiloide y tau) frecuentemente asociada con otros procesos relacionados con la edad (Deture & Dickson, 2019). Esta enfermedad se caracteriza por dos lesiones patológicas importantes en el cerebro: las placas amiloides, compuestas principalmente por péptidos $A\beta$, y los ovillos neurofibrilares (NFT) compuestos por tau hiperfosforilada (Naseri et al., 2019). De manera que la acumulación de $A\beta$ y la patología tau pueden provocar cambios estructurales en el cerebro; cambios como la pérdida de volumen del hipocampo y la disminución del metabolismo de la glucosa (Deture & Dickson, 2019). Como resultado se genera un agrandamiento de los ventrículos laterales y una disminución del peso del cerebro en la mayoría de los individuos afectados (Deture & Dickson, 2019). Este cambio de la morfología se puede observar en la Figura 1.

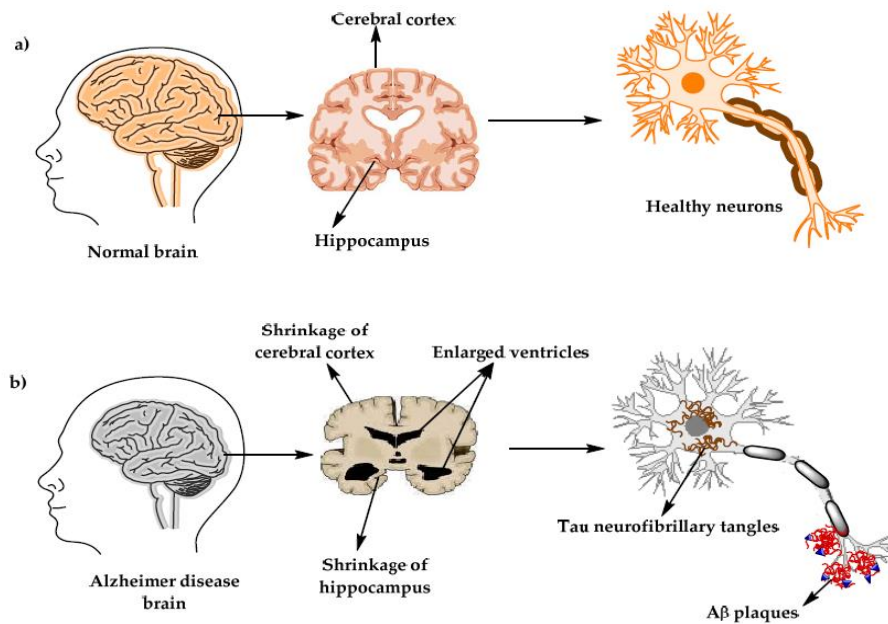


Figura 1. La estructura fisiológica del cerebro y las neuronas en un (a) cerebro sano y en un (b) cerebro con enfermedad de Alzheimer (Breijyeh & Karaman, 2020).

A medida que va avanzando la enfermedad, los efectos de la pérdida de la memoria, la dependencia social y las anomalías motoras se manifiestan (Deture & Dickson, 2019).

En 1984, el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares (NINCDS) y la Asociación de Enfermedades de Alzheimer y Trastornos relacionados (ADRDA) formaron un grupo para establecer un criterio de diagnóstico clínico para la AD. Ese criterio, que confirma el estado de demencia, incluye pruebas neuropsicológicas, pérdida progresiva de la memoria, deterioro de la actividad de la vida diaria y otros síntomas como la afasia, apraxia y agnosia. Asimismo, estos síntomas pueden comenzar entre los 40 y 90 años, incluso sin la presencia de cualquier síntoma sistémico o cerebral (Breijyeh & Karaman, 2020). En un paciente que es susceptible de padecer AD deben realizarse diversas pruebas como una examinación neurológica, una imagen de resonancia magnética y exámenes de vitamina B12 (Breijyeh & Karaman, 2020).

En el campo de los biomarcadores, el diagnóstico de la AD se define por la presencia de A β y tau fosforilada (Scheltens et al., 2021).

Tau es una familia de proteínas asociada a microtúbulos (MAPs) (Pîrșcoveanu et al., 2017) que contribuye a la estabilidad de los microtúbulos de los axones. También está involucrado en la regulación del crecimiento del axón y del transporte axonal (Wegmann et al., 2021). En el cerebro humano, se expresan 6 isoformas de esta proteína y tienen una longitud de entre 352 a 441 aminoácidos (Pîrșcoveanu et al., 2017). Por otro lado, la unión de tau a los microtúbulos está regulada por modificaciones post-traduccionales, mayoritariamente por la fosforilación (Wegmann et al., 2021). De hecho, tau es una fosfoproteína y su actividad biológica está regulada por su grado de fosforilación. Muchos de los sitios de fosforilación se dan en los aminoácidos serina/treonina-prolina (figura 2) y estas fosforilaciones pueden controlar las funciones normales de tau (Pîrșcoveanu et al., 2017).

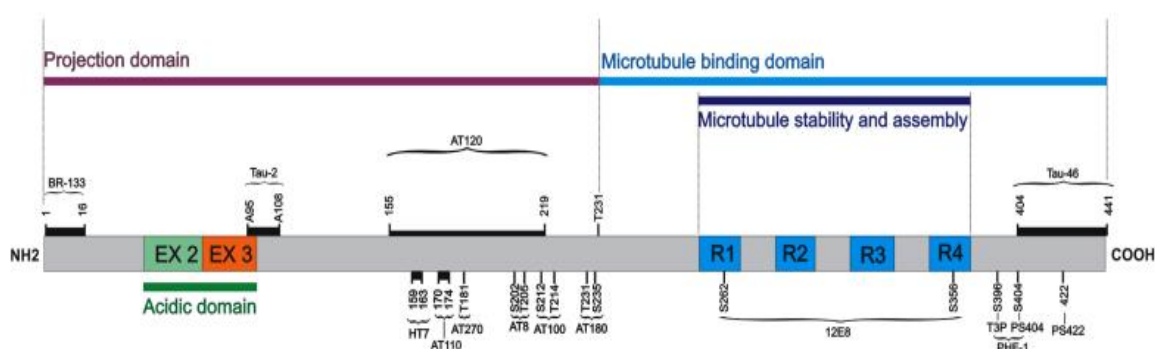


Figura 2. Los principales sitios de fosforilación de la proteína tau (Pîrșcoveanu et al., 2017).

Referente a esto, los pacientes que padecen AD presentan tau hiperfosforilada y estas no se pueden eliminar porque no presentan reactividad a ubiquitina. Además, esta hiperfosforilación contribuye a la formación de NFT y se ha visto que el nivel de fosforilación de tau es 3-4 veces mayor en pacientes con Alzheimer. Por lo que, la proteína tau hiperfosforilada es causante de la despolimerización de los microtúbulos y, por tanto, de la muerte neuronal (Pîrșcoveanu et al., 2017).

La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína transmembrana que gracias a la acción de las enzimas α -secretasa y γ -secretasa, libera un fragmento

soluble (Breijyeh & Karaman, 2020). Se denomina la vía no amiloidogénica de APP y ejerce un papel neuroprotector promoviendo la formación de la sinapsis, la migración neuronal y los brotes dendríticos (Hefter et al., 2020). Sin embargo, si no actúa la α -secretasa, el procesamiento alternativo de la APP por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa (vía amiloidogénica) causa la liberación de $A\beta$. Mutaciones específicas en APP dan lugar a un aumento de proteínas $A\beta$ y mutaciones puntuales en presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2) favorecen la formación de la isoforma $A\beta_{42}$. Asimismo, elevadas concentraciones de $A\beta_{42}$ se asocian con una mayor formación de fibrillas insolubles que componen las placas $A\beta$ (Oakley et al., 2006).

