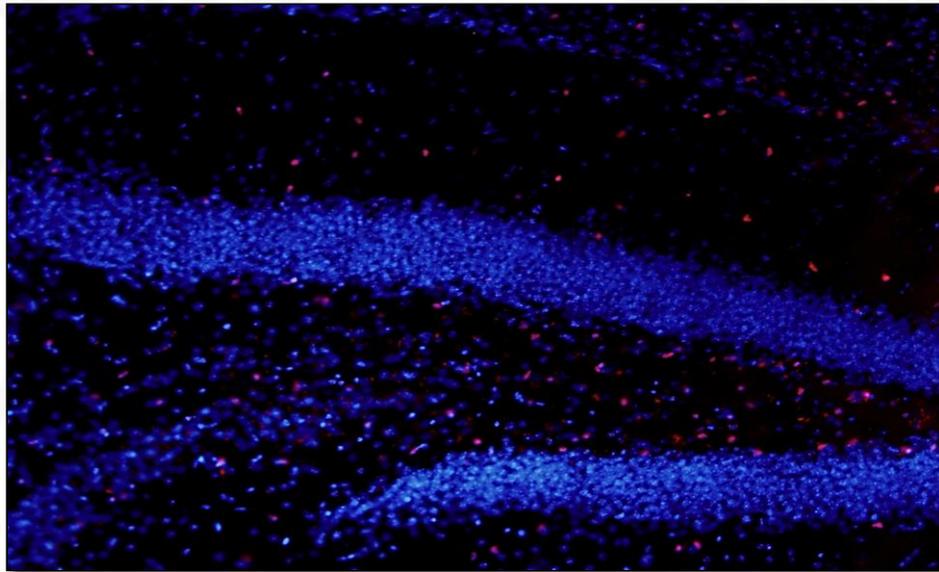


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOLOGÍA

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO INTRACEREBROVENTRICULAR CON  
EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 17 EN UN MODELO  
MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

*EFFECT OF INTRACEREBROVENTRICULAR TREATMENT WITH  
FIBROBLAST GROWTH FACTOR 17 IN A MURINE MODEL OF  
ALZHEIMER'S DISEASE*



**María Boquete Roca**

Departamento de Biología Funcional/Universidad de Oviedo

Intervenciones Traslacionales para la Salud /ISPA

**Julio/2024**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## Resumen

La enfermedad del Alzheimer (EA) es una de las afecciones neurodegenerativas más prevalentes en la población y, actualmente, no dispone de un tratamiento eficaz. Su fisiopatología está relacionada con la formación, agregación y depósito de placas de beta amiloide (A $\beta$ ) y, más recientemente, se ha demostrado una pérdida progresiva de oligodendrocitos. Estudios previos han demostrado el papel neuroprotector del factor de crecimiento de fibroblastos 17 (FGF17) sobre la oligodendrogli a en el proceso de envejecimiento. Por tanto, la hipótesis de este trabajo es que el FGF17 administrado vía intracerebroventricular produce una reducción de la densidad de placas de A $\beta$  y aumenta la proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos en un modelo murino de EA en estadio sintomático. Para demostrarla, se utilizaron 20 ratones macho en fondo genético 129Sv de 27 semanas de edad. Mediante cirugía estereotáxica, se implantó una bomba osmótica precargada con líquido cefalorraquídeo artificial o FGF17 (25  $\mu$ g/ml) en ratones APP/PS1 (n=5 por tratamiento) y se utilizaron los correspondientes ratones *na ve* APP/PS1 y silvestres (n=5 por genotipo). Tras 28 días de infusión, el efecto neuroprotector del FGF17 se evaluó en la corteza prefrontal e hipocampo del hemisferio contralateral, mediante inmunohistoquímica anti-A $\beta$  [MOAB-2] para medir la carga total A $\beta$  y mediante inmunofluorescencia indirecta anti-OLIG2 [EP112] para analizar la oligodendrogli a. Los resultados mostraron que la dosis empleada de FGF17 no tuvo un efecto directo sobre la carga total de A $\beta$  en los parámetros analizados. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la densidad y área ocupada por oligodendrocitos en la corteza prefrontal de los ratones tratados. Estos hallazgos apoyan el papel neuroprotector del FGF17 y arrojan luz sobre potenciales dianas terapéuticas para tratamientos novedosos y para la EA.

## Abstract

*Alzheimer's disease (AD) is one of the most prevalent neurodegenerative conditions in the population, and there is currently no effective treatment. Its pathophysiology involves the formation, aggregation and deposition of beta-amyloid (A $\beta$ ) plaques and, more recently, a progressive loss of oligodendrocytes has also been reported. Previous studies have demonstrated the neuroprotective role of fibroblast growth factor 17 (FGF17) on oligodendroglia in the ageing process. Therefore, the hypothesis of this work is that FGF17, administered via intracerebroventricular route, produces a reduction in A $\beta$  plaque density and increases oligodendrocyte proliferation and differentiation in a murine AD model at the symptomatic stage. For this purpose, 20 APP/PS1 strain 129Sv 27-week-old male mice were employed. By stereotaxic surgery, an osmotic pump pre-filled with artificial cerebrospinal fluid or FGF17 (25  $\mu$ g/ml) was implanted in APP/PS1 mice (n=5 per treatment) and their APP/PS1 and wild-type *naïve* counterparts (n=5 per genotype) were used. After 28 days of infusion, the neuroprotective effect was evaluated in the prefrontal cortex and hippocampus of the contralateral hemisphere using anti-A $\beta$  [MOAB-2] immunohistochemistry to measure the total A $\beta$  burden, and indirect anti-OLIG2 [EP112] immunofluorescence to analyze oligodendroglia.*

*Our results showed that the dose of FGF17 employed in this study had no direct effect on the total A $\beta$  burden in any of the parameters analyzed. However, a significant increase in the density and area occupied by oligodendrocytes in the prefrontal cortex was observed in FGF17 treated mice. These findings support the neuroprotective role of FGF17 and shed light on potential therapeutic targets towards novel treatments for AD.*



Universidad de Oviedo

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE TRABAJO FIN DE GRADO

Dña. MARÍA BOQUETE ROCA, estudiante del Grado en Biología de la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo, en relación con el Trabajo de Fin de Grado titulado “*Efecto del tratamiento intracerebroventricular con el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 17 en un modelo murino de Enfermedad de Alzheimer*” presentado para su defensa y evaluación en el curso académico 2023/2024, **DECLARA:**

- i) ser la autora del Trabajo de Fin de Grado,
- ii) que asume la originalidad de dicho trabajo, entendida en el sentido de que no ha utilizado fuentes sin citarlas debidamente.

En Oviedo, a 3 de julio de 2024

Firmado: María Boquete Roca

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Enfermedad de Alzheimer (EA).....	1
1.1.1. Etiología.....	1
1.1.2. Fisiopatología y principales signos histopatológicos.....	2
1.1.3. Relación entre oligodendrocitos y EA .....	3
1.2. FGF17 como molécula terapéutica en EA.....	4
1.2.1. Biodistribución y principales funciones.....	4
1.2.2. Propiedades neuroprotectoras y su función sobre los oligodendrocitos .....	5
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
3.1. Animales de experimentación .....	7
3.2. Diseño experimental y tamaño muestral .....	7
3.3. Cirugía estereotáxica de implantación y tratamiento farmacológico .....	8
3.4. Análisis histológico.....	9
3.4.1. Obtención y preparación del tejido.....	9
3.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas .....	10
3.5. Visualización al microscopio .....	11
3.6. Cuantificación y análisis estadísticos .....	12
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>5. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Gráfico de la prevalencia de la EA en diferentes rangos de edad .....	1
<b>Figura 2.</b> Procesamiento del A $\beta$ .....	3
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental del estudio en el que se enmarca el Trabajo de Fin de Grado y esquema ilustrativo de los análisis histológicos realizados en el presente trabajo .....	8
<b>Figura 4.</b> Regiones encefálicas específicas empleadas para la cuantificación .....	12
<b>Figura 5.</b> Análisis de la carga de A $\beta$ en la corteza prefrontal e hipocampo de los diferentes grupos experimentales .....	15
<b>Figura 6.</b> Análisis del tamaño de las placas de A $\beta$ en la corteza prefrontal e hipocampo dentro de los diferentes grupos experimentales .....	16
<b>Figura 7.</b> Efecto del tratamiento con FGF17 en la carga de A $\beta$ .....	17
<b>Figura 8.</b> Efecto del tratamiento ICV con FGF17 sobre el tamaño de las placas de A $\beta$ en los diferentes grupos experimentales .....	18
<b>Figura 9.</b> Análisis de la oligodendroglía en la corteza prefrontal e hipocampo de los diferentes grupos experimentales .....	21
<b>Figura 10.</b> Análisis de la oligodendroglía en la corteza prefrontal e hipocampo dentro de los diferentes grupos experimentales .....	22
<b>Figura 11.</b> Efecto del tratamiento ICV con FGF17 en la población de oligodendrocitos .....	24
<b>Tabla 1.</b> Tamaño muestral empleado en los análisis histológicos realizados en el presente Trabajo de Fin de Grado .....	8
<b>Tabla 2.</b> Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en las técnicas de inmunohistoquímica .....	11
<b>Tabla 3.</b> Variables cuantificadas para cada análisis histológico .....	12
<b>Tabla 4.</b> Comparaciones y <i>p</i> -valores de los análisis <i>post hoc</i> de Bonferroni y Kruskal-Wallis de los parámetros en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas. ....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS

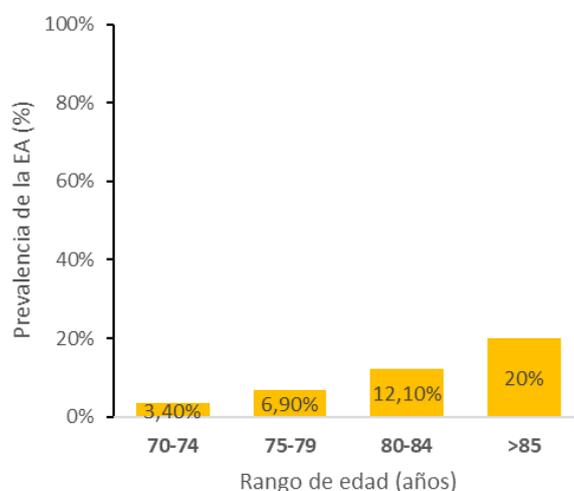
<b>ANOVA</b> , análisis de la varianza	<b>LCR o CSF</b> , líquido cefalorraquídeo artificial (del inglés <i>Cerebrospinal Fluid</i> )
<b>APP</b> , proteína precursora amiloidea (del inglés <i>Amyloid Precursor Protein</i> )	<b>RT</b> , temperatura ambiente (del inglés <i>Room Temperature</i> )
<b>A<math>\beta</math></b> , péptido beta amiloide	<b>SNC</b> , sistema nervioso central
<b>DAPI</b> , 4',6'-diamino-2-fenilindol diclorhidrato	<b>WT</b> , ratón silvestre (del inglés <i>wild type</i> ) <b>ICV</b> , vía intracerebroventricular
<b>EA</b> , Enfermedad de Alzheimer	
<b>ESM</b> , error estándar de la media	
<b>FGF</b> , factor de crecimiento de fibroblastos	
<b>ICV</b> , vía intracerebroventricular	
<b>IQR</b> , rango intercuartílico (del inglés <i>Interquartile Range</i> )	

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

#### 1.1.1. Etiología

La enfermedad del Alzheimer (EA) es uno de los tipos de demencia irreversible y una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en la población (Soria Lopez *et al.*, 2019). Esta condición se caracteriza por un deterioro cognitivo y funcional progresivo que se manifiesta gradualmente con el paso de los años (Soria Lopez *et al.*, 2019). Este declive cognitivo, irreversible y gradual, supone una enorme carga tanto para los pacientes afectados como para sus familiares y cuidadores (Soria Lopez *et al.*, 2019). Debido al aumento en la esperanza de vida, la población afectada por la EA también está viéndose incrementada (Zhang *et al.*, 2022). Estudios recientes revelan que cada 7 segundos se diagnostica un caso nuevo de EA a nivel mundial (Sánchez *et al.*, 2010). En España, la prevalencia varía en función del rango de edad, siendo del 3,4 % en personas de 70 a 74 años, del 6,9 % en aquellos de 75 a 79 años, del 12,1 % en el grupo de 80 a 84 y más del 20 % en personas mayores de 85 años, como se observa en la Figura 1 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ([Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias](#); Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social).



**Figura 1.** Gráfico de la prevalencia de la EA en diferentes rangos de edad. Modificado de Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias; Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.

