



Desenvolupament d'una teràpia anti-amiloide per a la malaltia d'Alzheimer en el gos amb disfunció cognitiva

M^a Neus Bosch Pont

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesi Doctoral

DESENVOLUPAMENT D'UNA TERÀPIA
ANTI-AMILOIDE PER A LA MALALTIA
D'ALZHEIMER EN EL GOS AMB
DISFUNCIÓ COGNITIVA

M^a Neus Bosch Pont

Barcelona, abril del 2012

Tesi Doctoral

DESENVOLUPAMENT D'UNA TERÀPIA
ANTI-AMILOIDE PER A LA MALALTIA
D'ALZHEIMER EN EL GOS AMB
DISFUNCIÓ COGNITIVA

Treball realitzat per M^a Neus Bosch Pont a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques I, de la Facultada de Medicina (IDIBAPS), de la Universitat de Barcelona, sota la direcció de la Dra Nicole-Josette Mahy i co-direcció del Dr. Manuel José Rodríguez Allué per optar al títol de Doctora en Biomedicina

L'autora

La Directora,

el co-Director;

Neus Bosch Pont

Dra. Nicole-Josette Mahy Dr. Manuel José Rodríguez Allué

Barcelona, abril del 2012

Els homes han de saber que és en el cervell, i només
en aquest, d'on sorgeixen els nostres plaers, alegries,
somriures i bromes i també les nostres penes, dolors, pesars
i llàgrimes....totes aquestes coses que nosaltres
experimentem venen del cervell

Atribuït a Hipòcrates, segle V aC

Quin és el seu nom?

Auguste

I el seu cognom?

Auguste

Com es diu el seu marit?

Crec que....Auguste

...A la meva família...

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair a la *Dra. Nicole Mahy*, per haver-me donat la oportunitat de realitzar la Tesi Doctoral dintre del grup de Neuroquímica de la Universitat de Barcelona. Després de treballar durant anys com Infermera ha sigut una gran experiència poder introduir-me en el món de la investigació, més concretament dintre en el món de les neurociències i de les empreses de I+D.

També dono gràcies al *Dr. Manuel Rodríguez* (Manolo para los amigos) per ajudar-me en els experiments i en la interpretació del lio de dades que tenia. Ahhh i gràcies per la paciència que has tingut durant els meus moments de crisi amb la Tesi i amb Medivet

Agraeixo a en *Marco Puglise* per introduir-me en el món del gos i de la síndrome de disfunció canina. També li agraeixo el fet d'ajudar-me en tot el que ha calgut quan he tingut dubtes sobre com analitzar els resultats de les immunos sobre teixit de gos.

Dono gràcies a tota la gent de Ars Veterinària i de Masies de Roda que, sense ànim de lucre, han ajudat a tirar endavant tot el treball realitzat amb gossos. A la *Joana* per analitzar les mostres de sang, a la *Cristina i Mohamed* per cuidar tan bé els gossos. Gràcies al *J. Mascort* per l'ajut en l'estudi dels gossos amb CDS.

Agraeixo a la gent del departament d'immunologia, *Rafa el Escalador i al Mario* per ajudar-me a tirar posar a punt els ELISAS. Sense ells, crec que gran part de la tesi no l'ha hagués pogut tirar endavant. A la *Montse* de Biologia molecular per ajudar-me en la purificació dels anticossos.

També agraeixo al *Dr. Joseph Araujo i al Dr. Milgram* per acollir-me tan bé en congrés de gossos i envelliment a Laguna beach (EEUU). També a la *Dra. Lemere* per donar-me idees sobre com platejar alguns experiments.

Agraeixo a tots els meus companys i ex- companys de grup de Neuroquímica i als grans moments que hem passat durant aquests anys de Tesi. A la gent que ha marxat: la hiperactiva *Montse* per les xarrades sobre la investigació i la medicina (i pels "cotilleos" de l'hospital). I al *Lorenzo* per fer-me veure que tots

els Italians no són iguals. Al *Lluís*, aquest personatge que gairebé no el conec però que ha format part de moltes converses del laboratori. A la gent de Neurotec: gracias *Andrea i al seu futur fill*, amiga, por tu Pisco Sour , tus historias sobre Chile y tus consejos, a la *Noe* i la seva capacitat de sorprendres, “a si???, doncs això no ho sabia...” i per ensenyar-me que es pot caminar amb uns tacons increïbles sense caure. A la *Pili* rizitos i sonrisitas. I al *Joan* per ajudar-me en alguns dels experiments. A la gent que està a punt de marxar: al meu de germà de Tesi, *Xavi*, mai oblidaré els nostres viatges i moments a dintre i fora del labo. Jo també estic segura que ens continuarem veient. I per últim, a tota la gent que es queda: Al *Chivi*, per estar al meu costat en totes les aventures de Medivet, i per fer-les una mica més alegres. A la *Maggie fru* i les seves històries de festes i de gats. A l'*Alan* per la seva manera peculiar de veure el món i a l'*Ivan* per les seves lliçons de física quàntica. Ahhh!!! I la gran *Carme* per tot l'ajut en molts experiments i en la burrocràcia.

Gràcies a la resta de personal de la Unitat de Bioquímica per ajudar-me en tot el que ha calgut, al *Dr. Josep Carreras*, la *Dra. Roser Cussó* i *Dr. Ferran Climent*. Al *Dr. Josep Saura* (Jou), crec que hem format un bon equip ell com a cap de departament i jo com a secretària. A la *Dra. Margarita Martín* (Marga) per donar-me amb tot lo relacionat amb anticossos (purificacions i IP) i el *Dr. José Manuel Vidal* (Jose), i el gran interès mostrat pel meu treball. Al *Tony* i les inoblidables sessions de cine i pel seu ajut en moltes coses de laboratori i sobretot en els últims experiments. Al *Francesco* per ensenyar-me tot allò que sé de la màfia italiana i a la *Marta* i al seu fantàstic gos. A la *Dami* i la seva petita *Olivia*. A l'Erola que m'ha acompanyat molts dies fins altes hores de la tarda. Al *Mario* per ajudar-me amb els Westerns. la *Rosario* i les seves abraçades. A l'*Ana B.* i la seva veu (nunca te olvidaré Biochemical sister). Al *David* el Canario i les seves bromes una mica pesadetes... A en *Feliu* i al *Feliu* i la seva passió per la seva música i per seu color taronja i al somriure tímid de l'*Helena*.

Agraeixo a tota la gent que va fer el Màtser en Neurociències, en especial a la Laia, al Javier, i a l'Empar, que ens hem continuat comunicant després de les classes.

Gràcies a tots els meus amics que directa o indirectament m'han animat durant aquests anys a tirar endavant amb la Tesi: A les amigues de la infància; *Vero, Núria, Tere...*, als amics de Biologia; *Òscar, Bionenes, Gemma, Eli, Montse i Bea* (auqñue no seas de Biologia te considero una ellas)..A la gent de l'hospital; en especial a les marcines *Marta i Francina* i a supervisora *Carmen Navarro*. Gràcies a la gent de Climbat (*Mireia, Natàlia, Patri, Flor, Ale, Alberto, Javis, Tai...i tota la gent que em deixo*) per ajudar-me a trobar un gran hobby i una manera de viure. A la *Shaula* for her English lessons.

Ein Danke an *Ulrike und Meinrad* für ihr interesse an meiner Arbeit und den Beistand am Ende meines Doktorates.

Al Dj. Collins per la seva companyia durant tota la Tesi i en especial aquests últims mesos.

A tú , *Florian*, pel teu ajut i suport durant la Tesi. Sobretot en les traduccions "on live/on Love",jejeje. Crec que t'ha tocat viure la part més dura de la meva tesi, però tot i així has sobreviscut..(ets un crack!!). Moltes gràcies.

A tota la meva família, que sense ells no hauria pogut escriure aquesta Tesi. Als meus avis..., a la meves cosines i les seves històries entretingudes durant els dinars familiars. Als meus pares per saber escoltar-me i intentar entendre per què volia fer la Tesi. Al meu pare i la seva gran vitalitat i a la meva mare per preocupar-se sempre de mi. I al meu gran germà al qui envejo per la seva capacitat de recordar els noms dels pobles, rius i països més perduts d'arreu del món. Estic segura que tu també acabaràs algun dia la Tesi.

Gràcies a tots de tot cor.....

PUBLICACIONES

El treball que es presenta a continuació, està basat les següents publicacions,

Dogs with cognitive dysfunction syndrome: a natural model of Alzheimer's disease. Maria Neus Bosch, Marco Pugliese, Javier Gimeno-Bayón, Manuel José Rodríguez, Nicole Mahy. Current Alzheimer Research. 2012 Mar 1;9(3):298-314.

Rapid improvement of canine cognitive dysfunction with immunotherapy designed for Alzheimer's disease. Maria Neus Bosch, Javier Gimeno-Bayón, Manuel J Rodríguez, Marco Pugliese, and Nicole Mahy. Sotmès a Current Alzheimer Research.

FINANÇAMENT

Aquest treball ha estat finançat per:

Medivet-Pharma, SL. Finques el Macià. Masies de Roda, sn. Barcelona, Espanya.

Centro de Desarrollo Industrial y Tecnológico (Iniciativa NEOTEC) de Ministerio de educación e innovación, Espanya.

Projectes SAF 2008-01902 i IPT-010000-2010. Ministerio de Ciencia e Innovación i per 2009SGR1380 de la Generalitat de Catalunya, Espanya.

ABREVIACIONS

A β = Beta Amiloide

ADAM= Proteïna de la família disintegrines i metal·loproteases

AGE= Productes finals de glicosilació avançada

AP= Fosfatasa Alcalina

APP= Proteïna Precursora Amiloide

ApoE4= Apolipoproteïna E4

BACE= Beta Secretasa

BHE= Barrera-Hemato-Encefàlica

BSA= Albúmina Sèrica Bovina

CB= Calbindina

CDR= Índex Clínic de Demència

CDS= Síndrome de Disfunció Cognitiva Canina

CR= Calretinina

DAB= Diaminobenzidina

DCLa= Deteriorament Cognitiu Lleu de tipus amnèsic

DCLna= Deteriorament Cognitiu Lleu de tipus no amnèsic

DCL= Deteriorament Cognitiu Lleu

D.O = Densitat Òptica

DSM= Manual de Diagnòstic i estadística de Desordres Mentals

¹⁸F-FDG = ¹⁸F-fluoro-2-desoxi-D-glucosa

GABA= Àcid Gamma Amino Butíric

GDS= Escala global de Deteriorament

GFAP= Proteïna àcida fibril·lar glial

GPT= Glutamat Piruvat Transaminasa

HMAT =Valor de la meitat de la titulació màxima

IFN γ = Interferóy

IL= Interleuquina

IRM= Imatges per Ressonància Magnètica

KLH= Helyhole Limpet Hemocyanin

λ = Longitud d'ona

ICD= Dèficit Cognitiu Lleu caní

LCR= Líquid-Céfalo-Raquidi

LRP= Receptors de proteïnes de baixa Densitat

MA= Malaltia d'Alzheimer

MAf= Malaltia d'Alzheimer de tipus familiar

MMSE= Mini.-Exàmen de l'Estat Mental

NGS= Sèrum Normal de Cabra

NSB= Unió no específica

PB= Tampó Fosfat

PBR=Receptor per a les Benzodiazepines Perifèric

PBS= Tampó Fosfat Salí

PFA= Paraformaldehid

PK= Fosfoquinasa

PrP^c= Proteïna priònica

PS= Presenilina

PV=Parvabulina

PVDF= Polivinil de difluorid

sCD= Dèficit Cognitiu Sever Caní

SNC= Sistema Nerviós Central

sAPP α = Proteïna Precursora Amiloide Soluble

RAGE= Receptor de productes Finals de Glicosilació Avançada

RNM= Ressonància Nuclear Magnètica

TB=Unió Total

TEP= Tomografia per Emissió de Positrons

ThT= Tioflavina T

Tg= Transgènic

TMB= Tetrametilbenzidina

INDEX

Capítol 1: INTRODUCCIÓ	1
1.1 LA MALALTIA D'ALZHEIMER	3
1.2 EL GOS COM A MODEL DE MALALTIA D'ALZHEIMER	7
1.3 LA SÍNDROME DE DISFUNCIÓ COGNITIVA CANINA	10
1.4 ESTUDIS IN-VIVO PER A L'AVAUACIÓ DE LA MA I DEL DÈFICIT COGNITIU CANÍ	12
1.4.1 Tècniques d'Imatges per Ressonància Magnètica (IRM) i edat	12
1.4.2 Paràmetres metabòlics	13
1.4.3 Biomarcadors al Líquid cefaloraquídi	15
1.4.4 Biomarcadors plasmàtics	16
1.5 ESTUDIS POST-MORTEM PER A L'AVAUACIÓ la MA i DÈFICIT COGNITIU CANÍ	17
1.5.1 Canvis estructurals a cervell	17
1.5.2 Oligòmers A β , maduració de plaques difuses, vulnerabilitat neuronal i reactivitat glial	18
1.5.3 Distribució de l'A β al cervell	18
1.5.4 Reactivitat amiloidea	21
1.6 ESTUDIS COGNITIVS I DE COMPORTAMENT EN LA MA I EN EL GOS ENVELLIT	26
1.6.1 Avaluació cognitiva a gossos estabulats	26
1.6.2 Avaluació cognitiva a gossos de companyia	27
1.7 ESTUDIS DIRIGITS AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER I DEL DÈFICIT COGNITIU CANÍ	31
1.7.1 Tractament farmacològic	31

1.7.1.1 <i>L Deprenil</i>	31
1.7.1.2 <i>Nicergolina</i>	32
1.7.1.3 <i>Propentofilina</i>	32
1.7.1.4 <i>Adrafanil</i>	32
1.7.2 Teràpia basada en suplementes dietètics i teràpies complementàries	33
1.7.3 Teràpia basada en l'enriquiment ambiental	33
1.7.4 Immunoteràpia d'A β	33
Capítol 2: HIPÒTESI I OBJECTIUS	41
Capítol 3: MATERIALS I METODOLOGIA	45
3.1 ANIMALS	47
3.1.1 Conills	47
3.1.2 Gossos	47
3.2 MOSTRES DE TEIXIT HUMÀ	48
3.3 MATERIALS	48
3.4 METODOLOGIA	51
3.4.1 Preparació de les vacunes	51
3.4.2 Inoculació de la vacuna	51
3.4.3 Extracció de sang	52
3.4.4 Extracció i conservació de LCR	53
3.4.5 Obtenció i conservació de sèrum i plasma	53
3.4.6 Mesura de paràmetres bioquímics i hematològics	54
3.4.7 Tècniques d'assaig per immunoabsorció lligat a enzim (ELISA)	54
3.4.7.1 <i>ELISA per a la detecció d'Aβ_{40} i Aβ_{42} a plasma i LCR</i>	54

3.4.7.2 <i>ELISA per a la detecció d'IgG anti-Aβ₄₀ a sèrum i LCR</i>	55
3.4.8 <i>Inhibició d'IgGs anti-Aβ₄₀ a sèrum amb fragments d'Aβ</i>	56
3.4.9 <i>Purificació d'IgG anti-Aβ₄₀ a partir del sèrum</i>	57
3.4.10 <i>Obtenció i preservació de mostres de teixit de gos</i>	60
3.4.10.1 <i>Obtenció de mostres</i>	60
3.4.10.2 <i>Fixació i criopreservació de les mostres</i>	60
3.4.10.3 <i>Congelació de les mostres</i>	60
3.4.11 <i>Tincions</i>	61
3.4.11.1 <i>Tinció de Nissl</i>	61
3.4.11.2 <i>Tinció de Prussian blue</i>	61
3.4.12 <i>Localització immunohistoquímica mitjançant reacció enzimàtica</i>	62
3.4.12.1 <i>Immunohistoquímica simple per a la detecció de plaques d'Aβ sobre mostres congelades canines amb anti-Aβ₄₀ purificats</i>	62
3.4.12.2 <i>Immunohistoquímica simple per a la detecció de plaques d'Aβ sobre mostres humanes amb IgGs anti- Aβ₄₀ purificats</i>	63
3.4.12.3 <i>Immunohistoquímica doble per a la detecció de plaques d'Aβ-astròcits GFAP(+) ó S100B(+) sobre mostres canines</i>	64
3.4.13 <i>Localització immunohistoquímica mitjançant fluorescència</i>	65
3.4.13.1 <i>Detecció doble de plaques d'Aβ ThT positives-plaques d'Aβ immunopositives sobre teixit humà</i>	66
3.4.14 <i>Autoradiografia "in vitro</i>	67
3.4.14.1 <i>Fixació del [³H]PK11195 per a la detecció de PBR sobre mostres de cervell caní</i>	67
3.5 <i>ANÀLISI ESTADÍSTICA</i>	68

Capítol 4: RESULTATS	71
4.1 ESTUDI DE SEGURETAT I EFICÀCIA DE DIVERSES IMMUNOTERÀPIES A β DISSENYADES A PARTIR DE DIFERENTS FRAGMENTS DEL PÈPTID A β ₄₀	73
4.1.1 Posta a punt del procediment	75
4.1.1.1 Procés d'immunització	75
4.1.1.2 Caracterització de la resposta immunitària	76
4.1.2 Resultats	76
4.1.2.1 La barreja A β ₁₋₄₀ + KLH-A β _{y-40} indueix les titulacions d'IgG anti-A β ₄₀ més elevades en conills.	76
4.1.2.2 Cap dels conills presenta efectes secundaris associats a la vacunació	77
4.1.2.3 Les IgG anti-A β ₄₀ obtingudes del sèrum de conills immunitzats amb la vacuna reconeixen els epítops linears A β ₁₋₁₁ , els epítops conformacionals A β ₄₀ i les plaques difuses i neurítiques	77
4.2 CARACTERITZACIÓ DE LA SÍNDROME DE DISFUNCIÓ CANINA. POSTA A PUNT DE L'ESTUDI D'EFICÀCIA I SEGURETAT DE LA VACUNA ANTI- AMILOIDE	81
4.2.1.Procediment	81
4.2.1.1 Selecció i caracterització dels gossos	81
4.2.1.2 Disseny i validació del procés d'immunització	82
4.2.3 Resultats de l'estudi d'eficàcia i seguretat	84
4.2.3.1 Els gossos amb dèficit cognitiu lleu es diferencien amb nivells elevats de proteïnes plasmàtiques, plaquetes i A β plasmàtic	84
4.2.3.2 La immunització provoca una millora cognitiva en els gossos amb CDS acompanyada d'un augment de la ràtio A β plasma/LCR	86

4.3 ESTUDI “EX VIVO”: CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA GENERADA PER LA VACUNA ANTI-AMILOIDE. EFECTES DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA A SNC.	91
4.3.1 Procediment	91
4.3.1.1 <i>Caracterització de la resposta immunitària</i>	91
4.3.1.2 <i>Efectes de la resposta immunitària en el SNC</i>	92
4.3.2 Resultats	94
4.3.2.1 <i>Les IgG anti-Aβ₄₀ dels gossos vacunats amb la mescla Aβ₁₋₄₀+KLH-Aβ_{y-40} reconeixen els epítops linears Aβ₁₋₁₁, les formes conformacionals de l'Aβ₄₀ soluble i les plaques difuses</i>	94
4.3.2.2 <i>No es detecten cúmuls de Fe²⁺ en cap dels gossos immunitzats</i>	97
4.3.2.3 <i>Els gossos vacunats amb la barreja d'Aβ₁₋₄₀+ KLH-Aβ_{y-40} presenten plaques d'amiloide més denses que no correlacionen amb el dèficit cognitiu</i>	97
4.3.2.4 <i>Els gossos vacunats amb la mescla Aβ₁₋₄₀+ KLH-Aβ_{y-40} presenten menys nombre d'astròcits S100B (+) i amb menys activació</i>	100
4.3.2.5 <i>La concentració de [³H]PK11195 unida a PBR es correlaciona amb l'edat, el dèficit cognitiu i estadi de plaques a escorça pre-frontal</i>	102
Capítol 5: DISCUSSIÓ	105
5.1 <i>La mescla Aβ₁₋₄₀+KLH-Aβ_{y-40} presenta una resposta immunògena potenciada i amb més capacitat per a reconèixer diverses formes d'amiloide. Aquesta capacitat es veu modificada en gossos per processos de maduració per afinitat i per edat.</i>	107
5.2 <i>S'ha establert una relació entre processos de dany oxidatiu, processos inflamatoris i de disposició d'amiloide característics d'estadis inicials de la CDS i de la MA, i diversos biomarcadors relacionats amb l'edat</i>	109

5.3 La immunització amb la mescla dels pèptids $A\beta_{1-40}$ -KLH- $A\beta_{y-40}$ indueix una millora cognitiva, associada a una resposta immunògena que du a l'eliminació d' $A\beta$ del SNC a perifèria per efecte sífó i sense efectes secundaris associats.	110
5.4 L'eliminació d' $A\beta$ i la millora cognitiva en els gossos vacunats, estan relacionades amb la reactivitat glial	112
Capítol 6: CONCLUSIONS	117
Capítol 7: REFERÈNCIES	121

Capítol 1
INTRODUCCIÓ

1.1 LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Alois Azlheimer, l'any 1907, identificà el primer cas de Malaltia d'Alzheimer (MA) en una dona de 50 anys anomenada *Auguste D.* La malaltia fou descrita com a demència, anys més tard, per *Emil Kraepelin* després d'observar característiques patològiques en els cervells de malalts. La MA és un tipus de demència caracteritzada per la pèrdua progressiva de la memòria i acompanyada de canvis estructurals i histopatològics en el cervell. Actualment, presenta una prevalença d'entre el 40 i 50% a l'edat de 80 anys. Aquesta incidència podrà quadruplicar-se el 2050 degut a l'augment de l'esperança de vida (Ballard et al., 2011).

Els criteris establerts per al diagnòstic de la MA, publicats i validats pel “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*” (DSM) (American Psychiatric Association, 1994) i pel “*National institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*” (NINCDSADRDA), es basen en la presència de deteriorament cognitiu confirmat per tests neuropsicològics. Els dominis cognitius més alterats són la memòria, el llenguatge, l'orientació, l'atenció i habilitats perceptives, constructives, funcionals i per a la resolució de problemes. Per poder confirmar el diagnòstic, cal descartar altres malalties neurològiques mitjançant anàlisis histopatològiques i de neuroimatge. Actualment no s'ha establert cap biomarcador prou potent que ajudi a la correcta diagnosi de la malaltia. Dintre dels tests neuropsicològics, i per tal de poder classificar rigorosament el ventall d'alteracions cognitives trobades en la població geriàtrica, hi trobem les escales globals com la “*Global Deterioration Scale (GDS)*” i la “*Clinical Dementia Rating*” (CDR). Aquestes escales consideren que una determinada puntuació pot ser indicativa de determinats estadis pre-dements o de deteriorament cognitiu lleu (DCL). El 1995, Petersen et al (Petersen et al., 1995) van ser dels primers en usar el terme de DCL com a diagnòstic independent no lligat a cap classificació dintre de les escales, definint-lo com una síndrome a on els individus presenten alteracions cognitives que no interfereixen en les activitats de la vida diària. Quan la pèrdua de memòria és el tret més predominant de la síndrome és vist com a un estadi prodròmic de la MA, classificant-se com a deteriorament cognitiu lleu amnèsic (DCLa). Quan les alteracions cognitives són en dominis no

memorístics, es considera que la síndrome no evolucionarà a MA, classificant-se com deteriorament cognitiu lleu no amnèsic (DCLna) (Golomb et al., 2004).

Estructuralment, el cervell dels malalts d'Alzheimer, es caracteritza per l'atròfia dels lòbuls temporal, parietal i frontal així com una augment del volum dels ventricles.

Histopatològicament, la MA es caracteritza per presència a cervell de plaques de Beta Amiloide ($A\beta$), correlacionades amb l'augment de diferents formes d'amiloide solubles (oligòmers i fibril·les), i per la presència de cabdells neurofibril·lars.

L' $A\beta$ és un pèptid de 40/42 aminoàcids originat per proteòlisis de la proteïna precursora amiloide (APP), la qual és una proteïna integral de membrana que es troba a diversos teixits i que està concentrada en les zones de sinapsis neuronals. Tot i que hi ha un gran desconeixement sobre les funcions de l'APP, diversos són els estudis que intenten esbrinar la funció d'aquesta proteïna de membrana. Estudis la relacionen amb l'activitat ferroxidasa (Duce et al., 2010). D'altres la relacionen amb la modulació del creixement cel·lular, de la motilitat i de la supervivència cel·lular (O'Brien and Wong, 2011), així com de amb la neurogènesi (Zhou et al., 2011). A Sistema Nerviós Central (SNC), la forma més comú de l'APP és la de 695 aminoàcids i aquesta pot ser processada per 3 enzims transmembranosos, α , β i γ secretasa. L' α secretasa és una zinc metal·loproteasa que pertany a la família de disintegrines i metal·loproteases (ADAM). La β secretasa pertany a la família de les aspartat proteases (BACE) amb 2 llocs actius per a l'aspartat. I la γ secretasa és un complex format per un únic lloc actiu, presenilin-1 (PS1) o PS2, i 3 dominis més: nicastrina, APH1 i PEN2. Quan l'APP és trencada per l' α secretasa, s'evita la formació d'amiloide i n'eixís un domini soluble ($sAPP\alpha$) amb propietats neuroprotectores i de millora cognitiva (Allinson et al., 2003). En canvi, quan és trencada per la β i γ secretases successivament, n'esdevé es forma l' $A\beta$ de 38, 40 ó 42 aminoàcids, depenent del lloc de tall de la γ secretasa (Haass and Selkoe, 2007) Fig.1.1

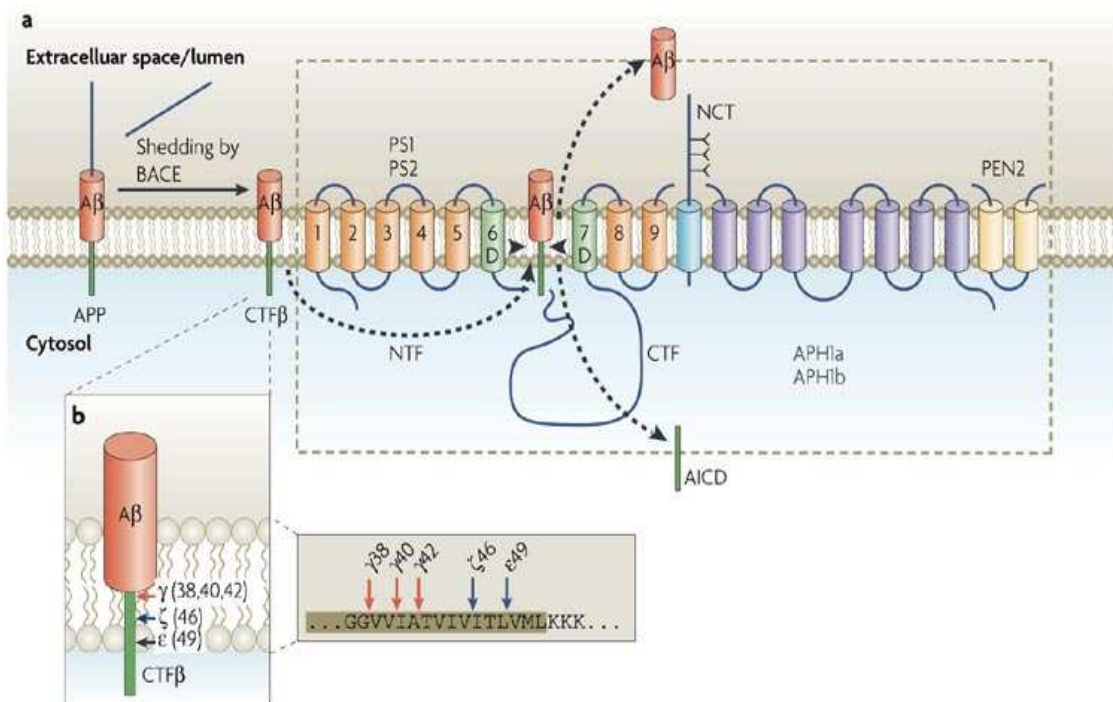


Fig.1.1 Formació de la proteïna Aβ per processament de la proteïna precursora amiloide (APP). El procés d'amiloidogènesi ve donat per unió de les β i γ secretases al lloc de tall de l'APP. Aquesta primerament és processada per la BACE (esquerre) i un llarg ectodomini és secretat. El domini que resta a la membrana (CTFβ) és transferit al domini actiu de la γ secretasa (PS1, PS2) i que, juntament amb els altres components del complex (APH1, nicastrina i PEN2), el talla alliberant-ne l'Aβ de 38, 40 o 42 aminoàcids. (Haass and Selkoe, 2007)

Diverses són les hipòtesis que descriuen els esdeveniments moleculars que originarien la MA. Una d'aquestes és la “Hipòtesi Amiloide” (Hardy and Higgins, 1992), (Fig.1.2) caracteritzada per disfuncions neuronals, neurodegeneració i la conseqüent disfunció cognitiva degudes al cúmul d'Aβ extracel·lular (formant oligòmers, fibril·les i plaques) per desequilibri de distribució del pèptid Aβ soluble entre compartiments central i perifèric. Aquesta és la més acceptada per gran part de la comunitat científica. L'origen dels esdeveniments pot ser genètic o no, classificant la MA com a familiar (MAf) o esporàdica (Karran et al., 2011): La MAf, associada a mutacions autosòmiques dominants en els gens de l'APP o en les PS1 i 2 (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995), és poc freqüent (5-10% dels casos de MA) i apareix normalment

abans dels 65 anys. Mutacions en aquests gens provoquen una mala escissió de l'APP per part de la BACE i la γ secretasa, amb un mal processament i cúmul de les diferents formes d'A β a SNC. La MA esporàdica apareix en edats més avançades (després dels 65 anys) i diferents són els factors que causen el desequilibri i cúmul del pèptid A β a SNC. S'han identificat diversos factors de risc que faciliten l'aparició de la MA o l'evolució del DCL cap a MA: la presència de l'al·lel de l'apolipoproteïna E4 (APOE4) (Corder et al., 1993), les malalties cardiovasculars (Ciobica et al., 2011), la diabetis mellitus de tipus II (Hölscher, 2011), l'estrès crònic, la depressió i el cúmul de metalls com l'Alumini o el Zinc (Haruhiko Akiyama et al.2011).