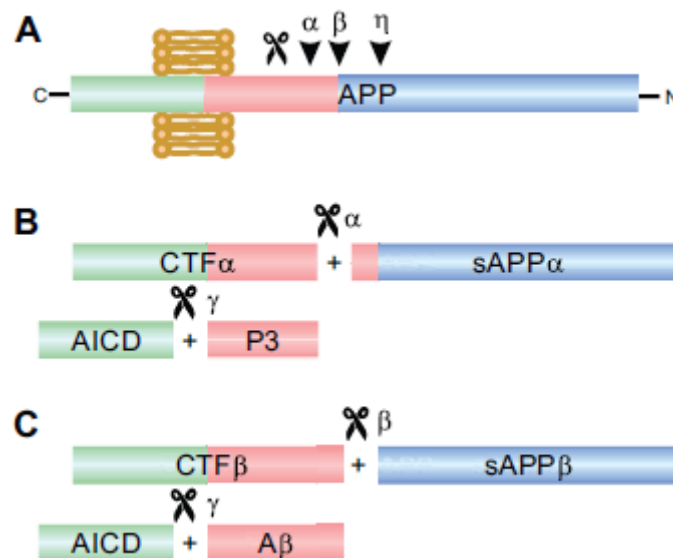


Figura 3. Procesamiento proteolítico de APP por las secretasas. (A) Esquema de la estructura de APP. (B) Vía no amiloidogénica. (C) Vía amiloidogénica (Hefter et al., 2020).

La hipótesis amiloide indica que la acumulación del péptido amiloide está en las bases de la cascada de efectos neuropatológicos de la AD. Además de un exceso de producción del péptido en el FAD, la degradación de $A\beta$ disminuye debido a la edad o condiciones patológicas; en ambos casos se provoca un aumento de cantidad de $A\beta$ y cuando la proporción $A\beta_{42}$ es mayor a $A\beta_{40}$, se forman fibrillas de amiloide. Esto genera neurotoxicidad y patología tau,

provocando la muerte de las células neuronales y la neurodegeneración (Breijyeh & Karaman, 2020).

Factores de riesgo

Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso complejo e irreversible y se considera el factor de riesgo más importante de la AD. Este proceso da lugar a una reducción de volumen y peso del cerebro, pérdida de sinapsis, disfunción mitocondrial y deterioro cognitivo, entre otros (Breijyeh & Karaman, 2020). Asimismo, en un estudio se vio un aumento de los niveles de placas amiloides y NFT en personas mayores de 65 años (Armstrong, 2019).

La AD se puede dividir en dos grupos; el primero, denominado inicio temprano de la AD, afecta a la población joven y la mayoría se deben a factores genéticos; y el segundo, inicio tardío de la AD, afecta a partir de los 65 años y abarcan la mayoría de casos de esta enfermedad (Breijyeh & Karaman, 2020).

Genética

La genética también es un factor muy importante. Se han identificado mutaciones autosómicas dominantes en los genes APP, PS1 y PS2 implicadas en el FAD; y el alelo $\epsilon 4$ del gen Apolipoproteína E (ApoE) como principal causa genética del AD esporádico (Breijyeh & Karaman, 2020). La mayoría de los casos de jóvenes con AD son por causa de estos genes; pero hay casos que se deben a otros factores genéticos adicionales, de los cuales no se tiene mucha información (Fenoglio et al., 2018).

El gen APP contiene 30 mutaciones de las cuales 25 están relacionadas con la AD y la acumulación de $A\beta$. La mutación A673T, en cambio, protege

contra el Alzheimer, disminuyendo la secreción de A β (Breijyeh & Karaman, 2020).

Los genes PS1 y PS2 también están involucrados en la formación de esta enfermedad. PS1 es una proteína que activa la enzima γ -secretasa y se ha visto que la falta de esta proteína implica disfunción sináptica y deterioro de la memoria. Por lo cual, estos resultados indican que PS1 es importante para mantener la memoria y las neuronas. Sin embargo, mutaciones puntuales pueden generar un aumento de la ratio A β_{42} / A β_{40} . En cuanto a las mutaciones en el gen PS2, estas no provocan un impacto tan grande en la producción de A β (Breijyeh & Karaman, 2020).

Por último, el gen ApoE produce una glicoproteína que actúa como ligando para partículas lipoproteicas como el colesterol. El colesterol es importante para mantener una función normal del cerebro. No obstante, la isoforma ApoE4 está asociada a la formación de la patología A β (Breijyeh & Karaman, 2020). Además, puede desarrollarse de manera más rápida, por lo que, se pueden dar casos de AD en personas jóvenes (Armstrong, 2019).

Factores ambientales

Existen varios factores ambientales que pueden favorecer la AD; por ejemplo, la contaminación del aire, la dieta, los metales y las infecciones (Breijyeh & Karaman, 2020).

La exposición prolongada de aire contaminado puede dar lugar a estrés oxidativo y neuroinflamación; y la falta de nutrientes, como el folato, la vitamina B12 y la vitamina D, también se asocian a problemas neurológicos (Breijyeh & Karaman, 2020).

Patologías asociadas

La AD muchas veces se ve asociado a enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Breijyeh & Karaman, 2020).

Diferentes enfermedades cerebrovasculares como el ictus o insuficiencia cardiaca pueden dar lugar a aumentar el riesgo de padecer AD, a causa de daño neural o pérdida de memoria (Breijyeh & Karaman, 2020).

La obesidad y la diabetes tipo 2 pueden generar un estado de inflamación por la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Esta inflamación puede afectar a la señalización de la insulina y, por ende, dañar la salud neural. Además, la inflamación cerebral aumenta las células de la microglía y altera la neurogénesis (Breijyeh & Karaman, 2020).

La epóxido hidrolasa soluble (sEH) como diana terapéutica

La epóxido hidrolasa soluble es una enzima que hidroliza una molécula antiinflamatoria denominada ácido epoxieicosatrienoico (EET). Esta molécula es parte de la cascada del ácido araquidónico (figura 4) y es capaz de reducir la inflamación y mitigar el estrés oxidativo. En cambio, cuando sEH actúa, los EET se convierten en ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET) y estas moléculas eliminan los efectos beneficiosos de los EET (Griñán-Ferré et al., 2020).

Los periodos largos de neuroinflamación pueden dar lugar a una pérdida neuronal que provocan la acción de células inmunitarias, como la microglía y los astrocitos. Es por ello, que esta enzima se considera una posible diana terapéutica. Asimismo, se ha visto que los inhibidores de sEH aumentan la cantidad de moléculas antiinflamatorias y, por tanto, disminuyen la respuesta inflamatoria de las células inmunitarias. Además, producen un efecto neuroprotector en neuronas (Kodani & Morisseau, 2019).

1-trifluorometoxifenil-3-(1-propionilpiperidin-4-il) urea (TPPU) es el inhibidor de sEH más utilizado en investigación y se caracteriza por su fácil obtención y

solubilidad. Asimismo, la administración oral repetida de esta reduce la neurotoxicidad (Zarriello et al., 2019).