La neuropatología de la EA fue descrita por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer tras realizar una autopsia cerebral a una mujer de 51 años en la que se observó una atrofia en la corteza cerebral y una reducción del volumen encefálico debida a la neurodegeneración (Alois Alzheimer, 1907). Estudios posteriores han permitido identificar las proteínas implicadas de forma directa o indirecta en esta enfermedad, como son la proteína tau o el péptido beta amiloide (A $\beta$ ), e hipotetizar sobre su rol en la etiología y desarrollo de esta enfermedad (Gómez-Virgilio *et al.*, 2022). En este sentido, en las lesiones histopatológicas se han observado placas

amiloides o seniles constituidas por depósitos de A $\beta$  y ovillos neurofibrilares formados por filamentos de proteína tau (Small & Cappai, 2006). Por otro lado, análisis genéticos relacionan la EA hereditaria con mutaciones específicas en los genes que codifican para la proteína precursora amiloidea (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*) y las proteínas presenilina 1 y 2 (que forman parte del enzima  $\gamma$ -secretasa), desencadenando un aumento en la producción y acumulación de A $\beta$  (Delacourte, 2002), como se detallará en apartados posteriores.

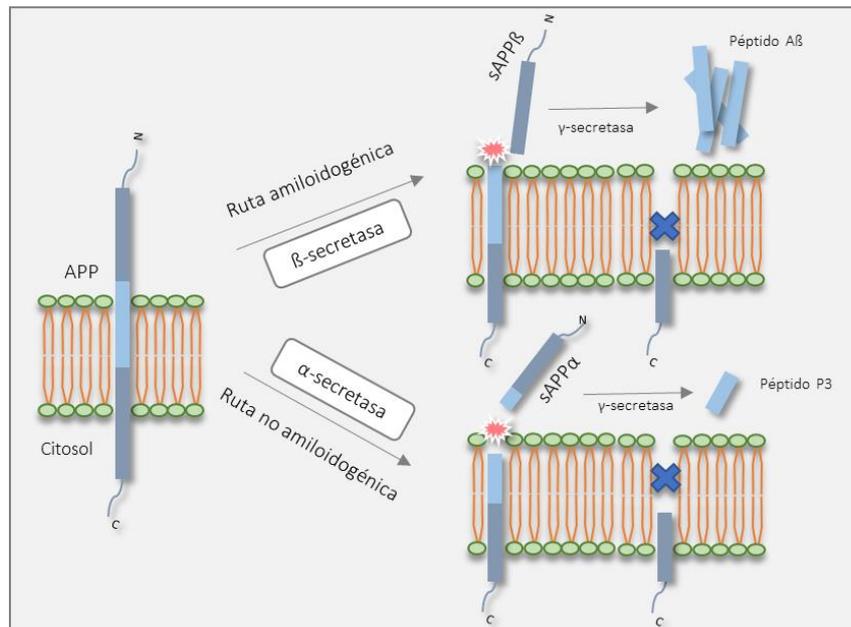
### **1.1.2. Fisiopatología y principales signos histopatológicos**

La EA desencadena un daño estructural y funcional en el sistema nervioso central (SNC), observándose lesiones en distintas estructuras encefálicas como el hipocampo, corteza cerebral y tronco encefálico (Passeri *et al.*, 2022).

Existen diferentes teorías que pretenden explicar la fisiopatología de la enfermedad. En primer lugar, la teoría de la desconexión cortical postula que, debido a la degeneración neurofibrilar, el hipocampo queda aislado de la neocorteza y, junto a la afectación de otras áreas encefálicas, se desencadenan los déficits cognitivos como la afasia (trastorno del lenguaje), la apraxia (problemas en el movimiento) y la agnosia (ausencia del reconocimiento; Mario *et al.*, 2008). Por otro lado, la teoría colinérgica propone que el deterioro cognitivo y progresivo de la EA se debe a una disminución de la actividad en el sistema colinérgico (Tobore, 2019). Por último, una de las hipótesis más ampliamente aceptada por la comunidad científica es la denominada “cascada amiloide”. Esta teoría propone que el origen de la EA estaría directamente relacionado con los efectos citotóxicos de la formación, agregación y depósito de las placas de A $\beta$  y su eliminación revertiría la patología (Folch *et al.*, 2018).

El péptido A $\beta$  se forma a partir del catabolismo de la proteína APP, una proteína transmembrana expresada en muchos tipos celulares, entre ellos las neuronas y las células gliales, como los astrocitos y los oligodendrocitos (Folch *et al.*, 2018). Esta proteína puede ser metabolizada a través de dos rutas secuenciales distintas: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica (Figura 2; Folch *et al.*, 2018). En situaciones fisiológicas normales, la proteína APP es metabolizada siguiendo una vía no amiloidogénica mediada principalmente por la  $\alpha$ -secretasa, generándose un fragmento soluble correspondiente al extremo N-terminal (sAPP $\alpha$ ) y un fragmento correspondiente al extremo C-terminal (péptido P3), que será escindido posteriormente por la  $\gamma$ -secretasa (Rodríguez & Signoret, 2017). El fragmento soluble sAPP $\alpha$  participa en la regulación de la excitabilidad neuronal, de la mejora de la plasticidad sináptica, del aprendizaje y memoria y en procesos de resistencia neuronal al estrés metabólico y oxidativo (Folch *et al.*, 2018). Sin embargo, en la EA, la proteína APP se metaboliza por la vía amiloidogénica, en la que interviene la enzima  $\beta$ -secretasa. Esta corta a la APP, formando el fragmento soluble sAPP $\beta$ , el cual, tras la acción de la  $\gamma$ -secretasa, genera péptidos como A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> y el fragmento C-terminal, que puede

ser transportado al interior de la célula donde induce la expresión de genes promotores de la muerte neuronal por apoptosis, entre otros (Figura 2; Folch et al., 2018).



**Figura 2.** Procesamiento de la proteína APP y formación del péptido A $\beta$ . Extraída de Castilla-Silgado *et al.* (2020).

El péptido A $\beta_{42}$  es altamente neurotóxico y presenta una tendencia a la agregación en placas seniles, desencadenando efectos tóxicos en las neuronas y sinapsis neuronales (Rodríguez & Signoret, 2017). Además, este fenómeno lleva asociada una respuesta glial exacerbada con la activación de microglía y astrocitos que liberan citocinas o elementos del sistema del complemento produciendo una respuesta neuroinflamatoria que contribuye al proceso neurodegenerativo en la EA (Folch *et al.*, 2018).

### 1.1.3. Relación entre oligodendrocitos y EA

Los oligodendrocitos son células gliales del SNC encargados de formar las vainas de mielina y dar apoyo metabólico a los axones neuronales. La generación de oligodendrocitos es continua desde estadios juveniles a la edad adulta y es necesaria para los procesos de aprendizaje, la memoria y la plasticidad neuronal (DeFlitch *et al.*, 2022). Estudios recientes han demostrado que la pérdida de oligodendrocitos está estrechamente relacionada con enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EA o la esclerosis múltiple (DeFlitch *et al.*, 2022).

Mediante el empleo de herramientas genéticas, DeFlitch *et al.* demostraron cambios en la densidad de oligodendrocitos y la oligodendrogénesis en diferentes regiones del hipocampo durante el proceso de envejecimiento fisiológico (DeFlitch *et al.*, 2022). El hipocampo es la región del cerebro que se relaciona principalmente con el aprendizaje y la formación de la memoria (Moser *et al.*, 2015; Eichbaum, 2017). Además, demostraron que las regiones del

hipocampo CA1, CA2 y CA3, en las que se observó una mayor oligodendrogénesis, coincidían con las regiones que sufren una mayor pérdida de oligodendrocitos en el modelo murino APP/PS1 de la EA (DeFlicht *et al.*, 2022).

Los oligodendrocitos forman las vainas de mielina que actúan como aislantes para proteger los axones neuronales y permitir la transmisión sináptica de forma eficiente (Chen *et al.*, 2023). Estudios previos en modelos *in vivo* de EA han demostrado que alteraciones en el proceso de formación de la mielina y en el desarrollo de los oligodendrocitos están estrechamente relacionados con patologías amiloideas y tau (Chen *et al.*, 2023), siendo estos más vulnerables a los factores que producen estrés celular en presencia de las mutaciones de los genes de la presenilina 1 y de la APP asociadas a la EA (Chen *et al.*, 2023). Además, en ratones APP/PS1 se ha observado modificaciones en la mielinización de las neuronas del hipocampo y una disminución prematura de la densidad de células progenitoras de oligodendrocitos (Chacon-De-La-Rocha *et al.*, 2020). Por último, se ha identificado una capacidad deteriorada de los oligodendrocitos en la EA para detectar y regular la actividad neuronal (Murdock & Tsai, 2023). Teniendo en cuenta que para la preservación de la memoria es necesaria la formación y remodelación de la mielina, esta limitación en la capacidad remodeladora de mielina de los oligodendrocitos podría estar también relacionada con el deterioro cognitivo de la EA (Murdock & Tsai, 2023).

## **1.2. FGF17 como molécula terapéutica en EA**

### **1.2.1. Biodistribución y principales funciones**

El factor de crecimiento de fibroblastos 17 (FGF17, del inglés *Fibroblast Growth Factor*) es una proteína plasmática que se encuentra codificada por el gen *FGF17/FGF13* en humanos (Furusho *et al.*, 2020). FGF17 forma parte de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), compuesta por 23 miembros con funciones importantes en el proceso de desarrollo del SNC (Oh *et al.*, 2003). Los FGF presentan alta afinidad por cuatro receptores pertenecientes a la familia de proteínas transmembrana de tipo tirosina quinasa (FGFR1-4; Liu *et al.*, 2003), expresados durante todo el desarrollo del individuo, así como en el cerebro adulto (Oh *et al.*, 2003). Estudios previos relacionan la familia de los FGF con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la EA, entre otras (Guo *et al.*, 2023). Entre las funciones de los FGF destacan la modulación de la proliferación, la migración, la supervivencia; la especificación del destino de las neuronas y de las células gliales; el establecimiento del patrón de las regiones de la neocorteza; el desarrollo del cerebelo; y el tamaño final de la corteza cerebral (Oh *et al.*, 2003). En concreto, FGF17 se

expresa durante el desarrollo embrionario en el mesencéfalo y prosencéfalo y juega un papel crucial en el establecimiento de los patrones neuronales (Searce-Leive *et al.*, 2007). A nivel experimental, se ha comprobado que los ratones deficientes de FGF17 no presentan la regionalización característica de la corteza frontal y poseen una reducción en las proyecciones neuronales de esta área (Searce-Leive *et al.*, 2007). Diversos estudios han demostrado la implicación de diferentes subtipos de FGF en enfermedades neurodegenerativas y su efecto protector cuando se emplean como tratamiento en la EA (Alam *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2023), como se detallará a continuación.

### **1.2.2. Propiedades neuroprotectoras y su función sobre los oligodendrocitos**

Los efectos neuroprotectores de la familia de los FGF se basan principalmente en la inhibición de la neuroinflamación y de la apoptosis de las células neuronales y gliales del SNC asociada a la acumulación de A $\beta$  y otras moléculas neurotóxicas (Guo *et al.*, 2023). De esta forma, se ha observado que el FGF2 tiene capacidad de inducir proliferación y diferenciación de progenitores de células neurales y gliales con propiedades antigénicas de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Alam *et al.*, 2022). Por su parte, el FGF18 tiene un efecto neuroprotector contra la neurotoxicidad inducida por 6-hidroxidopamina y contra el daño isquémico (Ciltas *et al.*, 2023). En cuanto al FGF21, presenta una función neuroprotectora en las células de neuroblastoma y tiene un papel clave en la prevención de la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Fang *et al.*, 2020). Por último, en el caso concreto del FGF17, este ejerce su función neuroprotectora promoviendo la supervivencia neuronal, el crecimiento neuronal y la neurogénesis en el cerebro (Iram *et al.*, 2022).

Estudios previos han identificado una relación directa entre los FGF y los oligodendrocitos de manera que déficits o defectos en los receptores de FGF producen una inhibición en la generación de células precursoras de oligodendrocitos (Furusho *et al.*, 2020). Además, los oligodendrocitos deficientes en los receptores de FGF no son capaces de expresar los genes codificantes de la proteína de mielina, viéndose limitada su capacidad para diferenciarse y observándose alteraciones en el proceso de mielinización (Li & Yao, 2013).