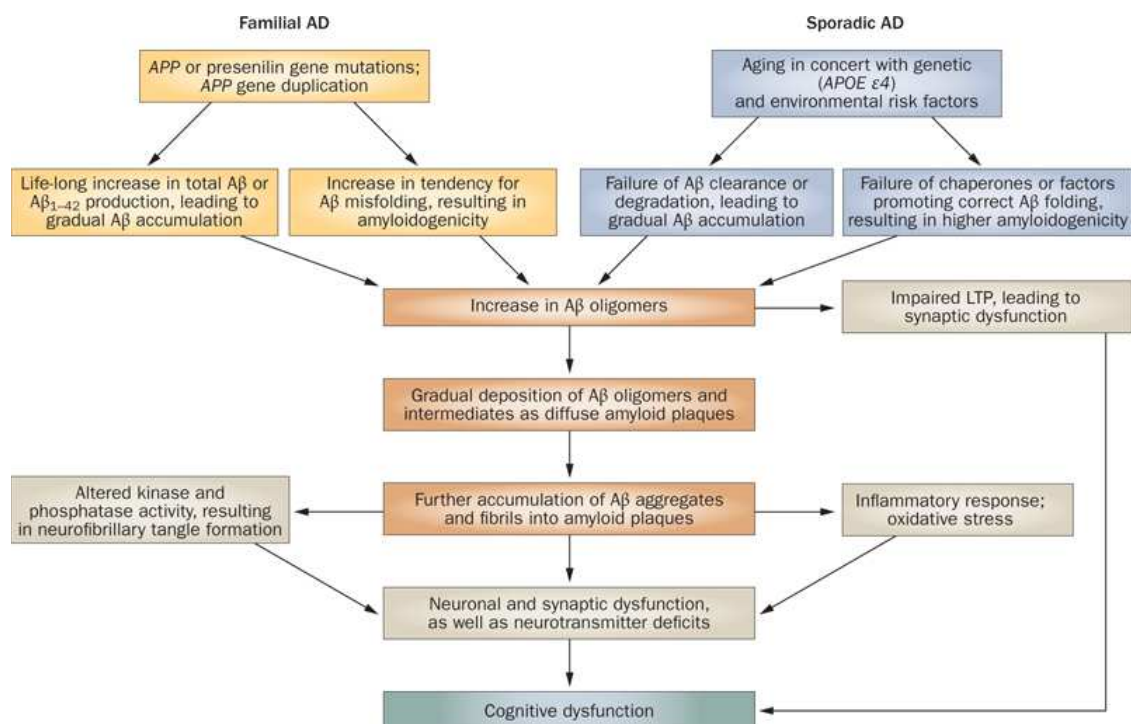


Fig.1.2 Cascada d'esdeveniments en la MA segons "Hipòtesi Amiloide". Actualment, la hipòtesi de la cascada amiloide suggereix que la sinaptotoxicitat i neurotoxicitat són produïdes per un "estrès d'agregació", d'origen genètic o esporàdic, degut a un augment de formes solubles i tòxiques d'espècies amiloides. L'agregació d'aquestes formes solubles dur a la formació per de fibril·les i plaques produint una alteració de les activitats quinasas de les cèl·lules, formació de cabdells neurofibril·lars, estrès oxidatiu i pèrdua neuronal. (Karran et al, 2011).

1.2 EL GOS COM A MODEL DE MALALTIA D'ALZHEIMER

Durant molts anys la recerca de la MA s'ha basat en manipulacions genètiques per poder reproduir la malaltia en diverses espècies, emprant models de llevat, com *Drosophila melanogaster* i *Caenorabditis elegants*, models de conill o de rosegador. Els estudis s'han focalitzat en ratolins *knock-out* i transgènics (Tg) per la major semblança del SNC d'aquests a l'humà i per la facilitat de poder aplicar-ne enginyeria genètica. Altres laboratoris han realitzat directament els estudis en altres espècies animals com el ximpanzé, l'ós polar, gat i gos ja que presenten espontàniament davallada cognitiva relacionada amb l'edat i amb característiques similars a la MA. (Johnstone et al., 1991; Price et al., 1991; Tekirian et al., 1996; Head et al., 2005; Pugliese et al., 2006b). El model caní està considerat actualment una bona eina per estudiar la MA, a cavall dels models modificats genèticament i humans (Cummings et al., març; Pugliese et al., 2006b; Sarasa and Pesini, 2009).

Un dels primers models animals da MA va ser el ratolí transgènic per la proteïna precursora amiloide, ratolí PDAPP, el qual acumula i diposita A β difús i fibrillar a plaques neurítiques d'escorça cerebral, hipocamp i cos callós (Hsiao et al., 1996). Altres ratolins que simulen la patologia de la MA són els transgènics per apoE o per la Tau. Més endavant i usant tècniques més sofisticades es van obtenir models animals transgènics creuant ratolins PDAPP amb ratolins apoE o amb dèficits/ sobre-expressió de gens; com per exemple els que expressen α ó β secretasa o enzims de degradació de la insulina (Gotz and Ittner, 2008; Jolivalt et al., 2010). Tots aquests models han permès obtenir molta informació sobre els mecanismes fisiopatològics de la MA i fer propostes de nous tractaments. Per exemple, propostes de tractaments com els inhibidors de la secretasa o les immunoteràpies no haguessin estat possibles sense aquests models animals. Taula1.1

Taula1.1 Característiques de Models Animals de MA

Natural models of Alzheimer's disease			
	Cognitive aspects	Neuropathology	Limitations
Aged primates (Martin et al., 1994)	Learning, memory and cognition impairment	Diffuse and neuritic A β plaques Soluble A β Phospho-tau tangles Dsyrophic neurites Neuronal loss Gliosis	Elevated costs studies Long-term housing
Non-housed CDS dog (Pugliese et al., 2006; Rofina et al., 2006)	Learning, memory and cognition impairment* Behavioral changes	Diffuse A β plaques Soluble A β Hyperphosphorylated Tau Neuronal loss Gliosis	Consent by the owner Lower costs studies Facilities not required
Housed aged dogs (Cummings et al., 1996)	Learning, memory and cognition impairment	Diffuse A β plaques Soluble A β Hyperphosphorylated Tau Neuronal loss Gliosis	Time consuming training for tasks learning Elevated costs studies Long-term housing
Induced models of Alzheimer's disease			
Fruit fly A β 40 or 42 fly (Iijima and Iijima-Ando, 2008) Tau-pathology fly (Khurana, 2008)	Associative learning and memory impairment	Amyloid deposits Primary tauopathy features Neuronal loss	No parallelism between fly brain and mammalian brain
Rabbit Hypercholesterolemia rabbit model (Sparks et al., 1994)	Cognitive impairment	A β plaques Gliosis Neuronal loss	Hypercholesterolemia model Limitation in learning, memory and cognition capacities
Rat Intraventricular Abeta infusion (Frautschy et al.)	Mild impairment	A β plaques Gliosis	Aggregates in the pump No evidences of learning, memory, cognitive impairment
Transgenic rats Cited in review (Martin et al., 1994)		A β plaques Gliosis	Low efficacy in the genome rats manipulations No evidence of learning, memory, cognitive impairment
Mouse SAMP8 (Pallas et al., 2008)	Mild cognitive impairment model	Oxidative damage	Mild cognitive impairment model Time consuming training for tasks learning
Trangenic mice Tg 2576 (Hsiao et al., 1996) PSAPP (Holcomb et al., 1998) 3xtg (Lewis et al., 2001)	Spatial cognitive and learning impairment	Neuritic and diffuse plaques Gliosis Neuritic dystrophy Hyperphosphorylated Tau	Time consuming training for tasks learning Elevated costs studies

Adaptat de (Bosch et al, 2012)

Tot i que molts dels models transgènics de la MA ens han aportat coneixements sobre els mecanismes moleculars de la patologia, cap d'aquests va acompanyat de tots els dèficits cognitius observats a la MA. A més a més, aquests tenen moltes limitacions, especialment alhora de representar el quadre complet de correspondència entre les mutacions i la malaltia. Per exemple, en els models de ratolins transgènics, les mutacions a l'APP i a la PS desemboquen només a la formació de plaques, mentre que en humans mutacions en els gens d'aquestes proteïnes desemboquen a la formació de plaques, cabdells i atrofia cerebral. Per tot això, aquests models animals aporten informació bàsicament dels factors patogènics inherents a la malaltia. En canvi, els mamífers caracteritzats per presentar síndrome de dèficit cognitiu i amb marcadors de MA aporten informació global de la malaltia i permeten identificar les dianes terapèutiques de tractaments proposats.

Dintre d'aquests mamífers, el gos i el ximpanzé presenten una gran varietat d'avaluacions cognitives properes a les que es fa humans per valorar la MA, faciliten la obtenció de mostres de líquid cefaloraquídi (LCR) i de teixit nerviós. (Adams et al., 2000a; Cotman and Head, 2008). Per raons ètiques, a priori, es selecciona el gos com a model. La correlació establida entre la progressió de la disfunció cognitiva del gos, la maduració de les plaques d'A β i molts dels marcadors cel·lulars i moleculars (Sarasa et al., 2010), juntament amb les similituds entre la patologia a gos i a humà, validen el gos com a model d'estudi de la MA i com a model d'estudi de l'envelliment cerebral humà. Algunes d'aquestes similituds es troben, per exemple, en l'APP, en la ferroxidasa exportadora de ferro (Duce et al.), en l'A β ₄₀ i A β ₄₂ (Johnstone et al., 1991; Kirkness et al., 2003; Sarasa et al., 2010) o en la deposició de les formes solubles d'A β en forma de plaques senils i d'angiopatia cerebral amiloide. La progressió de la disfunció cognitiva a gos, però, tot i presentar fosforilació de la Tau, (Head et al., 2005; Pugliese et al., 2006b), no va acompanyada de la formació de cabdells neurofibril·lars, probablement degut a les diferències entre les seqüències d'aquesta proteïna a gos i humà. Tot i que el cúmul de cabdells neurofibril·lars és comú a molts tipus de demència, la deposició d'amiloide és un dels primers esdeveniments en la MA i en processos d'envelliment cerebral. Aquest fenomen ja referenciat anteriorment com a "*Hipòtesi amiloide*" es

desenvolupa en gossos envellits (més grans de 8 anys) (Kiatipattanasakul et al., 1996; Dimakopoulos and Mayer, 2002; Pugliese et al., 2006b; Bernedo et al., 2009; Head et al., 2010). Tot això fa que el gos vell sigui un model quasi únic per a poder investigar processos de dèficit cognitiu relacionats amb maduració de les plaques d'A β . La identificació de cascades de neurotoxicitat (Lee et al., 2006; Crews and Masliah, 2010), dels mecanismes específics causants de la MA esporàdica, o la identificació de mecanismes que correlacionen l'estrès crònic (Alkadhi et al., 2011) amb la incidència de MA, poden ser alguns dels processos a investigar usant el gos envellit com a model de MA (Head et al., 2000). A més a més, el gos ofereix dianes per identificar l'eficàcia de tractaments que interfereixin en la producció d'A β , formació d'oligòmers, fibril·les o formació i maduració de plaques. A part, també permet entendre la dinàmica d'aquests components amiloides entre els compartiments central i perifèric, els seus efectes neurotòxics i els processos d'eliminació (Cribbs et al., 2003; Landsberg, 2005; Cotman and Head, 2008; Carter et al., 2010).

Actualment, els estudis que usen el gos com a model natural de MA es poden enfocar des de dos vessants diferents segons la metodologia utilitzada per a la valoració cognitiva. La primera empra tasques específiques per valorar el dèficit de memòria i aprenentatge de gossos estabulats- en general beagle. La segona es centra en valorar el dèficit de memòria i aprenentatge en gossos de companyia diagnosticats amb la Síndrome de Disfunció Cognitiva (CDS). Tot i la diversitat de races, sexe i condicions de vida d'aquests animals (Pugliese et al., 2005), representen un model validat per a la recerca de la MA (Pugliese et al., 2006b). Aquest abordatge presenta l'avantatge de no necessitar entrenar durant temps cada animal per aprendre tasques específiques i a més a més evita l'estabulació dels gossos durant més de 8 anys.

1.3 LA SÍNDROME DE DISFUNCIO COGNITIVA CANINA (CDS)

Actualment, s'estima que un 30-40% del total de la població de gossos majors de 7 anys (Shepherd, 2008). Igual que a humans, el procés d'envelliment en els gossos inclou canvis progressius i irreversibles a tot l'organisme, així com canvis

cognitius i conductuals. Alguns d'aquests canvis inclouen menor interacció social, menor orientació espacial o alteracions en hàbits d'eliminació (Mosier, 1989). Quan aquestes alteracions no es relacionen amb cap altre malaltia primària com tumor cerebral o infart cerebral, s'aplica el diagnòstic clínic de CDS, en el que succeeixen els següents canvis de comportament;

1. Disminució o canvis en la reactivitat d'estímuls rutinaris
2. Confusió i desorientació
3. Canvis en hàbits d'eliminació: eliminació inapropiada o incontinència
4. Menor interacció del gos amb el seus amos
5. Lentitud en obeir ordres
6. Major irritabilitat
7. Alteració del cicle de la son
8. Disminució de resposta sensorial
9. Canvis en la capacitat de resoldre problemes

Tots aquests símptomes s'inclouen dintre de la CDS (Ruehl et al., 1995), i corresponen a un ampli espectre de problemes de conducta que equivalen a la definició de demència en humans el DSM IV i a estadis 4-5 segons la GDS (Cummings et al., 1996). Alguns autors suggereixen la correspondència entre els gossos vells i el Deteriorament Cognitiu (Cotman and Head, 2008). En un estudi fet amb 180 gossos sense problemes de salut identificables, el 28% dels amos de gossos entre 11 i 12 anys, confirmaven que els gos presentava almenys 1 dels signes d'alteració cognitiva i un 10% dos o més signes d'alteració cognitiva (Neilson et al., 2001). Altres estudis mostren que només un 12% dels amos que detecten canvis de comportament en els seus gossos ho fan saber al seu veterinari (Landsberg, 2005). Estudis més actuals (Salvin et al., 2010) estimen una prevalença del 14,2% de la CDS dintre de la població envellida, dels quals només el 1,9% són diagnosticats com a CDS pels veterinaris.

1.4 ESTUDIS IN-VIVO PER A L'AVALUACIÓ DE LA MA I DEL DÈFICIT COGNITIU CANÍ

1.4.1 Tècniques d'Imatges per Ressonància Magnètica (IRM) i edat

Les tècniques de neuroimatge són part de les eines usades per a la diagnosi i desenvolupament de la MA (Gu et al., 2010). Els canvis en el volum de l'hipocamp, l'atròfia dels *girus* utilitzant la imatge per Ressonància Nuclear Magnètica (RNM) es poden analitzar amb Morfometria Basada en els Vòxels i/o la Màquina de Vector de Suport (Coupé et al., 2011).

Les tècniques de IRM són també de gran interès per a completar l'avaluació cognitiva de gossos envellits. Actualment, a nivell veterinari, només s'estan aplicant per identificar lesions cerebrals o per fer el diagnòstic de malalties del SNC. En canvi, encara s'usen poc per a la predicció, diagnosi o seguiment del gos envellit amb disfunció cognitiva. La relació entre l'atròfia progressiva a cervell i l'edat ha estat evidenciada en estudi *post-mortem* (Reifinger, 1997; Borràs et al., 1999) i confirmada en gossos establats utilitzant diverses tècniques de IRM (Kimotsuki et al., 2005; Tapp et al., 2006). Per determinar si la progressió de l'atròfia cerebral és una marcador d'edat en gossos, igual que a humans, s'han fet estudis d'IRM en gossos de companyia adaptant una classificació d'avaluació humana per a la seva valoració (Fig.1.3). Aquesta nova escala representa un mètode eficaç, ràpid i universal per a mesurar l'atròfia cerebral canina amb l'avantatge que no és necessària la supervisió d'un especialista (Pugliese et al., 2010).

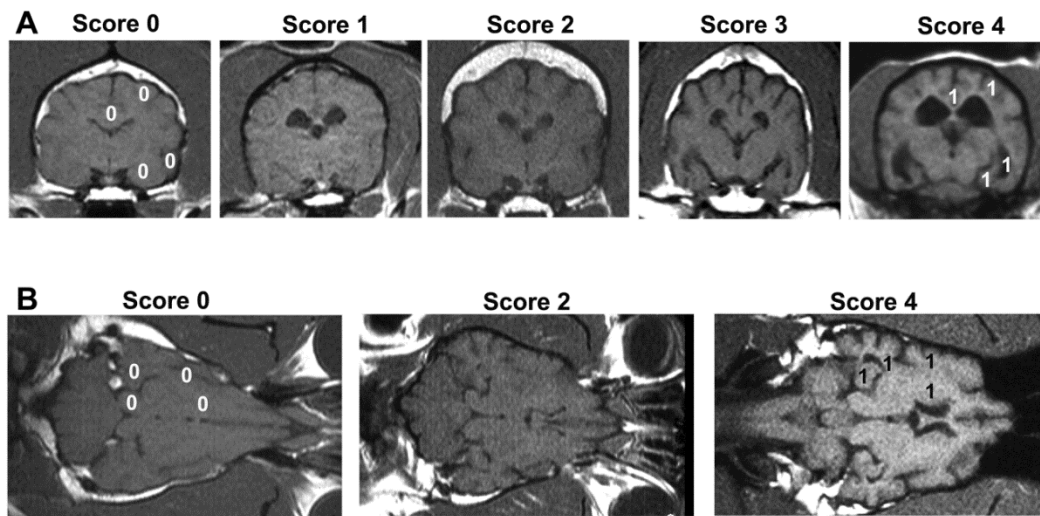


Fig.1.3 Tècniques de IRM en gossos de companyia envellits.

(A) T1- Imatge d'RM coronals de diferents gossos amb la puntuació total segons l'atròfia cerebral. (0-4). Van ser avaluats la mida del solc cerebral, mida de ventricles, la profunditat de les banyes temporals i l'allargada de l'hipocamp (0 ó 1). Si els valors de tots els paràmetres és 0, la puntuació total és 0; quan la puntuació total és 1 (mida ventricular 1); quan la puntuació total és 2 (mida ventricular 1 i solc cerebral 1); quan la puntuació total és 3 (mida ventricular 1, solc cerebral 1 i llargada de l'hipocamp); quan la puntuació és 4 (mida ventricular 1, solc cerebral 1, llargada de l'hipocamp i profunditat de la banya temporal).

(B) T1- Imatge d'RM coronal de diferents gossos amb la puntuació total segons l'atròfia cerebral (0-4) ; puntuació total 0 (tots les paràmetres són 0); puntuació total 2 (solc cerebral 1 i profunditat de la banya temporal 1); puntuació total 4 (tamany ventricular 1, solc cerebral 1, llargada de l'hipocamp 1 i profunditat de la banya temporal 1)

(Bosch et al, 2012).

1.4.2 Paràmetres metabòlics

La correlació entre paràmetres metabòlics indicadors de dany oxidatiu, l'A β i el dèficit cognitiu ha estat descrita en gossos i en humans (Parnetti et al., 2000; Head et al., 2002; Pugliese et al., 2005; Vukovich et al., 2009). Disfuncions en el metabolisme, en l'activitat proteosòmica, i en l'oxidació lipídica estan relacionades amb la deposició d'A β . El pèptid A β es pot unir al complex I de la NADH deshidrogenasa (Munguia et al., 2006) augmentant la disfunció mitocondrial, la formació de radicals lliures d'oxigen i conseqüentment la

producció d'espècies reactives d'oxigen (Papaioannou et al., 2001). Aquests productes generen quantitats massives de proteïnes danyades unides a polipèptids, els quals no només resisteixen atacs proteolítics sinó que també inhibeixen l'activitat proteosomal induint un cicle deletori per a la cèl·lula (Hipkiss, 2006). El pèptid A β també es pot unir a la hidroxiaacyl-CoA deshidrogenasa provocant una deficiència en la via de la β oxidació dels àcids grassos (Oppermann et al., 1999) i augmentant la disfunció mitocondrial (Fig.1.4). La glucosa és el substrat energètic principal del SNC i, juntament amb el lactat, assegura el funcionament neuronal (Ramonet et al., 2004)

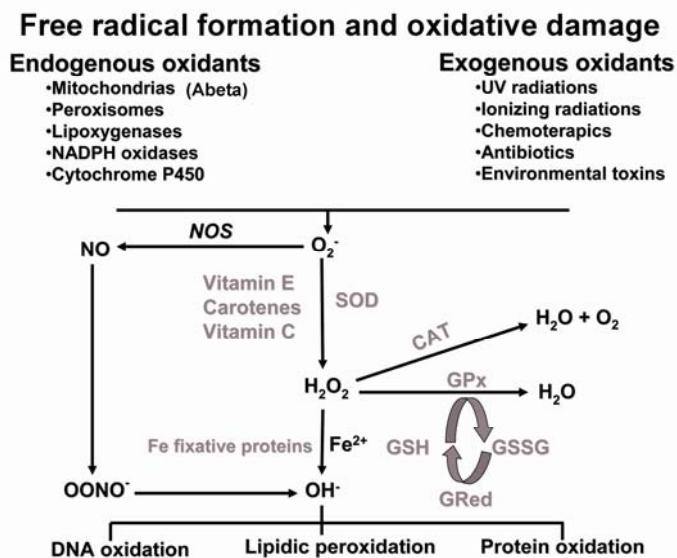


Fig.1.4. Participació del pèptid A β en la formació d'espècies reactives. El pèptid A β participa directament en la disfunció mitocondrial i en la formació d'espècies reactives presents en la neurodegeneració que duen a l'oxidació de DNA, proteïnes i lípids.(Bosch et al, 2012)

En humans es fan valoracions del metabolisme de la glucosa a cervell mitjançant la detecció de ^{18}F -fluoro-2-desoxi-D-glucosa (^{18}F -FDG) per Tomografia d'Emissió de Positrons (TEP). La ^{18}F -FDG, descoberta als anys 70, és una anàleg no metabolitzable de la glucosa que conté un isòtop radioactiu unit al fluor (^{18}F) i que actualment es pot detectar en organismes a través de la TEP. La ^{18}F -FDG no pot ser degradada per la cèl·lula, de manera que entra a la cèl·lula i sense entrar a la ruta glicolítica fins que la radioactivitat davalla. Diversos estudis que relacionen alteracions en el metabolisme cerebral amb els nivells d'A β_{42} a LCR en pacients de MA (Vukovich et al., 2009), però no amb la distribució d'A β a cervell (Rosenbloom et al., 2011).

Altres estudis en gossos estabulats relacionen paràmetres d'estrès oxidatiu a cervell i sèrum amb, l'edat i els nivells d'A β a cervell a gossos estabulats (Head et al., 2002). Els estudis en gossos de companyia amb CDS mostren una gran variabilitat en els nivells d'aquesta glucosa a LCR, però amb nivells més elevats de piruvat, lactat i K⁺ en el grup de gossos amb dèficits cognitius severos (sCD). Aquests increments s'han relacionat amb l'alteració del metabolisme de la glucosa que hi ha en dèficits cognitius avançats (Pugliese et al., 2005). En situacions de patologia, el lactat, format bàsicament als astròcits, constitueix un nou substrat energètic important per a les neurones i amb efectes vasodilatadors positius que faciliten l'aportació de glucosa i oxigen. Aquestes dades han permès l'aparició d'un nou paradigma que considera el lactat com a agent neuroprotector. Valorar les modificacions en les proporcions relatives de lactat i piruvat a LCR pot ser un bon indicador de l'evolució del dèficit cognitiu.

1.4.3 Biomarcadors al Líquid cefaloraquidi

Diversos són els estudis que han correlacionat biomarcadors a LCR amb la MA per a poder fer el diagnòstic de la malaltia en els estadis més inicials i un correcte seguiment d'aquesta (Blennow et al., 2010). En humans es reconeixen dos tipus de biomarcadors; els bàsics i els centrals. 1) Els primers serveixen per identificar condicions o alteracions que coexisteixen amb la malaltia. Dintre dels biomarcadors bàsics hi trobem el n^o de cèl·lules i l'índex d'IgG o d'IgM, indicadors de processos inflamatoris i/o infeccions cerebrals i més característics de malalties autoimmunes com l'esclerosi múltiple. La ràtio d'albumina LCR/albumina sèrum també es considera biomarcador bàsic, i és bon indicador de la integritat de la Barrera-hemato-encefàlica (BHE) (Tibbling et al., 1977), la qual pot estar alterada en processos infecciosos e inflamatoris, així com en tumors i malalties cerebrovasculars. 2) Els biomarcadors centrals són aquells associats directament a la malaltia i en el cas de la MA són els relacionats directament amb la patologia amiloide i cabdells neurofibril·lars. L'A β_{42} a LCR és considerat un dels principals marcadors per a una correcta diagnosi i seguiment de l'evolució de la MA. Estudis previs han demostrat que els nivells d'A β_{42} a LCR correlacionen negativament amb la càrrega total d'A β a plaques d'escorça frontal i hipocamp i amb la quantitat d'A β fibril·lar a cervell (Strozyk

et al., 2003; Fagan et al., 2006). A més a més, nivells baixos d'aquest pèptid a LCR es correlacionen directament amb els estadis més inicials de la MA i amb els casos de DCL que posteriorment evolucionen a la MA (DCLa) (Fjell et al., 2010). L'A β_{40} a LCR no és gaire utilitzat com a biomarcador. Només algun estudi ha relacionat els nivells alts d'oligòmers A β_{40} a LCR amb estadis inicials i avançats de la MA (Gao et al., 2010). Els nivells de Tau total a LCR són uns bons indicadors de dany neuronal i degeneració axonal i la Tau fosforilada sembla reflectir l'estat de fosforilació de la tau i, per tant, de la formació dels cabdells. Nivells elevats de Tau total i Tau fosforilada s'han associat a una ràpida progressió de DCL a la MA i amb una gran davallada cognitiva dels pacients de la MA (Blom et al., 2009; Sämgård et al., 2010).

En gossos s'han fet estudis amb marcadors per mesurar la integritat de la BHE i processos inflamatoris a SNC (Tipold et al., 1994). Altres estudis detecten nivells més baixos d'oligòmers d'A β_{42} en gossos vells establats en comparació als joves, mentre que els oligòmers A β_{40} es mantenen constats amb l'edat (Head et al., 2010).

1.4.4 Biomarcadors plasmàtics

El biomarcadors plasmàtics més estudiats fins ara han sigut l'A β_{42} i A β_{40} . Amb troballes contradictòries, hi ha grups que han detectat nivells més elevats d'A β_{40} a plasma de pacients amb la MA (Mehta et al., 2000). Altres estudis suggereixen com a factor de risc de patir MA el fet de presentar una ratio A β_{42} :A β_{40} elevada a plasma (van Oijen et al., 2006; Graff-Radford et al., 2007).

Estudis en gossos de companyia han trobat nivells elevats d'A β_{42} i de la ratio A β_{42} :A β_{40} en plasma de gossos a dèficit cognitiu lleu (González-Martínez et al., 2011).

1.5 ESTUDIS POST-MORTEM PER A L'AVALUACIÓ LA MA i DÈFICIT COGNITIU CANÍ

1.5.1 Canvis estructurals a cervell

A nivell macroscòpic, en el cervell envellit d'humans s'observa una pèrdua de teixit neuronal, així com una atròfia a hipocamp. Els pacients afectats per la MA, presenten una major pèrdua neuronal que els envellits. (Bobinski et al., 1997), així com una major atròfia a escorça entorrinal i hipocamp i un augment en el volum dels ventricles (Ezekiel et al., 2004; Coupé et al., 2011).

En el cervell dels gossos envellits també s'observa pèrdua neuronal de fins a un 30% a *girus* dentat. A part, també s'observa una disminució del volum de l'escorça prefrontal i (Tapp et al., 2004; Siwak-Tapp et al., 2008) i una gran associació entre l'atròfia cortical, la neurogènesi i la capacitat d'aprenentatge i memòria (Rofina et al., 2006; Siwak-Tapp et al., 2007). D'altra banda, s'han observat diferències estructurals en el SNC entre sexes durant l'envelliment. (Cotman and Head, 2008). Estudis en gossos de companyia també han evidenciat canvis macroscòpics en el SNC. Canvis com l'estretament de *girus*, *sulcus* més amples o dilatació de ventricles s'han associat a l'edat (Borràs et al., 1999) (Fig.1.5).

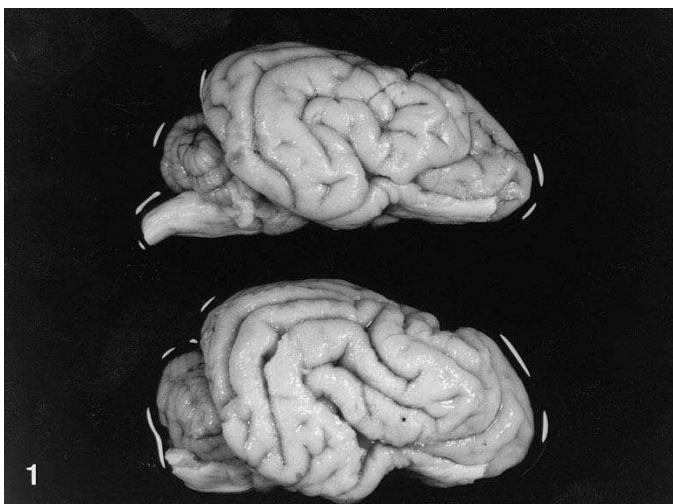


Fig.1.5 Canvis estructurals en el SNC a gossos de companyia. A dalt cervell de gos jove. A baix cervell de gos vell. Observis l'estretament dels girus i els sulcus més amples (Borràs et al, 1999).

1.5.2 Oligòmers A β , maduració de plaques difuses, vulnerabilitat neuronal i reactivitat glial

El primer tret neuropatològic en pacients amb la MA, descrit per E. Kraepelin a principis del segle XX, van ser les plaques senils i estudis posteriors les han relacionat amb el grau de demència (Blessed et al., 1968).