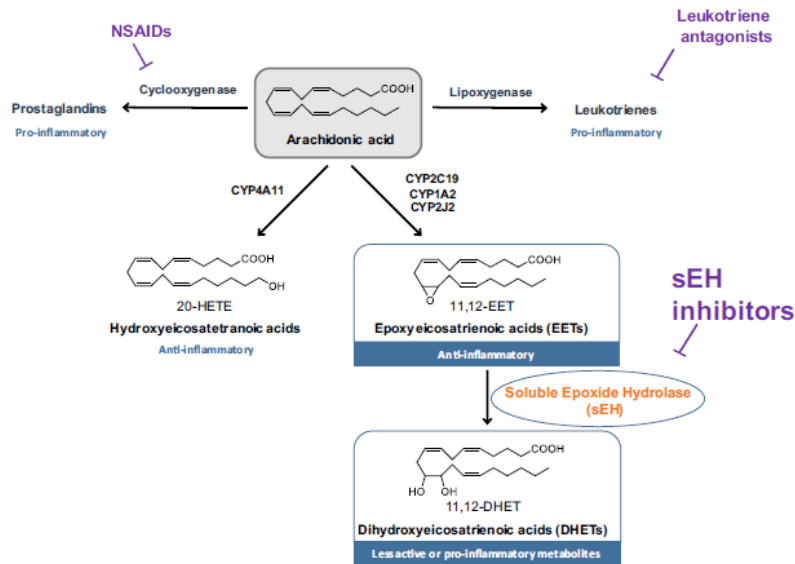


Figura 4. Cascada del ácido araquidónico (Griñán-Ferré et al., 2020).

Modelo de ratón 5xFAD

5xFAD es un modelo de ratón doble transgénico APP/PS1 que contiene 5 mutaciones características de la FAD (Oakley et al., 2006). La sobreexpresión de estas mutaciones, consiguen reproducir aspectos propios de la AD; como, por ejemplo, las placas A β , los NFT, la gliosis y la degeneración sináptica (Kimura & Ohno, 2009). Además, es un modelo animal que desarrolla la enfermedad muy temprano. A los 2 meses de edad presentan placas amiloides y gliosis, marcadores sinápticos reducidos, pérdida de neuronas y deterioro de la memoria (Oakley et al., 2006).

Debido a las mutaciones en APP y en PS1 se incrementa la producción de A β que da lugar a una patología de placa amiloide semejante a la que ocurre en la AD (Oakley et al., 2006).

Estas mutaciones fueron introducidas por mutagénesis dirigida en el ADNc del gen de la APP y PS1. Más tarde, se subclonó en el exón 2 del casete del transgén *Thy1* de ratón. Además, el transgén APP contiene un elemento potenciador de la interleucina-1 (IL-1). Tras purificar los transgenes de la secuencia del vector,

se añadieron los transgenes en proporciones iguales y se microinyectaron en pronúcleos de embriones híbridos C57/B6XSJL de una sola célula. Los ratones transgénicos fundadores se identificaron mediante una prueba PCR y Southern Blot (Oakley et al., 2006).

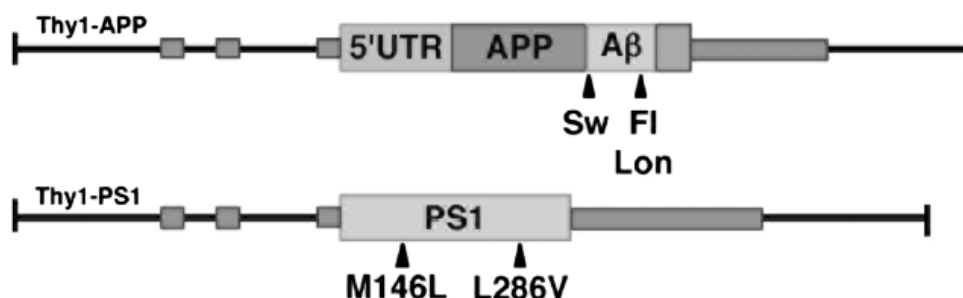


Figura 5. Esquema de los transgenes 5xFAD APP y PS1 (Oakley et al., 2006).

Antecedentes

Este trabajo ha sido una continuación de un proyecto comenzado previamente en el grupo de investigación “Neurodegeneración y Envejecimiento” del IIBB. El objetivo principal de este proyecto ha sido investigar si la administración de un agente farmacológico antiinflamatorio, TPPU, en el periodo prenatal de ratones puede generar un efecto neuroprotector en la descendencia. A fin de analizar el posible efecto neuroprotector de TPPU, se han realizado varias pruebas cognitivas y pruebas moleculares en un modelo de ratón 5xFAD de 2 meses de edad.

Previamente, se estudió el estado cognitivo de los ratones mediante las pruebas “memoria espacial” y “memoria de reconocimiento”; después, se realizaron diferentes pruebas moleculares con tejido de corteza e hipocampo. Debido a los buenos resultados obtenidos, se quiso aumentar el número de muestras utilizadas en las diferentes pruebas moleculares. Anteriormente, había 3 muestras/grupo y este trabajo ha complementado el estudio del proyecto aumentando el número de muestras por grupo en las diferentes pruebas moleculares, consiguiendo así un total de 6 muestras/grupo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis positiva: los ratones que hayan recibido el tratamiento farmacológico se hipotetiza que tendrán un mejor estado cognitivo respecto a los ratones no tratados. Es decir, los niveles de proteína tau hiperfosforilada y de A β disminuirán, y junto a esto disminuirá la neuroinflamación. De esta manera, los ratones tratados con TPPU presentarán menor patología del Alzheimer, asemejándose a los ratones salvajes WT usados como control.

Hipótesis alternativa: los ratones que hayan recibido el tratamiento farmacológico se hipotetiza que tendrán un peor estado cognitivo respecto a los ratones no tratados. Es decir, los niveles de proteína tau hiperfosforilada y de A β aumentaran, y junto a esto aumentara la neuroinflamación. De esta manera, los ratones tratados con TPPU presentarán mayor patología del Alzheimer.

Los objetivos de este estudio son:

- Analizar cambios epigenéticos en ratones modelo de la AD cuya madre ha sido tratada con un inhibidor de la epóxido hidrolasa soluble.
- Analizar el efecto neuroprotector de TPPU.
- Validar la sEH como diana farmacológica.
- Aumentar los niveles de moléculas antiinflamatorias.
- Generar beneficios a largo plazo en ratones 5xFAD.

MATERIALES Y METODOS

Pruebas moleculares

Los animales utilizados para las diferentes pruebas moleculares son un modelo animal 5xFAD de 2 meses de edad. En concreto, se extrajo el tejido izquierdo y derecho de corteza e hipocampo, de los cuales el derecho ha sido utilizado para las pruebas moleculares WB y qPCR.

Este proyecto tiene un total de 8 grupos: machos (M), hembras (H), modelo wild type (WT) o 5xFAD (HT) y control (CT) o tratado con TPPU; contiene tres variables de investigación: sexo (Sex), genotipo (G) y tratamiento (Tr); y el número de muestras por tipo de grupo es N=6, excepto en el grupo “H, CT, HT” que es N=4.