En un estudio realizado en ratones por Iram *et al.*, se demostró que FGF17 puede mejorar las funciones cognitivas a través de su efecto en la proliferación y en la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (Iram *et al.*, 2022). Así, la administración de líquido cefalorraquídeo (LCR), obtenido de ratones jóvenes, con alto contenido en FGF17 mejoró la memoria y las funciones cognitivas afectadas por el envejecimiento en ratones de edad avanzada (Iram *et al.*, 2022). Además, también se observó un aumento en la diferenciación de oligodendrocitos y de los componentes relacionados con la mielina. Por último, estos mismos autores comprobaron que, mediante la administración intracerebroventricular (ICV) de FGF17

exógeno durante 7 días, se reproducían los efectos observados tras la infusión de LCR de ratones jóvenes, induciendo la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos y su diferenciación en regiones del hipocampo. Además, cuando se bloqueaba el efecto de FGF17 se observaban alteraciones cognitivas dependientes de hipocampo, demostrando la implicación de FGF17 en el correcto funcionamiento hipocampal (Iram *et al.*, 2022).

Debido a que en la EA se han observado una disminución en la densidad de oligodendrocitos y alteraciones en el proceso de mielinización asociadas a la acumulación de A $\beta$  (Depp *et al.*, 2023), en este trabajo proponemos la administración ICV de FGF17 como tratamiento terapéutico para paliar estas alteraciones en un modelo murino de EA.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) es que “la administración ICV de FGF17 produce una reducción de la densidad de placas de A $\beta$  y un aumento en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de oligodendrocitos en diferentes regiones encefálicas en un modelo murino APP/PS1 de EA”.

Los objetivos generales y específicos son:

- I. Analizar cuantitativamente los cambios en la carga de A $\beta$  en las regiones encefálicas de interés (corteza prefrontal e hipocampo) mediante:
  - a. Evaluación del área encefálica ocupada por placas de A $\beta$  y la densidad de placas A $\beta$ .
  - b. Clasificación de las placas de A $\beta$  en función de su diámetro.
- II. Estudiar los cambios en la densidad celular de oligodendrocitos en las regiones encefálicas de corteza prefrontal e hipocampo.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales de experimentación

Para el desarrollo de este TFG se emplearon ratones macho transgénicos APP/PS1 y ratones silvestres (WT, del inglés *Wild Type*) de la cepa 129Sv de 27 semanas de edad (parentales de la colonia cedidos por los Dres. José María Pérez Freije y Olaya Santiago Fernández). Este modelo animal de EA expresa la proteína APP quimérica de ratón/humano (Mo/HuAPP695swe) y la proteína presenilina 1 humana mutante (PS1-De0; Coto-Vilcapoma *et al.*, 2022; Jankowsky *et al.*, 2004; Pérez-Martín *et al.*, 2023).

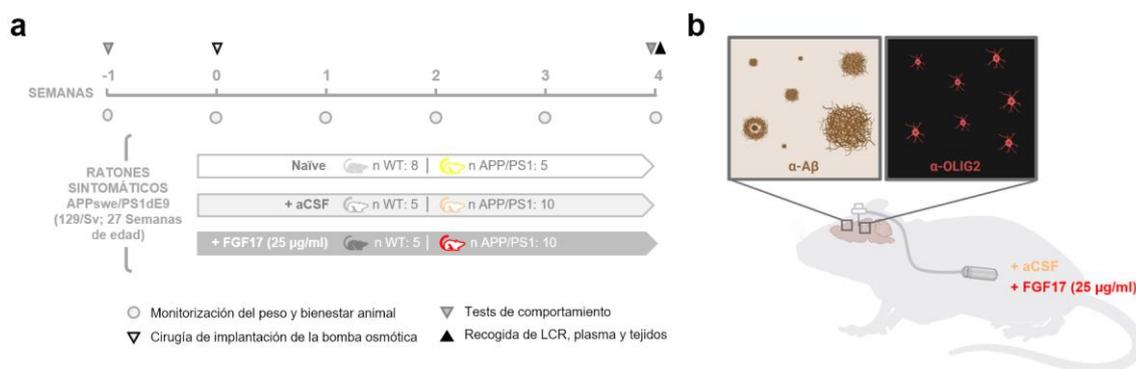
Los ratones se criaron y mantuvieron en el bioterio de la Universidad de Oviedo. Se alojaron en grupos de 5 ratones a temperatura y humedad relativa constantes ( $22 \pm 2$  °C y  $55 \pm 7$  %, respectivamente), con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (encendido de las luces a las 8:00 a. m.) y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores (A40; SAFE®, Rosenberg, Alemania).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad de Oviedo (PROAE 25/2022) y se realizaron en cumplimiento con la normativa europea (Directiva 2010/63/EU) y la española (RD118/2021 y Ley 32/2007) para el manejo y cuidado de los animales de experimentación.

#### 3.2. Diseño experimental y tamaño muestral

El diseño de los procedimientos realizados en este TFG se llevó a cabo bajo el principio de las tres erres de experimentación animal propuesto por Russel y Burch, con el fin de utilizar el mínimo número de animales de experimentación que permitieran obtener resultados robustos, concluyentes y reproducibles (Russell y Burch, 1959; Figura 3). Los ratones se distribuyeron de forma aleatoria en los siguientes grupos experimentales:

- I. WT y APP/PS1 sin tratamiento o *naïve* (n=8 y 5 ratones, respectivamente);
- II. WT y APP/PS1 implantados con infusión de LCR artificial (aCSF, del inglés *artificial Cerebrospinal Fluid*; n=5 y 10 ratones, respectivamente);
- III. WT y APP/PS1 implantados y con infusión de FGF17 (25 µg/ml; n=5 y 10 ratones, respectivamente).



**Figura 3.** Diseño experimental del estudio (a) en el que se enmarca el Trabajo de Fin de Grado y esquema ilustrativo de los análisis histológicos realizados en el presente trabajo (b). Panel b creado con: <https://www.biorender.com/>

En el presente TFG únicamente se recogen los resultados del análisis histológico de las muestras de tejido encefálico obtenidas a fin de estudio. El tamaño muestral empleado para las principales técnicas histológicas se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tamaño muestral empleado en los análisis histológicos realizados en el presente Trabajo de Grado.

Análisis	Naive		+aCSF		+FGF17 (25 µg/ml)	
	WT	APP	WT	APP	WT	APP
Inmunohistoquímica método ABC anti-Aβ	2	5	0	5	0	4
Inmunofluorescencia indirecta anti-OLIG2	5	5	0	5	0	4

Para mejorar la comprensión del trabajo y contextualizar los procedimientos realizados previamente a la eutanasia de los ratones, se describirán brevemente en los apartados siguientes.

### 3.3. Cirugía estereotáxica de implantación y tratamiento farmacológico

El procedimiento quirúrgico de implantación seguido fue el descrito por Pérez-Martín *et al.* (2023). Brevemente, tras rasurar la zona dorsal del cuello y dorso, los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2-3 % (v/v; Zoetis, España) y flujo de O<sub>2</sub> de 0,4 l/minuto y se colocaron en un marco estereotáxico (Digital Compact Mouse Stereotaxic Instrument; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE. UU.). Se realizó una incisión en forma de U entre los dos pabellones auditivos para exponer el cráneo y un bolsillo subcutáneo en el flanco derecho para alojar el módulo de la bomba osmótica intratecal (Micro-Osmotic Pump 1004; ALZET®, Cupertino, CA, EE. UU.). Tras medir las coordenadas estereotáxicas específicas de interés correspondientes al ventrículo derecho (-0,70 mm anteroposterior a Bregma y -1,26 mm respecto a la línea media) se realizó una craneotomía de 0,05 mm. A continuación, se implantó y fijó una cánula de infusión ICV (Brain Infusion Kit III 1-3mm; ALZET®) al cráneo mediante pegamento tisular de cianocrilato (Cicastick; Sutuvet, Santiago de Surco, Perú) y resina

fotocurable con luz UV (Transbond XT 4; 3M, Saint Paul, MN, EE. UU.). Por último, la incisión se cerró con puntos simples con sutura monofilar de polipropileno no reabsorbible 5-0 (Atramat®; Ciudad de México, México).

En función del grupo experimental, las bombas osmóticas fueron precargadas en condiciones de esterilidad y siguiendo el protocolo del proveedor, con una solución de FGF17 recombinante de ratón (25 µg/ml; R&D Systems-Biotechne, Minneapolis, MN, EE. UU.) o aCSF (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). Independientemente del tratamiento farmacológico recibido, el periodo de implantación de la bomba osmótica fue de 28 días con una tasa de infusión de 0,11 µl/hora. Todos los ratones intervenidos quirúrgicamente recibieron tratamiento analgésico, antiinflamatorio y antibiótico en el día de la implantación y durante las dos semanas posteriores (Pérez-Martín *et al.*, 2023).

### **3.4. Análisis histológico**

#### **3.4.1. Obtención y preparación del tejido**

Tras 28 días de implantación, los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 4 % (v/v) y se perfundieron con 40 ml de tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4 (Corning Incorporated, Nueva York, NY, EE. UU.) para lavar el árbol vascular. Se extrajo el encéfalo completo y se disecó por la línea media en corte parasagital para obtener los dos hemiencéfalos completos. A continuación, el hemiencéfalo izquierdo (contralateral a la implantación), destinado a análisis histológicos, se introdujo en solución fijadora de paraformaldehído al 4 % (p/v; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.) en tampón fosfato de Sorensen pH 7,4 durante 24 horas a temperatura ambiente (RT) y agitación continua. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se sumergió en una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % (p/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) diluida en PBS durante 24 horas a 4 °C y agitación. Finalmente, el tejido se embebió en una matriz con Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Nagano, Japón) y se mantuvo a -80 °C hasta el momento del seccionamiento.

Las estructuras encefálicas de interés en este TFG son la corteza prefrontal, hipocampo y *subiculum*, áreas relevantes en la EA. Con el fin de poder visualizarlas en una misma sección, se realizaron cortes parasagiales del hemiencéfalo izquierdo de 30 µm de espesor en un criostato (CM1900; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a una temperatura que oscilaba entre los -20 y -15 °C. Las secciones se recogieron en flotación en PBS en placas de 12 pocillos (Corning Incorporated). Por último, se lavaron en PBS y se criopreservaron añadiendo una solución compuesta por 30 % (v/v) de etilenglicol (Sigma-Aldrich) y 30 % (v/v) de glicerol (VWR Chemicals, Radnor, PA, EE. UU.) en tampón fosfato 0,02 M, pH 7,2 y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **3.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas**

Para el análisis de la carga de A $\beta$  y la densidad de oligodendrocitos se emplearon seis y dos cortes parasagittales de encéfalo, respectivamente, con una separación de 330  $\mu$ m de grosor entre cada uno de ellos. En primer lugar, las secciones de interés se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos a RT y agitación para eliminar los restos de solución crioprotectora. En función del análisis específico, se realizó inmunohistoquímica con avidina/biotina (método ABC) o inmunofluorescencia indirecta, cuyos protocolos describiremos brevemente a continuación.

#### ***Inmunohistoquímica ABC***

Tras los lavados iniciales, se incubaron las secciones en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5 % (v/v) en metanol durante 15 minutos a RT y agitación para inhibir la acción de las enzimas peroxidasa endógenas. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se incubaron las secciones durante 72 horas, a 4 °C y en agitación en una solución compuesta por anticuerpo primario anti-A $\beta$  [MOAB-2] (1:200; Tabla 2), 0,2 % (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 5 % (v/v) de suero normal de caballo (Vectastain® ABC-HRP Peroxidasa; Vector Laboratories, Newark, CA, EE. UU.) y PBS. Tras la incubación, las secciones se lavaron de nuevo con PBS (3 lavados x 10 minutos) y se incubaron durante una hora a RT en una solución compuesta por el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado (1:300; Tabla 2) en PBS. Transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar las secciones con PBS (3 lavados x 10 minutos) y se incubaron las secciones con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain® ABC-HRP Peroxidasa) durante 60 minutos a RT. A continuación, se lavaron las secciones con PBS (2 lavados x 10 minutos) y con Tris-HCl 0,2M a pH 7,6 durante 10 minutos a RT. Por último, se realizó el revelado de la peroxidasa con DAB (Envision Flex DAB + Chromogen; Dako Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) y la reacción se paró con tampón Tris-HCl 0,2M pH 7,6. Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se añadió medio de montaje de base acuosa (Aquatex®; Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) y cubreobjetos.