A gos, igual que a humans, les plaques senils i difuses d'A β , són considerades marcadors d'envelliment (Ruehl et al., 1995; Russell et al., 1996) i la seva relació amb el dèficit cognitiu fa que s'hagi considerat com a un dels factors més importants en la neurodegeneració. L'inici del dipòsit de plaques és cap als 8 anys d'edat i va augmentant amb l'edat. La formació i maduració de les plaques difuses en el gos es pot observar per immunohistoquímica, es troben en totes les capes de substància gris, es diferencien en 4 estadis que correlacionen amb la severitat del dèficit cognitiu del gos (Pugliese et al., 2006a).

A mostres cerebrals s'han trobat típics canvis relacionats amb l'edat, com pèrdua de cèl·lules nervioses, cúmul de lipofucsina a neurones i presència de *corpora amylacea* (Rofina et al., 2006; Márquez et al., 2010). Igual que en els malalts d'Alzheimer, els gossos amb CDS presenten dipòsits de calci aïllats i escassos, molts d'ells localitzats al citoplasma dels astròcits (Ramonet et al., 2002, 2006). Com moltes de les lesions cerebrals, els dipòsits deriven de processos excitotòxics i potencien l'activació de la micròglia i astrogliosis, que participen en la mort neuronal.

1.5.3 Distribució de l'A β al cervell

Un dels principals trets neuropatològics de la MA és el dipòsit d'A β al cervell. La quantitat de plaques al cervell no ha estat correlacionada amb l'estat cognitiu ni amb l'evolució de la malaltia en molts estudis. L'agregació i deposició de l'A β pot ser un esdeveniment primerenc que precedeix a la patologia relacionada amb la Tau (Karran et al., 2011). S'observen plaques difuses o dipòsit d'A β focals rodejats o no d'una corona neurítica. Quan el dipòsit focal està rodejat de la corona s'anomena placa neurítica. El principal component de les plaques difuses és l'A β ₄₂, mesuren unes 50 o 100 μ m i no es tenyeixen amb Vermell Congo ni

amb tioflavina. El seu aspecte és no fibril·lar, tot i que estudis immunohistoquímics han marcat oligòmers fibril·lars en plaques difuses (Kayed et al., 2007) tioflavina negatives. Encara resta per demostrar la hipòtesi de que les plaques difuses a cervell són una estadi previ a les plaques neurítiques. Estudis hipotitzen que les plaques difuses trobades a isocòrtex, són prèvies a les neurítiques (Metsaars et al., 2003). D'altres han trobat que sempre que hi ha plaques senils n'hi ha de difuses. El mateix estudi no troba relació entre plaques difuses i dèficit cognitiu, però sí entre neurítiques i dèficit cognitiu.(Delaère et al. 1991).

Immunohistoquímicament, a més a més, es poden diferenciar dipòsits focals caracteritzats per ser agregats d'A β amb una forma esfèrica i densa. Si aquests no es tenyeixen amb Hematoxilina-Eosina, es consideren dipòsits focals no amiloides o compactes i es relacionen amb la deposició d'A β_{40} . Quan són tenyits per Hematoxilina-Eosina es classifiquen com a dipòsits focals amiloides o senils i poden estar associats a corona neurítica (placa neurítica) o no (Duyckaerts et al., 2009) (Fig.1.6). Estudis suggereixen que les plaques difuses podrien precedir a les plaques neurítiques, associades a neurites distròfiques algunes immunoreactives a la Tau i gliosis reactiva, anant cap a plaques compactes amb alt grau de compactació fibril·lar i amb més % d'A β_{40} (Güntert et al., 2006).

La majoria de plaques es troben a substància gris del cervell, localitzant-se les neurítiques majoritàriament a les capes II-III. Aquestes es poden classificar segons la progressió i les regions cerebrals afectades en 3 estadis (A-C) segons Braak (Braak and Braak, 1991, 1997). A l'estadi A, els dipòsits es troben a les porcions basals de l'escorça; en el B es troben a isocòrtex i arribant a afectar l'hipocamp; l'estadi C implica l'afectació de tot l'isocòrtex (Duyckaerts et al., 2009).

Investigacions han confirmat que les plaques d'amiloide a gos estan formades majoritàriament per A β_{42} , com les de tipus difús a humans (Ishihara et al., 1991; Shimada et al., 1991; Nakamura et al., 1997; Miyawaki et al., 2002) i amb estructura de làmina β (negatiu per a tincions amb Congo Red i Tioflavina). Com en humans, la distribució de les plaques a cervell és heterogènia. En tots els casos, l'escorça pre-frontal és el principal lloc de deposició de les plaques difuses, seguit de les escorces parietal, entorrinal i occipital (Hou et al., 1997). En aquestes regions, les plaques apareixen com a conseqüència d'una resposta

neuronal i glial a lesions cerebrals duent a una davallada cognitiva progressiva (Cummings et al., 1996; Pugliese et al., 2007). A l'escorça pre-frontal, els precipitats d'A β s'han classificat en estadis de I al IV segons la distribució en les capes corticals, i les característiques i nombre de plaques. Les plaques estadi I es detecten en les capes corticals més profundes (V, VI), formant plaques disperses i molt poc denses. Quan aquestes plaques poden estendre's per les capes III-IV adoptant una aparença semblant a un núvol correspon a l'estadi II. L'estadi III es caracteritza per presentar plaques més denses localitzades principalment a les capes més superficials (II-III) juntament amb plaques a les capes més profundes. A l'estadi IV les plaques observades a l'estadi III, s'estenen al llarg de totes les capes i són més denses (Fig.1.6).

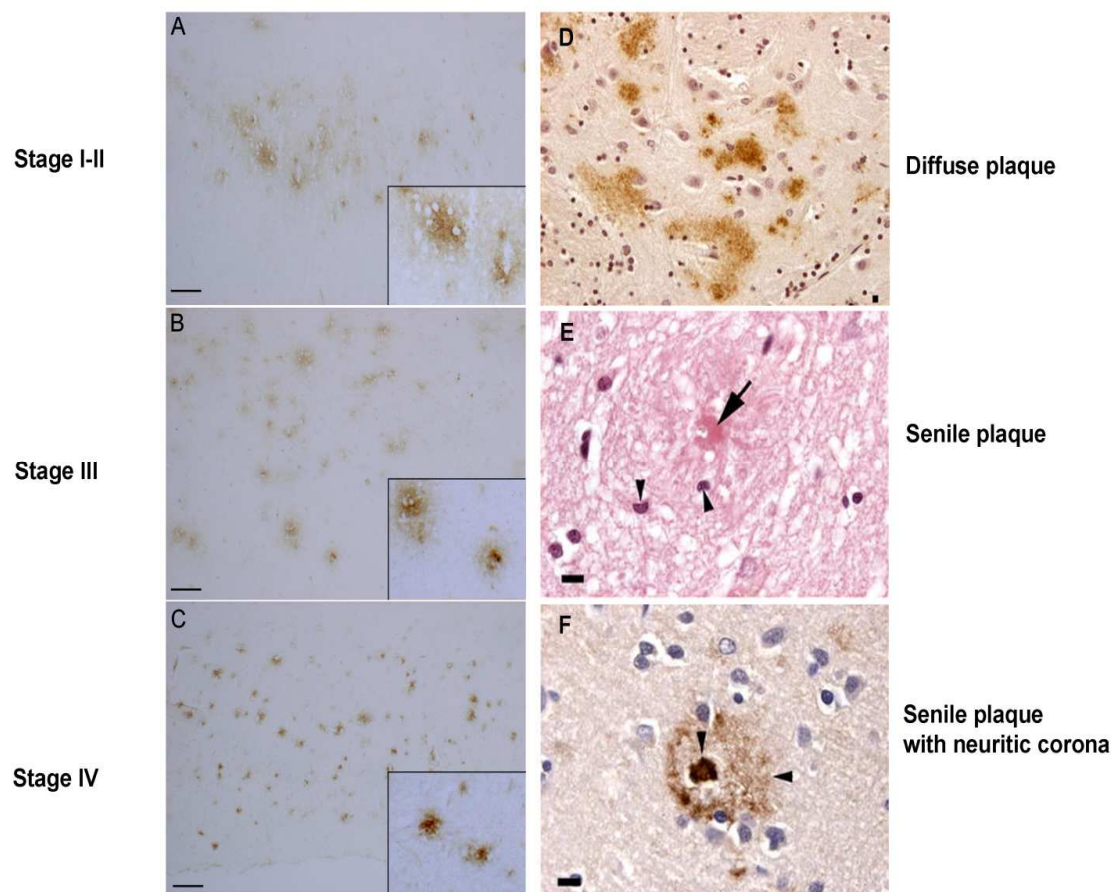


Fig.1.6 Micrografies representatives de plaques difuses d'A β a gossos (A-C) i difuses i senils a humans (D-E). Les plaques difuses a gossos són visualitzades escorça frontal amb l'anticòs -A β_{8-17} . A estadi I-II, les plaques es troben a capes més profundes d'escorça amb aspecte de núvol (A). A estadi III l'A β es deposita a capes més superficials d'escorça i són més denses. (B). A estadi IV són encara més denses i es troben distribuïdes per totes les capes de l'escorça (C). Les plaques difuses a humans es troben a estriat o escorça entorrinal (D). Les plaques senils (E-F), tenyides amb hematoxilina-eosina (E) o immunohistoquímicament (F) poden presentar corona neurítica.(fletxa). Es localitzen a neocòrtex, hipocamp o subiculum. Barres (A-C)=20 μ m, (D-F)=10 μ m. Adaptat de (Bosch et al 2012) i (Duyckaerts et al, 2009).

Tot i les marcades diferències entre estadis, a gossos totes les plaques observades són de tipus difús sense gaires components de tipus neurític. Els estadis II-IV presenten diferències significatives en la densitat i àrea de les plaques d'A β (Pugliese et al., 2006a).

En la MA, les alteracions funcionals i patològiques a diferents àrees cerebrals d'escorça entorrinal i hipocamp són menys greus. Així doncs, a cerebel, l'acetil colinesterasa ha estat associada a la formació del nucli de la placa durant el procés de maduració de plaques degut al seu efecte nucleador heterogeni (Araujo et al., 2011). La relació entre la patologia cerebel·losa, la densitat de l'acetil-colinesterasa i la disfunció cognitiva en gossos de companyia també ha estat estudiada (Pugliese et al., 2007). En aquests animals, els cerebel es caracteritza per no presentar plaques, en canvi els nivells d'acetil-colinesterasa reduïts correlacionen amb l'edat i la pèrdua de cèl·lules granulars, i només les cèl·lules de Purkinge correlacionen amb el dèficit cognitiu. Aquest resultat confirma la no existència d'una relació entre l'activitat acetil-colinesterasa i la deposició d'A β , indicant doncs, que els signes i símptomes de la disfunció cognitiva canina són principalment d'origen no cerebel·lós.

Per últim, en pacients amb la MA, els nivells d'oligòmers fibril·lars d'A β s'han correlacionat amb la puntuació de la Mini Mental State Examination (MMSE) i amb marcadors neuropatològics de la MA (Tomic et al., 2009). S'han trobat nivells elevats a escorça frontal, entorrinal i transentorrinal, a hipocamp i cerebel, totes les regions estan relacionades amb la MA. En gossos envellits, no s'ha trobat cap correlació entre els oligòmers pre-fibril·lars i el dèficit cognitiu, però podria haver-hi un possible correlació encara no estudiada amb els oligòmers fibril·lars (Head et al., 2010).

1.5.4 Reactivitat amiloidea

S'ha trobat abundant glia reactiva associada a plaques neurítiques en la MA i a plaques difuses en gossos (Shimada et al., 1992; Papaioannou et al., 2001). Ambdós processos, juntament amb la sobre-expressió d'astròcits S100B(+) que

embolcallen la placa, s'han relacionat amb els processos de deposició i maduració de la placa.

S100B és una proteïna petita (10Kda. aprox) amb 2 llocs d'unió al Ca^{2+} i que és capaç de regular l'activitat cel·lular a l'interactuar amb proteïnes de creixement, amb el domini regulador de la proteïna quinasa (PKC), amb el factor anti-apoptòtic bcl-2 o amb la proteïna supressora de tumor P53 (Steiner et al., 2011). D'altra banda, està altament implicada en la gènesis i maduració de les plaques difuses, relacionant-se amb estadis primerencs de plaques (Pugliese et al., 2006a). A plaques difuses d'estadis més avançats la correlació amb l'astroglíosis deixa d'estar relacionada amb la sobre-expressió de S100B (Fig.1.7).

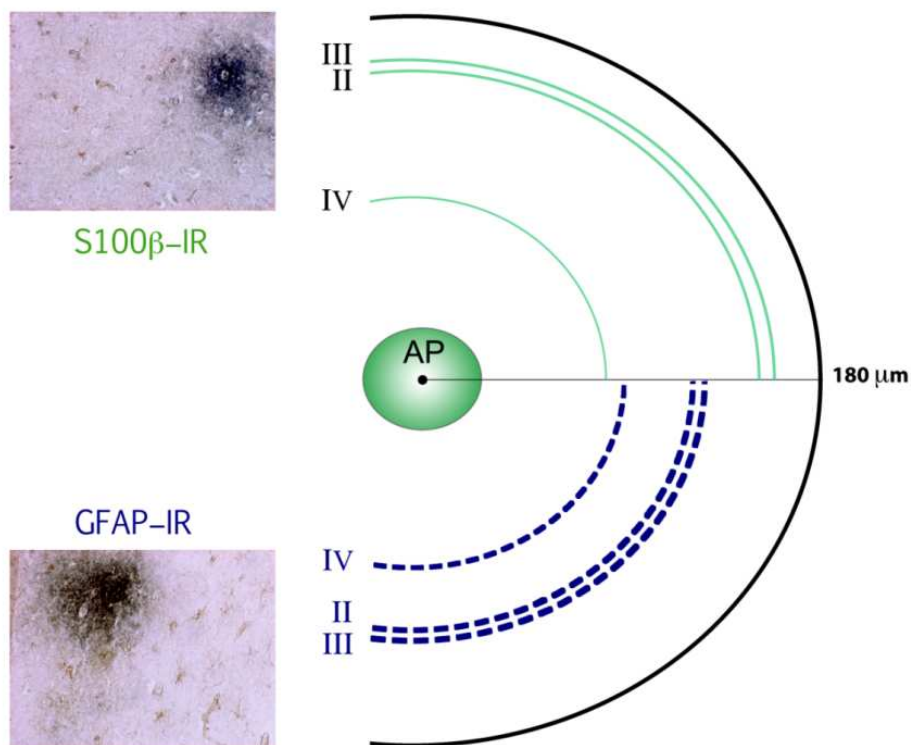


Fig.1.7 Astròcits immunoreactius per S100B i per GFAP. Els astròcits que expressen S100B o que són immunoreactius per GFAP són més propers (µm) a la placa amiloide (AP) en plaques d'estadi IV que en plaques d'estadi II-III. (Bosch et al, 2012).

Igual que l'astròglia, l'activació microglial a la MA està relacionada amb processos tòxics derivats del cúmul d'A β . La sobre-regulació de la microglia deguda a l'activació de receptors, com el complex d'immunohistocompatibilitat, pot activar-la passant d'un fenotip més ramificat a una altre més ameboida (Heneka et al., 2010). A estadis molt primerencs de la MA, la sobre-regulació és beneficiosa gràcies a la degradació de l'A β i fagocitosis que permet eliminar els debris de cèl·lules mortes, protegint el cervell dels seus efectes tòxics. Mes enllà, els astròcits reactius embolcallen les plaques i secreten factors de creixement i citoquines per a protegir les neurones danyades. No obstant, quan la malaltia progressa i el perfil inflamatori evoluciona cap a la secreció de citoquines pro-inflamatòries, la microglia perd el seu efecte neuroprotector part de la seva habilitat per fagocitar i eliminar l'A β . Així doncs, la microglia activada pot estar relacionada no només amb la el procés de formació de plaques, sinó que també d'A β fibril·lar i soluble i amb els metalls que ajuden a l'agregació de l'A β (Ortega Francisco J et al., 2012)

En quan a la reacció microglial en el gos, s'ha pogut detectar només microglia ramificada associada a capil·lars, que incrementa amb l'edat i amb els estadis de deposició. S'han trobat molt poques cèl·lules microgials associades a les plaques, sense cap correlació amb les plaques d'A β . A part de la dificultat tècnica per a poder observar reactivitat microglial per immunohistoquímica, la relació que alguns laboratoris han establert entre la maduració de les plaques difuses i la microglia reactiva, és controvertit per la manca d'especificitat dels anticossos utilitzats en aquests estudis no eren específics per marcadors de superfície microglial (Rofina et al., 2003). L'ús de marcadors específics de microglia mitjançant altres tècniques, com per exemple l'autoradiografia "*in vitro*", permetria resoldre aquests problemes.

A nivell neuronal, s'ha descrit que amb l'edat i la MA, la integritat neuronal i sinapsis es veuen alterades. El mecanismes pels quals està alterada no són clars, tot i molts autors la relacionen amb el cúmul d'A β i amb l'alteració en els processos de degradació de l'APP (Crews and Masliah, 2010). Estudis actuals relacionen la pèrdua de sinapsis neuronals amb la conversió de monòmers d'A β no tòxics a oligòmers tòxics, mentre que les fibril·les i plaques d'amiloide deixarien de ser considerades tòxiques (Haass and Selkoe, 2007).

En gossos de companyia s'ha comparat la vulnerabilitat a la mort de les interneurons GABAèrgiques corticals, amb la dels humans i de gossos beagle establats (Pugliese et al., 2004). En gossos de companyia majors de 8 anys, la distribució general i tipologia de les interneurons Parvabulina (PV), Calretinina (CR) i Calbindina (CB) positives és similar a la descrita anteriorment en beagles (Hof et al., 1996), suggerint una causa comuna independent a la raça i sexe. La vulnerabilitat en les interneurons GABAèrgiques CB-immunopositives i resistència de les GABAèrgiques PV i CR positives és similar en gossos i en humans. Altres estudis en pacients afectats de MA, han trobat una major capacitat de protecció neuronal segons la capacitat de conservació de les proteïnes que s'uneixen a Ca^{2+} (Fonseca and Soriano, 1995; Sampson et al., 1997). La vulnerabilitat a la mort de les neurones corticals GABAèrgiques CB immunopositives en gossos amb estadi II de deposició de plaques, és superior a l'observada en els estadis III i IV. Així doncs, la neurodegeneració s'associa a una desregulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} intraneuronal, la qual està relacionada amb l'activació de receptors glutamatèrgics per part de diferents factors excitotòxics o amb l'activació de proteïna priònica (PrP^c) per part d'oligòmers d'A β extracel·lulars, (Alberdi et al., 2010; Head et al., 2010; Struble et al., 2010; Fedrizzi and Carafoli, 2011) en gossos i en humans. Aquest efecte deleteri, absent en plaques d'estadi III i IV tindria lloc en estadis primerencs de deposició provocant una cascada d'esdeveniments patològics que durien a una mort neuronal i reacció glial. Aquesta toxicitat en els estadis primerencs deposició de plaques, a part comportaria generació de radicals lliures accelerant la disfunció neuronal (Skoumalova et al., 2003) i per tant el procés d'envelliment.

Tal i com s'ha trobat a la MA l'estrès oxidatiu pot relacionar-se amb els nivells de Zn^{2+} relacionat amb la inhibició de l'activitat APP ferroxidasa (Duce et al.). En qualsevol cas, aquests resultats confirmen que el procés d'envelliment en determinades àrees del cervell s'inicia a etapes de la vida adulta en gos establats i humà, associat a un pic d'estrès oxidatiu i una conseqüent alteració en les proteïnes reguladores de la supervivència cel·lular. En els estadis inicials de deposició de plaques es detecta, en gossos, una davallada important de bcl2 i un

augment de l'expressió Bax relacionats amb els processos neurodegeneratius (Dimakopoulos and Mayer, 2002).

Contràriament als resultats trobats en humans (Keeney et al., 2011), en gossos de companyia no s'ha demostrat una associació entre l'alteració proteïnes reguladores de cicle cel·lular i la localització, distribució i relació de la deposició d'A β i de tau hiperfosforilada (Pugliese et al., 2006b) Fig. 1.8. Tot i la presència a neurones de cossos fosfo-específics que incrementen amb l'edat, aquests no correlacionen amb el dèficit cognitiu (Papaioannou et al., 2001). Tampoc s'han observat cabdells neurofibril·lars de tau fosforilada a cervell de gossos vells. Això suggereix que la hiperfosforilació de la tau no està directament relacionada amb el dèficit cognitiu en gossos. El perquè no trobem patologia neurofibril·lar a cervell de gos envellit és una qüestió a resoldre: mentre que una explicació podria ser que la curta vida dels gossos no permetria la formació dels cabdells, altra explicació podria ser que les diferències en la seqüència del pèptid entre humà i gos, no permetria la formació dels filaments helicoidals (Wegiel et al., 1998). Altra hipòtesi és que la formació d'agregats de catepsina D i de productes finals de glicosilació a gossos, escassos en humans, farien que el procés d'envelliment estigués alentit en gossos (Bi et al., 2003). En aquestes situacions, el gos no desenvoluparia cabdells, així que la pèrdua de neurones CB-immunopositives, juntament amb la deposició d'A β produirien estructures anòmales que durien a un dèficit cognitiu.

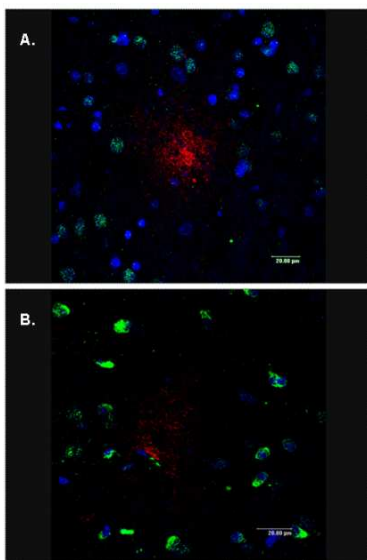


Fig.1.8 Representació de neurites immunopositives per fosfo-tau. **(A)** Representació de la fosfo-tau Thr181 immunofluorescent (verd) i de les plaques d'A β (vermell) en un gos amb CDS (20 anys). **(B)** Representa la fosfo-tau ser396 (verd) i les plaques d'amiloides (vermell) a una altre gos amb CDS (16 anys). A un d'ells s'observen neurites immunopositives per fosfo-tau que estan rodejant les plaques. Barra=20 μ . Adaptat de Pugliese et al, 2006.

1.6 ESTUDIS COGNITIUS I DE COMPORTAMENT EN LA MA I EN EL GOS ENVELLIT

Per a poder fer un bon estudi cognitiu, és necessària una bona classificació i un bon seguiment de l'evolució dels animals. Diversos estudis avaluen els dèficits de memòria en els gossos d'edat avançada. Tots els procediments es basen en dos tipus d'avaluació; Una avalua la capacitat d'aprenentatge i de memoritzar determinades tasques de gossos estabulats o no. L'altra, dirigida específicament a gossos de companyia, valora una escala amb diferents punts que inclouen exploracions clíniques i entrevistes als amos dels gossos. Degut a aquestes diferències alhora de mesurar cognitivament els gossos es tracten per separat els dos models d'avaluació.

1.6.1 Avaluació cognitiva a gossos estabulats

Es basa en diverses tasques que reflecteixen l'especificitat en determinats circuits neuronals i/o funcions a determinades àrees del cervell. Tots els laboratoris amb gossos estabulats tenen aparells adaptats del Test General de Wisconsin. L'avaluació es realitza mitjançant el test de reconeixement d'un objecte o tests per a observar l'estona que triga a reconèixer una posició o una mostra, a on s'usa com a recompensa el menjar per motivar l'aprenentatge de l'animal (Milgram et al., 1994, 2002; Head et al., 1995; Callahan et al., 2000). Els gossos envellits estabulats (molts d'ells beagle), són diagnosticats de dèficit cognitiu quan presenten una capacitat disminuïda en l'aprenentatge de tasques com: memòria de reconeixement d'un objecte (Milgram et al., 1994), memòria i aprenentatge visual-espacial (Adams et al., 2000b; Chan et al., 2002), funció espacial al·locèntrica (Milgram et al., 1999), aprenentatge discriminatori i reversible (Head et al., 1998). De tots aquests estudis s'ha pogut concloure:

1. La detecció de la disfunció cognitiva canina depèn dels processos cognitius involucrats en la tasca que s'està utilitzant i del seu nivell de dificultat
2. La variabilitat en les capacitats cognitives augmenta amb l'edat

Una important limitació en l'ús d'aquest model caní és el temps que es necessita per dissenyar cada test i els cost elevat que suposa l'estabulació i cura les animals. Per exemple, es necessiten dues setmanes per a completar l'aprenentatge d'una tasca d'associació i 4 mesos per l'aprenentatge de tasques més complexes.

1.6.2 Avaluació cognitiva a gossos de companyia

En els gossos de companyia mitjançant les proves clíniques i les entrevistes amb els amos dels gossos es pot determinar la presència de signes de CDS. La interpretació cognitiva dura uns 15-20 minuts. La facilitat i la certesa de que el test ha estat completat correctament, dependran de l'habilitat i la pràctica que tingui el veterinari neuròleg per explicar les preguntes als amos. Les desavantatges d'aquest tests s'han de tenir en compte alhora de fer el diagnòstic final, sobretot en respostes a preguntes relacionades amb l'agressivitat del gos o altre difícils d'interpretar pel propietari.

Els últims anys diversos tests cognitius s'han desenvolupat per a poder classificar els gossos i així investigar correlacions entre diversos marcadors neuropatològics o de disfunció cognitiva (*Kiatipattanasakul et al., 1996; Pugliese et al., 2005; Rofina et al., 2006; Salvin et al., 2010*). Per exemple, *Colle et al* (*Colle M-A et al., 2000*), van dissenyar una escala clínica de fàcil valoració (Aged Related Cognitive and Affective Disorders-ARCAD) basada en entrevistes a amos de gossos i que proveeix d'una avaluació global comparable a les escales clíniques usades en la pràctica a humans com el MMSE o les Activitats de la Vida Diària. L'avaluació cognitiva del gos mitjançant l'escala ARCAD presenta una bona correlació entre els dèficits cognitius i el manteniment de comportaments com el menjar, beure o eliminació, dormir amb la deposició d'A β . En canvi, no correlaciona amb símptomes ambiental-dependents com el comportament d'aprenentatge específic, autocontrol, capacitats d'aprenentatge socials i adaptatiu, segurament degut a la dificultat d'avaluar aquests punts a través d'entrevistes amb els propietaris dels animals. El criteri d'avaluació de la demència proposat per *Kiatipattanasakul et al* (*Kiatipattanasakul et al., 1996*) inclou diversos punts per a un anàlisi dels

canvis cognitius i la seva correlació amb l'apoptosi de cèl·lules neuronals i glijals. Aquests no inclouen aspectes cognitius i ambientals com el caminar, la postura o símptomes sensorials com la pèrdua auditiva o la hipersensibilitat a l'olor. Per tal d'investigar la relació entre l'assaig cognitiu i els marcadors de patologia cerebral (atròfia cortical, A β , dany oxidatiu, desmielinització, i cúmul de macròfags), *Rofina et al* (Rofina et al., 2003) van elaborar un qüestionari per avaluar els canvis ambientals dels gossos relacionats amb l'edat, establint correlacions amb moltes de les característiques patològiques. El seu anàlisi suggereix una relació clau entre el dany oxidatiu molecular i cel·lular i els canvis de comportament de l'animal.

L'any 2005, el nostre Grup va desenvolupar i validar un nou test basat en un qüestionari de 16 ítems per identificar i discriminar estadis inicials i tardans de disfunció cognitiva a partir d'una translació l'experiència dels manuals MMSE i DSM IV que s'apliquen a humans (Pugliese et al., 2005).

Aquesta escala permet diferenciar gossos amb demència lleu (ICD) i severa (sCD), i és important per a la identificació d'esdeveniments cel·lulars i moleculars característics d'estadis inicials de la MA o del DCL. A més, permet valorar de forma global i progressiva la davallada de memòria, de cognició i alteracions en la personalitat de gossos de diverses edats, sexe i raça.

El qüestionari és omplert durant l'entrevista del veterinari neuròleg amb l'amo del gos i els resultats són analitzats i completats directament amb l'exploració clínica. Dels 16 punts avaluats n'hi ha 7 a on les puntuacions entre gossos no són sempre fiable. Per exemple, els ítems que valoren el menjar, bordar, beure o auto-control són fàcils d'entendre per als amos, però difícil d'avaluar a la consulta. El punt d'agressivitat és difícil de qualificar perquè l'amo té tendència a ser reticent a l'hora de mesurar aquest punt. La valoració de l'auto-estimulació i del comportament social après són difícils de poder ser entesos pels amos. Per la dificultat de definir i avaluar-los aquests 7 punts s'han eliminat de l'escala

Els 9 punts restants, s'han considerat suficients per a l'avaluació de l'estat cognitiu dels gossos, permetent una bona discriminació entre animals (Taula 1.2). Aquesta avaluació incorpora punts que avaluen el comportament

mantingut (com el comportament en l'eliminació o ritme de vida) i d'altres com la marxa, la posició, les ganes de jugar o els comportaments exploratoris són fàcils d'entendre i d'avaluar. El nou qüestionari validat de 9 ítems dona una classificació similar a l'anterior, consumeix menys temps i és més selectiu i acurat a l'hora de classificar els gossos en IDC i/o sDC. La puntuació total, per tant, suggereix la classificació dels gossos en 4 grups diferenciats segons edat i estat cognitiu: Adults Control (AC), Vells Control (OC), IDC i sDC que correlacionen amb estadi de plaques d'A β a escorça, també quan s'ajusta per edat.