Western Blot (WB)

En primer lugar, se homogeneizó el tejido cerebral (corteza o hipocampo) mediante 200 μ L/100 μ L, respectivamente, del reactivo RIPA+C; que contiene un tampón de lisis RIPA, inhibidores de proteasas (Complete, componente comercial con una mezcla de inhibidores) y de fosfatasas (NAVA y NaF). Además, la lisis se reforzó con la ayuda de un sonicador. Después, se centrifugó 10 minutos, a 4^o y a 13000 g y se recogió el sobrenadante. Mediante el método Bradford, se midió la cantidad de proteína por muestra.

A partir de ahí, se prepararon las muestras para el Western Blot. Las muestras contenían 6xDTT, agua destilada y la muestra con 40 μ g de proteína (en total 18 μ L).

Estas muestras, junto con el marcador de peso molecular, se cargaron en un gel de electroforesis al 12% y se realizó una electroforesis SDS-PAGE (100 V, 2 horas). Después, se transfirió la proteína a una membrana de PVDF durante 90 minutos a 200 miliAmperes y más tarde, se bloqueó la membrana con Blotting-Grade Blocker al 5% durante 1 hora. Se incubó con el anticuerpo primario over

night en un agitador rotatorio. Las diferentes características de los anticuerpos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados y sus características.

| Anticuerpo | Origen | Dilución | Peso molecular (kDa) |
|-------------------|---------------|-----------------|-----------------------------|
| GFAP | Ratón | 1:1000 | 50 |
| HT7 | Ratón | 1:1000 | 79 |
| AT8 | Ratón | 1:1000 | 55 |
| EGR-1 | Conejo | 1:500 | 75 |
| β -tubulina | Ratón | 1:1000 | 55 |

Por último, se hicieron tres lavados de 5 minutos con tampón TBS (T-TBS) y se incubó con el anticuerpo secundario (dilución 1:2000) por 1 h y en agitación. Antes de leer la membrana, se hicieron tres lavados con T-TBS.

La lectura de las membranas se realizó con ECL (reactivos de detección Prime Western Blotting) y se leyó a partir de una maquina llamada *Chemidoc*. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa informático "ImageLab". Las proteínas fueron normalizadas con un control de carga (β -tubulina).

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para comenzar, se realizó la extracción de ARN, a partir del lado derecho de los tejidos corteza e hipocampo, utilizando el Kit de aislamiento de ARNm mirVanaTM (#AM156; Life Technologies). Se añadió tampón de lisis a la muestra y esta se trituró con la ayuda de un pestle. Después, se añadió una solución de homogenado y cloroformo con el que se consiguió aislar el ARNm. A continuación, mediante diferentes soluciones de lavado y finalmente con agua libre de nucleasas, calentada previamente, precipitó el ARNm. Por último, se cuantificó la cantidad de ARNm extraído en un espectrofotómetro de microvolúmenes llamado nanodrop. Cuando la cantidad de ARNm obtenido no llegaba al mínimo necesario, se utilizaba una centrifuga de calor (SpeedVac), que concentra las muestras.

Seguidamente, se obtuvo el ADNc mediante un Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (#4368814; Life Technologies). Se añadieron 500/300 ng (corteza e hipocampo respectivamente) de ARNm de cada muestra junto con 14,2 μ L de agua libre de nucleasas y 5,8 μ L de MasterMix (volumen total de 20 μ L). Se pusieron los tubos en un termociclador durante 135 minutos (tabla 2).

Tabla 2. Programa de PCR para la obtención de ADNc.

| | Paso 1 | Paso 2 | Paso 3 | Paso 4 |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Temperatura | 25 °C | 37 °C | 85 °C | 4 °C |
| Tiempo | 10 minutos | 120 minutos | 5 minutos | - |

Una vez obtenido el ADNc, se hizo una dilución 1:4 (10 μ L de ADNc y 30 μ L de agua libre de nucleasas). Después, se prepararon las placas de 96 pocillos con las diferentes sondas TaqMan (Applied Biosystems). Los diferentes genes analizados en la qPCR son *Ephx2*, *Sirt 2*, *Hdac1*, *Hdac2*, *Dnmt1* y *Dnmt3a*.

En cada pocillo se añadieron 9 μ L de MaterMix junto con 1 μ L de DNAc diluido. Más tarde, se selló la placa con un sellador de placas adhesivas y se centrifugó. Por último, se puso la PCR y después, se analizaron los datos obtenidos.

Estadística

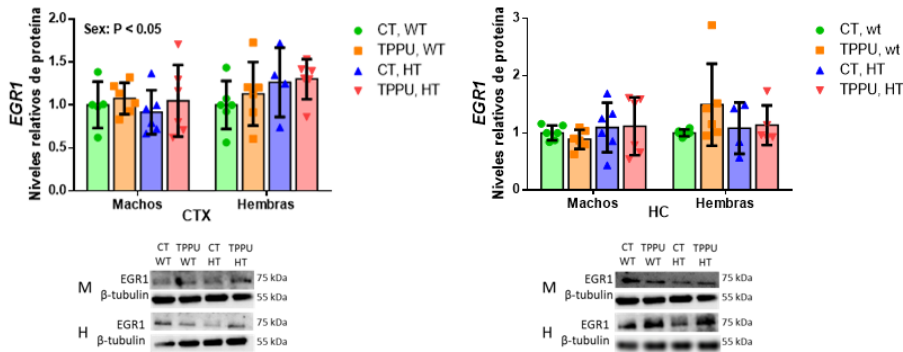
Los resultados fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism y se utilizaron las pruebas estadísticas ANOVA unidireccional y bidireccional. Después, se realizó un test post-hoc para las comparaciones múltiples entre las distintas variables: genero, genotipo y tratamiento. Se considera un resultado significativo cuando el “p valor” es menor a 0,05. Cuando el factor sexo no era significativo, el análisis estadístico de los factores tratamiento y genotipo se realizó con la suma de los datos de machos y hembras.

RESULTADOS

Pruebas moleculares

Western Blot (WB)

A



B

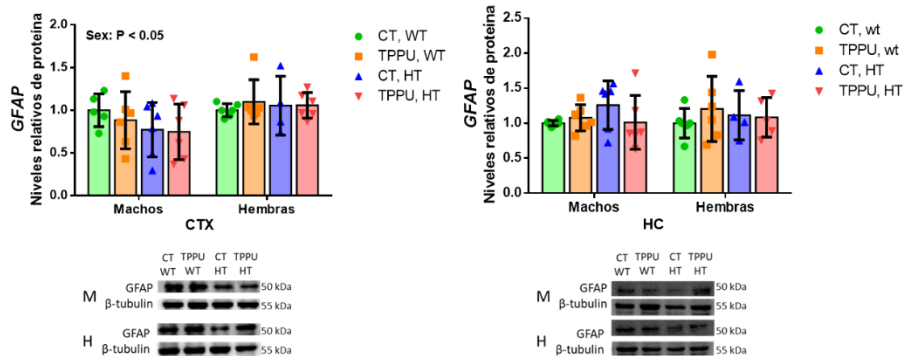
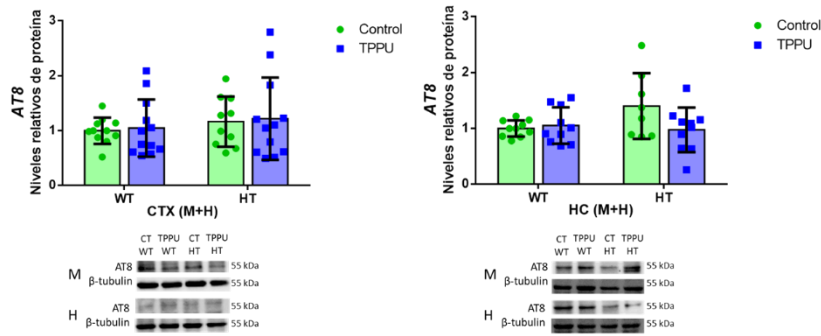