#### ***Inmunofluorescencia indirecta***

Tras los lavados iniciales, las secciones se incubaron en una solución de bloqueo durante una hora a RT y agitación. La solución de bloqueo estaba compuesta por 10 % (v/v) de suero normal de burro (#017-000-121; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.), 0,1 % (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), fracción de anticuerpos Fab anti-ratón de burro 1:250 (#715-007-003; Jackson ImmunoResearch) diluido en solución de 0,2 % (p/v) de PBS-gelatina (VWR Chemicals). A continuación, se realizaron tres lavados de PBS de 10 minutos a RT y agitación, y se incubaron las secciones a 4 °C en agitación durante una noche completa con la solución que contenía el anticuerpo primario anti-OLIG2 [EP112] (1:200; Tabla 2), 5 % (v/v) de suero normal de burro, 0,2 % (v/v) de Triton X-100 y PBS-gelatina.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron durante 90 minutos a RT, en agitación y en oscuridad, con la solución que contenía el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3 (1:500; Tabla 2), 5 % (v/v) de suero normal de burro, 0,2 % (v/v) de Triton X-100 y PBS-gelatina. Finalmente, las secciones se lavaron de nuevo con PBS y se montaron en portaobjetos gelatinizados, añadiendo medio de montaje con 4',6'-diamino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, Fluoroshield™ con DAPI; Sigma-Aldrich) para contrateñir los núcleos celulares.

**Tabla 2.** Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en las técnicas de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario o secundario	Especie	Técnica	Concentración	Casa Comercial
Anti-A $\beta$ [MOAB2]	Ratón	IHC	1:200	Abcam (#ab126649)
Anti-OLIG2 [EP112]	Conejo	IF	1:200	Cell Marque RabMab (#387R-14)
Anti-IgG ratón biotinilado	Caballo	IHC	1:300	Vector Laboratories (#PK-4002)
Cy3 Anti-Conejo AffiniPure™	Burro	IF	1:500	Jackson ImmunoResearch (#711-165-152)

Abreviaturas: IF, inmunofluorescencia; IHC, inmunohistoquímica ABC.

Con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos empleados, se utilizaron los siguientes controles: a) omisión de anticuerpos primarios, para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios y b) omisión de los anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo Cy3 o biotinilados, para detectar autofluorescencia o fluorescencia inespecífica y actividad peroxidasa endógena. En ninguna de estas comprobaciones se detectaron falsos positivos por uniones inespecíficas.

### 3.5. Visualización al microscopio

Para la visualización y adquisición de imágenes se empleó un microscopio de epifluorescencia Olympus Bx61 acoplado a una cámara digital Color View III, y el programa *Olympus Soft Imaging System* (Olympus, Tokio, Japón), disponible en la Unidad de microscopía fotónica y procesamiento de imágenes de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. En función del análisis, se adquirieron imágenes digitales a 4X con una exposición de 1/1000 segundos para la inmunohistoquímica ABC, o imágenes digitales a 20X con exposición de 3,5 y 1/8,5 segundos para el fluoróforo Cy3 y DAPI de la inmunofluorescencia indirecta. El procesamiento y análisis se llevó a cabo con el *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) de forma semiautomática y mediante sistema de doble ciego.

### 3.6. Cuantificación y análisis estadísticos

En función del análisis histológico específico, se realizaron diferentes recuentos y obtención de variables en tres áreas encefálicas de interés: corteza prefrontal, hipocampo y *subiculum* (Figura 4), como se detallará a continuación y se recoge en la Tabla 3.



**Figura 4.** Regiones encefálicas específicas empleadas para la cuantificación. Creada con: <https://www.biorender.com/>

Para evaluar el efecto del tratamiento de FGF17 sobre la carga de A $\beta$ , se cuantificaron diferentes variables relacionadas con el área de las placas seniles de A $\beta$  y el tamaño de placa (Tabla 3).

Para estudiar el efecto del tratamiento con FGF17 en los oligodendrocitos, se analizó la densidad de oligodendrocitos y la intensidad de la fluorescencia de OLIG2, empleando diferentes parámetros (Tabla 3). Respecto a los parámetros relacionados con la intensidad de fluorescencia, se cuantificó: la intensidad media y total de fluorescencia de cada partícula OLIG2 positiva (+) y la intensidad total de todas las partículas OLIG2 + en la región encefálica de interés. En la Tabla 3 se recogen todas las variables cuantificadas y evaluadas en el presente TFG.

**Tabla 3.** Variables cuantificadas para cada análisis histológico.

Análisis	Variable (Unidades)
Efecto del tratamiento en la carga de A $\beta$	Área media de la placa de A $\beta$ ( $\mu\text{m}^2$ )
	Área total ocupada por placa de A $\beta$ ( $\mu\text{m}^2$ )
	Porcentaje de área ocupada por placa de A $\beta$ (%)
	Número absoluto de placas de A $\beta$ (unidades)
	Densidad de placas de A $\beta$ (placas/ $\text{mm}^2$ )
	Porcentaje de placas < 500 $\mu\text{m}^2$ (%)
	Densidad de placas < 500 $\mu\text{m}^2$ (placas/ $\mu\text{m}^2$ )
	Porcentaje de placas 500-1000 $\mu\text{m}^2$ (%)
	Densidad de placas 500-1000 $\mu\text{m}^2$ (placas/ $\text{mm}^2$ )
	Porcentaje de placas 1000-2000 $\mu\text{m}^2$ (%)
	Densidad de placas 1000-2000 $\mu\text{m}^2$ (placas/ $\text{mm}^2$ )
	Porcentaje de placas > 2000 $\mu\text{m}^2$ (%)
	Densidad de placas > 2000 $\mu\text{m}^2$ (placas/ $\text{mm}^2$ )
Efecto del tratamiento sobre los oligodendrocitos	Área total del ROI ( $\text{mm}^2$ )
	Área media de partículas OLIG2+ ( $\mu\text{m}^2$ )
	Área total ocupada por partículas OLIG2+ ( $\mu\text{m}^2$ )
	Porcentaje de partículas OLIG2+ (%)
	Número absoluto de partículas OLIG2+ (unidades)
	Densidad de oligodendrocitos (partículas OLIG2+/ $\text{mm}^2$ )
	Intensidad media de fluorescencia OLIG2+ (u.a.)
	Intensidad total de fluorescencia OLIG2+ (u.a.)
Intensidad total de fluorescencia OLIG2+ en el ROI (u.a.)	

Abreviaturas: u.a., unidades arbitrarias.

Con el fin de aplicar los análisis estadísticos más adecuados según la distribución de los datos obtenidos, en primer lugar, se comprobó la normalidad con las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Saphiro Wilks. Basándonos en este resultado y en función de los grupos experimentales a comparar, se aplicaron las pruebas *t* de Student o U de Mann-Whitney, para comparaciones por pares, y el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni o análisis de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples corregidas por Bonferroni cuando se compararon tres o más grupos experimentales. El nivel de significación estadística mínima se estableció en  $p < 0,05$  tanto para las pruebas paramétricas como las no paramétricas. Todos los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM) o como la mediana  $\pm$  el rango intercuartílico (IQR, del inglés *Interquartile Range*), en función de su distribución e independientemente de si se muestran o no los replicados biológicos. Todos los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se realizaron con el software SPSS versión 28 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE. UU.) y GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.), respectivamente.

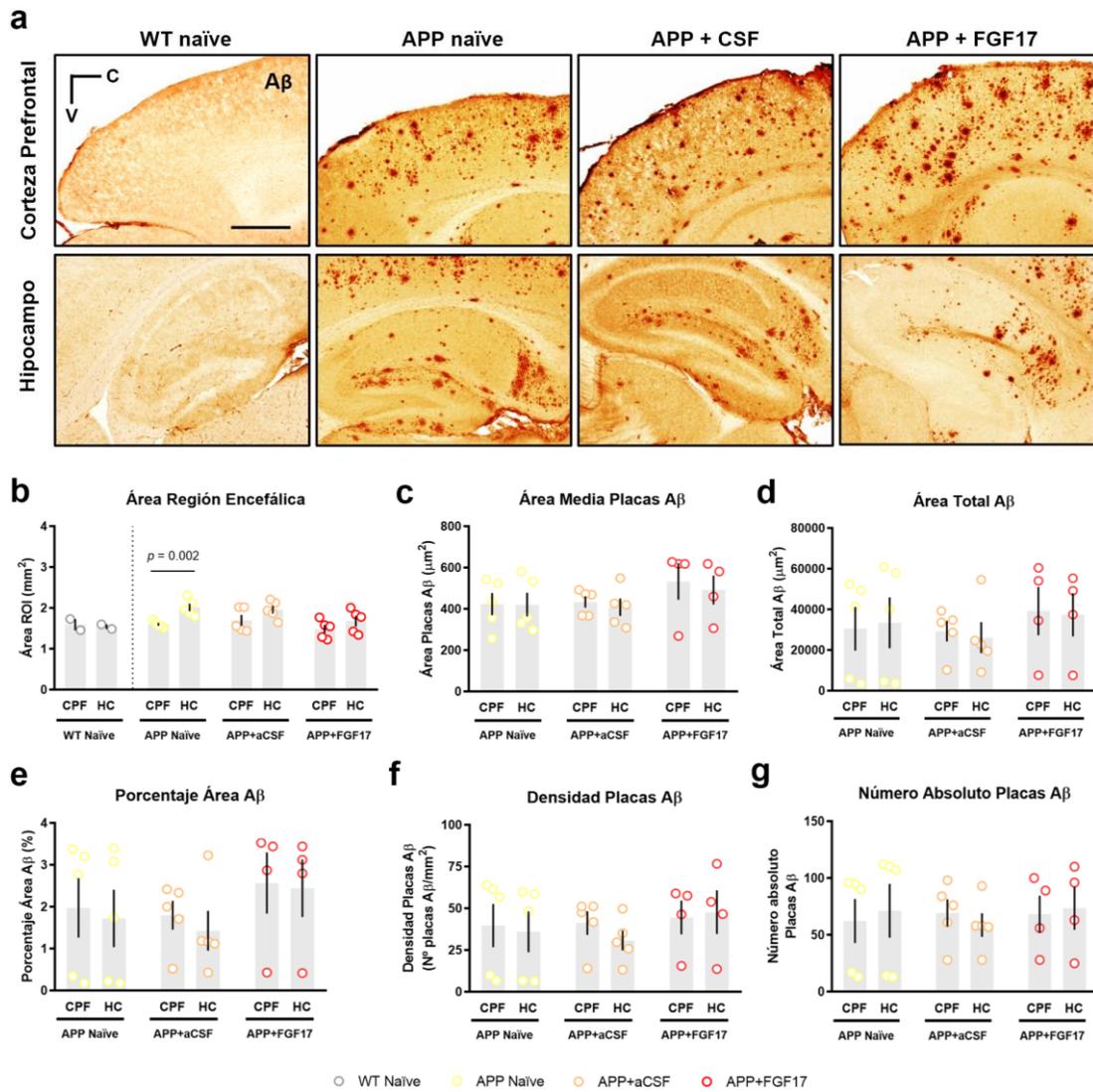
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo de todos los parámetros empleados en las tres regiones encefálicas analizadas (corteza prefrontal, hipocampo y *subiculum*) mediante ANOVA de un factor seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni. Al no observarse diferencias estadísticamente significativas entre las regiones de hipocampo y *subiculum* ( $p > 0,05$  para todos los parámetros) y con el fin de simplificar y mejorar la interpretación de los resultados, los datos de estas dos regiones se mostrarán de forma conjunta.