Taula 2. Test Cognitiu

Cognitive test					
Items	Score	Items	Score	Items	Score
(1) Walking Normal Trudging Abnormal, one direction, circling	1 3 5	(7) Life rhythm Normal Rest and sleep over during the day Switches between insomnia & hypersomnia Restless at bedtime	1 2 3 5	(13) Auto-stimulatory behavior Normal Alteration seeking licking and nibbling Stereotyped nibbling, tail chasing Repeated movements of licking, scratching and nibbling	1 2 3 5
(2) Eating Normal Regurgitation and re-ingestion Anorexia Hyperphagia/tachyphagia	1 2 3 5	(8) Play behavior Normal Increase Decrease	1 3 5	(14) Learned social behavior Normal (unchanged) Bites without warning Does not submit itself when rebuked Steal and retains the stolen objects	1 2 3 5
(3) Posture/ emotional of expression Normal Decrease of body language Abnormal, loss of body language	1 3 5	(9) Exploratory behavior Normal Decrease (disorientation expectance posture, etc) Increase (obsessive exploration of the same place, including oral exploration)	1 3 5	(15) Adaptive capabilities Normal Retreats from novel situation Unable to accept changes in routine Looks indifferent to changes	1 2 3 5
(4) Barking Normal Monotonous and loud Barking throughout night or at unusual object	1 3 5	(10) Self-control Normal Difficulties to calm down after a stressful event Alternate periods of hyperactivity and indifference Tend to generalize aversive experience	1 2 3 5	(16) Interaction with other animals or with owners Normal Decreased (loss of relationship with humans or other animals) Complete loss relationship with owners	1 3 5
(5) Drinking Normal Champing at water without swallowing Polydipsia	1 3 4	(11) Aggressive behavior Absence (never showed) Aggressiveness for fear Aggressiveness for irritability	1 3 5		
(6) Elimination behavior Normal Defecate and urinate at home: occasionally in a small scattered amount Loss control of sphincters: defecate and urinate outside of sleeping area Loss control of sphincters: defecate and urinate inside of sleeping area	1 3 4 5	(13) Learned specific behavior Normal (unchanged) Random responses Decreased response	1 3 5		

Valors totals del test de 16 ítems; <23=normal; 23-33=Dèficit cognitiu lleu(IDC); >33=Dèficit cognitiu greu (sDC). Valors totals del test de 9 ítems; <12=normal; 12-26=Dèficit cognitiu lleu(LCD); >26=Dèficit cognitiu greu (sDC). (Bosch et al, 2012)

En gossos estabulats la puntuació de tests i la deposició de plaques també correlacionen quan s'observen el nombre d'errors a la memòria discriminatòria, memòria reversible i aprenentatge espacial amb el total d'A β a escorça frontal i entorrinal (Satou et al., 1997). La Taula1.3 mostra les correlacions obtingudes a ambdós models.

Taula1.3 Relació entre les plaques d'amiloide i els test de comportament en gossos de companyia i estabulats

Relation between Aβ plaques in prefrontal cortex and behavioral tests			
Companion dogs (Different breeds and sex)			
<i>Age (years)</i>	<i>Plaque density (Plaques/mm²)</i>	<i>Plaque stage maturation</i>	<i>Cognitive score test (using 9 item test)</i>
1-6(n=4)	0		9-11(YC)
8-15 (n=5)	12.8 \pm 7.75	I-II	13-21(LCD)
14-20 (n=7)	26.85 \pm 12.10	II-IV	27-40(SCD)
Housed dogs (Beagle breed and different sex)			
<i>Age (years)</i>	<i>Plaque occupancy (% area occupied by Aβ immunostaining)</i>	<i>Cognitive tasks</i>	
4.3-15.3 (n=7)	0-0.9	- Object discrimination learning - Reversal learning	
8.4-15.3 (n=13)	0-21.3		

Els gossos de companyia es classifiquen en 3 grups segons l'edat i l'abundància de plaques, l'estadi de maduració i el test cognitiu, joves (YC), dèficits cognitius lleus (LCD) i dèficits cognitius greus (sCD). Els gossos beagle estabulats van ser classificats en 2 grups (joves i vells) depenent de l'edat i la seva correlació amb el nombre de plaques i el nombre d'errors en 2 tasques. (Bosch et al, 2012)

Com a aspecte important, i per a aconseguir una valoració ben graduada del dèficit cognitiu, és necessari establir una correlació acurada entre els esdeveniments progressius a nivell cognitiu i la cascada d'esdeveniments moleculars i cel·lulars. Des del nostre punt de vista, els gossos de companyia són un bon model de la deposició d'A β , els oligòmers, activitat i pèrdua neuronal amb participació de la glia relacionats amb el dèficit cognitiu.

1.7 ESTUDIS DIRIGITS AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER I DEL DÈFICIT COGNITIU CANÍ

Fins ara, els estudis farmacològics amb una varietat de dianes per al dèficit cognitiu caní han tingut un efecte molt limitat alhora de millorar els símptomes. Molts d'aquests tractaments deriven directament de fàrmacs utilitzats en la MA, com la immunoteràpia anti-A β . La influència de la dieta i la qualitat ambiental s'han considerat importants alhora d'interferir en la davallada cognitiva, com l'eficàcia de la vitamina B en pacients amb MA (Smith et al., 2010).

1.7.1 Tractament farmacològic

1.7.1.1 L Deprenil

L Deprenil actualment és usat per al tractament de la malaltia de Parkinson i és considerat com a un possible fàrmac per al tractament de la MA (Alafuzoff et al., 2000; Wilcock et al., 2002). L Deprenil és un inhibidor selectiu de la monoamino oxidasa B, i conseqüentment, augmenta l'activitat neuronal i indueix selectivament la catalasa i la superòxid dismutasa a cervell conferint neuroprotecció i supervivència cel·lular. Aquest (Anapranil®) va ser el primer fàrmac usat per al tractament de la CDS (Milgram et al., 1993; Ruehl et al., 1995; Siwak et al., 2000; Campbell et al., 2001), tot i que els mecanismes que produeixen la millora cognitiva encara no estan clars, es pensa que gran part prové de l'augment de la dopamina i d'altres neurotransmissors a escorça e hipocamp (Knoll, 1998).

1.7.1.2 Nicergolina

La Nicergolina és un derivat de l'ergolina amb una ampli espectre d'acció en moltes espècies com rosegadors, gossos i humans. Algunes de les accions són: 1) indueix vasodilatació i augmenta la pressió arterial, 2) millora l'activitat colinèrgica i la funció dels neurotransmissors catecolaminèrgics, 3) inhibeix l'agregació plaquetària, 4) presenta propietats neurotròfiques i antioxidants (Peremans et al., 2002; Winblad et al., 2008). El tractament amb nicergolina augmenta l'expressió de l'òxid nítric sintetasa neuronal a escorça cerebral i ganglis basals produint un augment de la pressió sanguínia (Giardino et al., 2002). La Nicergolina està a l'abast per al tractament del dèficit cognitiu en gossos vells.

1.7.1.3 Propentofilina

La propentofilina és un modulator de cèl·lules gials. S'han fet estudis pre-clínic adreçats a processos de la MA i de demència vascular a on hi ha activació de cèl·lules gials i augment de producció de citoquines, radicals lliures i glutamat (Ringheim, 2000). En canvi, l'evidència de que sigui beneficiosa per a la millora de la funció global i de les activitats de la vida diària és dubtosa (Frampton et al., 2003). La propentofilina està acceptada per al tractament de la letargia en gossos vells, incrementant l'aportació d'oxigen a SNC sense augmentar la necessitat d'aportar la de glucosa.

1.7.1.4 Adrafanil

L'Adrafanil augmenta l'activitat noradrenèrgica i ajuda al manteniment de l'alerta, l'atenció, el cicle de la son, i augmentant el temps d'exploració i activitat. En humans és usat per a augmentar l'estat d'alerta i per superar estats de fatiga. En gossos establats l'adrafanil millora l'aprenentatge discriminatori, l'activitat locomotora i causa una augment transitori de l'ensum.

1.7.2 Teràpia basada en suplementes dietètics i teràpies complementàries

Diversos estudis fets a gossos vells estabulats i no estabulats han valorat l'interès de suplementes dietètics amb una ampli espectre d'antioxidants (Milgram, 2003; Milgram et al., 2005), mostrant resultats positius per a la memòria, capacitat d'aprenentatge i estat immune (Cotman et al., 2002; Milgram et al., 2002, 2004; Head and Zicker, 2004; Ikeda-Douglas et al., 2004; Head et al., 2009; Fahnestock et al., 2010). Per això, una gran varietat de teràpies complementàries amb nutrients, extractes d'herba i vitamines Per exemple Ginkgo biloba, pyridoxine, vitamina E, etc estan administrant-se actualment per a millorar el dèficit cognitiu en gossos.

1.7.3 Teràpia basada en l'enriquiment ambiental

Ambients estimulants poden facilitar el tractament i millora de gran diversitat de malalties a cervell com la MA. Una estimulació pobre durant el desenvolupament pot induir una disminució cognitiva (Herring et al., 2009; Cotel et al., 2010). En els gossos, la davallada relacionada amb l'edat pot ser atenuada amb l'exercici físic o l'entrenament cognitiu, especialment quan es combinen amb dietes complementàries (Milgram et al., 2002, 2004; Nippak et al., 2007; Pop et al., 2010). El resultat de l'enriquiment ambiental presenta efectes múltiples i millora funcions no només relacionades amb la pèrdua neuronal o paràmetres cel·lulars (Siwak et al., 2005; Head et al., 2009).

1.7.4 Immunoteràpia d'A β

El 1965 l'investigador, *Baruch Blumberg*, utilitzant una tècnica d'aïllament de proteïnes va detectar un antigen a la sang d'un aborigen australià que s'unia a anticossos derivats de la sang d'una persona hemofílica d'USA. Blumberg el va anomenar "antigen Australià" i el van relacionar amb la infecció per hepatitis B de l'aborigen. A partir d'aquest moment es va veure que es podien sintetitzar vacunes derivades de partícules de virus o bacteris. Els antigens poden

sintetitzar-se directament o bé obtenir-los per enginyeria genètica. Els tractaments contra el *papillomavirus* humà i contra la hepatitis B són 2 exemples de vacunes sintetitzades a partir d'antígens purificats que actualment estan en ús. Més endavant van sorgir les vacunes conjugades, en les que l'antigen es combina amb una proteïna *carrier* per augmentar la seva immunogenicitat.

Les vacunes actives desenvolupades com a immunoteràpia contra la MA, es basen en el concepte anterior de sintetitzar una vacuna a partir d'un pèptid immunogen. Gran part de les vacunes dissenyades per a combatre la MA utilitzen l'A β agregat com a antigen. Administracions repetides d'aquest antigen provoca una resposta immunògena contra els agregats d'A β , evitant-ne la formació i/o eliminant-los.

Des de meitat dels anys 90 en que *Solomon et al* (Solomon et al., 1996, 1997) van demostrar que anticossos monoclonals anti-A β prevenien i dissolien agregats d'amiloide, van començar a emergir les primeres immunoteràpies. La primera immunoteràpia activa va ser dissenyada el 1999 per *Shenk et al* (Schenk et al., 1999), amb una reducció important de la patologia A β en ratolins tg-PDAPP. Fins ara s'han desenvolupant diverses immunoteràpies, moltes de les quals han arribat a Fase clínica d'experimentació en humans ([taula1.4](#)). Algunes d'aquestes vacunes testades han tingut efectes nocius, abandonant-se el seu desenvolupament. Per exemple, un 6% dels pacients que havien entrat a l'estudi de l'AN 1792 de la farmacèutica Elan and Wyeth, van presentar meningoencefalitis, causada, en gran part, pel tipus de resposta inflamatòria de l'adjuvant (QS21) utilitzat. Posteriorment, les vacunes testades s'han basat en la combinació de diversos pèptids i adjuvants per augmentar la seva eficàcia i seguretat.

Taula 1.4 Assajos clínics d'immunoteràpies actives d'Aβ

Therapy	Sponsors	Vaccine	Phase and number of trials	Estimated patient enrollment	Treatment duration	Primary outcome measures	Estimated completion date of final trial
ACC-001	Elan; Wyeth	Aβ amino-terminal conjugate	II; three trials	360	24 months	Safety, tolerability and treatment-related adverse effects	May 2012
CAD-105	Novartis	Aβ ₁₋₅ coupled to Qb virus-like particles	II; three trials	84	12-24 months	Safety and tolerability	June 2011
Affitope AD01; Affitope AD02	Affiris AG; GlaxoSmithKline	Aβ amino-terminal mimotope ± adjuvant	IIb; two trials	48	12 months	Safety and tolerability*	December 2009
V950	Merck	Aβ amino-terminal peptides conjugated to ISCO-MATRIX®†	I; one trial	124	48 months	Safety and tolerability	April 2014
UB311	United Biochemical	Aβ ₁₋₁₄ using UBITH®‡	I; one trial	18	7 months	Safety and tolerability	December 2010

*Long-term extension of previous phase I trial. †ISCO-MATRIX® produced by CSL Behring, King of Prussia, PA, USA. ‡UBITH® produced by United Biomedical, Hauppauge, NY, USA. Abbreviation: Aβ, amyloid-β.

(Lemere and Masliah, 2010)

Per a que el desenvolupament d'una vacuna per al tractament de la MA sigui segur i eficaç, ha de complir les següents característiques;

- 1) Desenvolupament en un model animal apropiat i de translació fàcil i fiable a humans
- 2) Estimulació de resposta immunitària antiinflamatòria o Th2, evitant l'activitat citotòxica de la micròglia
- 3) Eliminació de les plaques i de l'Aβ soluble (monòmers i oligòmers) del SNC a perifèria
- 4) Evidències de millora cognitiva
- 5) Prova que pot ser utilitzada en pacients envellits

Tenint en compte els 5 punts anteriors, els desenvolupaments de vacunes fets en models transgènics de ratolins presenten limitacions degut a la dificultat per poder reproduir en aquests animals la resposta immune humana. Poder estudiar immunoteràpies dirigides a la MA en gossos presenta moltes

avantatges. El genoma complet dels gossos es molt més homòleg als dels humans que el d'altres models de MA. Exceptuant els primats no humans, el genoma complet del gos és molt més homòleg al de l'humà que el d'altres models animals de MA (Kirkness et al., 2003; Cannarozzi et al., 2007). Tal i com s'ha comentat abans, la seqüència d'A β de 40 i 42 aminoàcids a gos és la mateixa que la humana, desenvolupant espontàniament monòmers, oligòmers i plaques. En quan als canvis associats a l'envelliment, humans i gossos presenten també moltes similituds: ambdós presenten reducció de limfòcits, monòcits, granulòcits, cèl·lules T, cèl·lules CD4 i CD8 (Greeley et al., 2001; Blount et al., 2005) i el percentatge total de cèl·lules B disminueix amb l'edat. Canins i humans presenten un canvi important de predomini de fenotips CD45RA⁺ a CD45RO⁺ en les poblacions limfocitàries CD4 i CD8 (Greeley et al., 2006), amb una disminució conseqüent de la capacitat de resposta de les cèl·lules T cap a nous antígens. No obstant la capacitat de respondre a antígens ja reconeguts es manté. En gossos vells, igual que en humans, la capacitat funcional de cèl·lules B i T estan alterades, amb una reducció total d'interlukina-2 (IL-2) i de l'expressió dels seu receptor, i afavorint l'augment de la ratio Th1 (pro-inflamatòria):Th2 (anti-inflamatòria) a subpoblacions de cèl·lules sanguínies i induint respostes pro-inflamatòries (Sakata-Kaneko et al., 2000; Horiuchi et al., 2007). Les citoquines derivades d'aquestes subpoblacions regulen la resposta immune: mentre que les Th1 reforcen respostes cel·lulars secretant citoquines com l'interferó γ (IFN γ), IL-12 i IL-15, les Th2 reforcen respostes humorals secretant citoquines com IL-4, IL-5. Tot i que la subpoblació Th1 sigui més abundant, la Th2 produeix més citoquines. Recentment, s'està investigant la resposta de tipus Th17 després de immunització (Lin et al., 2010), que ha estat associada a encefalitis autoimmune a ratolí (Veldhoen et al., 2006) i a malalties inflamatòries com l'esclerosi múltiple en humans (Matusevicius et al., 1999). Com els humans, els gossos poden presentar respostes de tipus Th17 associades a la immunoteràpia (Day, 2009). Totes aquestes similituds entre humans i gossos fan que aquest sigui considerat un bon model per fer estudis de seguretat i eficàcia d'immunoteràpia anti-A β , evitant així l'ús de primats no-humans.

En gossos, els pocs estudis de vacunes anti-A β s'han fet en animals estabulats, a on s'ha estudiat els efectes a nivell cognitiu, i a nivell neuropatològic, sense aportar resultats prometedors (Head et al., 2008). A part també s'ha caracteritzat la resposta immune derivada del tractament (Vasilevko et al., 2010).

Desenvolupar la teràpia anti-A β en gossos estabulats i de companyia, permet investigar els complexos mecanismes cel·lulars i moleculars implicats a nivell central i perifèric, així com els seus efectes a nivell cognitiu. En pacients d'Alzheimer i en ratolins tg, la micròglia juga un paper molt important en l'eliminació de l'A β dipositada (Streit et al.; El Khoury et al., 1996, 2007; DeWitt et al., 1998; Alarcón et al., 2005; Fiala et al., 2007). Les vacunes d'A β activen inicialment les cèl·lules presentadores d'antigen, les quals mitjançant citoquines i la presentació del pèptid activen les cèl·lules T. Després d'una segona senyal, l'antigen soluble presentat per les cèl·lules T activen les cèl·lules B de memòria amb una conseqüent producció d'anticossos. Aquesta immunització decantarà cap a una resposta perifèrica de tipus Th1 o Th2 i que mitjançant diverses senyals, com per exemple citoquines, activarà l'eliminació de l'A β . Tal i com mostra la [Fig.1.9](#), l'eliminació de l'A β soluble e insoluble s'explica actualment amb 5 possibles mecanismes d'acció (von Bernhardi, 2010) a on hi estan involucrats principalment la micròglia/macròfags i els anticossos anti-A β i que poden actuar per separat o combinats. Els mecanismes il·lustrats són els següents:

- A) Eliminació mitjançant fagocitosis de la placa d'A β per activació de la micròglia i/o per invasió al SNC de macròfags-monòcits circulants a través de receptors *scavenger*
- B) Eliminació de la placa d'A β mitjançant unió específica de la micròglia a la placa
- C) Interacció directa al SNC i unió dels anticossos a la placa d'A β
- D) Interacció directa al SNC dels anticossos per neutralitzar l'A β soluble, reducció de la placa
- E) Hipòtesi de l'efecte sífó perifèric, en que els anticossos perifèrics i d'altres components plasmàtics com l'albumina indueixen un flux d'A β a perifèria

per mantenir l'equilibri en la seva distribució entre els compartiments central i perifèric. Com a resultat la càrrega central d'A β va disminuint progressivament.

Aquests mecanismes no poden ser considerats excloents, i dependrà del tipus d'immunoteràpia usada en cada assaig.

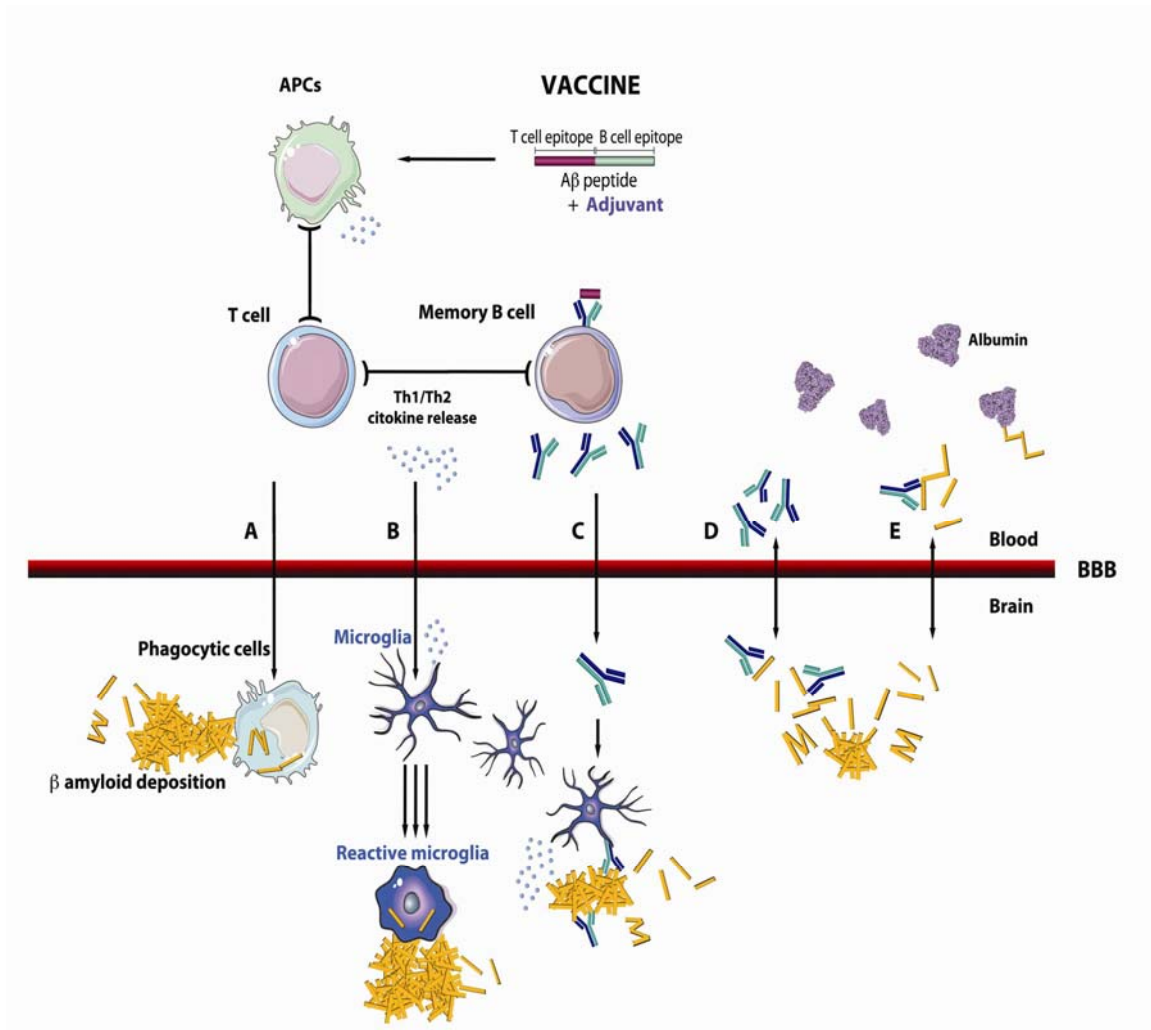


Fig.1.9 Mecanismes proposats d'eliminació d'A β induïts per la immunització d'una vacuna activa d'A β . (A-B) Fagocitosis de la placa per activació de la micròglia o per invasió a SNC de les cèl·lules fagocítiques; (C) Disgregació de la placa per interacció directa o indirecta dels anticossos a la placa; (D) Neutralització de l'A β per interacció dels anticossos amb l'A β soluble. (E) Per efecte sífon en el que els anticossos a plasma o altres components produeixen un aflux d'A β de SNC a perifèria. (Bosch et al, 2012)

Una de les rutes d'eliminació del pèptid amiloide és a través dels receptors de lipoproteïnes de baixa densitat (LRP1), situats a l'endoteli de la BHE. Aquests receptors estan regulats a la baixa en animals envellits i altament influenciats per l' α 2-Macroglobulina i/o l'APOE2 (Shibata et al., 2000). A més a més, agents perifèrics que s'uneixen a l'A β , com anticossos, gelsolina o gangliòsids, poden promoure l'eliminació de l'amiloide cerebral (DeMattos et al., 2002; Matsuoka et al., 2003). D'altra banda, els receptors per productes de glicosilació avançada (RAGE) també estan altament implicats en el transport de pèptid amiloide. Aquest receptor pertany a la superfamília de les immunoglobulines i es troba a les membranes de diferents tipus cel·lulars com per exemple, endotelials, musculars, neuronals o cèl·lules relacionades amb processos inflamatoris com macròfags o micròglia. A més a més, té la capacitat d'unir-se a diferents lligands com els productes de glicosilació avançada (AGE), a S100B o A β soluble. Els AGE es veuen augmentats en processos d'estrès oxidatiu i, per tant, en malalties com la diabetis, aterosclerosi, retinopaties i neuropaties (Münch et al., 2010). S'ha trobat un increment dels dipòsits d'AGE a neurones i astròglia relacionats amb l'edat i amb la MA. Aquests dipòsits també s'han detectat a plaques d'amiloide, sense quedar clar el paper que exerceixen en la maduració de les plaques (Kimura et al., 1995; Valente et al., 2010). Així doncs, una regulació a l'alça dels RAGE estarà relacionada directament amb el cúmul dels AGE, S100B i l'A β soluble a SNC i, per tant, amb la MA. Diversos estudis han relacionat l'augment d'expressió dels RAGE amb el transport i el cúmul d'A β a través de la BHE, amb l'augment de les citokines pro-inflamatòries i amb la disminució del flux cerebral (Deane et al., 2003, 2009, 2012). Altres estudis els han relacionat amb l'activació de micròglia a través del S100B o A β soluble, via NF-Kappa β (Bianchi et al., 2010) i amb la migració microglial (Bianchi et al., 2011). Per últim, estudis relacionen aquests receptors amb la neurotoxicitat induïda per diverses formes d'A β (oligòmers i agregats) (Sturchler et al., 2008). El bloqueig dels receptors RAGE, així com una disminució dels seus lligands pot dur a una menor entrada de l'A β a cervell, menor activació microglial i per tant menor neurotoxicitat.

Els últims anys s'han dedicat molts esforços a la investigació de immunoteràpies amb vacunes sintetitzades a partir de pèptids d'A β en diversos models animals. La possibilitat de poder realitzar avaluacions cognitives, fer seguiment longitudinal d'un tractament i obtenir mostres de teixit per a estudis histològics i moleculars, ens reafirma la idoneïtat del gos amb CDS com animal d'elecció per l'estudi de seguretat i eficàcia de teràpies dirigides a la prevenció i/o tractament de la MA. Així doncs, el nostre grup es planteja desenvolupar i comprovar l'eficàcia i seguretat en gossos amb CDS d'una vacuna dissenyada a partir de fragments C-terminal units a un carrier + adjuvant que indueix resposta de tipus Th2.

Capítol 2

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi

L'administració d'una immunoteràpia dissenyada a partir d'un adjuvant + A β ₄₂ fibril·lar indueix una millora cognitiva associada a una resposta immunògena i a una disminució de la càrrega d'amiloide a SNC en humans, però amb efectes secundaris nocius deguts a una resposta immunògena citotòxica exagerada induïda per l'adjuvant i el fragment d'A β ₄₂ que usats. El nostre grup es planteja si l'administració d'una immunoteràpia dissenyada a partir d'un adjuvant que indueix respostes de tipus Th2 o anti-inflamatòria + un fragment C-terminal del pèptid A β fibril·lar induirà una millora cognitiva evitant els efectes nocius observat en immunoteràpies ja testades en humans. El gos amb la síndrome de disfunció cognitiva és un bon model natural ja validat de deteriorament cognitiu lleu i d'estadis inicials d'Alzheimer per les múltiples similituds que presenta amb l'humà. La possibilitat d'una avaluació cognitiva i de l'obtenció de mostres durant el període d'immunització ens permetrà realitzar un bon seguiment de la resposta al tractament a nivell cognitiu i identificar els mecanismes moleculars i cel·lulars que hi participen.

Per tot això aquest treball planteja els següents objectius:

1. Escollir la vacuna anti-amiloide més eficaç i segura d'entre 5 vacunes originals dissenyades a partir de diferents fragments C-terminals d'A β fibril·lar
2. Identificar i quantificar els marcadors perifèrics bioquímics i hematològics més adients relacionats amb l'envelliment i la síndrome de disfunció cognitiva canina
3. Definir el protocol d'immunització de gossos amb la vacuna escollida i identificar els canvis cognitius provocats pel tractament en gossos amb la síndrome de disfunció cognitiva, així com els possibles efectes secundaris

4. Caracteritzar els diferents mecanismes cel·lulars i moleculars que participen a nivell central i perifèric en la resposta a la immunoteràpia en gossos sans i amb síndrome de disfunció cognitiva
5. Disposar d'una teràpia per la síndrome de disfunció cognitiva canina que pugui ser una proposta de tractament per la prevenció i/o curació de la MA.

Capítol 3

MATERIALS I

METODOLOGIA

3.1 ANIMALS

3.1.1 Conills

Per a l'estudi de seguretat i eficàcia de diverses immunoteràpies A β dissenyades a partir de diferents fragments es van utilitzar 12 conills del tipus *New Zealand White*, femelles, de 1.5-2Kg de pes, establats a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

3.1.2 Gossos

A l'inici de l'estudi i pera la caracterització de la CDS es van utilitzar un total de 36 gossos. 12 d'aquests eren gossos beagle (Laboratoris Harlan Gannat, France) establats en grups de 3 en construccions de 1.85mx3m de llarg i alimentats diàriament amb 340gr de menjar Hill's. I 24 eren gossos de companyia de diferent raça, sexe i edat que van ser explorats per veterinaris neuròlegs a la clínica veterinària (Ars veterinària, Barcelona, Spain). 21 dels dels 36 inicials van ser utilitzats per a l'estudi d'immunització, dels quals 9 eren gossos beagle estadulats i 12 gossos de companyia amb CDS. (Fig.3.1)



Fig.3.1 Varietat de gossos utilitzats per als estudis en gossos. Dels 36 gossos a l'inici de l'estudi, 12 eren gossos beagle establats (A), i 24 eren gossos de companyia (B).

Tots els animals han estat tractats d'acord amb la legislació Europea d'experimentació animal (86/609/EU) i els procediments han estat aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona i pels amos dels gossos en el cas dels gossos familiars. S'han realitzat tots els esforços per minimitzar els patiment animal i s'han utilitzat el n^o d'animals estrictament necessaris per a l'obtenció de les dades científiques. A més a més, els amos dels gossos de companyia van ser informats per escrit de tots els possibles danys i efectes secundaris derivats de les tècniques utilitzades i del procés d'immunització.

3.2 MOSTRES DE TEIXIT HUMÀ

Per als experiments d'immunohistoquímica sobre teixit humà, es van utilitzar mostres d'hipocamp i escorça cerebral humana de pacients amb MA d'estadi II i VI (d'acord amb l'escala de Braak & Braak (Braak and Braak, 1991), parafinades i tallades a 5µm. Les mostres van ser cedides pel Banc de Teixits Neurològics de la Universitat de Barcelona.