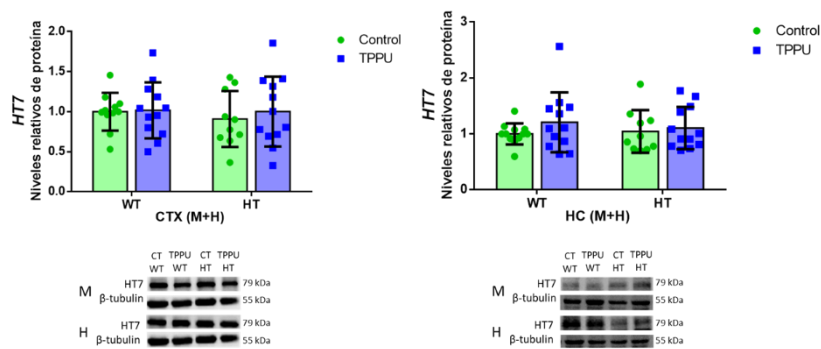
Figura 6. **Resultados de los efectos neuroprotectores de la inhibición de sEH por TPPU en Western Blot.** Se han analizado las proteínas *EGR1* (A) y *GFAP* (B). Para cada proteína se muestran los resultados de la corteza e hipocampo y los resultados de los machos y las hembras se muestran por separado. Los resultados fueron normalizados con β -tubulina. Se han realizado pruebas estadísticas ANOVA de dos vías y los valores P se indican en la parte superior de los gráficos: Sex, efecto del sexo. Se consideran diferencias significativas cuando $P < 0,05$. $N=6$ ratones/grupo.

Con el fin de conocer el efecto que puede tener este tratamiento farmacológico, se estudió el nivel de proteína mediante WB y la expresión de diversos genes mediante qPCR. De cada proteína y gen, hay dos gráficas y cada una hace referencia a un tejido cerebral distinto; corteza (CTX) o hipocampo (HC). Además, las gráficas muestran la suma de resultados de machos y hembras cuando no hay un efecto del sexo; en cambio, cuando la hay, se muestran por separado.

A



B



C

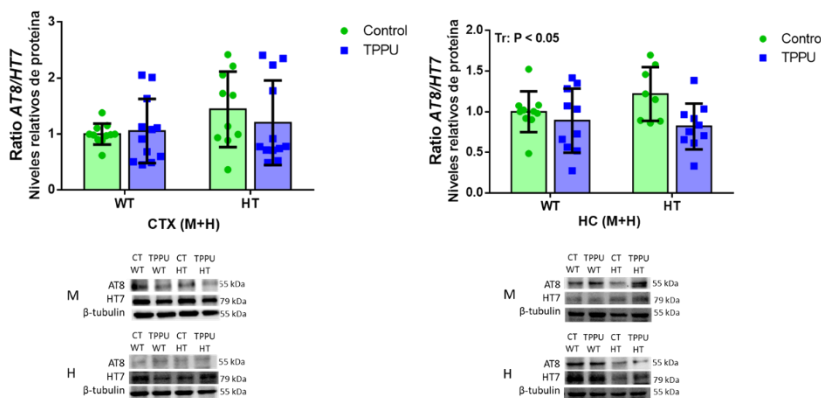


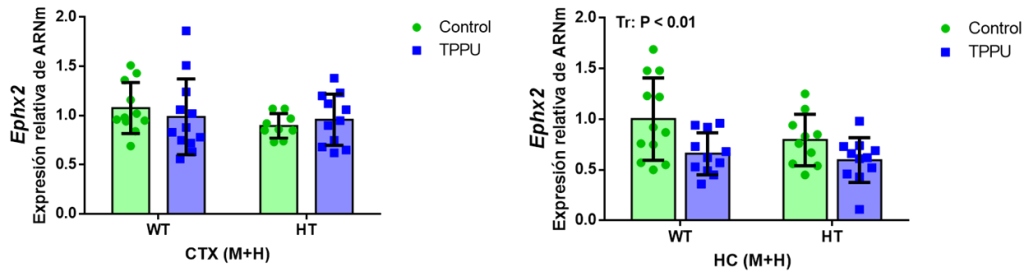
Figura 7. Resultados de los efectos neuroprotectores de la inhibición de sEH por TPPU en Western Blot. Se han analizado las proteínas AT8 (A), HT7 (B) y la ratio AT8/HT7 (C). Para cada proteína se muestran los resultados de la corteza e hipocampo y también la suma de los resultados de machos y hembras. Los resultados fueron normalizados con β -tubulina. Se han realizado pruebas estadísticas ANOVA de dos vías y los valores P se indican en la parte superior de los gráficos: Tr, efecto del tratamiento. Se consideran diferencias significativas cuando $P < 0,05$. N=6 ratones/grupo.

Debajo de las gráficas se presentan imágenes representativas de las proteínas inmunodetectadas con su respectivo control de carga. Está dividido por sexos y por tipo de grupo. En la parte derecha se puede observar el peso molecular de cada proteína en kilo Dalton (kDa).

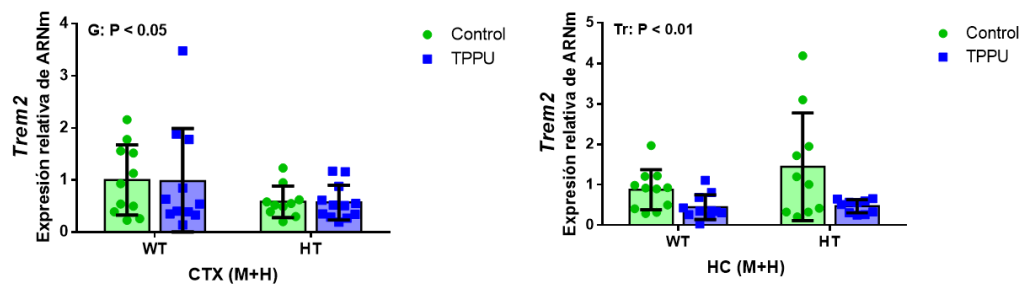
Los resultados mostraron diferencias significativas entre sexos en la corteza en EGR1 (figura 6, A). Además, se pudo apreciar como las hembras WT y HT presentan un aumento de proteína respecto a los machos. En cambio, en hipocampo se vio que los niveles de proteína de machos y hembras son parecidos, excepto el grupo TPPU, WT que presentó un mayor nivel de proteína en hembras que en machos. También se observaron diferencias significativas entre sexos en la corteza de la proteína GFAP (figura 6, B). Asimismo, los niveles de proteína en las hembras eran mayores que en los machos. Respecto al hipocampo, no hubo diferencias significativas entre sexos y los niveles de proteína eran similares entre machos y hembras. Los resultados de la proteína tau hiperfosforilada no mostraron diferencias significativas (figura 7, A). Los niveles de proteína del control y TPPU fueron similares en la corteza; en cambio, en hipocampo sí que se observó una disminución del nivel de proteína en los ratones heterocigotos tratados con TPPU. En cuanto al genotipo en hipocampo se apreciaba un aumento del nivel de proteína en los ratones HT, CT. Con referencia a la proteína tau total se apreció un incremento del nivel de proteína del grupo TPPU, HT en la corteza; y del grupo TPPU, WT en hipocampo (figura 7, B). Pero no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, cuando se realizó una ratio entre la proteína tau hiperfosforilada y la tau total, se observaron resultados significativos respecto al tratamiento en hipocampo (figura 7, C). Tanto en los animales WT como HT hubo un decrecimiento de los niveles de tau cuando se aplicaba el tratamiento TPPU. En la corteza también se observó una disminución de proteína tau en los HT cuando se aplica TPPU, pero este no era significativo.