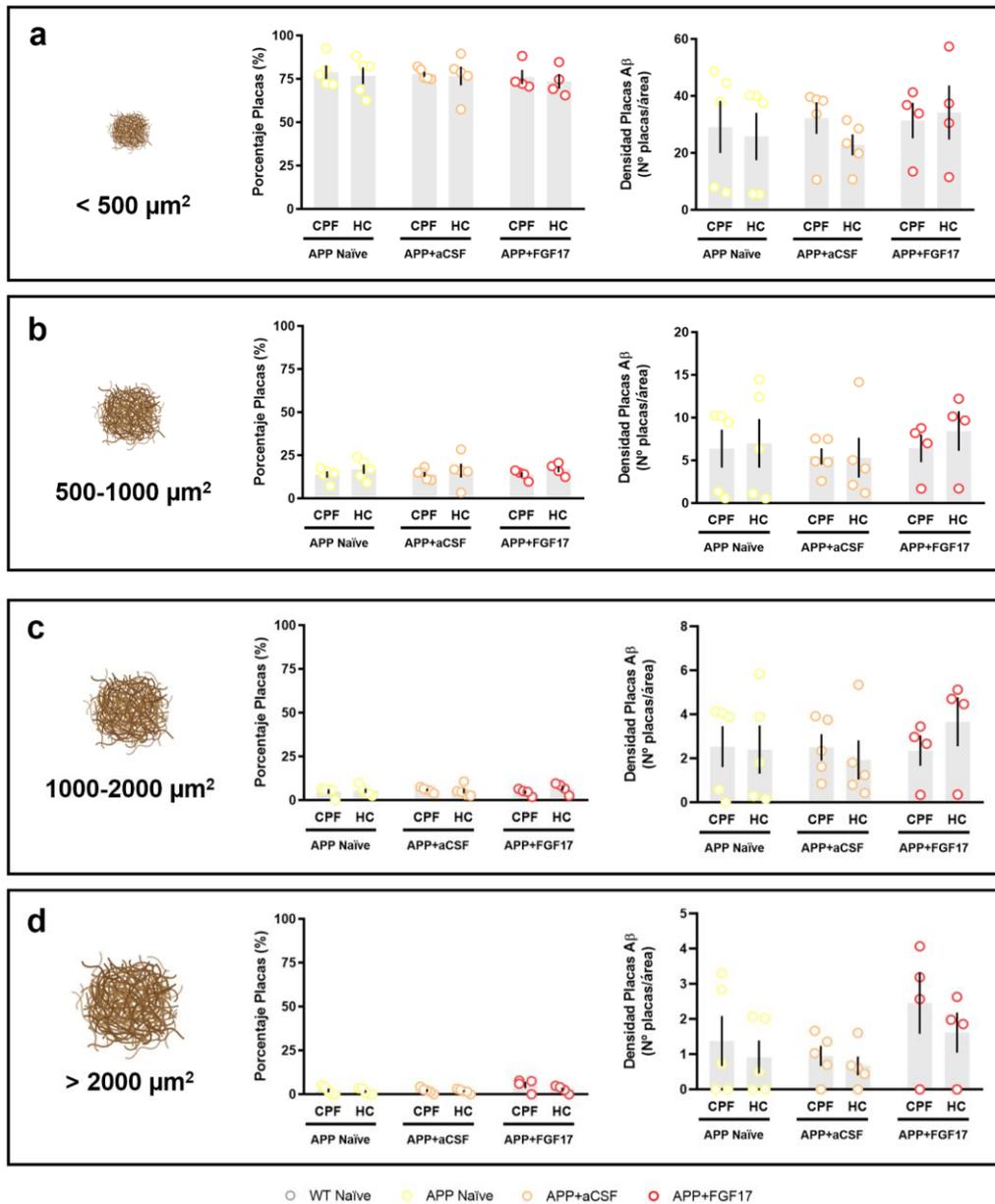
### 4.1. FGF17 administrado vía ICV no ejerce un efecto directo en la carga de A $\beta$ en la corteza prefrontal e hipocampo

Con el fin de analizar la carga de A $\beta$  en las diferentes regiones encefálicas de interés en el hemisferio contralateral al lugar de la implantación, así como entre los grupos experimentales, se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el método ABC para detectar A $\beta$  (Figura 5a) y se cuantificaron diferentes parámetros relacionados con el área ocupada por placas (Figuras 5 y 7) y el tamaño de las placas (Figuras 6 y 8). Debido a la distribución normal de los datos correspondientes a este apartado ( $p$  valor de los tests de Kolmogorov-Smirnow y Saphiro Wilk  $> 0,05$  para todos los parámetros), las pruebas estadísticas empleadas fueron  $t$  de Student y ANOVA de un factor seguido del test de Bonferroni para comparaciones por pares y múltiples, respectivamente.

En primer lugar, se analizaron las diferencias existentes entre la corteza prefrontal y el hipocampo dentro de cada grupo experimental mediante la prueba estadística  $t$  de Student (Figura 5b-g). En los ratones APP *naïve*, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área de la región encefálica analizada siendo esta mayor en el hipocampo que en la corteza prefrontal ( $p = 0,002$ ; Figura 5b). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las áreas encefálicas dentro de los grupos experimentales estudiados para el resto de las variables analizadas sobre la carga de A $\beta$  ni sobre el tamaño de las placas seniles ( $p > 0,05$ ; Figura 5b-g y Figura 6a-d, respectivamente).

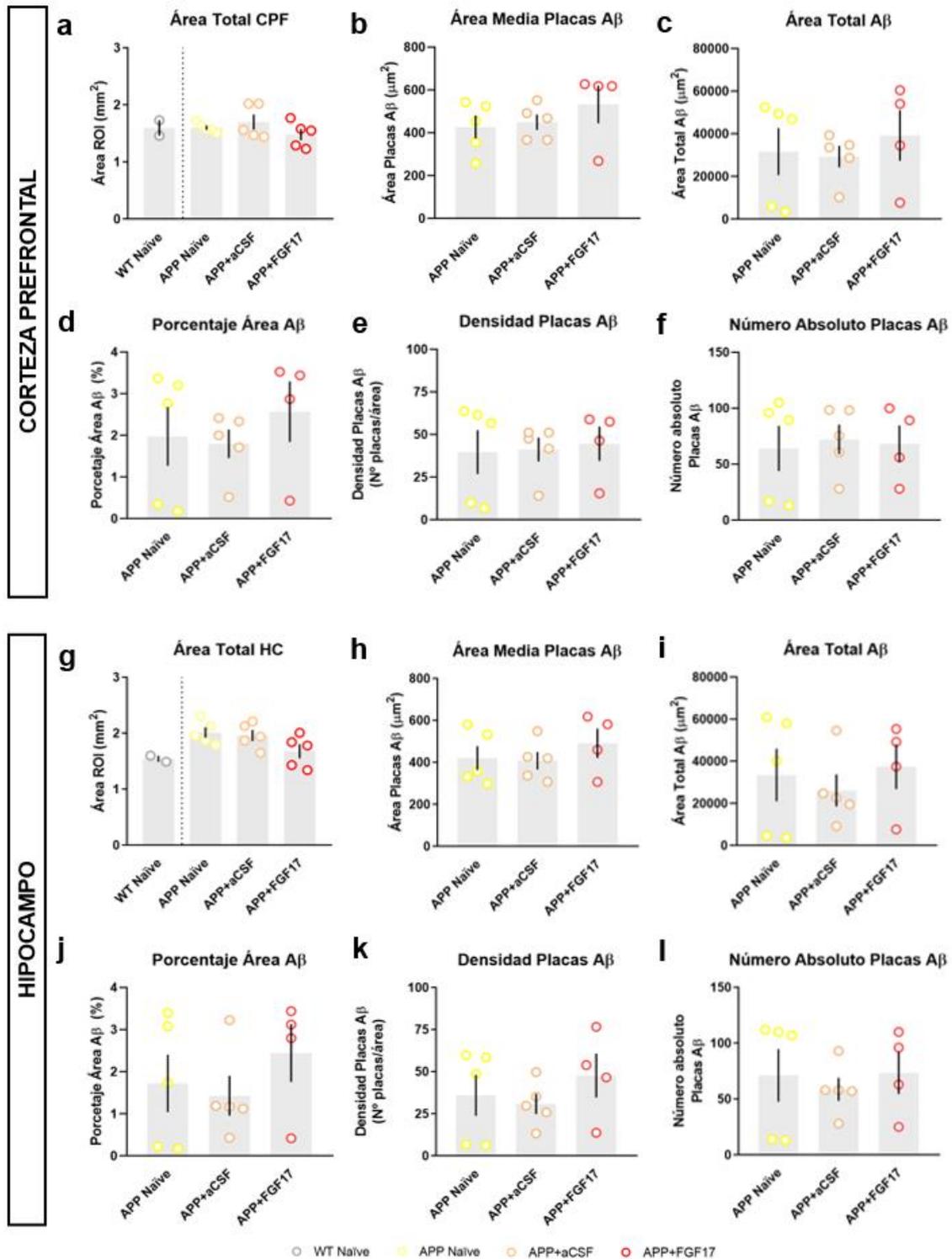


**Figura 5.** Análisis de la carga de A $\beta$  en la corteza prefrontal e hipocampo de los diferentes grupos experimentales. (a) Microfotografías de inmunohistoquímica anti-A $\beta$  [MOAB 2] de las dos regiones encefálicas de interés (corteza prefrontal e hipocampo) en el hemisferio contralateral a la implantación en los diferentes grupos experimentales WT *naïve*, APP *naïve*, APP tratado con aCSF y APP tratado con FGF17. (b-g) Representación gráfica de los diferentes parámetros cuantificados y la comparación corteza prefrontal *versus* hipocampo dentro de cada grupo experimental. n= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran replicados, media y ESM. Test t de Student para b-g. Barra de escala: 500  $\mu\text{m}$ . A $\beta$ , péptido  $\beta$ -amiloide; C, caudal; CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; ROI, región de interés; V, ventral.

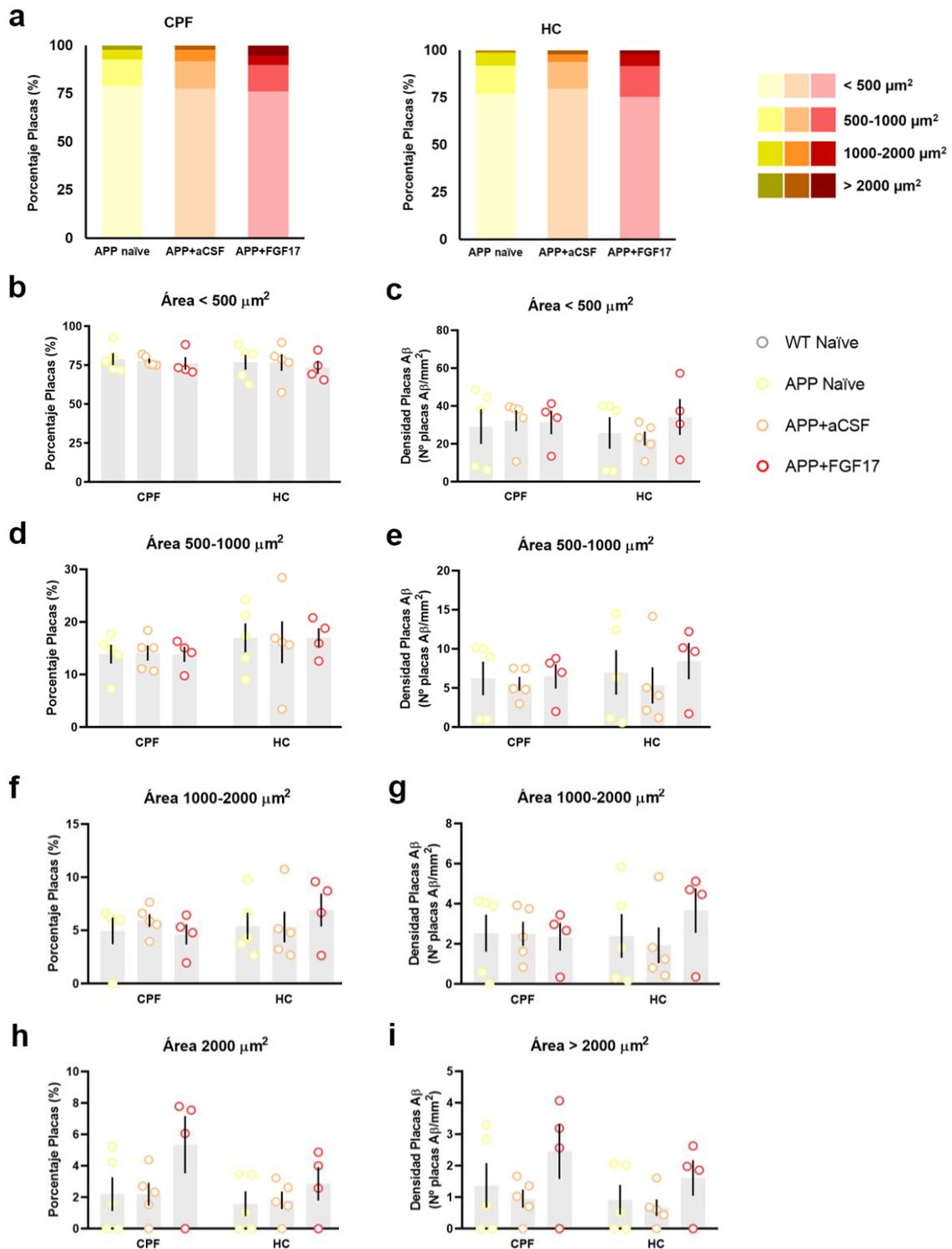


**Figura 6.** Análisis del tamaño de las placas de Aβ en la corteza prefrontal e hipocampo dentro de los diferentes grupos experimentales. (a-d) Representación esquemática y gráfica del porcentaje y densidad de las placas de Aβ en función del área media ocupada: menor 500 μm<sup>2</sup> (a), entre 500 y 1000 μm<sup>2</sup> (b), entre 1000 y 2000 μm<sup>2</sup> (c), y mayor de 2000 μm<sup>2</sup> (d). n= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran replicados, media y ESM. Test t de Student. Aβ, péptido β-amiloide; CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo.