3.3 MATERIALS

Pèptids i proteïnes		
Nom	Descripció	Subministrador
Keyhole Limpet Hemocianina (KLH)	Proteïna extreta del mol·lusc utilitzat com a <i>carrier</i> en moltes de les vacunes gràcies a la seva alta immunogenicitat	Sigma, Barcelona, Spain
Kir. 6.1	Subunitat del canal de K-ATP	Alamone Labs, Jerusalem, Israel
Pèptid Aβ ₁₋₄₀	Pèptid Aβ de 40 aminoàcids amb una puresa del 95-98%	Genscript, NJ, USA
Pèptid Aβ ₁₋₁₁	Fragment N-terminal d'Aβ amb una puresa del 95-98%	Anaspec, CA, USA
Pèptid Aβ ₁₂₋₂₉	Fragment central d'Aβ amb una puresa del 95-98%	Anaspec, CA, USA
Pèptid Aβ ₂₉₋₄₀	Fragment C-terminal d'Aβ amb una puresa del 95-98%	Anaspec, CA, USA
Pèptid KLH-Aβ _{x-40}	Fragment C-terminal d'Aβ conjugat amb KLH	Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Pèptid KLH-Aβ _{y-40}	Fragment C-terminal del pèptid d'Aβ aminoàcids amb una puresa del 95-98% i conjugat amb KLH	Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Pèptid KLH-Aβ ₂₅₋₄₂	Pèptid de 42 aminoàcids amb una puresa del 95-98% i conjugat amb KLH	Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Anticossos i radiolligands		
Nom	Descripció	Subministrador
Goat anti-rabbit IgG biotinitat	IgG contra les IgG de conill produïda en cabra i conjugada amb biotina	Sigma Aldrich, MO, USA
Goat anti-rabbit IgG HRP	IgG contra les IgG de conill produïda en cabra i conjugada amb horseradish peroxidase (HRP)	Sigma Aldrich, MO, USA
Mouse anti-A β ₄₀	IgG contral l'A β de 40 aminoàcids produïda en ratolí	Dako, Glostrup, Denmark
Rabbit anti-proteïna glial fibril·lar acídica (GFAP) IgG	IgG contra laGFAP produïda en conill	Dako, Glostrup, Denmark
Goat anti-dog IgG biotinitat	IgG contra les IgG de gos produïda en cabra i conjugada amb biotina	Lifespan bioscience, WA, USA
Rabbit anti-S100 IgG	IgG contra la proteïna S100 produïda en conill	Dako, Glostrup, Denmark
Rabbit anti-mouse IgG biotinitat	IgG contra les IgG de ratolí produïda en conill i conjugada amb biotina	Sigma Aldrich, MO, USA
[³ H] PK11195.	Radiolligand específic del receptor de benzodiazepines perifèriques (PBR)	Perkin Elmer, Massachusetts, USA

Kits		
Nom	Descripció	Subministrador
Kit de detecció per ELISA A β ₄₀ i A β ₄₂ humans	Kit d'ELISA per a la detecció d'A β ₄₀ i A β ₄₂ a plasma i LCR	IBL international, Hamburg, Germany
Kit d'amplificació de senyal d'ELISA	Kit per a l'amplificació de la senyal de l'anticòs de detecció	Invitrogen, CA, USA

Altres compostos		
Nom	Descripció	Subministrador
Diaminobenzidina (DAB)	Substrat orgànic que amb presència d'una peroxidasa i d'H ₂ O ₂ adopta color porpra	Sigma Aldrich, MO, USA
Clorur de Niquel	Metall usat en que amb presència d'una peroxidasa i d'H ₂ O ₂ adopta color negre.	Sigma Aldrich, MO, USA
Extravidin-Cy3	Forma modificada de l'avidina amb alta afinitat cap a la biotina conjugada amb Cy3	Sigma Aldrich, MO, USA
ExtrAvidin Peroxidase	Forma modificada de l'avidina amb alta afinitat cap a la biotina conjugat amb HRP	Sigma Aldrich, MO, USA
Hidròxid d'Alumini en gel (Alum®)	Sals d'Alumini en forma estable usades com a adjuvant a les vacunes	Sigma, Barcelona, Spain
Isoflurane	Éter halogenat usat com a anestèsic inhalat. Presenta efectes vasodilatadors.	Laboratoris Esteve, Barcelona, Spain
Poli-D lisina	Aminoàcid que s'usa com a revestiment per millorar l'adherència del teixit al porta	Sigma Aldrich, MO, USA
Nuclear Fast Red	Component orgànic usat com a contra tinció de nuclis en tincions histològiques	Sigma Aldrich, MO, USA
Prolong gold antifade	Medi de muntatge per a mostres hidratades	Sigma Aldrich, MO, USA
Sepharosa en pols activada amb Bromur de cianogen	Boletes de polímer polisacàrid activat amb bromur de cianogen per acoblar-ho proteïnes o pèptids	Pharmacia, Barcelona, Spain
3,3', 5,5'tetrametil-benzidina (TMB)	Substrat orgànic que amb presència d'una peroxidasa i d'H ₂ O ₂ canvia el color a blau, passant a groc quan es para la reacció amb H ₂ SO ₄	BD Biobiosciences, Barcelona, Spain
Tioflavina T (ThT)	Sal de benzotiazol que capaç d'unir-se a les fibre d'amiloide	Sigma Aldrich, MO, USA
Tiopental Sòdic	Somnífer barbitúric usat com a sedant	Thiobarbital, Braun Medical S.A., Spain
Violeta Cresyl	Component orgànic usat per a la tinció histològica	Sigma Aldrich, MO, USA

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Preparació de les vacunes

Els pèptids A β van ser dissolts amb Dimetil Sulfòxid (DMSO) a raó de mg/ml, i van ser guardats en alíquotes d'1 ml a -80°C fins 24h abans de la inoculació de la vacuna als animals. Per a la preparació de les vacunes, es va seguir el següent protocol;

1. Pipetejar el volum necessari de cada pèptid per a tenir una quantitat final de 100 μ gr del pèptid A β ₁₋₄₀ (V1), o 100 μ gr del pèptid KLH-A β _{x-40} (V2), o 100 μ gr del pèptid KLH-A β _{y-40} (V3), o 100 μ gr del pèptid KLH-A β ₂₅₋₄₂ (V4), o 100 μ gr de 1/3 d'A β ₁₋₄₀ + 2/3 de KLH-A β _{y-40} (V5)
2. Afegir Solució Salina 0.9% estèril a eppendorf + 1mg d'Alum fins a 1ml final. En el cas de les solucions Sham o Placebo es prepara la Solució Salina 0.9% estèril + 1mg d'Alum
3. Deixar a 4°C tota la nit (ON) en rotació

Guardar a 4°C fins el moment d'injectar la vacuna

3.4.2 Inoculació de la vacuna

La vacuna va ser inoculada via subcutània (s.c). Aquesta via d'administració consisteix en administrar el fàrmac a una zona subcutània de l'animal, essent absorbit plexe arteriovenós de la zona. A conill s'escull la zona de clatell i a gos la zona de clatell o submamària.

A conill

1. Aspirar el contingut de l'eppendorf amb la xeringa
2. Rasurar zona de clatell, desinfectar , i pessigar el teixit greixós
3. Introduir el contingut de la xeringa
4. Realitzar petit massatge a zona per assegurar que la solució es distribueixi bé

A gos beagle estabulat

1. Aspirar el contingut de l'ependorf amb una xeringa
2. Rasura la zona anterior, inferior d'abdomen, desinfectar amb alcohol 70°C i pessigar el teixit greixós
3. Inocular tot el contingut de la xeringa
4. Realitzar petit massatge a zona per assegurar que la solució es distribueixi bé

3.4.3 Extracció de sang

A conill (Fig.3.2A)

1. Sedar l'animal durant 5 min amb Isoflurane inhalat.
2. Desinfectar el pavelló auricular amb alcohol realitzar lleuger massatge dilatar la vena.
3. Introduir palometa a la vena marginal del pavelló auricular
4. Extreure entre 5 i 10 ml de sang ó fins a 50ml per a l'ex-sanguinació amb xeringa adequada.

Distribuir la sang de la xeringa en tubs amb gel coagulant.

A gos beagle estabulat(Fig.3.2B)

1. Rasurar zona de vena cefàlica d'extremitat anterior
2. Palpar i vena i s'impedeix el retorn venós per induir vasodilatació
3. Introduir xeringa i aspirar 5 ml de sang

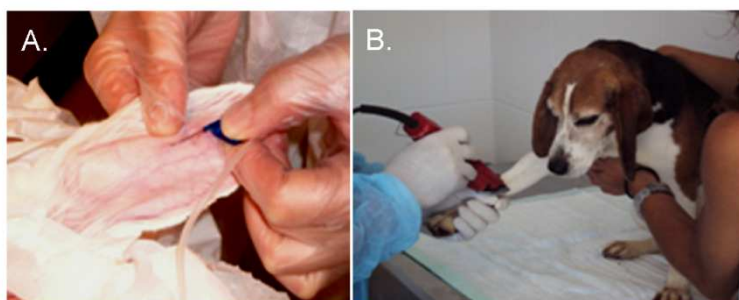


Fig.3.2 *Extracció de sang a conills i gossos. A vena marginal de pavelló auditiu en conills (A). A vena cefàlica (B).*

3.4.4 Extracció i conservació de LCR

L'extracció de LCR és una tècnica delicada a realitzar per una persona amb experiència i s'ha de monitoritzar l'animal pel risc que té de patir depressió respiratòria degut a l'anestèsia i/o la manipulació. En el nostre l'extracció de LCR va ser realitzada pel veterinari neuròleg (Fig.3.3).

1. Anestesiari l'animal amb Tiopental Sòdic
2. Monitoritzar per al control de ritme cardíac i oxigen i pressió
3. Col·locar en posició lateral i controlar la respiració del gos
4. A zona de cisterna magna i introduir agulla de punció lumbar
5. Deixar caure gotes de LCR per la paret de l'eppendorf, descartant la primera gota

Guardar LCR en alíquotes a -80°C fins al seu ús



Fig.3.3 *Extracció de LCR a gossos. L'extracció es realitza mitjançant punció a zona de cisterna magna.*

3.4.5 Obtenció i conservació de sèrum i plasma

Distribuir sang en tubs amb gel coagulant per al sèrum (BD, NJ, USA) o EDTA per al plasma (BD, NJ, USA).

1. Deixar reposar la sang durant 30min a temperatura ambient (RT)
2. Centrifugar 3000rpm durant 15 min
3. Aliquotar el sèrum o plasma que queda a la part superior del tub

Guardar a -80°C fins al seu ús

3.4.6 Mesura de paràmetres bioquímics i hematològics

Els paràmetres bioquímics; Fosfatasa Alcalina (AP), Glutamat Piruvat Transaminasa (GPT), creatinina, Urea, Proteïna Total i glucosa van ser analitzats per espectrofotometria (DIRUI CS-800, RAL, Barcelona, Spain). Els paràmetres hematològics; cèl·lules de la sèrie blanca, limfòcits, monòcits, neutròfils, eosinòfils, basòfils, hemoglobina, reticulòcits i plaquetes van ser mesurats per impedància de flux laminar (Procyte DX, Barcelona, Spain) Ambdós van ser mesurats a la clínica Ars Veterinària (Barcelona, Spain).

L'albumina a sèrum es mesurà mitjançant colorimetria i per bromocressol (ADVIA 1800, Siemens diagnòstic, Marburg, Germany) i l'albumina a LCR per immunonefelometria (BN2, Siemens, Marburg, Germany) al centre de diagnosi de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (Barcelona, Spain). Posteriorment, es calculà el quocient d'albumina (Qalb) segons *Tibbling et al*, (Tibbling et al., 1977).

$$Qalb = [albumina a LCR \text{ mgr/L}] / [albumina a sèrum \text{ gr/L}]$$

3.4.7 Tècniques d'assaig per immunoabsorció lligat a enzim (ELISA)

La tècnica d'ELISA es basa en la detecció d'antígens o anticossos, que han estat immobilitzats, mitjançant anticossos marcats per a poder fer una posterior detecció. Les tècniques d'assaig per immunoabsorció lligat a enzim (ELISA), es van usar per analitzar i quantificar el pèptids A β ₄₀ i A β ₄₂ i les IgG anti- A β ₄₀ a sang i LCR.

3.4.7.1 ELISA per a la detecció d'A β ₄₀ i A β ₄₂ a plasma i LCR

1. Diluir les mostres a 1/3 per mesurar A β ₄₀ a LCR, 1/25 per mesurar A β ₄₂ a LCR i 1/5 per mesurar A β ₄₀ a plasma amb Tampó fosfat salí (PBS) 10mM, pH7.4-0.05%Tween (PBST)-1% Albumina sèrica bovina (BSA) proveït pel KIT

2. Pipetejar per triplicat 100µl de la mostra diluïda, juntament amb les solucions de Corbes Standard, a dintre pouets de la placa pre-sensibilitzada i deixar incubar tota la nit (ON) a 4°C
3. Després de 7 rentats amb 0.05%PBST d'incubar-ho amb 100µl de l'anticòs secundari 1h a 4°C
4. Afegir el cromogen 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) durant 30min i parar reacció amb H₂SO₄ 1N

3.4.7.2 ELISA per a la detecció d'IgG anti-Aβ₄₀ a sèrum i LCR

En mostres de conill

1. Sensibilitzar una placa de 96 pouets (Maxisorb, Nunc, Langensfeld, Germany) amb 100µl d'Aβ₄₀ diluït a 2µg/ml amb NaHCO₃ 50mM, pH9.6. ON a 4°C
2. 1 rentat amb 200µl de 0.05%PBST
3. Bloqueig de les unions inespecífiques amb 200µl de 0.05%PBST-5%BSA 2h a temperatura ambient (RT)
4. 3 rentats amb 200µl de PBST
5. Afegir 100µl de sèrum diluït 1/100 amb PBS-5%BSA per triplicat i deixar incubar 2h a RT. Incubar 3 pouets més amb només amb PBS-5%BSA com a referència del "fons"
6. 4 rentats amb 200µl de PBST
7. Incubar amb 100µl d'anti-rabbit biotinilat diluït 1/20000 amb PBS-5%BSA 1h a RT
8. 5 rentats amb 200µl de PBST
9. Incubar amb 100µl d'extrAvidin-peroxidasa diluïda 1/2000 amb PBS-5%BSA 30min a RT
10. 5 rentats amb 200µl de 0.05%PBST
11. Afegir 100µl de TMB durant 5 min i aturar la reacció amb 100µl H₂SO₄ 0.1M
12. Llegir amb espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 450nm (λ=450nm)

Normalitzar els valors obtinguts de densitat òptica (D.O) respecte el valors de D. O. de “fons” més baix de totes les plaques usades a l’experiment.

En mostres de gos

1. Sensibilitzar les plaques tal i com s’ha descrit anteriorment.
2. 1 rentat amb 200µl de Tris 50mM pH7.5-NaCl 150mM (TBS)- 0.05% Tween (TTBS)
3. Bloqueig de les unions inespecífiques amb 200µl TBS-5%BSA durant 2h a RT
4. 1 rentat amb 200µl de TTBS
5. Afegir per triplicat 100µl de sèrum diluït 1/200 amb TBS-5%BSA o LCR diluït 1/2 amb TBS deixant-se incubar durant 2h RT. A part incubar 3 pouets amb TBS com a referència del “fons”
6. Incubar amb 100µl d’anti-dog biotinilat diluït 1/40000 amb TBS-5%BSA. 30min a RT
7. 4 rentats amb 200µl de TTBS
8. Afegir 100µl d’sreptavidina diluïda 1/4000 amb TBS-5%BSA durant 1h a RT
9. 5 rentats amb 200µl de TTBS
10. Afegir el Kit d’amplificació d’ELISA
11. Deixar revelar durant 1min30seg i parar la reacció amb 50 µl H₂SO₄ 0.3M
12. Llegir amb espectrofotòmetre a $\lambda=495\text{nm}$

Normalitzar els valors de D.O obtinguts respecte el valors de D.O de “fons” més baix de totes les plaques usades per l’experiment.

3.4.8 Inhibició d’IgGs anti-A β ₄₀ a sèrum amb fragments d’A β

En mostres de conill

1. Diluir el sèrum de conills immunitzats 1/500 amb PBS 10mM, pH7.4-5%BSA

2. Aliquotar el sèrum diluït en eppendorfs i afegir a cadascun un fragment d' $A\beta_{40}$ a $2.5\mu\text{M}$ (1-40, 1-11,12-28, 29-40) o Kir.6.1 com a control negatiu o no afegir pèptid
3. Deixar incubar ON a 4°C amb lleugera rotació
4. Afegir les mostres de cada conill a una mateixa placa sensibilitzada amb $A\beta_{40}$
5. Detectar les IgGs anti- $A\beta_{40}$ tal i com s'ha descrit anteriorment. El sèrum no es diluirà, ja que s'ha diluït anteriorment

En mostres de gos

1. Diluir el sèrum de gossos immunitzats 1/500 amb TBS 50mM pH7.5- NaCl 150mM -5% BSA
2. Aliquotar el sèrum diluït en eppendorfs i afegir a cadascun un fragment d' $A\beta_{40}$ a $2.5\mu\text{M}$ (1-40, 1-11,12-28, 29-40) o Kir.6.1 com a control negatiu o no afegir-hi pèptid
3. Deixar incubar ON a 4°C amb lleugera rotació
4. Després es van afegir les mostres de cada conill a una mateixa placa sensibilitzada amb $A\beta_{40}$
5. Detectar les IgGs anti- $A\beta_{40}$ tal i com s'ha descrit anteriorment.

3.4.9 Purificació d'IgG anti- $A\beta_{40}$ a partir del sèrum

Aquesta tècnica es una adaptació protocol d'elució d'antígens per gradient de pH mitjançant columnes immunoafinitat (Lane D, 1988) basant-se en l'elució d'anticossos específics anti- $A\beta_{40}$ mitjançant columnes preparades amb una matriu de Bromur de Cianogen activat i acoblat al grup C-terminal del pèptid $A\beta_{40}$.

En mostres de conill

1. Acoblar 3mg de pèptid $A\beta_{40}$ a 1.5mg de Sepharosa en pols activada amb Bromur de cianogen

2. Dipositar tot el volum de la reïna a una columna de cromatografia de 5ml (Bio-Rad, CA, USA)
3. Afegir 10ml de PBS 10mM, pH7.4 fred
4. Passar 3 vegades 20ml de sèrum obtingut dels conills immunitzats
5. Tornar a rentar la columna amb 10ml de PBS fred
6. Eluir amb gradient de pH; 1^{er}. glicina 100mM, pH2.5; 2^{on}. glicina 100mM+urea 4M, pH2.5 per obtenir els anticossos units més fortament al pèptid.
7. Recollir les fraccions de 500µl en eppendorfs a on s'ha afegit 50µl de Tris 1M, pH8 per a neutralitzar la solució d'anticossos.
8. Rentar la columna amb 15ml de PBS fred.
9. Per a comprovar a quin dels eppendorfs hi ha anticossos, activar una membrana de fluoro polivinilidè (PVDF) (Healthcare, CT, USA). amb metanol x 5 min+ 1 rentat amb aigua destil·lada (H₂O_d) x 5min + 1 rentat amb TBS 20mM, 137mM ClNa, pH7.5 x 5min
10. Deixar assecar la membrana i aplicar un "punt" de 2 µl de cadascuna de les elucions i deixar assecar 2min.
11. Bloqueig de les unions inespecífiques amb 0.2%TTBS-5%NFM 1h amb moviment suau
12. 3 rentats TTBS x 5min
13. Incubar amb anti-Rabbit HRP 1/1200 diluït amb TTBST-5%NFM 1h amb moviment suau
14. 2 rentats TTBS x 5min
15. Revelar 5min amb 0.03% de DAB en TBS i 5µl 30%d'H₂O₂ (Merck, Madrid, Spain)
16. Rentar 10min amb H₂O_d i deixar assecar
17. Detectar quins són els eppendorfs que contenen anticossos
18. Per tal a una bona conservació, dialitzar les solucions amb el anticossos mitjançant filtres amicon de 50K (Millipore, MA, USA) i dur igual volum amb Tris 50mM, pH7.4.

Quantificar concentració d'anticossos amb espectrofotòmetre a $\lambda=280\text{nm}$ (Nanodrop ND1000, Thermo scientific, De, USA).

En mostres de gos

1. Dipositar 0.5ml del volum de la reïna d'abans una columna de cromatografia
 2. Rentar-la amb 10ml de PBS
 3. Passar 3 vegades 1ml de sèrum dels gos immunitzat
 4. Tornar a rentar la columna amb 10ml de PBS fred
 5. Eluir amb gradient de pH; 1^{er}. glicina 100mM, pH2.5; 2^{on}. glicina 100mM+urea 4M, pH2.5 per obtenir els anticossos units més fortament al pèptid.
 6. Recollir les elucions en fraccions de 200µl en eppendorfs a on s'ha afegit 3µl de Tris 1M, pH8 per a tornar la solució d'anticossos a pH neutre.
 7. Per a comprovar a quin dels eppendorfs hi ha els anticossos, activar una membrana de PVDF amb metanol x 5min + 1 rentat amb H₂O_d x 5min + 1 rentat TBS 20mM, 137mM ClNa, pH7.5 x 5min
 8. Assecar la membrana i aplicar un "punt" de 2 µl de cadascuna de les elucions i deixar assecar 2min.
 9. Bloqueig de les unions inespecífiques amb 0.2%TTBS-5%NFM durant 1h amb moviment suau
 10. Rentats TTBS x 5min
 11. Incubar amb anti-dog biotinitat diluït 1/5000 amb 0.2%TTBS NFM 5%1h amb moviment suau
 12. 2 rentats 0.2% TTBS x 5min
 13. Revelar 5min amb 0.03% DAB en TBS i 5µl 30%d'H₂O₂
 14. Rentar 10min amb H₂O_d i deixar assecar
 15. Detectar quins són els eppendorfs que contenen anticossos
 16. Per tal a una bona conservació i concentració , dialitzar les solucions amb el anticossos mitjançant filtres i dur meitat volum amb Tris 50Mm
- Quantificar concentració d'anticossos amb espectrofotòmetre a $\lambda=280nm$

3.4.10 Obtenció i preservació de mostres de teixit de gos

3.4.10.1 Obtenció de mostres

1. Un cop sacrificat el gos per sobredosi d'anestèsia es procedeix a la recollida de mostres
2. Les mostres, recollides i separades pel veterinari neuròleg, seran tractades immediatament segons l'ús que se'n vulgui fer (Fixació química o congelació)
3. De cada òrgan a mostrejar, part de les mostres es fixaran i l'altra part es congelaran. En el cas del cervell, un hemisferi es fixarà i l'altre es congelarà. Les mostres susceptibles a la pèrdua de la forma, es fixen a suro blanc per a evitar que adoptin formes no anatòmiques

3.4.10.2 Fixació i criopreservació de les mostres

Submergir les mostres d'1cm màxim de gruix a dintre d'un recipient amb una solució de 4% Parafolmaldehid (PFA) diluït amb Tampó fosfat (PB) 10mM, pH7.4

1. Mantenir amb 4%PFA durant 3-4 dies a 4°C. Renovar-la quan sigui necessari
2. Substituir el PFA per Solució de sacarosa al 15% + 0.001 %Azida Sòdica diluïda amb PB, renovant-la cada 24h durant 3 dies
3. Congelar les mostres submergint-les a neu carbònica

Guardar-les a -80°C

3.4.10.3 Congelació de les mostres

- 1 Afegir mostres en forma cúbica d'1cm³ congelació entre neu carbònica fins que el teixit estigui congelat
- 2 Embolicar en paper d'alumini i marcar el tipus de mostra

Guardar-les a -80°C

3.4.11 Tincions

L'estudi de tinció es realitza sobre mostres fixades d'escorça frontal i hipocamp de 12µm de gruix que han estat tallades amb criòstat (Thermo scientific, NH, USA) sobre porta-objectes impregnats de poli-D lisina. Abans de realitzar qualsevol procediment cal deixar les mostres tallades sobre el porta-objectes com a mínim una setmana a -25°C.

3.4.11.1 Tinció de Nissl

1. Temperar mostres
2. Bany en etanol 95°+formaldehid v/v (1:1) x 5min
3. Bany en etanol 95° x 2min
4. Bany en cloroform + etanol + èter etílic v/v/v (1:1:8) x 10min
5. Bany en etanol 95°, 100, xilol x 2min
6. Bany en etanol 100°,95° x 2min
7. Bany en solució de violeta Cresyl x10min; 1gr de violeta de amb 3ml Àcid acètic glacial + 1000ml H₂O_d, pH 3.5
8. Deshidratar amb bany en etanol 95°, 100° x 2min+xilol x10min
9. Muntatge amb medi de muntatge per mostres deshidratades, DPX

3.4.11.2 Tinció de Prussian blue

1. Temperar mostres
2. Bany en PBS x 10min
3. Bany en solució de Ferrocianat Potàssic: 5%Ferrocianur potàssic en H₂O_d+ 5%HCl x 30min
4. Bany amb H₂O_d
5. Bany amb 0.1% Nuclear Fast Red en H₂O_d x 5min
6. Bany amb H₂O corrent fins x 5min
7. Deshidratar en bany en etanol 95°, 100° x 2min+xilol x10min
8. Muntatge amb DPX

3.4.12 Localització immunohistoquímica mitjançant reacció enzimàtica

Aquesta tècnica consisteix en la detecció d'una proteïna i/o pèptid incubant la mostra amb un anticòs específic (anticòs primari). Posteriorment, la incubació de la mostra amb un anticòs secundari (que detecti l'anticòs primari) marcat directa o indirectament amb *HRP*, permetrà l'oxidació del substrat DAB amb l'ajut d' H_2O_2 , i la visualització de la proteïna que es vol detectar amb el microscopi òptic.(Fig.3.4A). Si a la DAB se li afegeix $NiCl_2$, el producte final de la reacció serà de color negre, de manera que es podrem diferenciar dos tipus de proteïna (marcades de color porpra o negre) en una mateixa mostra. Les mostres es van observar a 5x, 10x i 40x amb el microscòpia òptica (Olympus America, NY, USA). Les imatges es van obtenir amb la càmera digital DP50, equipada amb els software Axio-Vision (Carl Zeiss, Germany).

3.4.12.1 Immunohistoquímica simple per a la detecció de plaques d'A β sobre mostres congelades canines amb anti-A β_{40} purificats

1. Temperar mostres durant 20 min
1. 1 bany amb PBS 10mM,pH 7.4 x 10min
2. 98%Àcid Fòrmic x 30seg
3. 2 rentats amb H_2O_d x 5 min
4. Inhibició de la Peroxidases endògenes; 180 ml de PBS+19.6 ml de Metanol+600 μ L de H_2O_2 x 30min(a fosques)
5. 3 rentats amb PBS x 5 min
6. Muntar els portes amb Sistema de racs i cassetes (Shandom Sequenza Slide Rack, Thermo Scientific, NH, USA)
7. Bloqueig de les unions no específiques; 150 μ l de PBS-5%NGS- 5%BSA 2h a fosques RT
8. Incubació amb 100 μ l d'IgGs anti-A β_{40} diluïts 1/10 ó 1/100 (purificada de conill) PBS-1%NGS-1%BSA ON a fosques 4°C
9. 3 rentats amb PBS x 5min
10. Incubació 100 μ l d'anticòs secundari anti-rabbit biotinitat diluït 1/500 amb PBS-1%-NGS-1%BSA 2h a fosques RT

11. 3 rentats amb PBS x 5 min
12. Incubació amb 100µl d'extrAvidin-peroxidase diluït 1/250 amb PBS-1%NGS-1%BSA 1.5h a fosques RT
13. 3 Rentats amb PBS x 5min
14. Desmuntar portes amb sistema de racs i cassetes
15. Revelar amb 0.03% DAB diluïda en 200ml PBS i filtrada + 50ml d'H₂O₂ durant 5 min a fosques
16. Rentats amb H₂O_d 2 x 10 min
17. Deshidratació amb alcohol (70°, 95°,100°) x 3min
18. Xilol x 5min
19. Xilol x 10min
20. Muntatge amb DPX

3.4.12.2 Immunohistoquímica simple per a la detecció de plaques d'Aβ sobre mostres humanes amb IgGs anti- Aβ₄₀ purificats

1. Desparafinar i rehidratar les mostres; 2 xilols X10min, alcohol (100° , 95° 70°, PBS) x 5min
2. 98% Àcid Fòrmic x 1.5-2min
3. 2 rentats amb H₂O_d x 5min
4. Inhibició de la Peroxidases endògenes x 30min (a fosques)
5. 3 rentats amb PBS x 5min
6. Muntar els portes amb sistema de racs i cassetes
7. Bloqueig de les unions no específiques amb 150µl de PBS-5%NGS-5%BSA 2 h a les fosques RT
8. Incubació amb 100µl d'IgG d'anti-Aβ₄₀ a diluït 1/10 o 1/100 (purificada de conill) ó 0.21mg/ml (purificada de gos) amb PBS-1%NGS-1%BSA ON a fosques 4°C
9. 3 rentats amb PBS x 5min
10. Incubació amb 100µl amb anticòs secundari anti-rabbit biotinilat 1/500 o anti-dog biotinilat 1/5000 diluït amb PBS-1%NGS-1%BSA 2h a fosques RT
11. 3 rentats amb PBS x 5min

12. Incubació amb 100µl d'extrAvidin-peroxidase 1/250 diluït amb PBS-NGS1%-BSA1% 1.5h a fosques RT
13. 3 rentats amb PBS x5min
14. Desmuntar portes amb sistema de racs i cassetes
15. Revelar amb DAB 0.03% diluïda en 200ml de PBS i filtrada + 50ml d'H₂O₂ 5min a fosques
16. 2 rentats amb H₂O_d x 10min
17. Deshidratació amb alcohol (70°, 95°,100°) x 3min
18. Xilol 5min
19. Xilol 10min
20. Muntar amb DPX

3.4.12.3 Immunohistoquímica doble per a la detecció de plaques d'Aβ-astrocits GFAP(+) ó S100B(+) sobre mostres canines

1. Temperar mostres 20 min
2. 1 bany amb PBS x 10min
3. 98%Àcid Fòrmic x 30seg
4. 2 rentats amb H₂O_d x 5min
5. Inhibició de la Peroxidases endògenes x 30min (a fosques)
6. 3 rentats amb PBS x 5min
7. Muntar els portes amb sistema de racs i cassetes
8. Bloqueig de les unions no específiques amb 150µl de PBS-5%NGS-5%BSA 2h a fosques RT
9. Incubació amb 100µl d'anti-Aβ40 diluït 1/100 amb PBS-1%NGS-1%BSA ON a fosques 4°C
10. 3 rentats amb PBS x 5min
11. Incubació amb 100µl d'anti-mouse biotinilat diluït 1/100 amb PBS-1%NGS-1%BSA 2h a fosques RT
12. 3 rentats amb PBS x 5min
13. Incubació amb 100µl d'extrAvidin-peroxidase diluït 1/250 amb PBS-1%NGS-1%BSA 1.5h fosques RT
14. 3 rentats amb PBS x 5min
15. Desmuntar portes amb sistema de racs i cassetes

16. Revelar amb 0.1gr DAB + 0.1gr NiCl diluïda en 200ml PBS i filtrada + 50ml d'H₂O₂ durant 15min a fosques
17. 2 rentats amb H₂O x 10 min
18. Muntar els portes amb sistema de racs i cassetes
19. 3 Rentats amb PBS x 5min
20. Incubació amb 100µl d'anti-GFAP 1/250 o d'anti-S100 1/500, ON 4°C a fosques RT
21. 3 rentats amb PBS x 5min
22. Incubació amb 100µl anticòs secundari anti-rabbit biotinitat diluït 1/500 amb PBS-1%NGS-1%BSA 2h a fosques RT
23. 3 rentats amb PBS x 5min
24. Desmuntar portes amb sistema de racs i cassetes
25. Revelar amb 0.03% DAB diluïda en 200ml de PBS i filtrada + 50ml d'H₂O₂ 5min a fosques
26. 2 rentats amb H₂O x 10min
27. Deshidratació amb alcohol (70°, 95°, 100°) x 3min
28. Xilol 5min
29. Xilol 10min
30. Muntar amb DPX

3.4.13 Localització immunohistoquímica mitjançant fluorescència

En aquest cas l'anticòs secundari està marcat amb un fluorocrom, que segons la seva longitud d'ona d'emissió, es visualitzarà amb diferent color mitjançant el microscopi de fluorescència ([Fig.3.4B](#)). Aquesta tècnica permet visualitzar la co-localització de dos pèptids i/o proteïnes diferents marcats fluorocroms que emetin a diferent longitud d'ona. En aquest cas, es vol saber si les IgGs anti-Aβ₄₀ co-localitzen amb les plaques Tioflavina T (ThT) positives. La ThT és un benzotiazol que en presència de fibril·les d'amiloide presenta emissió màxima de λ=350-480nm (color blau). Els anticossos anti-Aβ₄₀ es marquen amb cianina (Cy3) la qual té una emissió màxima de λ~570 nm (color vermell). Les mostres es van observar a 20x amb microscòpia de fluorescència (Carl Zeiss, Germany) (λ=670nm per detectar les plaques marcades amb els anticossos; λ=465nm per detectar plaques ThT positives).