qPCR

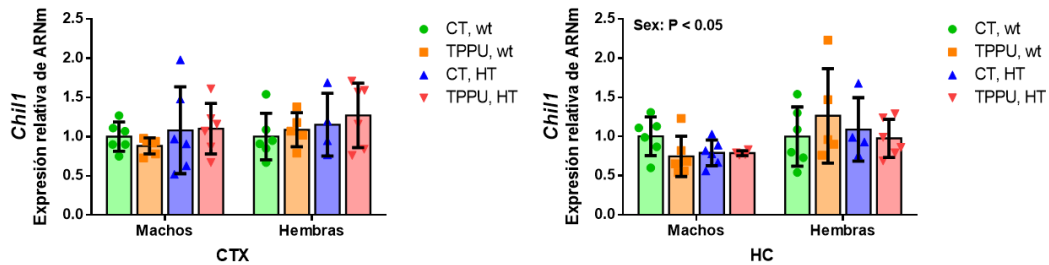
A



B



C



D

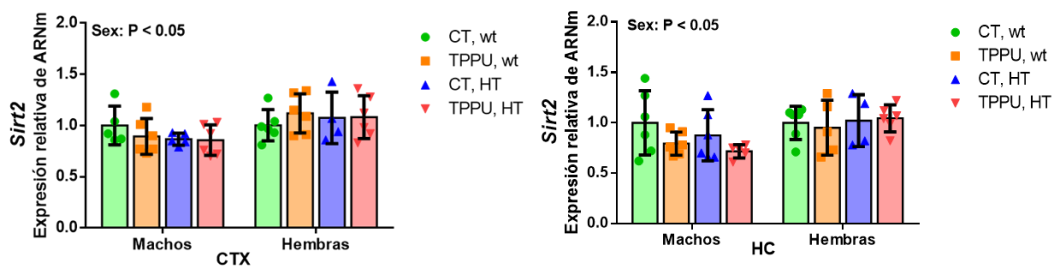
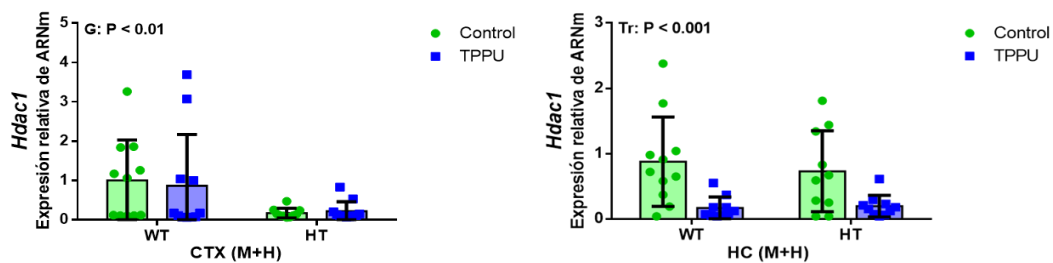


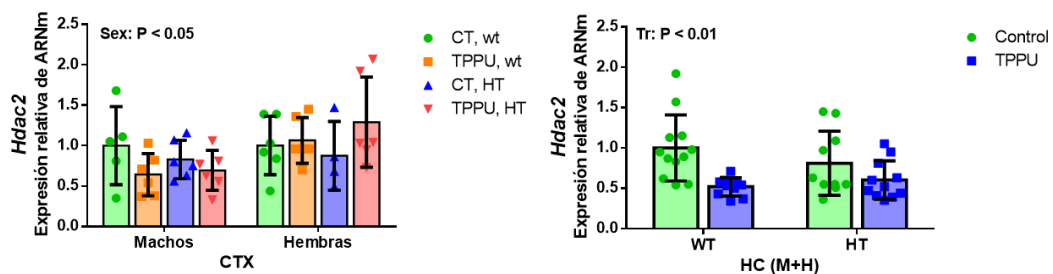
Figura 8. Resultados de los efectos neuroprotectores de la inhibición de sEH por TPPU en la técnica qPCR. Los cambios en la expresión relativa de los genes se describen para *Epxh2* (A), *Trem2* (B), *Chil1* (C) y *Sirt2* (D). Se han realizado pruebas estadísticas ANOVA de dos vías para estudiar cada expresión génica y los valores P se indican en la parte superior de los gráficos: Tr, efecto del tratamiento; G, efecto del genotipo; Sex, efecto del sexo. Se consideran diferencias significativas cuando $P < 0,05$. N=6 ratones/grupo.

La expresión del gen *Ephx2* en hipocampo mostró una disminución de la expresión cuando se administraba TPPU (figura 8, A). En cambio, en la corteza no se vieron diferencias significativas en cuanto al tratamiento o al genotipo. Respecto a la expresión del gen *Trem2* en la corteza se vieron diferencias significativas entre genotipos, esto es, los ratones HT presentaron menor expresión génica que los WT. No obstante, en hipocampo se observaron diferencias en el tratamiento; los animales tratados con TPPU mostraron una menor expresión que los controles (figura 8, B). Por último, los genes *Chil1* (figura 8, C) y *Sirt2* (figura 8, D) presentaron diferencias entre sexos. En ambos tejidos se observó un aumento de la expresión génica en las hembras.

A



B



C

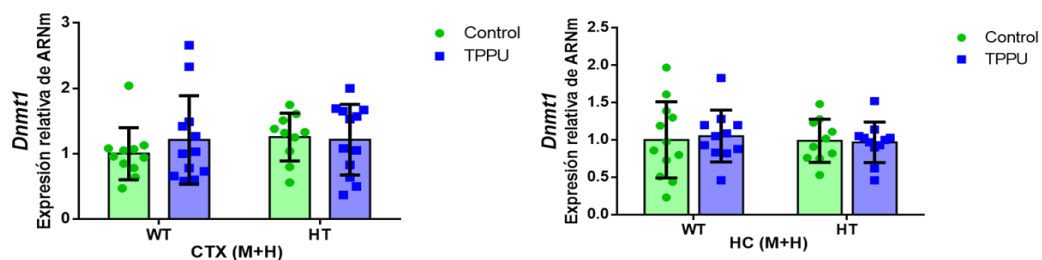


Figura 9. Resultados de los efectos neuroprotectores de la inhibición de sEH por TPPU en la técnica qPCR. Los cambios en la expresión relativa de los genes se describen para *Hdac1* (A), *Hdac2* (B) y *Dnmt1* (C). Se han realizado pruebas estadísticas ANOVA de dos vías para estudiar cada expresión génica y los valores P se indican en la parte superior de los gráficos: Tr, efecto del tratamiento; G, efecto del genotipo; Sex, efecto del sexo. Se consideran diferencias significativas cuando $P < 0,05$. N=6 ratones/grupo.