En segundo lugar, se compararon las diferencias existentes entre los diferentes grupos experimentales mediante la prueba paramétrica ANOVA de un factor seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni, no observándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados ( $p > 0,05$  para todas las variables) relacionados con la carga de Aβ (Figura 7) ni con el tamaño de las placas de Aβ (Figura 8).



**Figura 7.** Efecto del tratamiento con FGF17 en la carga de A $\beta$ . (a-l) Representación gráfica de los parámetros cuantificados en la corteza prefrontal (a-f) y en el hipocampo (g-l) y comparaci3n entre los diferentes grupos experimentales. N= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran replicados, media y ESM. ANOVA de un factor seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni ( $p > 0.05$  para todas las comparaciones). Los datos de ratones WT en a y en g se muestran como referencia y no se han empleado para comparaciones. A $\beta$ , péptido  $\beta$ -amiloide; CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; ROI, regi3n de interés.



**Figura 8.** Efecto del tratamiento ICV con FGF17 sobre el tamaño de las placas de A $\beta$  en los diferentes grupos experimentales. (a) Representación gráfica del porcentaje de placas clasificadas en función del área ocupada (menor  $500 \mu\text{m}^2$ , entre  $500$  y  $1000 \mu\text{m}^2$ , entre  $1000$  y  $2000 \mu\text{m}^2$  o mayor de  $2000 \mu\text{m}^2$ ) en la corteza prefrontal e hipocampo para cada grupo experimental. (b-i) Representación gráfica individual del porcentaje (b, d, f, h) y la densidad (c, e, g, i) de las placas de A $\beta$  en función de su tamaño y comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. N= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran replicados, media y ESM. ANOVA de un factor seguido del test *post hoc* de Bonferroni ( $p > 0.05$  para todas las comparaciones). A $\beta$ , péptido  $\beta$ -amiloide; CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo.

Los resultados obtenidos en la comparación entre regiones encefálicas dentro de cada grupo experimental demuestran una mayor área de la región encefálica analizada en el grupo APP *naïve*, siendo esta mayor en la corteza prefrontal que en el hipocampo. Sin embargo, no se observan diferencias ni en la densidad de placas ni en el área ocupada por A $\beta$ . Estos hallazgos no coinciden con estudios histopatológicos previos realizados en modelos murinos de EA (APP/PS1 y Tg2576) y en humanos, donde la deposición de A $\beta$  comienza y es más severa en la corteza, continuando secundariamente a otras regiones del hipocampo (corteza entorrinal y CA1, principalmente) y otras áreas subcorticales como el estriado, tálamo y cerebelo (Whitesell *et al.*, 2019). Estos resultados indicarían que el modelo empleado en este TFG, a pesar de presentar las mutaciones APP/PS1, no recapitula específicamente la temporalidad de los signos histológicos de la EA, pudiendo ser el fondo genético de la cepa 129 Sv la razón de esta discrepancia.

Respecto al efecto del tratamiento con FGF17 vía ICV, este parece no ejercer un efecto directo en la deposición de A $\beta$  ni en el área y distribución de las placas con la dosis empleada en este trabajo. Diversos estudios han mostrado el papel neuroprotector de algunos FGF en diferentes modelos de neurodegeneración (Alam *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2023), incluyendo modelos de EA, donde diferentes FGF disminuyeron la peroxidación neuronal y el estrés oxidativo inducidos por las placas de A $\beta$ , reduciendo el daño neuronal alrededor de las placas del hipocampo (Mark *et al.*, 1997). En otro trabajo, en el que se administró de forma sistémica FGF2 en un modelo APP23 de EA, se demostró una reducción de la patología de A $\beta$  debido a una disminución en la expresión de BACE1, principal enzima responsable de la generación de A $\beta$  (Katsouri *et al.*, 2015). Sin embargo, no existe evidencia científica hasta la fecha que demuestre la relación directa entre FGF17 y el metabolismo de A $\beta$ .

Por último, cabe destacar que en el presente TFG se ha empleado una dosis de FGF17 de 25  $\mu\text{g/ml}$  durante 28 días a un flujo de 0,11  $\mu\text{l/hora}$ . En el estudio previo en el que nos basamos, y que demostró el papel neuroprotector del FGF17 en ratones envejecidos WT de 20 meses de edad, la dosis empleada fue la misma, pero administrada en un tiempo menor, 7 días. Esto resulta en un flujo de 0,5  $\mu\text{l/hora}$  y, por lo tanto, en una concentración mayor del fármaco en el sistema ventricular del ratón implantado (Iram *et al.*, 2022). Por tanto, no podemos asegurar si la ausencia de resultados se debe a la dosis y tiempo de administración diferente o si se debe a la utilización de ratones con patología A $\beta$  con placas muy densas como para observar resultados evidentes. Tras la revisión de la bibliografía disponible hasta la fecha, es la primera vez que se evalúa el efecto del FGF17 en un modelo de EA, lo que dificulta establecer una relación entre nuestros resultados y trabajos previos.

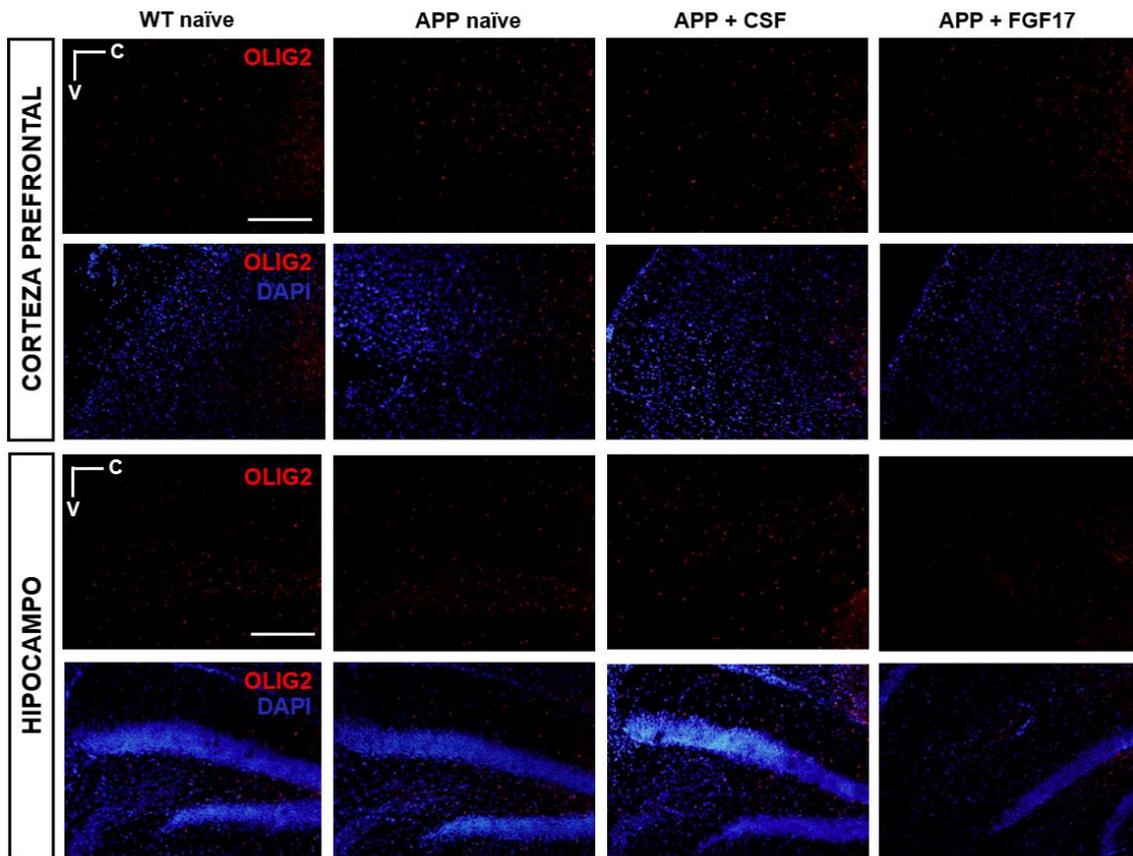
En estudios futuros, podría considerarse aumentar la dosis inicial del fármaco cargado en la bomba osmótica, con el fin de aumentar el flujo y la concentración de este en el sistema ventricular del ratón implantado. Por otro lado, en nuestro trabajo evaluamos a nivel histológico el hemiencéfalo contralateral a la implantación, por lo que sería importante analizar también el efecto que tiene el tratamiento en el hemisferio ipsilateral, ya que la distribución y concentración de FGF17 puede ser distinta en este caso.

#### **4.2. El tratamiento con FGF17 aumenta la densidad de oligodendrocitos en la corteza prefrontal**

Para analizar la población de oligodendrocitos en la corteza prefrontal e hipocampo y el efecto del tratamiento con FGF17 en la oligodendroglía en el hemisferio contralateral, se realizó la técnica de inmunofluorescencia anti-OLIG2 (Figura 9), marcador de oligodendrocitos maduros. A continuación, se cuantificaron diferentes parámetros relacionados con el área y la densidad de oligodendrocitos, así como la intensidad de fluorescencia de las partículas OLIG2+ (Figuras 10 y 11).

Tras realizar las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Saphiro Wilks, se observaron diferencias en la distribución de las variables cuantificadas, siendo esta no normal en los parámetros área total de las regiones de interés ( $p < 0,001$ ), número de partículas OLIG2+ en corteza prefrontal e hipocampo ( $p < 0,001$ ), densidad de oligodendrocitos en hipocampo ( $p < 0,001$ ) e intensidad total de fluorescencia en ambas regiones analizadas ( $p = 0,002$  para la corteza prefrontal,  $p < 0,001$  para el hipocampo).

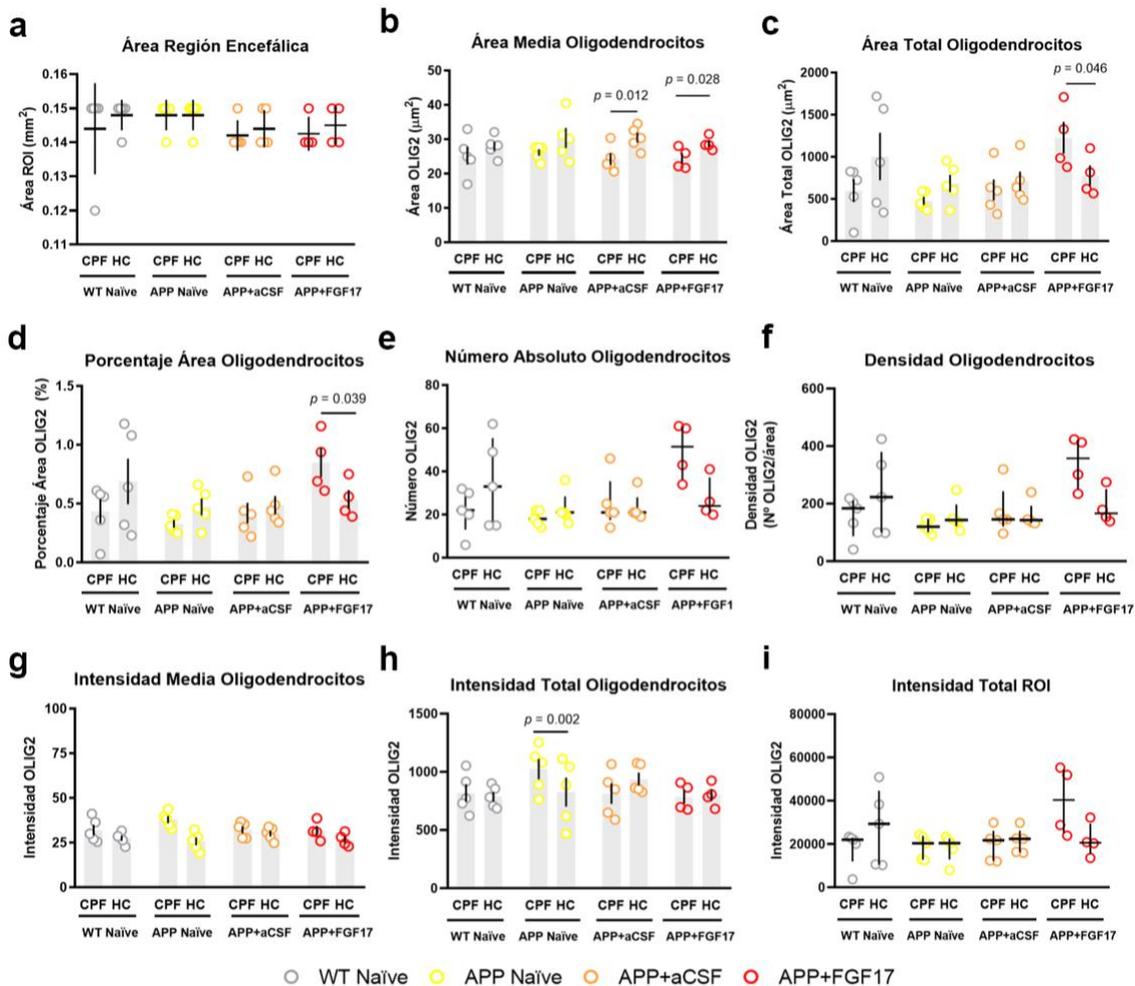
Teniendo en cuenta estos resultados, se han realizado los análisis estadísticos no paramétricos U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, para comparaciones por pares o comparaciones múltiples de las variables anteriormente mencionadas, y las pruebas paramétricas  $t$  de Student y ANOVA de un factor seguido del test *post hoc* de Bonferroni para el resto de las variables con distribución normal.