3.4.13.1 Detecció doble de plaques d'A β ThT positives-plaques d'A β immunopositives sobre teixit humà

- 1 Desparafinar i rehidratar les mostres; 2 xilol x 10min+ alcohol 100^o , 95^o 70^o + PBS x 5min
- 2 98% àcid. fòrmic x 30seg
- 3 rentats amb H₂O₂ vegades x 5 min
- 4 Muntar els portes amb sistema de racs i cassetes
- 5 Bloqueig de les unions no específiques amb 150 μ l de PBS- 5%NGS- 5%BSA 2h a fosques RT
- 6 Incubació amb 100 μ l d'IgGs anti-A β ₄₀ a diluït 1/10- 1/1 (purificada de conill) o 0.21mg/ml (purificada de gos) amb PBS-1%NGS-1%BSA ON 4^oC a fosques
- 7 3 rentats amb PBS x 5min
- 8 Incubació amb 100 μ l d'anticòs secundari anti-rabbit biotinilat diluït 1/500 o anti-dog biotinilat 1/5000 amb PBS-NGS1%-BSA1% 2h a fosques RT
- 9 3 rentats amb PBS x 5min
- 10 Incubació amb 100 μ l d'extravidin-Cy3 diluït 1/100 amb PBS-1NGS%- 1% BSA1h 1 a fosques RT
- 11 3 rentats amb PBS x 5min
- 12 Desmuntar els portes amb sistema de racs i cassetes
- 13 Deixar mostres assecar a les fosques a 4^oC ON
- 14 Rehidratar mostres alcohol (100^o, 95^o, 70^o) x 5min
- 15 2 rentats H₂O_d x 5min
- 16 0.05% ThT en 0.1 M d'HCl (filtrat) x 3min
- 17 1 rentat amb H₂O_d x 5min
- 18 1 rentat amb 1% àcid. acètic x 20min
- 19 1 rentat amb H₂O_d x 5min
- 20 Muntar amb 10 μ l de medi de muntatge per mostres hidratades Prolong gold antifade reagent

Deixar a 4^oC i mirar a microscopi al dia següent

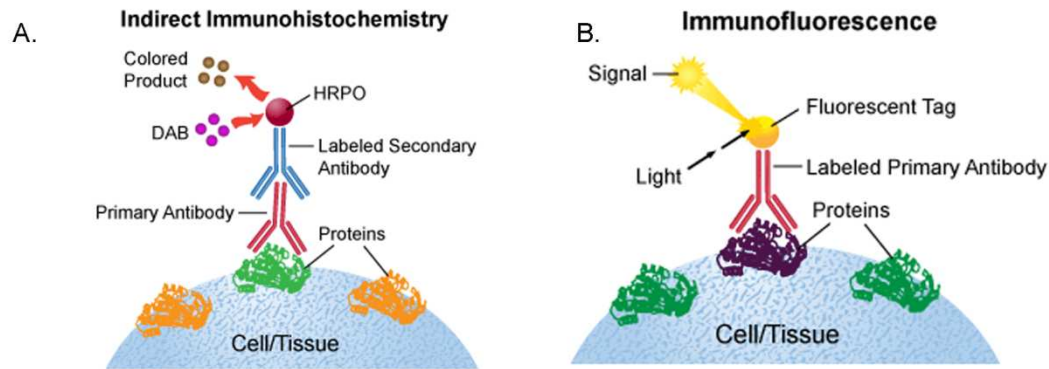


Fig.3.4. Localització immunohistoquímica mitjançant reacció enzimàtica(A) i localització immunohistoquímica mitjançant fluorescència amb marcador fluorocrom(B).

3.4.14 Autoradiografia “in vitro

Degut a la dificultat a l'hora de detectar micròglia reactiva en teixit cerebral de gos, es va realitzar la quantificació a l'escorça pre-frontal, entorrinal i l'hipocamp del receptor perifèric de benzodiazepines (PBR) per autoradiografia in vitro amb [^3H] PK11195. El PBR a SNC s'expressa principalment a les cèl·lules microgials (Weissman and Raveh, 2003). S'ha demostrat que el PK11195 SNC presenta especificitat incrementada quan hi ha dany cerebral agut i/o crònic. Per exemple, després de traumatismes cranioencefàlics (Ramlackhansingh et al., 2011), en malalties neurodegeneratives com la MA (Venneti et al., 2009; Kadir et al., 2011) i Parkinson (Gerhard et al., 2006). Aquest augment d'especificitat s'associa a un increment dels llocs d'unió de l'enantiòmer (R) de PK11195 a cèl·lules gials quan la micròglia passa d'un estat “resting” a activar-se (Banati, 2002).

3.4.14.1 Fixació del [^3H]PK11195 per a la detecció de PBR sobre mostres de cervell caní

Fer el disseny de l'experiment segons el número de portes, tenint en compte que s'han de fer banys d'unió total (TB) per cada cas i banys d'unions no específiques (NSB) per cada canvi de situació en l'experiment.

1. Temperar mostres x 20min
2. Bany amb Tris 50mM, pH 7.5-HCl x 5min

3. Pel TB: 1nM de [³H] pK11195 en Tris-HCl x 2 hores a 4°C
4. Pel NSB: 2microM pk11195 en Tris-HCl x 2 hores a 4°C
5. 2 rentats en Tris-HCl x 2min
6. 2 rentats en H₂O_d a 4°C
7. Deixar assecar en la nevera amb ventilador incorporat.
8. Exposar las seccions a un Films de triti (Amersham healthcare, CT, USA) juntament amb els patrons de radioactivitat (³H-microescales;Amersham healthcare, CT, USA) a cada casset durant 20 dies
9. Revelar film amb revelador automàtic (Curix 60, AGFA, Spain)
10. Netejar film amb aigua corrent i deixar assecar

Per mesurar la concentració de [³H] pK11195 unit a PBR, es van quantificar els grisos mitjançant el Image-Pro Plus (MD, USA) de les imatges obtingudes en els films de revelar Posteriorment, i tenint en compte la taxa de caiguda de radioactivitat, el percentatge de [³H] pK11195 que hi ha en el teixit i la relació mmol lligant-reactiu, es va fer la conversió dels valors donats (nCi/mg teixit) a concentració (fmol/mg proteïna).

3.5 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Després de tractar les mostres i normalitzar-les segons l'experiment, tal i com s'explicarà en el capítol de resultats, es va fer l'anàlisi estadística utilitzant dos programes complementaris: 1) SPSS 15.0 per a Window XP (IBM España, Madrid, Spain) 2) Statgraphics plus 5.0 per a Windows XP (Virginia, USA).

Per a la comparació de les variables, es va assumir n nivell de significació de 0.05 ($p \leq 0.05$). En tots els casos, es va fer una primera anàlisi de la distribució de freqüències dels paràmetres. En el cas de que la distribució fos normal i que no hi hagués diferències significatives entre les desviacions estàndard de les variables; a) s'aplicava l'anàlisi de mitjanes segons un factor quan es volia comparar variables quantitatives de 2 poblacions, b) quan es volia comparar les variables quantitatives de 3 poblacions o més s'aplicava l'anàlisi de la variància (ANOVA) segons un factor seguit de la prova post-hoc de Bonferroni per a la

comparació de les mitjanes, . En el cas que la distribució no segueixi una distribució normal o que hi hagués diferències significatives entre les desviacions estàndard es realitzaven probes no paramètriques d'anàlisi de medianes a) s'aplicava la prova de Mann Whitney (MW) quan es comparaven medianes de 2 poblacions , b) s'aplicava la prova de quan Kurskal-Wallis (KW) quan es comparava les medianes de 3 poblacions o més.

Per a analitzar les correlacions lineals diverses variables d'una mateixa població es mesurava el coeficient de correlació de Pearson en el cas de distribucions normals o el coeficient de correlació de Spearman en el cas de distribucions que no seguien una normal.

Capítol 4
RESULTATS

4.1 ESTUDI DE SEGURETAT I EFICÀCIA DE DIVERSES IMMUNOTERÀPIES A β DISSENYADES A PARTIR DE DIFERENTS FRAGMENTES DEL PÈPTID A β ₄₀

Diverses han estat les vacunes sintètiques dissenyades a partir de fragments del pèptid A β de 40 i 42 aminoàcids i de diferents formulacions d'adjuvants i carriers (Janus et al., 2000; DeMattos et al., 2002; Dodart et al., 2002; Maier et al., 2006; Shi et al., 2011). Experiments amb aquestes vacunes han demostrat la seva eficàcia experimental, millorant els dèficits cognitius en ratolins transgènics i eliminant les plaques d'amiloide cerebrals. Una de les primeres immunoteràpies dissenyades a partir del pèptid A β ₄₂ (compost AN 1792, Elan and Wyeth) va arribar fins a estudis clínics en Fase II però es va interrompre pels seus efectes indesitjables: un 6% dels pacients que varen rebre la vacuna van ser afectes de meningoencefalitis sèptica. Es va proposar que part dels efectes secundaris eren causats per una resposta exagerada de tipus Th1 (pro-inflamatòria) (Orgogozo et al., 2003) deguda, en part, a l'adjuvant utilitzat (QS21), (Cribbs et al., 2003) i en part, als epítops reconeguts pels anticossos anti-A β generats per la vacuna (Lee et al., 2005; Li et al., 2005). Estudis comparatius amb diversos adjuvants demostraven que la immunització amb QS21 provoca una gran resposta immunògena i de tipus Th1 (Cribbs et al., 2003). D'altra banda, estudis d'epítops demostraven que les IgG anti-A β generades a partir de la vacuna reconeixien majoritàriament fragments linears, N-terminals d'A β , independentment de si el pacient havia patit o no meningoencefalitis (Lee et al., 2005) i que, sorprenentment, la resposta induïda per aquests fragments era més aviat de tipus Th2 (Li et al., 2005; Maier et al., 2006). Estudis posteriors es van centrar en la identificació de les respostes immunitàries induïdes segons els adjuvants i/o els fragments d'A β utilitzats en la vacuna (Asuni et al., 2006; Ghochikyan A et al., 2006).

Així doncs, aquells anticossos que reconeixen fragments N-terminal del pèptid s'associen a respostes anti-inflamatòries (Bard et al., 2003), reconeixen i disgreguen les plaques d'amiloide i es poden unir als vasos cerebrals (Pfeifer et al., 2002; Fryer et al., 2003) provocant micro-hemorràgies. Mentre que els anticossos que reconeixen fragments C-terminal del pèptid provoquen respostes pro-inflamatòries (Monsonigo et al., 2003), reconeixen A β soluble i plaques

d'amiloide i també poden provocar micro-hemorràgies (Wilcock et al., 2004), però sense presentar risc d'encefalomielitis i permetent l'eliminació de A β des de el SNC i la perifèria (Fig.4.1)

1	N-terminal	Central	C-terminal	42
	<ul style="list-style-type: none"> • Enter the brain • Bind to APP, cerebral and vascular Aβ deposits • Dissolve amyloid plaques by Fc-mediated phagocytosis and Aβ degradation by glial cells • Risk of CAA, microhemorrhage • Risk of encephalomyelitis → Aβ clearance: within CNS 	<ul style="list-style-type: none"> • No brain penetration • Bind to APP, monomeric Aβ • Do not bind to aggregated Aβ, amyloid plaques or vascular Aβ deposits • Dissolve amyloid plaques mainly by the peripheral sink mechanism <p style="text-align: center;">→ Aβ clearance: periphery</p>	<ul style="list-style-type: none"> • May or may not enter the brain • Bind to APP, monomeric Aβ and amyloid plaques • neutralize toxic effects of Aβ • Risk of CAA, microhemorrhage <p style="text-align: center;">→ Aβ clearance: within CNS & periphery</p>	

Fig.4.1 Principals característiques dels anticossos segons el reconeixement d'epítops d'A β_{42} (Lichtlen and Mohajeri, *J.Neurochem*,2008).

Tenint en compte aquestes consideracions, les principals recomanacions pel disseny de futures vacunes anti-A β són:

1. No ha d'incloure encefalitis autoimmunitària
2. Ha de ser preventiva o ha de millorar les funcions cognitives si el tractament s'inicia després de detectar símptomes
3. Ha de funcionar en persones d'edat avançada a on el sistema immunitari està deteriorat
4. No ha de ser cara

A partir d'aquestes recomanacions es van dissenyar vacunes formulades a partir de fragments C-terminal del pèptid A β , conjugats amb KLH i amb Hidròxid d'Alumini com a adjuvant que induïx respostes de tipus Th2.

Per tal de poder escollir la formulació més eficaç i segura es van immunitzar conills amb les formulacions anteriors. A partir dels resultats obtinguts després

d'aquestes immunitzacions, es passaria a fer l'estudi d'immunització usant el gos amb CDS com a model de MA.

4.1.1 Posta a punt i caracterització del procediment

Les possibles vacunes dissenyades van ser: $A\beta_{1-40}$ + Alum® (V1, com a control positiu); KLH- $A\beta_{x-40}$ + Alum® (V2); KLH- $A\beta_{y-40}$ + Alum® (V3); KLH- $A\beta_{25-42}$ + Alum® (V4); $A\beta_{1-40}$ + KLH- $A\beta_{y-40}$ + Alum® (V5).

4.1.1.1 Procés d'immunització

Per a la detecció i caracterització de la resposta immunitària 12 conills varen rebre 6 injeccions s.c al clatell de les vacunes anteriorment dissenyades (Immunized V1, V2, V3, V4, V5; n=2) durant un període d'immunització de 51 dies. A 2 conills més se'ls va injectar una solució d'1mg d'Hidròxid d'Alumini amb Solució Salina al 0.9% fins arribar a 1.5ml de solució (grup sham). A més a més, se'ls va extreure sang cada 10 dies fins al dia 71 en el qual es va exsanguinar i sacrificar l'animal (Fig.4.2). Durant el període d'immunització es va revisar diàriament l'estat de la zona de punció, així com l'estat general dels conills.

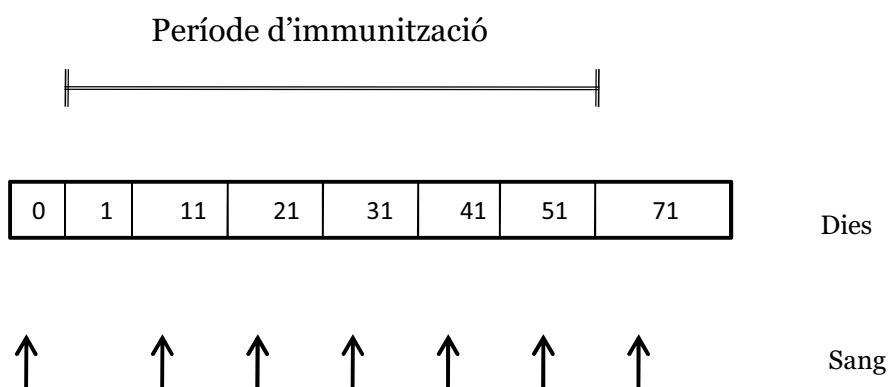


Fig.4.2. *Procés d'immunització en conills.* Es va fer un seguiment dels animals durant un període de 71 dies. Durant aquest temps els conills reberen 6 immunitzacions i es van sacrificar a dia 71. A més a més, se'ls extragué sang cada 10 dies per determinar la titulació d'anticossos.

4.1.1.2 *Caracterització de la resposta immunitària*

Per caracteritzar la resposta immunitària en els conills immunitzats amb les diverses vacunes es van mesurar els nivells d'IgG anti-A β_{40} a partir del sèrum obtingut de la sang extreta durant l'estudi d'immunització. Per realitzar l'estudi de reconeixement d'epítops linears i conformacionals d'A β_{40} , en primer lloc, es caracteritzà el reconeixement de les IgG anti-A β_{40} cap a la forma soluble l'A β_{40} , incubant-se les mostres de sèrum obtingut a dia 71 dels conills amb resposta immunitària amb tres diferents fragments linears d'A β_{40} (1-11, 12-28, i 29-40) o amb el pèptid sencer per calcular el "Percentatge d'inhibició".

Percentatge d'inhibició = 100 - (D.O inhibició (mostra + fragment A β)/D.O total mostra)

En segon lloc, es caracteritzà el reconeixement de les IgG anti-A β , de les formes d'A β insolubles, detectant-se les plaques d'amiloide a teixit cerebral de gos amb CDS i humà amb la MA mitjançant els anticossos anti-A β_{40} purificats a partir del sèrum. Per a assegurar resultats comparables, es van utilitzar talls consecutius d'hipocamp de: 1) gos diagnosticat de CDS amb plaques d'estadi IV. 2) pacient amb estadi II de Braak&Braak (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002). Els anticossos usats van ser sempre els obtinguts després de la primera elució amb glicina a pH àcid i provant-se diverses dilucions optimitzar la detecció de les plaques. Posteriorment, s'observà si les plaques que es detectaven amb els anticossos purificats co-localitzaven amb plaques ThT positives. Per això, es va fer una detecció doble amiloide-ThT a mostres d'hipocamp de pacients amb estadi inicials de la MA i es van observar a 20x amb microscòpia de fluorescència.

4.1.2 *Resultats*

4.1.2.1 *La barreja dels pèptids A β_{1-40} + KLH-A β_{y-40} indueix les titulacions d'IgG anti-A β_{40} més elevades en conills.*

Els conills immunitzats amb A β_{25-40} no van generar anticossos. Els nivells màxims d'anticossos en els conills immunitzats es van observar entre els dies 21

i 51 després de la primera dosi de vacunació i els nivells més elevats van ser detectats en conills immunitzats amb la barreja dels pèptids $A\beta_{1-40}+KLH-A\beta_{y-40}$ (Fig.4.3A). En aquesta barreja, el valor de la meitat de la titulació màxima (HMAT) a dia 51 també era el més alt (HMAT=1434), seguit del valor d'HMAT de V3 (HMAT=1025), V1 (HMAT=278) i V2 (HMAT=224) (Fig4.3B).

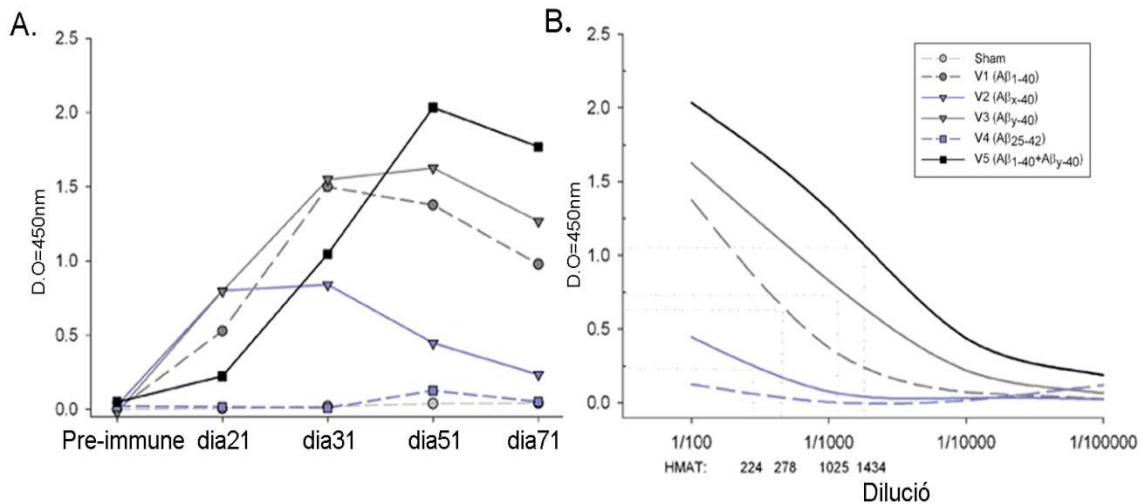


Fig.4.3 Nivells d'IgG anti- $A\beta_{40}$ a conills immunitzats. Els conills immunitzats amb la barreja dels pèptids (V5) presenten els nivells més elevats d'anticossos (A), així com els valors més elevats de la meitat de la titulació màxima (HMAT) a dia 51, (HMAT=1434) (B).

4.1.2.2 Cap dels conills presenta efectes secundaris associats a la vacunació

Durant tot el període d'immunització es va revisar diàriament l'estat de la zona de punció així com l'estat general dels conills. No es van trobar alteracions cutànies a la zona de punció, ni canvis en l'estat general dels conills.

4.1.2.3 Les IgG anti- $A\beta_{40}$ obtingudes del sèrum de conills immunitzats amb la vacuna V5 reconeixen els epítops linears $A\beta_{1-11}$, els epítops conformacionals $A\beta_{40}$ i les plaques difuses i neurítiques

La caracterització de les IgG anti-A β_{40} es va fer amb els conills immunitzats amb A β_{1-40} (V1), KLH-A β_{y-40} (V3) i A β_{1-40} +KLH-A β_{y-40} (V5). El pèptid lineal A β_{1-11} era reconegut pels anticossos purificats a partir del sèrum de V1 i V5. El pèptid lineal A β_{12-28} no va ser reconegut per cap dels anticossos purificats. I els pèptids lineal A β_{29-40} i conformacional A β_{40} van ser reconeguts per tots els anticossos. Els anticossos derivats de les vacunes formulades amb el pèptid A β_{1-40} (V1 i V5) reconeixien millor el pèptid conformacional A β_{40} que els linears amb diferències significatives ($p=0.0032$), així com també reconeixien millor el lineal A β_{1-11} que l' A β_{29-40} ($p= 0.029$) (Fig 4.4A). La vacuna V3 dissenyada amb el pèptid A β_{y-40} reconeixia només pèptid lineal A β_{29-40} .

En les immunohistoquímiques sobre teixit cerebral de gos amb CDS s'observà que els anticossos comercials i els purificats a partir del sèrum dels conills immunitzats amb V1 i V5 detectaven les plaques difuses (Fig4.4B). Els anticossos purificats a partir del sèrum de V3 presentaven un marcatge més dèbil. En les immunohistoquímiques sobre teixit cerebral humà amb la MA s'observà que tots els anticossos purificats reconeixien les plaques difuses i els anticossos generats a partir de V1 i V5 també reconeixien les plaques neurítiques. Els anticossos comercials presentaven un marcatge dèbil de les plaques difuses i molt més específic de les plaques neurítiques de pacient amb la MA. En les dobles immunohistoquímiques s'observà que els anticossos comercials i els purificats a partir del sèrum dels conills immunitzats amb V1 i V5 detectaven plaques positives per la ThT. Els anticossos derivats del sèrum de V3 quasi no co-localitzaven amb plaques positives per la ThT (Fig4.4B).

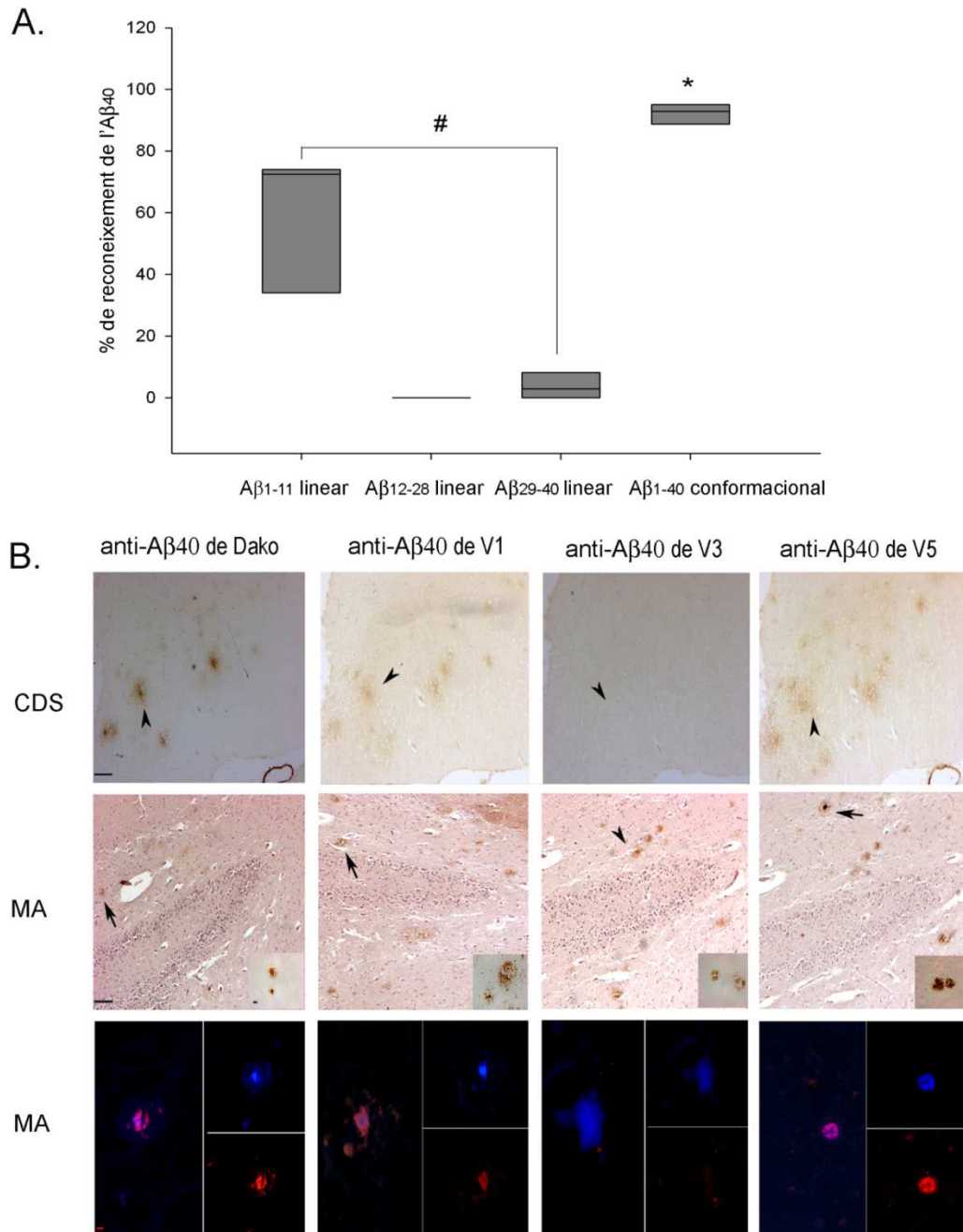


Fig.4.4 *Reconeixement de formes solubles i insolubles d'Aβ per part de les IgG anti-Aβ₄₀ purificades del sèrum dels conills immunitzats.* Les IgG anti-Aβ₄₀ derivades dels conills immunitzats amb vacunes que contenen Aβ₁₋₄₀ (V1 i V5) reconeixen millor els epítops conformacionals Aβ₁₋₄₀ que els linears (*p=0.0032), i els linears Aβ₁₋₁₁ que els Aβ₂₉₋₄₀ (#p=0.029) (A). A més, reconeixen plaques neurítiques (♣), ThT positives i les plaques difuses (▲) (B). Les IgG anti-Aβ₄₀ derivades de la vacuna formulada només amb el pèptid Aβ_{y-40} (V3), reconeixen els epítops conformacionals Aβ₁₋₄₀ i els linears Aβ₂₉₋₄₀ (dades no mostrades). A part, només reconeixen escassament plaques de tipus difús (B). Immunohistoquímica 100µm i 10 µm. Immunofluorescència 10 µm.

4.2 CARACTERITZACIÓ DE LA SÍNDROME DE DISFUNCIÓ CANINA. POSTA A PUNT DE L'ESTUDI D'EFICÀCIA I SEGURETAT DE LA VACUNA ANTI-AMILOIDE

En base als resultats de l'estudi d'immunització a conills, es va dissenyar l'estudi d'immunització en gossos amb una de les vacunes. Tenint en compte que cap de les formulacions emprades va provocar efectes secundaris, i basant-nos en les titulacions d'anticossos i els epítops que reconeixien, es va escollir la vacuna V5 formulada a partir de la barreja dels pèptids $A\beta_{1-40}+KLH-A\beta_{y-40}$. Així doncs, l'administració d'una vacuna que combina dos pèptids i Alum® com a adjuvant hauria d'induir una resposta immunitària elevada de tipus Th2. D'altra banda, el fet que els anticossos generats reconeguin fragments N i C terminals de l'A β podria activar diferents mecanismes d'eliminació de l'A β de SNC cap a perifèria.