El nivel de expresión del gen *Hdac1* disminuyó en la corteza de los ratones heterocigotos y, en hipocampo, los ratones tratados con TPPU presentaron menor expresión de *Hdac1* que los animales control (figura 9, A). Respecto al gen *Hdac2* en la corteza se observó una diferencia significativa entre sexos y se apreció un incremento de la expresión en las hembras (figura 9, B). Ese incremento de expresión se dio en todos los grupos excepto en el grupo CT, HT. En hipocampo los ratones WT y HT tratados con TPPU presentaron menor expresión génica que los controles. Finalmente, se muestra el nivel de expresión génica de *Dnmt1* (figura 9, C). En la corteza se observó un aumento de la expresión en el grupo WT tratado con TPPU; sin embargo, en el grupo HT no. En cuanto al hipocampo, no se observaron diferencias ni en el genotipo ni en el tratamiento.

En resumen, a nivel de proteína se observó un efecto de TPPU en la ratio de tau hiperfosforilada sobre tau total (AT8/HT7) y, a nivel de expresión génica, una disminución de la expresión de genes que promueven la neuroinflamación.

DISCUSIÓN

El Alzheimer es una ND compleja y progresiva, y es la causa principal de demencia en personas ancianas (Athar et al., 2021). Además, durante las últimas dos décadas el desarrollo de tratamientos farmacológicos para tratar AD ha supuesto un reto muy grande. De hecho, muchos tratamientos se han rechazado por fallos en las diferentes fases clínicas. En 2020 se seleccionaron 441 drogas en desarrollo para el tratamiento de AD. Estos están clasificados en diferentes grupos; de los cuales destacan los tratamientos dirigidos a A β , inflamación, neurotransmisores y sus receptores, y tau (van Bokhoven et al., 2021). El fármaco Aducanumab de Biogen fue aprobado provisionalmente por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos (EE.UU.) (van Bokhoven et al., 2021). Aducanumab es un anticuerpo monoclonal dirigido a los agregados formados por A β , pero no se obtuvieron datos suficientes para respaldar su eficacia. (Tampi et al., 2021). Respecto a la inflamación, hoy en día existen los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID); sin embargo, no han resultado ser fármacos muy prometedores (Sung et al., 2020). En cambio, la neuroinflamación es una diana de interés creciente en el AD. Por ello, este estudio utiliza el fármaco TPPU que inhibe la enzima sEH, para aumentar los niveles de los antiinflamatorios endógenos EETs. Nuestros resultados muestran una disminución de proteína tau hiperfosforilada sobre proteína tau total y una disminución de la expresión de genes relacionados con la inflamación. Esto sugiere que TPPU es capaz de inhibir sEH y aumentar los niveles de moléculas antiinflamatorias (EET). De hecho, estudios anteriores demostraron que la inhibición de sEH por TPPU era capaz de reducir la neuroinflamación (Ghosh et al., 2020; Zhang, Xu, et al., 2020). Además, también se demostró su capacidad de penetración en el cerebro y su especificidad respecto a la diana terapéutica (Ghosh et al., 2020). Eso afirma que la disminución de la expresión del gen *Ephx2* en hipocampo se da gracias a TPPU. Por consiguiente, los niveles de EETs aumentarán y tendrán un efecto neuroprotector. Se sabe que los EETs contienen diversos efectos en el cerebro, entre ellos diversas funciones para regular la inflamación; como, por ejemplo, la modulación de la angiogénesis, la regulación del flujo sanguíneo cerebral y la mediación de la señalización neuroendocrina (Zarriello et al., 2019). También los

resultados muestran una disminución de la expresión génica de *Trem2* en hipocampo cuando es tratado con TPPU. Este gen modula las respuestas inflamatorias en la microglía, pero en condiciones patológicas, debido a una inflamación crónica, se da lugar a un aumento de su expresión (Qin et al., 2021). Sin embargo, la expresión de *Trem2* en la corteza es más baja en el grupo HT. Estos resultados hacen pensar que no hay una reacción inflamatoria en la corteza a esa edad y que el estado principal de la microglía de los HT es diferente a la de los WT; en todo caso, sería necesario realizar más estudios.

En los genes *Hdac1* y *Hdac2* se observan diferencias significativas en cuanto al tratamiento en hipocampo. Ambos genes participan en la desacetilación de histonas y en la regulación de la expresión génica. La disminución de la expresión de los dos genes provoca el mantenimiento de las histonas acetiladas; esto quiere decir que la expresión de ciertos genes seguirá activa. Se sabe que *Hdac2* está involucrado en el deterioro cognitivo que se encuentra en la AD. De hecho, se ha visto que la sobreexpresión de este gen en hipocampo disminuye la transcripción del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) y esto causa pérdida neuronal y deterioro de la memoria (Kumar et al., 2022). De manera que una vez más TPPU ayuda en la disminución de la expresión de *Hdac2*; y, por tanto, los ratones tendrán un mejor estado cognitivo. Además, se ha demostrado que la hipoacetilación de histonas y los cambios transcripcionales están implicados en diversos trastornos neurodegenerativos (Kumar et al., 2022). Por otro lado, se podría decir que el estado de metilación sobre el ADN no varía cuando se administra TPPU, dado que no se observan diferencias significativas en *Dnmt1*. No obstante, debería completarse con el estudio de enzimas demetiladoras de ADN y de análisis de los niveles de metilación.

Más tarde, en algunos casos se ven diferencias significativas entre machos y hembras. Esto indica que hay diversos factores de cada sexo que modifican la expresión de estos genes. Se ha visto que la respuesta inmunitaria de hembras y machos es diferente debido a cambios en los cromosomas sexuales y las hormonas. Por otro lado, también se ha visto que las hembras contienen una respuesta inflamatoria más fuerte que los machos; y que diferencias en el peso y, por tanto, una dosis distinta del fármaco administrado genera una distribución y efecto distinto de este. Además, las hormonas sexuales afectan a la

farmacodinámica y farmacocinética de las drogas (Farkouh et al., 2021). Por lo que, el efecto de TPPU en estos genes en machos y hembras no es igual y los resultados de ambos no se pueden analizar conjuntamente.

Finalmente, se observa una disminución de tau hiperfosforilada respecto a la tau total en hipocampo cuando se administra TPPU. Lo cual parece indicar que la disminución de inflamación en hipocampo ha dado lugar a una menor patología tau.

Por lo general, el tratamiento con TPPU provoca cambios en hipocampo. Puede haber diferentes causas por las cuales el efecto del fármaco es diferente en hipocampo y en la corteza. Una de las razones podría ser que el hipocampo sea una estructura más vulnerable al deterioro de la AD que el conjunto de la corteza cerebral y también, podría serlo al de los efectos de TPPU.