**Figura 9.** Análisis de la oligodendroglía en la corteza prefrontal e hipocampo de los diferentes grupos experimentales. Microfotografías de inmunofluorescencia anti-OLIG2 [EP112] de las dos regiones encefálicas de interés en los diferentes grupos experimentales *WT naïve*, *APP naïve*, APP tratado con aCSF y APP tratado con FGF17. Barra de escala: 500  $\mu\text{m}$ . C, caudal; DAPI, 4',6'-diamino-2-fenilindol diclorhidrato; V, ventral.

Antes de evaluar el efecto del tratamiento con FGF17, se analizaron las diferencias existentes entre la corteza prefrontal y el hipocampo dentro de cada grupo experimental (Figura 10). En los ratones *WT naïve* no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la corteza prefrontal y el hipocampo en ninguno de los parámetros analizados (Figura 10 a-i). Por el contrario, en los ratones *APP naïve* sí que se detectó una mayor intensidad total de fluorescencia anti-OLIG2 dentro de los oligodendrocitos en la corteza prefrontal respecto al hipocampo ( $p = 0,002$ ; Figura 10h).

Respecto a los ratones APP tratados con aCSF y APP tratados con FGF17, se observó en ambos casos que el área individual de las partículas OLIG2 + era mayor en el hipocampo respecto a la corteza prefrontal ( $p = 0,012$  para APP + aCSF, y  $p = 0,028$  para APP + FGF17; Figura 10b). Sin embargo, en la corteza prefrontal de los ratones APP tratados con FGF17 se observó que el área total y porcentaje de área ocupada por oligodendrocitos era mayor respecto al hipocampo ( $p = 0,046$  y  $p = 0,039$ , respectivamente; Figura 10c, d).



**Figura 10.** Análisis de la oligodendroglía en la corteza prefrontal e hipocampo dentro de los diferentes grupos experimentales. (a-i) Representación gráfica de los diferentes parámetros cuantificados de la inmunofluorescencia anti-OLIG2 [EP112] y la comparación entre la corteza prefrontal *versus* hipocampo dentro de cada grupo experimental. N= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran la mediana e IQR (a, e, f, i), y la media y ESM (b-d, g, h). Test U de Mann-Whitney para a, e, f, i; y test t de Student para b-d, g, h. Barra de escala: 500 µm. CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; ROI, región de interés.

En segundo lugar, se compararon las diferencias existentes entre los diferentes grupos experimentales mediante el empleo del test ANOVA seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni para los parámetros con distribución normal (área media de oligodendrocitos, área total y porcentaje ocupado por oligodendrocitos, intensidad media y total de fluorescencia de OLIG2; Figura 11b-d, g, h), y la prueba de Kruskal-Wallis para aquellos datos con distribución no normal (Figura 11a, e, f, i).

La prueba ANOVA de un factor, reveló diferencias estadísticamente significativas en el área total y porcentaje de área ocupada por oligodendrocitos en la corteza prefrontal ( $p = 0,006$ ; en ambos casos), mientras que no se observaron diferencias en el hipocampo ( $p > 0,05$ ; Figura 11c, d). Tras el análisis *post hoc* de Bonferroni, en ambos parámetros se observó que el área total y el porcentaje de área ocupada por oligodendrocitos eran más altos en la corteza de los ratones

APP tratados con de FGF17 respecto al resto de grupos experimentales ( $p$  valores en Tabla 4; Figura 11c, d).

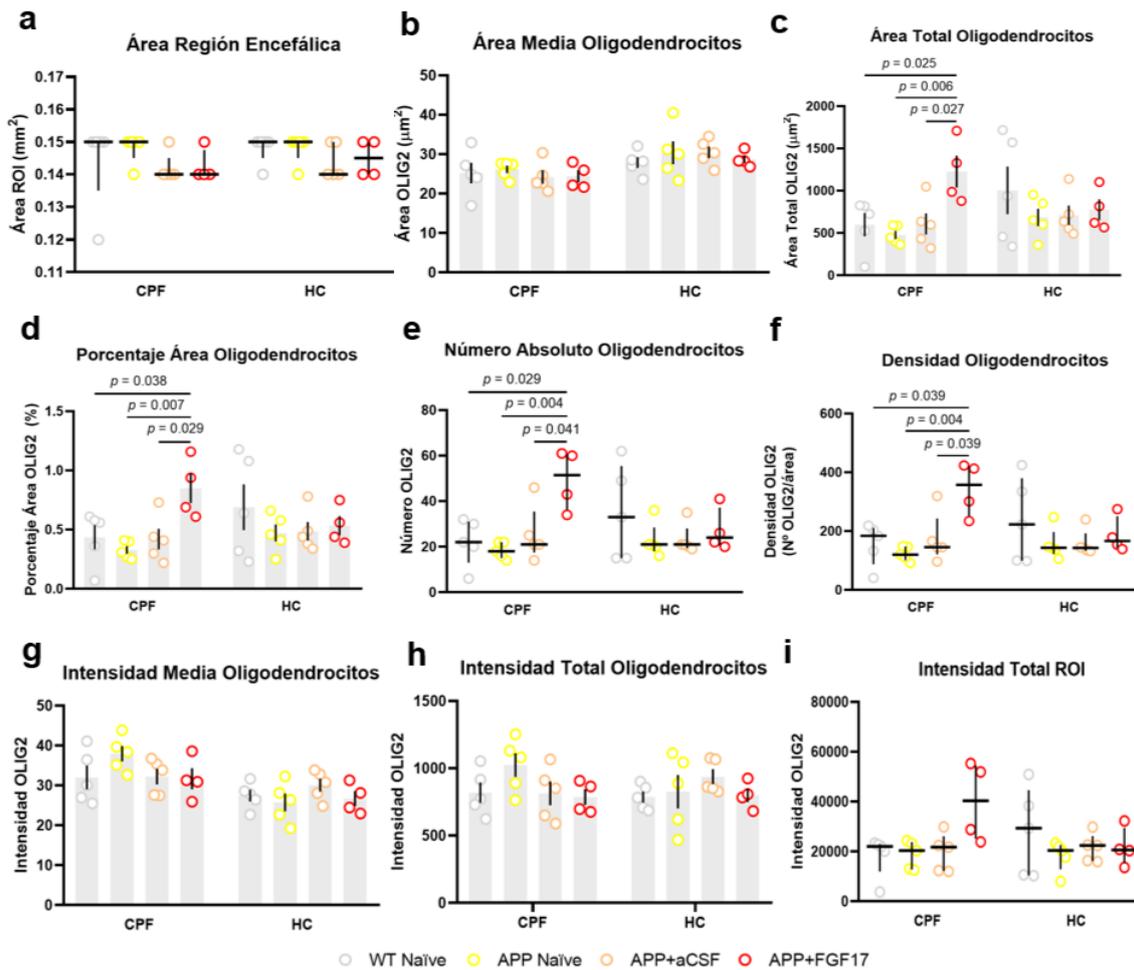
**Tabla 4.** Comparaciones y  $p$  valores de los análisis *post hoc* de Bonferroni y Kruskal-Wallis de los parámetros en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro analizado	Comparaciones y $p$ -valores		
	APP + FGF17 vs.	APP + FGF17 vs.	APP + FGF17 vs.
	WT <i>naïve</i>	APP <i>naïve</i>	APP + aCSF
Área total ocupada por oligodendrocitos en CPF <sup>1</sup>	0,025	0,006	0,027
Porcentaje de área ocupada por oligodendrocitos en CPF <sup>1</sup>	0,038	0,007	0,029
Número absoluto de oligodendrocitos en CPF <sup>2</sup>	0,029	0,004	0,041
Densidad de oligodendrocitos en CPF <sup>2</sup>	0,039	0,004	0,039

<sup>1</sup> Resultados de la prueba *post hoc* paramétrica de Bonferroni, <sup>2</sup> Resultados comparaciones múltiples de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. CPF, corteza prefrontal; vs., *versus*.

Tras el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto ( $p = 0,034$ ; Figura 11e) y en la densidad ( $p = 0,030$ ; Figura 11f) de oligodendrocitos en la corteza prefrontal, pero estas diferencias no se observaron en el hipocampo ( $p > 0,05$ ; Figura 11a, e, f, i). Las comparaciones múltiples entre grupos experimentales revelaron un mayor número absoluto y aumento en la densidad total de oligodendrocitos en el grupo experimental de los ratones APP tratados con FGF17 respecto al resto de grupos experimentales ( $p$  valores en Tabla 4; Figura 11e, f).

Los resultados obtenidos en el análisis comparativo de la oligodendroglía en las diferentes regiones encefálicas analizadas coinciden con estudios previos en los que no se observa una clara diferencia en el número relativo ni absoluto de los oligodendrocitos entre el neocórtex anterior e hipocampo en ratones adulto WT ni APP/PSN1 (Valério-Gomes *et al.*, 2018; DeFlicht *et al.*, 2022). En el trabajo publicado por DeFlicht y colaboradores, demuestran que existe una disminución en la densidad de oligodendrocitos en regiones específicas del hipocampo (CA3 y CA4) en ratones APP/PSN1 (DeFlicht *et al.*, 2022). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el presente trabajo podría deberse a que el análisis cuantitativo se ha realizado entre las zonas CA3-CA2, lo que podría enmascarar potenciales diferencias. Por otro lado, estudios previos han demostrado una disminución en la densidad de células precursoras de oligodendrocitos, pero no en el número de oligodendrocitos maduros (Chacon-De-La-Rocha *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2023), lo que concuerda con los resultados obtenidos.



**Figura 11.** Efecto del tratamiento ICV con FGF17 en la población de oligodendrocitos. (a-i) Representación gráfica de los parámetros cuantificados en la corteza prefrontal y en el hipocampo de la inmunofluorescencia anti-OLIG2 [EP112] y comparación entre los diferentes grupos experimentales. n= 4-5 ratones por grupo experimental. Se muestran la mediana e IQR (a, e, f, i), y la media y ESM (b-d, g, h). Test Kruskal-Wallis para a, e, f, i; y prueba ANOVA seguido de Bonferroni para b-d, g, h. CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; ROI, región de interés.

De cualquier modo, las diferencias observadas entre regiones encefálicas en los ratones tratados con FGF17 vendría determinada por el propio efecto del tratamiento, como demostramos con las comparaciones entre grupos experimentales. Estos hallazgos concuerdan parcialmente con resultados previos, en los que el tratamiento ICV con FGF17 induce un aumento en la proliferación en las células precursoras de oligodendrocitos y su diferenciación a oligodendrocitos en el hipocampo durante el proceso de envejecimiento biológico, mejorando las funciones cognitivas y la memoria (Iram *et al.*, 2022). Cabe mencionar que, en ese estudio, emplearon diferentes marcadores celulares para células precursoras de oligodendrocitos (Pdgfr- $\alpha$ ) y de oligodendrocitos maduros (MBP, OLIG2), y únicamente evaluaron el efecto del tratamiento en el hipocampo, región en la que en nuestro estudio no hemos detectado variaciones con la dosis de FGF17 utilizada (25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,11  $\mu\text{l/hora}$ ; 28 días de implantación). Cabría esperar que, ajustando nuestra dosis a la empleada en el trabajo de Iram y colaboradores

(25 µg/ml; 0,5 µl/hora; 7 días de implantación) y replicando los análisis específicos realizados, obtendríamos resultados similares a los descritos previamente (Iram *et al.*, 2022), tanto en la corteza prefrontal como en hipocampo. No obstante, en el estudio de Iram *et al.* solo usan ratones WT y en nuestro caso disponemos de ratones modelo de EA. Esto puede ser clave para entender la falta de resultados en el hipocampo, una de las regiones más afectadas en la EA. Lo que sí podemos sacar en claro con estos resultados es que la región con mayor carga de A $\beta$ , la corteza prefrontal, tiene capacidad de respuesta al tratamiento, aun cuando con los tiempos y dosis empleados no se haya visto una modificación de la carga.