4.2.1.Procediment

4.2.1.1 Selecció i caracterització dels gossos

Abans d'iniciar l'estudi d'immunització, es va caracteritzar la CDS a nivell cognitiu i molecular a fi d'identificar i agrupar adequadament els animals sans i els animals amb dèficit cognitiu.

Un total de 36 gossos inclosos en l'estudi van ser dividits en 2 grups: El primer grup, format per 12 gossos beagle sans estabulats. El segon grup, format per 24 gossos de companyia de raça, sexe i edat diversos. Per tal de caracteritzar la CDS, el veterinari neuròleg va fer una primera valoració cognitiva dels gossos de companyia i, segons la puntuació total obtinguda en el test cognitiu, es van classificar en:1) Adults Control (AC) a on s'inclouen gossos estabulats i de companyia menors de 8 anys; Vells Control (OC) a on s'inclouen gossos estabulats i de companyia majors de 8 anys i sense dèficit cognitiu;3) gossos amb CDS. Aquests últims eren tots majors de 8 anys i, segons el seu grau de dèficit cognitiu, es van subdividir en grup amb LCD i en grup amb sCD.

Posteriorment, es van valorar 16 paràmetres bioquímics i hematològics, així com els nivells d'A β a sang i LCR i Qalb per mesurar la integritat de la BHE.

4.2.1.2 Disseny i validació del procés d'immunització

Seguint les recomenacions del comitè d'ètica i degut a la negativa de molts dels amos a que els seus gossos participessin a l'estudi, s'hi van incloure 21 dels 36 gossos inicials. D'aquests, 9 gossos eren beagle establulats i 12 gossos de companyia amb CDS ([taula4.1](#)): 6 dels 9 gossos beagle establulats van ser immunitzats amb la vacuna (immunized AC) i els 3 restants, van ser immunitzats amb una solució d'1mg d'Alum[®] + solució salina (Placebo). Dels 12 gossos de companyia amb CDS inclosos a l'estudi d'immunització, 9 van ser immunitzats (Immunized CDS) i els 3 restants van ser tractats com a grup placebo incloent-se a dintre del grup placebo anterior.

Es va dissenyar un estudi d'immunització de 131 dies de durada, en el qual els gossos van rebre 6 injeccions s.c de la vacuna al clatell distribuïdes en 51 dies. En un estudi doble cec, s'anà fet una valoració cognitiva a dies 0, 31, 51 i 131 dels gossos de companyia ([Fig.4.5](#)) i extraccions periòdiques de sang i LCR a tots els animals. A partir de la sang i LCR, es van mesurar possibles variancions dels paràmetres bioquímics i hematològics, dels nivells d'A β a plasma i LCR, dels nivells d'IgG anti-A β ₄₀ a sèrum i LCR i del Qalb.



Fig.4.5. Procés d'immunització en gossos. Es va fer un seguiment dels animals durant un període de 131 dies. Durant aquest temps els gossos reberen 6 immunitzacions. A més a més s'extragué sang i LCR periòdicament.

Tots els gossos van ser monitoritzats per detectar les reaccions adverses i la zona de punció va ser revisada periòdicament . El tractament i seguiment del gossos beagle establats es va dur a terme sota supervisió del mateix veterinari.

Taula 4.1 Classificació del gossos inclosos a l'estudi i tractaments rebuts

ID	Raça	Sexe	Edat	Grup de caracterització de la CDS	Grup d'immunització
1	Gos beagle establats	Mascle	2	AC	Immunized AC
2	Gos beagle establats	Mascle	2	AC	Immunized AC
3	Gos beagle establats	Mascle	3	AC	Immunized AC
4	Gos beagle establats	Mascle	4	AC	Immunized AC
5	Gos beagle establats	Mascle	4	AC	Immunized AC
6	Gos beagle establats	Mascle	6	AC	Immunized AC
7	Gos beagle establats	Mascle	4	AC	Placebo
8	Gos beagle establats	Mascle	2	AC	Placebo
9	Gos beagle establats	Mascle	2	AC	Placebo
10	Gos beagle establats	Mascle	3	AC	AC
11	Gos beagle establats	Mascle	6	AC	AC
12	Gos beagle establats	Mascle	8	OC	OC
13	Pastor Belga	Femella	6	AC	AC
14	Rottweiler	Femella	7	AC	AC
15	Mestís	Femella	6	AC	AC
16	Mestís	Mascle	10	OC	OC
17	Mestís	Femella	10	OC	OC
18	Mestís	Mascle	12	OC	OC
19	Gos d'atura	Mascle	12	OC	OC
20	Beagle	Mascle	13	OC	OC
21	Mestís	Mascle	13	OC	OC
22	Gos d'atura	Mascle	14	OC	OC
23	Mestia	Femella	14	ICD	LCD
24	Kurzhaar	Femella	12	ICD	LCD
25	Golden retriever	Femella	11	ICD	Placebo
26	Mestís	Femella	14	ICD	Placebo
27	Gos d'atura	Mascle	15	ICD	Immunized CDS
28	Mestís	Mascle	15	ICD	Immunized CDS
29	Boxer	Mascle	10	ICD	Immunized CDS
30	Mestís	Femella	13	ICD	Immunized CDS
31	Mestís	Mascle	14	ICD	Immunized CDS
32	Beagle	Mascle	14	ICD	Immunized CDS
33	Mestís	Mascle	15	sCD	Placebo
34	Golden Retriever	Femella	15	sCD	Immunized CDS
35	Mestís	Femella	18	sCD	Immunized CDS
36	Mestís	Mascle	15	sCD	Immunized CDS

12 gossos beagle establats i 24 de companyia van ser inclosos l'estudi. Aquests van ser classificats en Adults Control (AC, n=14), Vells Control (OC, n=8), dèficit cognitiu lleu (ICD, n=10) i dèficit cognitiu sever (sCD, n=4.). A l'estudi d'immunització es van incloure 9 gossos beagles establats i 12 de companyia dels anteriors. 6 gossos establats van ser immunitzats (immunized AC), juntament amb 6 gossos amb CDS (immunized CDS). Els 3 gossos establats i els 3 CDS restants van rebre Alum®+solució salina (Placebo).

4.2.2 Resultats de l'estudi d'eficàcia i seguretat

4.2.2.1 Els gossos amb dèficit cognitiu lleu es diferencien amb nivells elevats de proteïnes plasmàtiques, plaquetes i $A\beta$ plasmàtic

La caracterització inicial mostra que tots els 16 paràmetres bioquímics i hematològics analitzats estaven dintre del rang de normalitat en tots els animals i que en el grup de gossos amb CDS, els nivells de proteïnes plasmàtiques i plaquetes eren més elevats i els de reticulòcits més baixos que a la resta de grups ($p=0.004$, 0.001 i 0.002 , respectivament) (Dades no mostrades). D'altra banda, els nivells d' $A\beta_{40}$ plasmàtic eren més elevats en el grup de gossos amb LCD ($p=0.029$) (Fig.4.6A), i en tots els grups els nivells $A\beta_{42}$ plasmàtic era inferior al límit de detecció. A LCR, els nivells d' $A\beta_{40}$ restaven estables amb l'edat i la disfunció cognitiva, mentre que els nivells $A\beta_{42}$ estaven incrementats en el grup de gossos amb LCD ($p=0.018$) (Fig.4.6B,C). La dispersió en els valors d' $A\beta_{42}$ a LCR quedava força reduïda quan el grup de gossos amb LCD es subdividia en: 1) LCD1, caracteritzat per gossos amb nivells similars d' $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ a LCR als dels grups Control i sCD, però amb els nivells d' $A\beta_{40}$ plasmàtic més elevats que la resta de grups($p=0.009$) (Fig.4.6A, B, C); 2) LCD2, caracteritzat per gossos amb els nivells més elevats d' $A\beta_{42}$ ($p=0.018$), i nivells d' $A\beta_{40}$ plasmàtic i a LCR similars als grups Control i sCD (Fig.4.6C). Quan s'aplica aquesta nova classificació als nivells de proteïna plasmàtica, plaquetes i reticulòcits, les diferències anteriors només s'observen en el grup LCD1 ($p=0.009$, 0.024 i 0.010 , respectivament). Per últim, el Qalb només correlacionava amb l'edat només en els grups ($R^2= 0.56$, $p=0.0008$) (Fig. 4.6D).

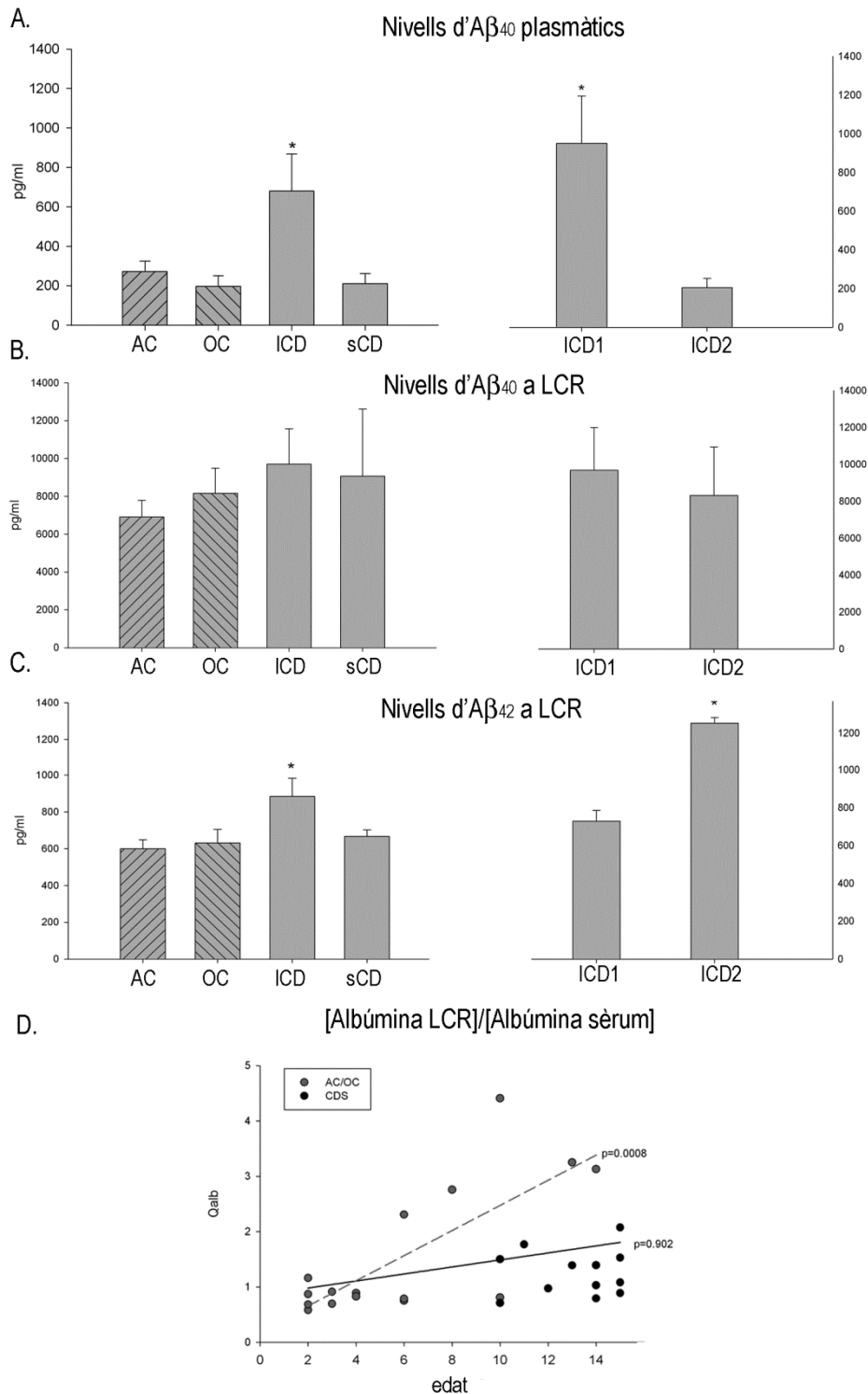


Fig.4.6 Nivells d'Aβ₄₀ i Aβ₄₂ plasmàtics i a LCR a gossos sense CDS (AC i OC) i amb CDS (ICD i sCD) i correlació del Qalb amb l'edat. Els nivells plasmàtics d' Aβ₄₀ (A) són diferents en els gossos amb ICD (p=0.029). En aquest grup, els nivells d'Aβ₄₂ a LCR (C) també són més elevats que els dels altres grups (p=0.018). Dintre del grup amb ICD, es diferencien dos sub-grups: ICD1, a on els gossos presenten nivells plasmàtics d'Aβ₄₀ elevats (p=0.0009) (A) i ICD2, a on els gossos presenten nivells d' Aβ₄₂ a LCR elevats (p=0.018) (C). No es detecten diferències en els nivells d' Aβ₄₀ a LCR entre grups (B). El Qalb correlaciona fortament amb l'edat quan es contemplen els grups control (p=0.0006, r²=0.56). Quan es fa la mateixa correlació entre els grups AC i CDS, la correlació desapareix (p=0.902) (D).

4.2.2.2 La immunització provoca una millora cognitiva en els gossos amb CDS acompanyada d'un augment de la ràtio A β plasma/LCR

A dia 31 els gossos CDS immunitzats van presentar una davallada del 30% dels valors de test cognitiu. (Fig.4.7), mantenint-se fins a dia 51. En el grup placebo s'observava una tendència a la disminució, que reflecteix probablement la millor atenció prestada per l'amo i el veterinari al gos. Degut als problemes trobats perquè els amos fessin els seguiment els 131 dies, només 2 dels gossos immunitzats van ser avaluats al final de l'estudi. Els dos animals van presentar valors més baixos en el test, comparats amb els seus valors a dia 31 i 51 (Valors del Test= 11 i 9).

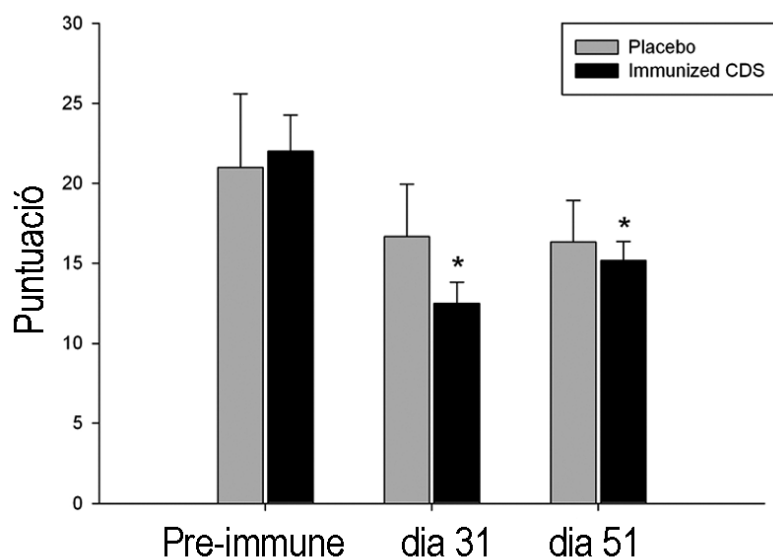


Fig.4.7 Avaluació dels canvis de comportament durant l'estudi d'immunització. Es va realitzar mitjançant els test cognitiu validat a dies 0, 31, 51, i 131. A dia 31, ja es detecten canvis en tots els gossos, però només en els gossos tractats les diferències són significatives (p=0.027).

En quan a l'evolució dels paràmetres bioquímics i hematològics, només es va detectar canvis en la AP amb valors més elevats en els gossos de companyia (Taula4.2) a dia 71 i 131 (p=0.023 i 0.049, respectivament), probablement deguts als hàbits alimentaris irregulars causats pels amos.

Taula 4.2 Rang de valors dels paràmetres bioquímics i hematològics durant l'estudi d'immunització

Paràmetres Hematològics	Placebo	Immunized AC	Immunized CDS	Rang
Cèl·lules de la sèrie blanca	6.49±0.68-10.88±1.58	6.08±0.99-11.10±0.416	6.99±1.15-0.86±1.26	5.05-16.76
Limfòcits	1.30±0.15-2.20±0.66	1.05±0.16-2.33±0.74	1.07±0.21-2.30±0.54	1.05-5.10
Monòcits	0.42±0.81-1.18±0.19	0.45±0.11-0.98±0.15	0.43±0.05-1.04±0.15	0.16-1.12
Neutròfils	4.38±0.50-13.00±8.52	4.21±0.52-8.06±0.13	4.18±1.59-6.67±1.38	2.95-11.64
Eosinòfils	0.22±0.05-0.37±0.10	0.31±0.04-0.72±0.16	0.19±0.08-0.43±0.11	0.06-1.23
Basòfils	0.02±0.004-0.06±0.01	0.02±0.005-0.06±0.01	0.02±0.006-0.05±0.01	0.00-0.10
Hematòcrit	46.88±2.51-48.83±1.07	47.06±1.46-57.90±1.13	41.27±4.73-47.82±6.57	37.3-61.7
Hemoglobina	14.45±0.48-16.13±0.55	14.96±0.41-18.63±0.41	13.700±1.35-5.27±0.56	13.1-20.5
Reticulòcits	29.86±8.71-42±4.80	37.80±4.08-64.13±9.95	29.81±4.49-43.41±7.93	6.6-100.7
Plaquetes	178.33±31.07-381.25(±84.86	221.67±5.17-18.33±25.20	285.50±40.77-343±41.51	148-484
Paràmetres Bioquímics	Placebo	Immunized AC	Immunized CDS	Rang
Fosfatasa Alcalina (AP)	105.33±6.32-238.83±48.01	89.33±18.50-165.00±72.39	403.71±136.59-760.71±256.45	23-212
Glutamat Piruvat Transaminasa (GPT)	41.33±9.49-119.833±51.46	39.67±9.82-80.67±18.80	99.66±22.44-161.66±25.26	0-100
Creatinina	0.793±0.11-1.10±0.07	0.79±0.08-1.04±0.02	0.87±0.11-1.13±0.15	0.5-1.8
Urea	33.25±3.62-64.31±15.92	24.43±3.76-58.5±3.77	40.52±8.98-106.21±36.67	18-60
Proteïna Total	6.20±0.115-6.66±0.287	5.90±0.06-6.80±0.15	6.55±0.13-7.45±0.21	5.2-8.2
Glucosa	100.50±12.41-115.66±6.35	98.00±10.01-128±6.50	89.80±4.54-107.28±5.35	74-143

Rang de valors (±s.d) dels paràmetres bioquímics i hematològics mesurats durant l'estudi d'immunització. Els valors en negreta de la Fosfatasa Alcalina (AP) presenten diferències significatives en els gossos de companyia.

El Qalb va restar semblant en tots els grups durant tot l'estudi d'immunització (Dades no mostrades).

D'altra banda, els nivells d'A β ₄₀ plasmàtic a gossos AC immunitzats tendien a incrementar fins a dia 41. La mateixa tendència, però amb més variabilitat, s'observava en el grup de gossos amb CDS immunitzats ([Fig.4.8A](#)). A LCR, els nivells d'A β ₄₀ al grup de gossos AC immunitzats presentaven una valors similars al grup placebo, mentre que els nivells d' A β ₄₂ presentaven un pic màxim a dia 131 (p=0.034). En el grup de gossos amb CDS immunitzats aquests valors d'A β ₄₀ a LCR tendien a baixar ([Fig.4.8B](#)), i els d' β ₄₂ eren més baixos a dia 51 (p=0.049) ([Fig.4.8C](#)). Quan es calculava la ràtio entre l'A β plasma/LCR, es detectava una la tendència a l'augment només en el grup amb CDS immunitzat ([Fig.4.8D](#)). Si aquesta ràtio es calculava només en els gossos LCD1, resultava significativa a dia 51 (p=0.0211) ([Fig.4.8H](#)) respecte els AC immunitzats i els placebo.

En quan als nivells d'IgG anti-A β ₄₀ a sèrum, els gossos Control immunitzats van presentar un màxim a dia 31, que restava augmentat fins a dia 51 i amb diferències significatives respecte als seus valors pre-immunes (p=0.0042) i als del grup Placebo (p=0.0079). Els nivells d'anticossos tornaven progressivament a nivells basals fins a dia 131. En els gossos amb CDS immunitzats, les IgG anti-A β ₄₀ a sèrum presentaven un pic màxim a dia 71 amb diferències significatives respecte els seus valors pre-immune (p=0.0078) i als del grup Placebo (p=0.0022) ([Fig.4.8E](#)), retornant igualment a nivells basals fins a dia 131. A LCR les IgG anti-A β ₄₀ en gossos Control immunitzats s'apujaven significativament a dia 51 comparats amb els seus valors pre-immune(p=0.0042) i els del grup Placebo (p=0.0078). El grup d'animals amb CDS immunitzats, presentava una tendència similar, però amb valors més baixos ([Fig.4.8F](#)). A més a més, entre les IgG anti-A β ₄₀ a LCR i a sèrum s'observava una correlació linear positiva (r²=0.53, p=0.0013) ([Fig.4.8I](#)). Per últim, només en el grup de gossos amb CDS immunitzats, la ràtio entre les IgG anti-A β ₄₀ i l'A β ₄₀ plasmàtic era d'1/25 amb una correlació linear positiva (r²=0.362, p=0.0049) en tots els dies de l'estudi ([Fig.4.8D](#)).

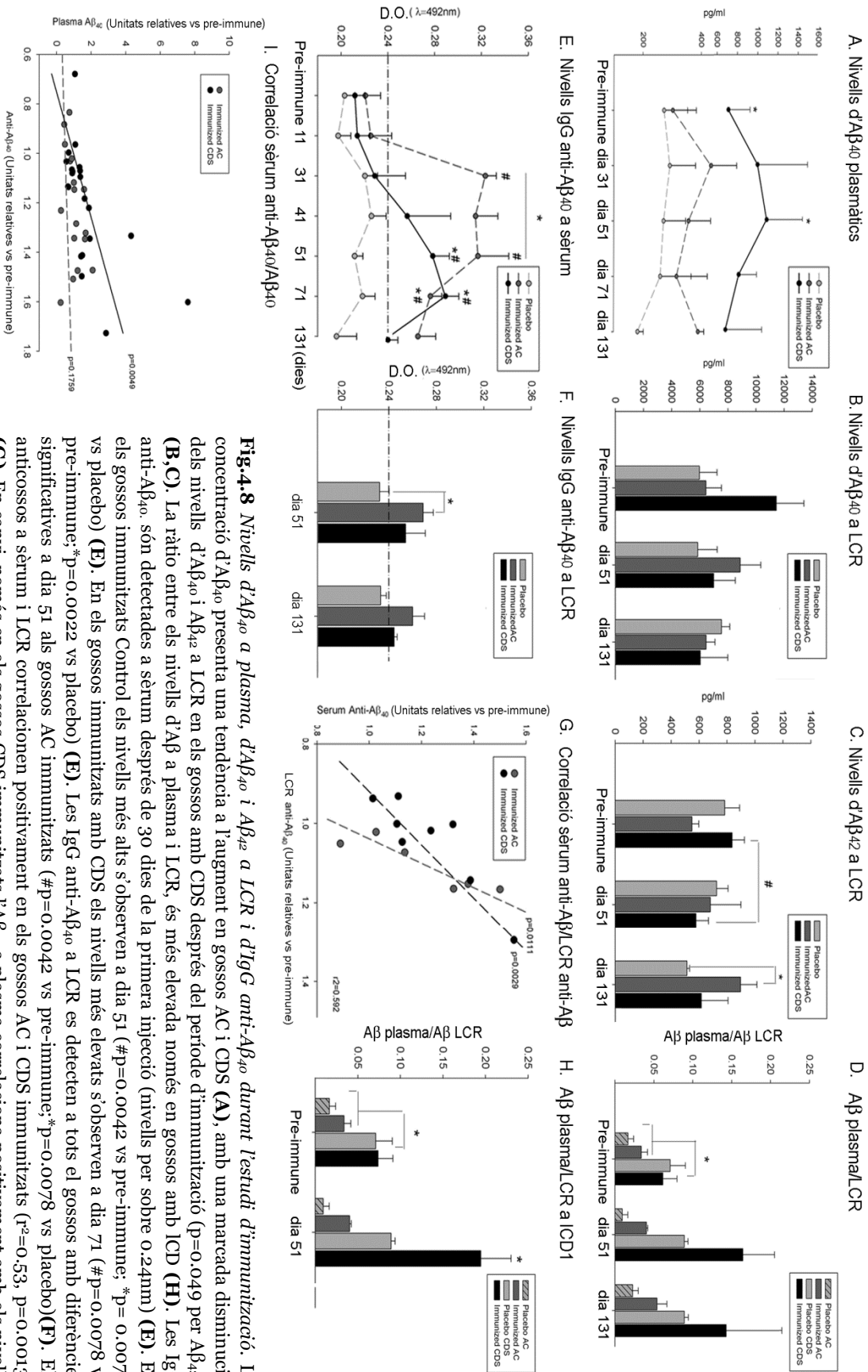


Fig.4.8 Nivells d'Aβ₄₀ a plasma, d'Aβ₄₀ i Aβ₄₂ a LCR i d'IgG anti-Aβ₄₀ durant l'estudi d'immunització. La concentració d'Aβ₄₀ presenta una tendència a l'augment en gossos AC i CDS (A), amb una marcada disminució dels nivells d'Aβ₄₀ i Aβ₄₂ a LCR en els gossos amb CDS després del període d'immunització (p=0.049 per Aβ₄₂) (B,C). La ràtio entre els nivells d'Aβ a plasma i LCR, és més elevada només en gossos amb ICD (H). Les IgG anti-Aβ₄₀ són detectades a sèrum després de 30 dies de la primera injecció (nivells per sobre 0.24mm) (E). En els gossos immunitzats Control els nivells més alts s'observen a dia 51 (#p=0.0042 vs pre-immune; *p= 0.0079 vs placebo) (E). En els gossos immunitzats amb CDS els nivells més elevats s'observen a dia 71 (#p=0.0078 vs pre-immune;*p=0.0022 vs placebo) (E). Les IgG anti-Aβ₄₀ a LCR es detecten a tots el gossos amb diferències significatives a dia 51 als gossos AC immunitzats (#p=0.0042 vs pre-immune;*p=0.0078 vs placebo)(F). Els anticossos a sèrum i LCR correlacionen positivament en els gossos AC i CDS immunitzats (r²=0.53, p=0.0013) (G). En canvi, només en els gossos CDS immunitzats l'Aβ₄₀ a plasma correlaciona positivament amb els nivells d'anti-Aβ₄₀ (r²=0.362, p=0.0049) (I).

4.3 ESTUDI “EX VIVO”: CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA GENERADA PER LA VACUNA ANTI-AMILOIDE. EFECTES DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA A SNC.

Un cop finalitzat l'estudi d'immunització en gossos, en el qual s'observava que la vacuna V5 induïa una millora cognitiva i l'eliminació d'A β de SNC cap a perifèria en gossos amb CDS, es realitzà l'estudi “*ex vivo*” per avançar en els coneixements dels efectes produïts per la vacuna. Amb les mostres de fluids dels gossos immunitzats, es van caracteritzar els anticossos i la capacitat d'aquests de reconèixer les formes solubles e insolubles de l'A β . Amb les mostres de teixit cerebral gossos immunitzats i no immunitzats, es va realitzar tres tipus d'estudi; 1) Estudi per detectar possibles micro-hemorràgies intracerebrals associades al procés immunització.; 2) Deposició d'amiloide en funció de la edat, el grau de dèficit cognitiu i canvis causats per la immunització, 3) Relació entre reactivitat astro- i microglial i edat, dèficit cognitiu, disposició d'amiloide i immunització.

4.3.1 Procediment

4.3.1.1 *Caracterització de la resposta immunitària*

La capacitat de reconeixement de les formes solubles de l'amiloide dels anticossos generats en gossos es va caracteritzar emprant el sèrum de 3 gossos AC immunitzats i de 4 gossos CDS immunitzats. Tal i com s'havia fet a l'estudi anterior, s'afegiren fragments del pèptid A β_{40} (1-11, 12-28, 29-40) o tot el pèptid sencer al sèrum obtingut a dia 51 i dia 71 després de la primera immunització. Per extrapolació a la recta patró (D.O basals de fons de reactius amb i sense mostra) es calculà els percentatge d'inhibició provocat pels diferents fragments d'A β .

Percentatge d'inhibició = 100 - (D.O (mostra + fragment A β) - constant / pendent de la recta)

Per tal de mesurar la capacitat de reconeixement de les formes insolubles de l'amiloide dels anticossos generats en gossos es va fer la detecció immunohistoquímica de plaques d'amiloide a mostres d'hipocamp humà amb

MA d'estadi Braak&Braak (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002) II i VI. Com a anticòs primari s'usà el sèrum total extret a dia 51 de 3 gossos AC i 4 CDS que havien estat immunitzats o les IgG anti-A β_{40} purificades. Per quantificar les plaques d'amiloide es van realitzar 5 microfotografies semi-atzaroses a 10x de cada mostra, de 0.21mm². Posteriorment, es va quantificar el nombre de plaques de cada micrografia calculant-se el n^o de plaques/mm², relativitzant-se respecte el n^o de plaques/mm² del control positiu (anticossos comercials). Per últim, s'observà si les plaques que es detectaven amb els anticossos purificats colocalitzaven amb plaques ThT positives. Per això, es va fer una detecció doble amiloide-ThT a mostres d'escorça de cervell de pacients amb la MA d'estadi II i es van observar a 20x amb microscòpia de fluorescència

4.3.1.2 Efectes de la resposta immunitària en el SNC

Per detectar si els animals havien presentat micro-hemorràgies cerebrals degudes a la immunització es van tenyir les mostres amb Blau de Prússia per observar microscòpicament els cúmuls de Fe²⁺.