CONCLUSIONES

En consecuencia, se observa una disminución de la expresión en genes implicados en la inflamación y una disminución de la proporción de tau hiperfosforilada sobre la tau total; asimismo, la disminución de la expresión del gen que codifica para la sEH indica que se aumentan los niveles de moléculas antiinflamatorias. De modo que, la administración de TPPU de manera prenatal mejora el estado cognitivo y genera beneficios a largo plazo en los ratones que presentan Alzheimer familiar. Además, se confirma que la sEH es una prometedora diana farmacológica y que la neuroinflamación tiene un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Pero se necesitan más estudios para comprobar el efecto de TPPU en la corteza; y también, es necesario estudiar las diferencias encontradas entre machos y hembras.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87–105. <https://doi.org/10.5114/FN.2019.85929>
- Athar, T., al Balushi, K., & Khan, S. A. (2021). Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, 48(7), 5629–5645. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06512-9>
- Brejijeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
- Deture, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 2019 14:1, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13024-019-0333-5>
- Farkouh, A., Baumgärtel, C., Gottardi, R., Hemetsberger, M., Czejka, M., & Kautzky-Willer, A. (2021). Sex-Related Differences in Drugs with Anti-Inflammatory Properties. *Journal of Clinical Medicine*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/JCM10071441>
- Fenoglio, C., Scarpini, E., Serpente, M., & Galimberti, D. (2018). Role of Genetics and Epigenetics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 62(3), 913–932. <https://doi.org/10.3233/JAD-170702>
- Ghosh, A., Comerota, M. M., Wan, D., Chen, F., Propson, N. E., Hwang, S. H., Hammock, B. D., & Zheng, H. (2020). An epoxide hydrolase inhibitor reduces neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 12(573). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABB1206>
- Griñán-Ferré, C., Codony, S., Pujol, E., Yang, J., Leiva, R., Escolano, C., Puigoriol-Illamola, D., Companys-Aleman, J., Corpas, R., Sanfeliu, C., Pérez, B., Loza, M. I., Brea, J., Morisseau, C., Hammock, B. D., Vázquez, S., Pallàs, M., & Galdeano, C. (2020). Pharmacological Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase as a New Therapy for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 17(4), 1825–1835. <https://doi.org/10.1007/S13311-020-00854-1>
- Hefter, D., Ludewig, S., Draguhn, A., & Korte, M. (2020). Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 26(3), 231–251. <https://doi.org/10.1177/1073858419882619>
- Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) | Delegaciones CSIC. (n.d.). Retrieved June 5, 2022, from

<https://delegacion.catalunya.csic.es/instituto-de-investigaciones-biomedicas-de-barcelona-iibb/>

- Kaminska, J., & Zoladek, T. (2021). *Molecular Sciences Editorial Yeast Models and Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases*.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168775>
- Kimura, R., & Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Disease*, 33(2), 229–235.
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2008.10.006>
- Kodani, S. D., & Morisseau, C. (2019). Role of epoxy-fatty acids and epoxide hydrolases in the pathology of neuro-inflammation. *Biochimie*, 159, 59–65.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2019.01.020>
- Kritsilis, M., Rizou, S. v., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19102937>
- Kumar, V., Kundu, S., Singh, A., & Singh, S. (2022). Understanding the Role of Histone Deacetylase and their Inhibitors in Neurodegenerative Disorders: Current Targets and Future Perspective. *Current Neuropharmacology*, 20(1), 158–178. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210609160017>
- Lashley, T., Schott, J. M., Weston, P., Murray, C. E., Wellington, H., Keshavan, A., Foti, S. C., Foiani, M., Toombs, J., Rohrer, J. D., Heslegrave, A., & Zetterberg, H. (2018). *Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects*. <https://doi.org/10.1242/dmm.031781>
- Naseri, N. N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M., & Luo, W. (2019). The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 705, 183–194.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.04.022>
- Nikolac Perkovic, M., & Pivac, N. (2019). Genetic Markers of Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1192, 27–52.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9721-0_3
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Pîrșcoveanu, D. F. V., Pirici, I., Tudorică, V., Bălșeanu, T. A., Albu, V. C., Bondari, S., Bumbea, A. M., & Pîrșcoveanu, M. (2017). Tau protein in neurodegenerative diseases - a review. *Romanian Journal of Morphology*

- and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 58(4), 1141–1150. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556602/>
- Qin, Q., Teng, Z., Liu, C., Li, Q., Yin, Y., & Tang, Y. (2021). TREM2, microglia, and Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 195. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111438>
- Scheltens, P., de Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Sherzai, D., & Sherzai, A. (2019). Preventing Alzheimer's: Our Most Urgent Health Care Priority. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(5), 451–461. <https://doi.org/10.1177/1559827619843465>
- Sung, P. S., Lin, P. Y., Liu, C. H., Su, H. C., & Tsai, K. J. (2020). Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS21030701>
- Tampi, R. R., Forester, B. P., & Agronin, M. (2021). Aducanumab: evidence from clinical trial data and controversies. *Drugs in Context*, 10. <https://doi.org/10.7573/DIC.2021-7-3>
- van Bokhoven, P., de Wilde, A., Vermunt, L., Leferink, P. S., Heetveld, S., Cummings, J., Scheltens, P., & Vijverberg, E. G. B. (2021). The Alzheimer's disease drug development landscape. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13195-021-00927-Z>
- Wegmann, S., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2021). A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2021.03.003>
- Zarriello, S., Tuazon, J. P., Corey, S., Schimmel, S., Rajani, M., Gorsky, A., Incontri, D., Hammock, B. D., & Borlongan, C. v. (2019). Humble beginnings with big goals: Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors for treating CNS disorders. *Progress in Neurobiology*, 172, 23–39. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2018.11.001>
- Zhang, L., Chen, C., Mak, M. S. H., Lu, J., Wu, Z., Chen, Q., Han, Y., Li, Y., & Pi, R. (2020). Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 431–458. <https://doi.org/10.1002/MED.21624>
- Zhang, L., Xu, S., Wu, X., Muse, F. M., Chen, J., Cao, Y., Yan, J., Cheng, Z., Yi, X., & Han, Z. (2020). Protective Effects of the Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-Propionylpiperidin-4-yl) Urea in a Rat Model of Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00182>

AUTOEVALUACIÓN

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de investigación “Neurodegeneración y Envejecimiento” coordinado por Coral Sanfeliu. El grupo trabaja en la prevención del Alzheimer mediante la administración de un fármaco.

La neurobiología es un ámbito de la ciencia que desde hace años me ha llamado la atención. Por ello, realizar las prácticas sobre el Alzheimer me ha gustado mucho. Además, he descubierto que es un ámbito que desconozco y cada artículo que he leído, me ha servido para aprender algo nuevo. En cuanto a la universidad, no hemos tenido ninguna asignatura sobre neurociencia, pero el conocimiento de algunas técnicas que he utilizado sí que me han servido. Como, por ejemplo, saber qué es y para qué sirve un Western Blot o una PCR cuantitativa. Asimismo, asignaturas como “Expresión y Replicación Génicas” de la Universidad Rovira y Virgili (URV) y “Citogenética” de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) también me han ayudado a entender mejor cómo funciona el ADN y la expresión de genes.

Mi trabajo en este grupo de investigación ha sido muy positivo y beneficioso. Aquí he podido conocer un proyecto de investigación y formar parte de él; además, he aprendido a interpretar y ser crítica con los resultados obtenidos. También he sido capaz de aprender rápido y organizarme de forma adecuada. Mi objetivo principal era conocer un lugar de trabajo diferente a la universidad y aprender lo máximo posible; y definitivamente, así ha sido.

Por ello, me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado y han sido parte de mi aprendizaje. Gracias a la Dra. Coral Sanfeliu y a Clara Bartra por su amabilidad y dedicación y por darme la oportunidad de formar parte de este estudio. Por otro lado, también quiero agradecer a la Dra. Ana Fernández por su tiempo y consejos a la hora de realizar este trabajo.

Yo, Ainhoa Villoslada Fanega, con DNI 73452828M, soy conocedora de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 1 de septiembre de 2022