En resumen, la dosis de FGF17 administrado vía ICV en el presente TFG promueve un incremento en la población de oligodendrocitos en la corteza prefrontal de los ratones tratados, sin afectar de manera directa a la carga total de A $\beta$  en el modelo murino de EA APP/PS1.

## **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectivas futuras en esta línea de investigación, de forma más inmediata sería muy interesante realizar un análisis del efecto del tratamiento en el hemiencéfalo ipsilateral, como hemos hecho en el hemiencéfalo contralateral a la implantación, puesto que es posible que la respuesta pueda observarse antes. Además, en ambos hemiencéfalos, se podrían realizar análisis moleculares, como expresión génica o niveles de proteínas implicadas tanto en la eliminación de A $\beta$  como en la activación de la oligodendroglía, ya que pueden dar información sobre los mecanismos de acción del FGF17 y sobre nuevas dianas terapéuticas.

Por otro lado, también podrían introducirse cambios en el diseño experimental para optimizar la dosis y ventana temporal efectiva de FGF17 vía ICV. Esto podría ir acompañado de estudios en una fase presintomática o sintomática temprana de la enfermedad, donde las placas de A $\beta$  serían menos densas y más fáciles de eliminar. Esto podría proporcionar información valiosa sobre el potencial terapéutico neuroprotector del FGF17 y su aplicación en modelos preclínicos de EA con alto potencial traslacional.

Por último, se propone evaluar el efecto de la dosis empleada de FGF17 en el comportamiento general y en las funciones cognitivas de los ratones tratados, puesto que daría información sobre si este tratamiento tiene efecto sobre la mejora de los aspectos funcionales asociados a la patología, siendo de gran relevancia a nivel clínico.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este TFG, y a partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las conclusiones que se exponen a continuación.

- I. El tratamiento de FGF17 (25  $\mu\text{g/ml}$ ) administrado ICV durante 28 días no modifica la carga de  $A\beta$  en el modelo murino de EA APP/PS1 (129Sv).
  
- II. A pesar de la presencia de signos histopatológicos de la EA en los ratones tratados con FGF17, la dosis administrada fue eficaz para inducir una respuesta en la oligodendroglía en la corteza prefrontal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, R., Mrad, Y., Hammoud, H., Saker, Z., Fares, Y., Estephan, E., Bahmad, H. F., Harati, H., & Nabha, S. (2022). New insights into the role of fibroblast growth factors in Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, *49*(2), 1413-1427. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06890-0>
- Alois Alzheimer. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, *64*:146-8
- Castilla-Silgado, J., Coto-Vilcapoma, A., Lago-Vallejo, B., Ménendez-González, M., Tomás-Zapico, C. Aclaramiento del péptido beta-amiloide en salud y enfermedad: de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer al desarrollo de estrategias terapéuticas. *Fisiología*, *23*(1), 9-14
- Chacon-De-La-Rocha, I., Fryatt, G., Rivera, A. D., Verkhatsky, A., Raineteau, O., Gómez-Nicola, D., & Butt, A. M. (2020). Accelerated Dystrophy and Decay of Oligodendrocyte Precursor Cells in the APP/PS1 Model of Alzheimer's-Like Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 575082. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.575082>
- Chen, P., Guo, Z., & Zhou, B. (2023). Disease-Associated Oligodendrocyte: New Player in Alzheimer's Disease and CNS Pathologies. *Journal of Integrative Neuroscience*, *22*(4), 90. <https://doi.org/10.31083/j.jin2204090>
- Ciltas, A. C., Karabulut, S., Sahin, B., Filiz, A. K., Yulak, F., Ozkaraca, M., Karatas, O., & Cetin, A. (2023). FGF-18 alleviates memory impairments and neuropathological changes in a rat model of Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *101*, 102367. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2023.102367>
- Coto-Vilcapoma, M. A., Castilla-Silgado, J., Fernández-García, B., Pinto-Hernández, P., Cipriani, R., Capetillo-Zarate, E., Menéndez-González, M., Álvarez-Vega, M., & Tomás-Zapico, C. (2022). New, Fully Implantable Device for Selective Clearance of CSF-Target Molecules: Proof of Concept in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16), 9256. <https://doi.org/10.3390/ijms23169256>
- DeFlitch, L., Gonzalez-Fernandez, E., Crawley, I., & Kang, S. H. (2022). Age and Alzheimer's Disease-Related Oligodendrocyte Changes in Hippocampal Subregions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*, 847097. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.847097>
- Delacourte, A. (2002). Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *EMC - Tratado de Medicina*, *6*(4), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(02\)70234-1](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(02)70234-1)
- Depp, C., Sun, T., Sasmita, A. O., Spieth, L., Berghoff, S. A., Nazarenko, T., Overhoff, K., Steixner-Kumar, A. A., Subramanian, S., Arinrad, S., Ruhwedel, T., Möbius, W., Göbbels, S., Saher, G., Werner, H. B., Damkou, A., Zampar, S., Wirths, O., Thalmann, M., Nave, K. (2023). Myelin

dysfunction drives amyloid- $\beta$  deposition in models of Alzheimer's disease. *Nature*, 618(7964), 349–357. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06120-6>

**Fang, X., Ma, J., Mu, D., Li, B., Lian, B., & Sun, C. (2020).** FGF21 Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models Via Repression of Neuroinflammation. *Neurotoxicity Research*, 37(3), 616-627. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00151-6>

Folch, J., Etcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., Olloquequi, J., & Camins, A. (2018). Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating  $\beta$ -amyloid protein. *Neurología*, 33(1), 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.03.012>

Furusho, M., Ishii, A., Hebert, J. M., & Bansal, R. (2020). Developmental stage-specific role of Frs adapters as mediators of FGF receptor signaling in the oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, 68(3), 617-630. <https://doi.org/10.1002/glia.23743>

**Gómez-Virgilio, L., Reyes-Gutiérrez, G. S., Silva-Lucero, M. del C., López-Toledo, G., Cárdenas-Aguayo, M. del C., Gómez-Virgilio, L., Reyes-Gutiérrez, G. S., Silva-Lucero, M. del C., López-Toledo, G., & Cárdenas-Aguayo, M. del C. (2022).** Etiología, factores de riesgo, tratamientos y situación actual de la enfermedad de Alzheimer en México. *Gaceta médica de México*, 158(4), 244-251. <https://doi.org/10.24875/gmm.22000023>

Guo, K., Huang, W., Chen, K., Huang, P., Peng, W., Shi, R., He, T., Zhang, M., Wang, H., Hu, J., Wang, X., Shentu, Y., Xu, H., & Lin, L. (2023). Fibroblast growth factor 10 ameliorates neurodegeneration in mouse and cellular models of Alzheimer's disease via reducing tau hyperphosphorylation and neuronal apoptosis. *Aging Cell*, 22(9), e13937. <https://doi.org/10.1111/acel.13937>

**Iram, T., Kern, F., Kaur, A., Myneni, S., Morningstar, A. R., Shin, H., Garcia, M. A., Yerra, L., Palovics, R., Yang, A. C., Hahn, O., Lu, N., Shuken, S. R., Haney, M. s., Lehallier, B., Iyer, M., Luo, J., Zetterberg, H., Keller, A., ... Wyss-Coray, T. (2022).** Young CSF restores oligodendrogenesis and memory in aged mice via Fgf17. *Nature*, 605(7910), 509-515. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04722-0>

**Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004).** Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific  $\gamma$  secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159-170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>

- Katsouri, L., Ashraf, A., Birch, A. M., Lee, K. K. L., Mirzaei, N., & Sastre, M. (2015). Systemic administration of fibroblast growth factor-2 (FGF2) reduces BACE1 expression and amyloid pathology in APP23 mice. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 821-831. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.004>
- Li, J.-S., & Yao, Z.-X. (2013). Modulation of FGF receptor signaling as an intervention and potential therapy for myelin breakdown in Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 80(4), 341-344. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.12.008>
- Liu, A., Li, J. Y. H., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L. A., & Joyner, A. L. (2003). FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development*, 130(25), 6175-6185. <https://doi.org/10.1242/dev.00845>
- Mario, Á. S., Ivonne, P., Arnoldo, P. S., Marilet, Á. S., & Lázaro, Á. (2008). Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(3), 196-201.
- Moser, M. B., Rowland, D. C., & Moser, E. I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a021808. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021808>
- Murdock, Mitchell H. & Tsai, Li-Huei. (2023). Insights into Alzheimer's disease from single-cell genomic approaches. *Nature Neuroscience*, 26, 181-193. <https://www.nature.com/articles/s41593-022-01222-2>
- Oh, L. Y. S., Denninger, A., Colvin, J. S., Vyas, A., Tole, S., Ornitz, D. M., & Bansal, R. (2003). Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Signaling Regulates the Onset of Oligodendrocyte Terminal Differentiation. *The Journal of Neuroscience*, 23(3), 883-894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00883.2003>
- Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., Malaplate, C., Yen, F. T., & Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13954. <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- Pérez-Martín, E., Coto-Vilcapoma, A., Castilla-Silgado, J., Rodríguez-Cañón, M., Prado, C., Álvarez, G., Álvarez-Vega, M. A., Fernández-García, B., Menéndez-González, M., & Tomás-Zapico, C. (2023). Refining Stereotaxic Neurosurgery Techniques and Welfare Assessment for Long-Term Intracerebroventricular Device Implantation in Rodents. *Animals*, 13(16), 2627. <https://doi.org/10.3390/ani13162627>
- Plan Integral Alzheimer y otras Demencias. 2019-2023. Ministerio de Sanidad, Gobierno de España.

[https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Plan\\_Integral\\_Alzheimer\\_Octubre\\_2019.pdf](https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Plan_Integral_Alzheimer_Octubre_2019.pdf)

- Rodríguez, A. E. E., & Signoret, V. C. Z. (2017).** Papel de la agregación del péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(1), 2-11.
- Russell, W. M. S. & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*.
- Sánchez, C. R. de, Nariño, D., & Cerón, J. F. M. (2010).** Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer. *Acta Neurológica Colombiana*, 26(3 Supl 1), Article 3 Supl 1.
- Scearce-Leive, K., Roberson, E.D., Gerstein, H., Cholfin, J.A., Mandiyán, V.S., Sha, N.M., Rubenstein, J.L.R. & Mucke, L. (2007). Abnormal social behaviors in mice lacking Fgf17. *Genes, Brain and Behavior*, 7(3), 344-354. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00357.x>
- Small, D. H., & Cappai, R. (2006). Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: A centennial perspective. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 708-710. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04212.x>
- Soria López, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Chapter 13—Alzheimer's disease. En S. T. Dekosky & S. Asthana (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 167, pp. 231-255). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Tobore, T. O. (2019).** On the Etiopathogenesis and Pathophysiology of Alzheimer's Disease: A Comprehensive Theoretical Review. *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(2), 417-437. <https://doi.org/10.3233/JAD-181052>
- Valério-Gomes, B., Guimarães, D. M., Szczupak, D., & Lent, R. (2018).** The Absolute Number of Oligodendrocytes in the Adult Mouse Brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 90. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00090>
- Whitesell, J. D., Buckley, A. R., Knox, J. E., Kuan, L., Graddis, N., Pelos, A., Mukora, A., Wakeman, W., Bohn, P., Ho, A., Hirokawa, K. E., & Harris, J. A. (2019).** Whole brain imaging reveals distinct spatial patterns of amyloid beta deposition in three mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology*, 527(13), 2122-2145. <https://doi.org/10.1002/cne.24555>
- Zhang, R., Xu, X., Yu, H., Xu, X., Wang, M., & Le, W. (2022).** Factors Influencing Alzheimer's Disease Risk: Whether and How They are Related to the APOE Genotype. *Neuroscience Bulletin*, 38(7), 809-819. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00814-5>