Per detectar els canvis en la deposició d'amiloide i en la reactivitat glial es van observar microscòpicament les mostres que havien estat tenyides immunohistoquímicament amb marcadors d'amiloide i astroglials. En aquest estudi es van usar un total de 19 mostres de cervell d'escorça frontal de gossos que segons l'edat, el grau de deteriorament cognitiu i si havien rebut immunització, es van classificar en: gossos adults i que no havien rebut immunització (AC; n=3); gossos vells, sense demència i que no havien rebut immunització (OC; n=3); gossos vells amb CDS i que no havien rebut immunització (CDS; n=8); gossos adults que havien rebut immunització (immunized AC; n=1); gossos vells sense demència que havien rebut immunització (immunized OC; n=3); i gossos vells amb CDS a l'inici del període d'immunització (immunized CDS; n=1) (taula4.3). Es van observar a diversos augments amb microscòpia òptica.

Per últim, els canvis en la reactivitat microglial es van detectar mitjançant marcatge específic de la [³H] PK11195 per autoradiografia "*in vitro*". En aquest estudi es van usar un total de 14 mostres d'hipocamp, d'escorça entorrinal, i

escorça pre-frontal de gossos. D'aquests gossos, 4 no presentaven dèficit cognitiu i no havien rebut immunització (AC-OC), 5 presentaven diversos graus de dèficit cognitiu i no havien rebut immunització i 5 més (amb o sense dèficit cognitiu) havien estat immunitzats (Veure [taula 4.3](#)). Dels gossos que havien rebut immunització només es disposava de mostres d'hipocamps i escorça entorrinal.

Taula 4.3 Mostres per l'estudi d'efecte de la resposta immunitària en el SNC

Id	Raça	Edat	Grup	Estadi plaques	Estudi
1	Beagle	3	AC	0	1/2
2	Cocker	1	AC	0	1
3	Canitx	6	AC	0	1
4	Mestís	1	AC	0	2
5	Mestís	7	AC	0	2
6	Schnauzer	8	OC	I	1/2
7	Yorkshire	8	OC	0	1
8	Canitx	15	OC	I	1
9	Pastor Alemán	10	LCD	II	1/2
10	Canitx	11	LCD	II	2
11	Mestís	13	LCD	III-IV	1/2
12	Boxer	15	LCD	I	1
13	Mestís	14	SCD	0	1
14	Canitx	14	SCD	II	1
15	Pequinés	15	SCD	III-IV	1
16	Mestís	16	SCD	III-IV	1/2
17	Fox Terrier	16	SCD	III-IV	2
18	Mestís	20	SCD	III-IV	1
19	Beagle estabulat	6	Immunized AC	0	1/2
20	Beagle estabulat	8	Immunized OC	0	1/2
21	Mestís	12	Immunized OC	Immunized	1/2
22	Mestís	13	Immunized OC	Immunized	1/2
23	Mestís	15	Immunized CDS	Immunized	1/2

19 mostres d'escorça pre-frontal de gossos de diferent edat, raça i dèficit cognitiu van ser usades per a la detecció de micro-hemorràgies i reacció per a l'estudi de reacció astrogliàl **(1)**. 14 mostres d'hipocamp de gossos de diferent edat, raça i dèficit cognitiu van ser usades per a l'estudi de reacció microglial **(2)**.

Per quantificar les plaques d'amiloide es van fer 5 microfotografies semi-atzaroses a 5x, cadascuna de 4mm². Després d'observar la forma i disposició de les plaques, es va mesurar l'àrea i densitat de les plaques, transformant les imatges a escala de grisos i quantificant-se posteriorment l'àrea en μm² i la densitat mitja de cada placa. La densitat de cada placa es va normalitzar respecte la densitat mitja de la mostra.

Per a la quantificació d'astròcits immunoreactius per GFAP i S100B a substància blanca, es van realitzar 5 microfotografies semi-atzaroses a 40x de la zona intersticial de cada mostra i es calculà la densitat mitja d'astròcits immunoreactius GFAP(+) i S100B(+). A més a més, es quantificà la intensitat del marcatge (densitat) a citoplasma dels astròcits S100B(+) tal i com s'havia fet per les plaques d'amiloide.

Per a la quantificació d'astròcits immunoreactius GFAP(+) i S100B(+) relacionats amb la placa també es van realitzar microfotografies semi-atzaroses de 5 plaques a 40X. Tal i com s'havia fet anteriorment es va mesurar àrea i densitat de placa i després es varen quantificar el nombre d'astròcits GFAP(+), S100B(+) que estaven a una distància màxima de 180μm de la part més externa de la placa. A part, als astròcits S100B(+) immunoreactius també se'ls va mesurar la intensitat del marcatge.

4.3.2 Resultats

4.3.2.1 *Les IgG anti-Aβ₄₀ dels gossos vacunats amb la barreja d' Aβ₁₋₄₀+ KLH-Aβ₁₋₄₀ reconeixen els epítops linears Aβ₁₋₁₁, les formes conformacionals de l'Aβ₄₀ soluble i les plaques difuses*

Les IgGs anti-Aβ₄₀ del grup CDS reconeixien millor les formes conformacionals d'Aβ₄₀ que les diferents formes linears (*p<0.001). En aquest grup, si comparàvem el percentatge de reconeixement dels epítops linears, observàvem que a dia 71 l'epítop Aβ₁₋₁₁ era el més reconegut (#p<0.001). El reconeixement de les diferents formes d'Aβ en el grup AC era molt variable, observant-se només diferències entre el reconeixement entre Aβ₄₀ conformacional vs Aβ₁₂₋₂₉ a dia 51 (\$p=0.0039). En els 2 grups s'observà una tendència reconèixer millor l'epítop Aβ₁₋₁₁ a dia 71 que a dia 51, sense diferències significatives (Fig.4.9)

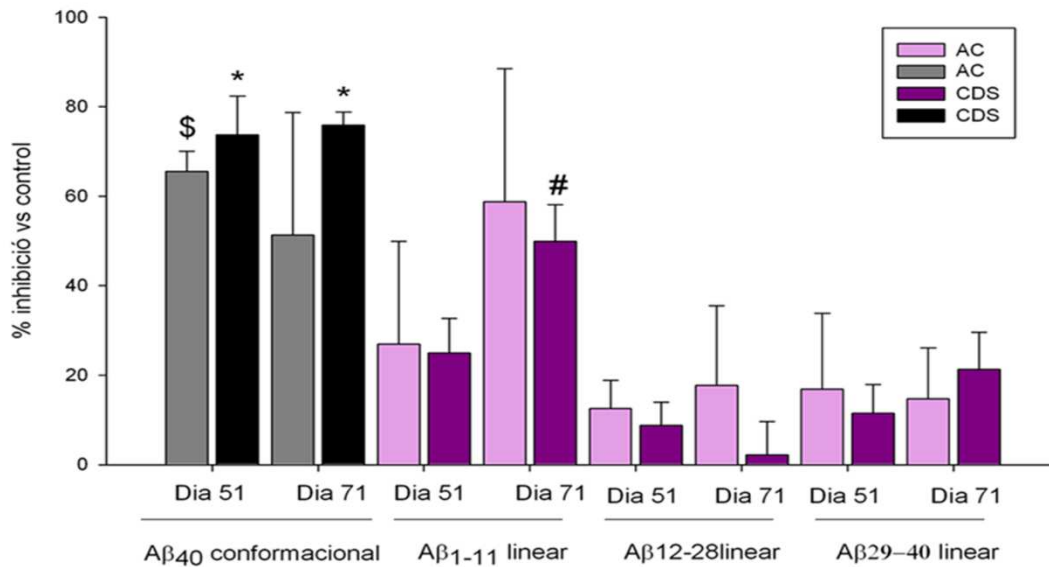


Fig.4.9 *Reconeixement de formes d'amiloidesoluble.* Les IgG anti-Aβ₄₀ de gos reconeixen les formes solubles de l'Aβ, majoritàriament conformacionals (*p<0.001) i N-terminals (#p<0.001) a dia 71 post-immunització en els gossos CDS.

Abans de purificar les IgG anti-Aβ₄₀, es va fer la detecció de plaques amb el sèrum total i/o doblement concentrat. La detecció no va ésser suficient per a poder extreure'n resultats concloents (Dades no mostrades). Després de purificar els anticossos, es van quantificar els anticossos de cada elució i es decidí realitzar la detecció immunohistoquímica a una concentració de 0.21mg/ml dels anticossos purificats. Es van detectar plaques sobre teixit cerebral humà amb MA estadi II i VI i s'observà que les mostres amb MA d'estadi II presentaven més plaques difuses que les d'estadi VI. Després de quantificar el nombre de plaques detectades amb els anticossos purificats i relativitzar-les respecte el n^o de plaques detectades amb els anticossos comercials, (fig.4.10A). s'observà que les IgG anti-Aβ₄₀ de gos detectaven millor les plaques a mostres de MA d'estadi II, majoritàriament difuses, (p=0.018) que a mostres de MA d'estadi VI. Els anticossos de gossos Control i CDS presentaven deteccions similars (Fig.4.10B). El nombre de plaques detectades en humans amb estadi II de la MA correlacionava amb el percentatge de reconeixement del pèptid Aβ₄₀ conformacional a dia 51 post-immunització

($p=0.050$, $r^2=0.551$) (Fig.4.910C). Els anticossos purificats, no co-localitzen amb les plaques ThT positives (fig.4.10A).

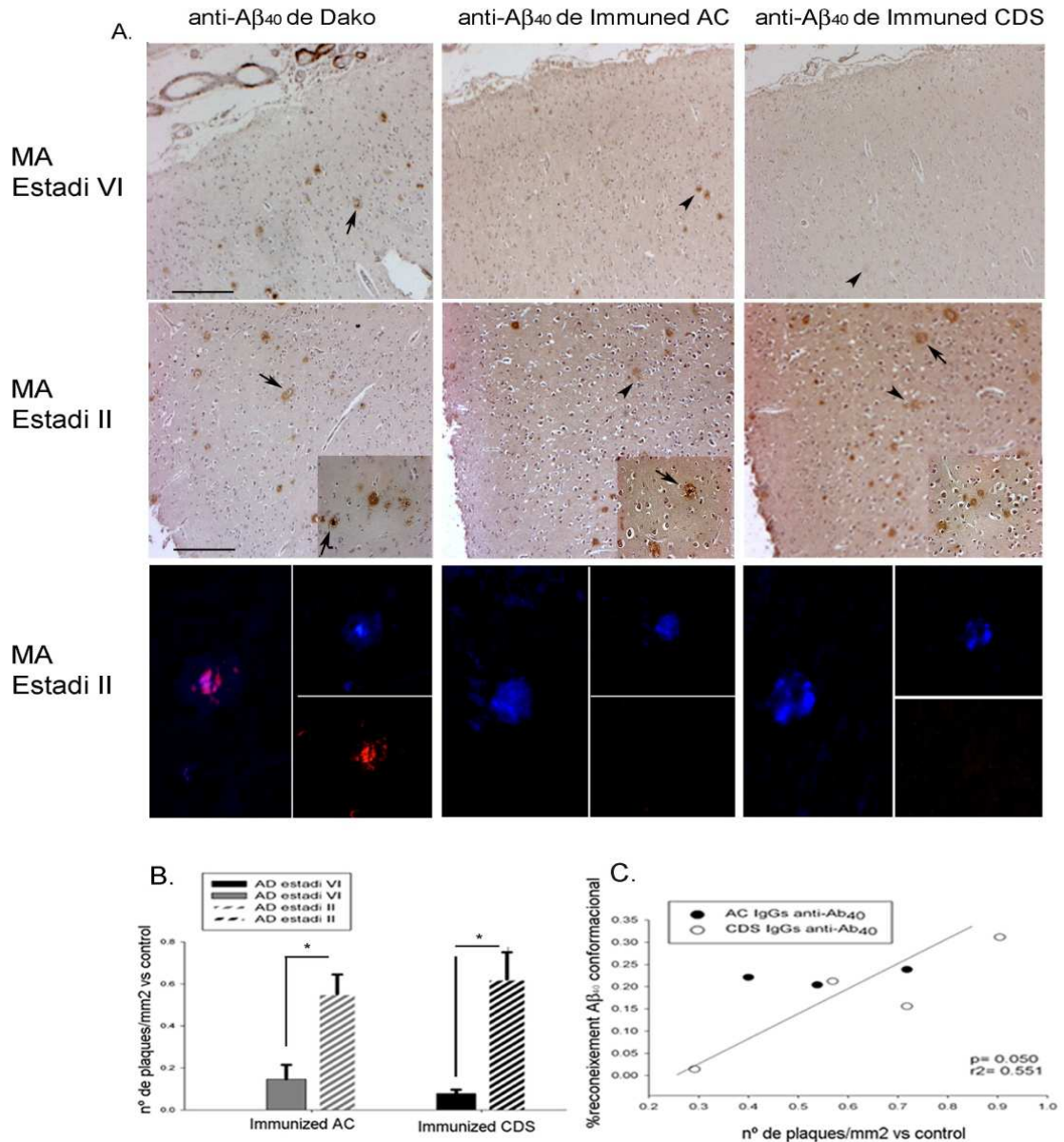


Fig.4.10 Reconeixement de formes d'amiloide insolubles de les IgG anti-A β_{40} de gos. Les IgG anti-A β_{40} de gos també reconeixen millor les plaques d'amiloide sobre teixit cerebral amb la MA d'estadi II, a on majoritàriament les plaques són de tipus difús (\blacktriangle) que amb MA d'estadi VI, a on majoritàriament les plaques són de tipus neurític (\blacktriangledown) ($p=0.018$) (A). El marcatge de plaques amb els anticossos purificats no co-localitza amb les plaques ThT positives (A). El percentatge de reconeixement de les plaques marcades amb els anticossos purificats correlaciona amb el percentatge de reconeixement de les formes solubles conformacionals ($p=0.050$, $r^2=0.551$) (D). Barra; immunohistoquímica=100 μ m i 10 μ m. Barra immunofluorescència=10 μ m.

4.3.2.2 No es detecten cúmuls de Fe^{2+} en cap dels gossos immunitzats

Cap de les mostres d'escorça pre-frontal de gossos vacunats i no vacunats observades presentava cúmuls de Fe^{2+} al voltant dels vasos, indicant manca d'extravasació cerebral (Fig.4.11).

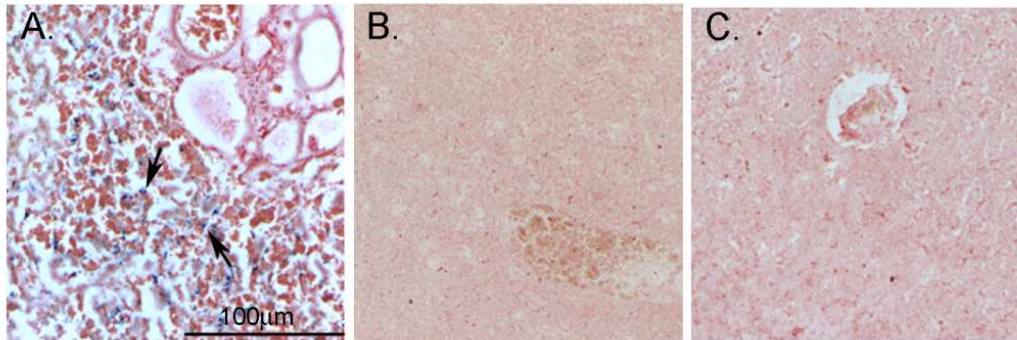


Fig.4.11 Detecció de cúmuls de Fe^{2+} amb tinció d'hemosiderina. A fetge (A) es poden observar cúmuls de Fe^{3+} perivasculars Tant a gossos no vacunats (B) com a gossos vacunats (C), no s'observen cúmuls de Fe^{2+} perivasculars.

4.3.2.3 Els gossos vacunats amb la barreja d' $A\beta_{1-40}$ i $KLH-A\beta_{y-40}$ presenten plaques d'amiloide més denses que no correlacionen amb el dèficit cognitiu

Els 3 gossos AC, juntament amb un gos OC i un amb dèficits cognitius severos que no havien rebut la vacuna no presentaven plaques d'amiloide (n=5). Tampoc se'n va detectar als gossos AC i OC immunitzats.(n=2) (taula4.3). La resta de mostres de gossos presentaven plaques difuses de diferent nombre, àrea, densitat i disposició i basant-nos en estudis nostres previs, van ser classificades en:

- 1) Mostres amb plaques d'estadi I/II de deposició, amb nombre escàs de plaques d'àrea gran i poc denses, i que es trobaven a les capes més profundes de l'escorça (capes V-VI) (n=2)
- 2) Mostres amb plaques d'estadi II de deposició, amb un nombre més abundant de plaques, d'àrea més petita i d'aspecte de núvol, a les capes més superficials de l'escorça (n=3)

- 3) Mostres amb plaques d'estadi III/IV de deposició, que presentaven plaques més nombroses, de menor àrea i més denses, a les capes més superficials (capes II-III) o per totes les capes de l'escorça(n=5)
- 4) Mostres de gossos immunitzats amb plaques més petites i més denses que les d'estadi III i IV localitzades a les capes més superficials o repartides per totes les capes(n=3) ([taula4.3](#), [fig.4.12A](#)).

L'anàlisi estadístic comparant l'àrea i densitat de les plaques entre grups evidencià una tendència a la disminució de l'àrea en les plaques d'estadi III-IV respecte les plaques d'estadi I-II, que resultava significativa pels gossos immunitzats ($p=0.036$)([Fig.4.12B](#)). En canvi, la densitat de les plaques presentava tendència a l'augment amb diferències significatives entre gossos vacunats i gossos amb plaques d'estadi I-II ($p=0.032$) ([Fig.4.12C](#)). Per últim, en gossos que no havien rebut immunització, s'observà que el grau de dèficit cognitiu es correlacionava negativament amb l'àrea mitja de les plaques d'amiloide ($p=0.0021$; $r^2=0.871$)([fig.4.12D](#)) i positivament amb l'estadi de deposició de les plaques ($p=0.0013$; $r^2=0.499$) (dades no mostrades). Aquestes correlacions es mantenen quan es corregien per l'edat dels animals.

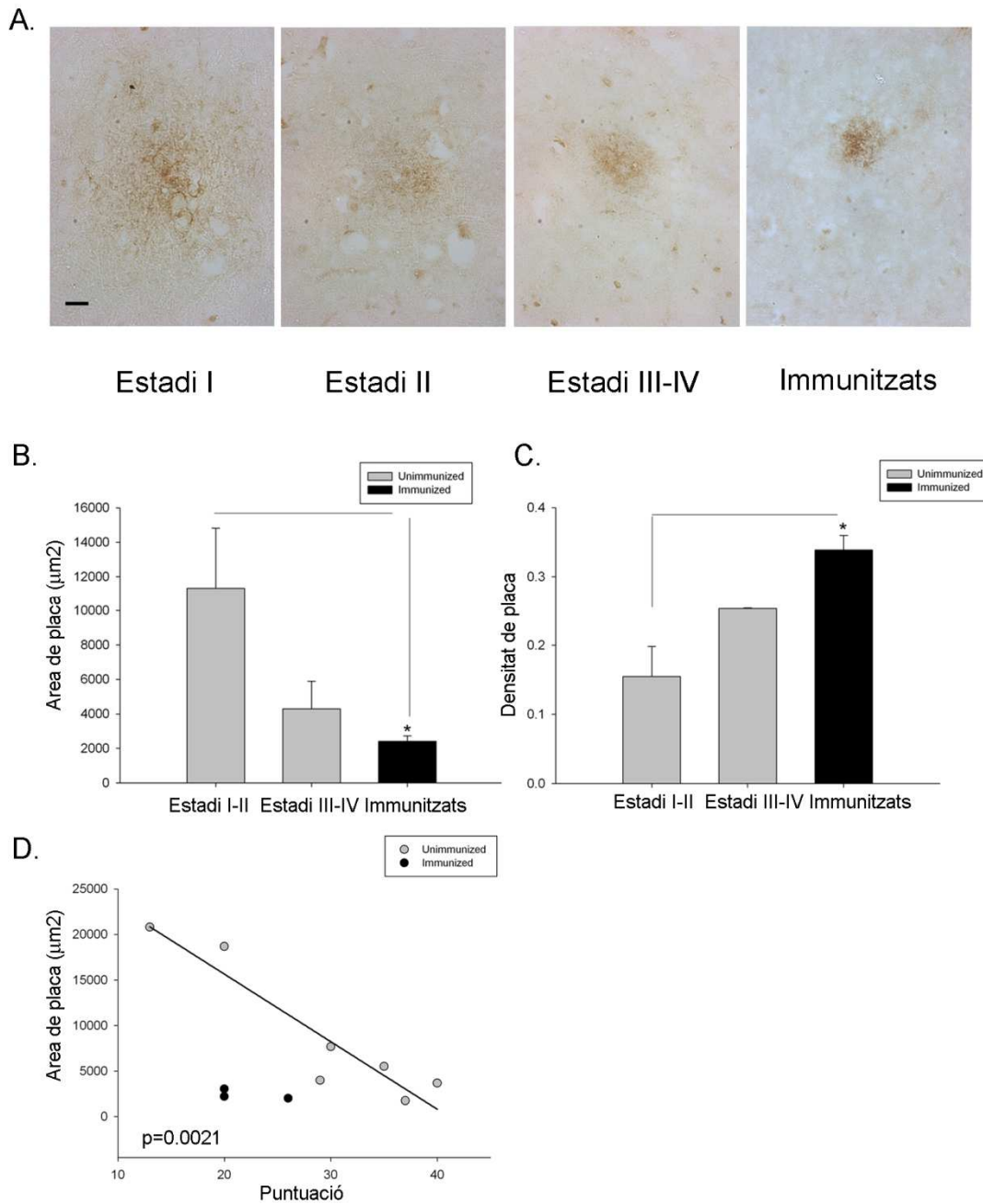


Fig.4.12 Plaques de diferents estadis de deposició(A). Les plaques d'estadi I i II de deposició són més escasses, a zones més internes d'escorça i amb àrea més gran i menys denses.(A,B,C) Les plaques amb estadi III-IV són més abundants, a capes més externes o repartides per totes les capes, amb una àrea més petita i més denses (A,B,C). Les plaques dels gossos que han estat immunitzats presenten una àrea més petita i són més denses amb diferències significatives respecte les d'estadi I i II ($p=0.036$ per àrea; $p=0.03$ per densitat) (A,B,C). En els gossos que no han rebut la vacuna, l'àrea de les plaques correlaciona amb el dèficit cognitiu. (D): Barra=100µm

4.3.2.4 Els gossos vacunats amb la barreja d' $A\beta_{1-40}$ KLH- $A\beta_{1-40}$ presenten menys nombre d'astròcits S100B (+) i amb menys activació

A substància blanca, el nombre d'astròcits GFAP (+), S100B(+) i la intensitat del marcatge S100B(+) era similar a les mostres de gossos no vacunats quan es comparaven segons estadi de deposició de plaques i grau de dèficit cognitiu (Fig.4.13A). En aquestes mostres, el nombre d'astròcits GFAP(+) correlacionava positivament amb el nombre d'astròcits S100B(+), correlació inexistente en els gossos immunitzats (Fig.4.13B). En aquest últim grup, s'observà una menor intensitat de marcatge i activació dels astròcits S100B(+) a en comparació al grup de gossos no vacunats ($p < 0.0001$) (Fig.4.13A, C).

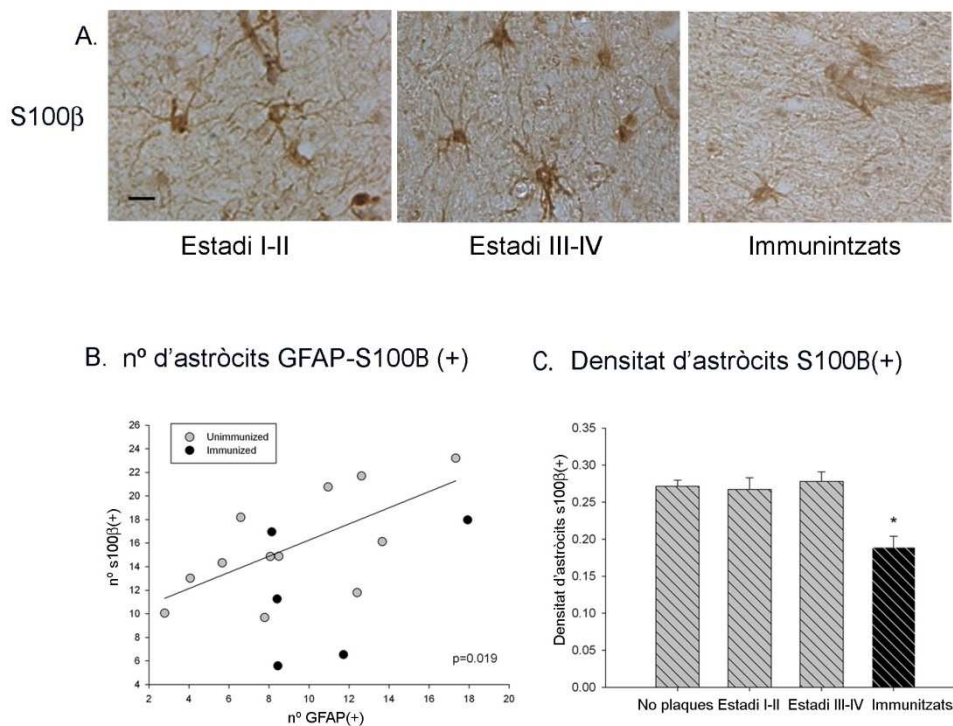


Fig.4.13 Astròcits positius per GFAP i S100B a substància blanca (A). Els astròcits S100B(+) a gossos vacunats presenten un marcatge menys intens ($p < 0.0001$ vs no vacunats) (A,C). A més, el nombre d'astròcits s100B(+) correlaciona amb el nombre de GFAP(+), només en els gossos no vacunats. Barra=10 μ m

Quan es va considerar la placa com a entitat única i s'analitzà la reacció astrogliol al voltant de les plaques, s'observà que el nombre d'astròcits GFAP(+) era superior a gossos amb plaques d'estadis III-IV($p < 0.005$) respecte a la resta de grups i també superior al nombre d'atròcits S100B(+) ($p = 0.021$ vs estadis II, III-IV i vacunats) Fig.4.14A, B. El nombre d'astròcits S100B(+) era superior a gossos amb plaques d'estadi I respecte la resta de grups ($p < 0.001$). En aquest grup, el nombre d'astròcits S100B(+) era superior al nombre astròcits GFAP(+) ($p < 0.0032$) vs estadis I, II, i vacunats) Fig.4.14 A, B. El nombre i densitat dels astròcits S100B (+) era inferior en gossos vacunats respecte els no vacunats ($p = 0.016$ per nombre vs estadi III-IV; $p = 0.026$ per densitat vs estadi III-IV) Fig4.14 A,B,C.

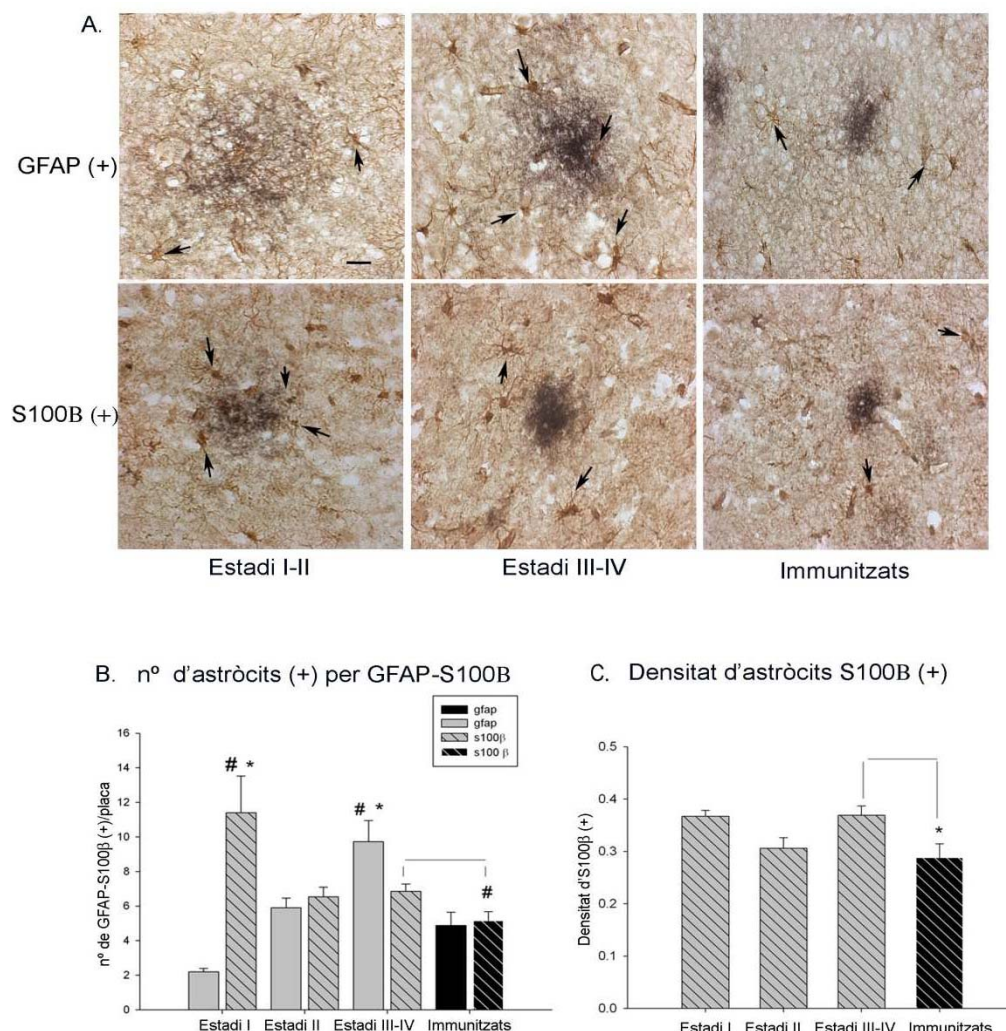


Fig.4.14 Astròcits positius per GFAP i S100B al voltant de les plaques d'amiloide (A). Els astròcits GFAP(+), són més abundants en estadis III-IV ($p = 0.005$) (A,B). Els astròcits s100B(+) són més abundants a plaques d'estadi I ($p < 0.001$) (A,B). Rodejant les plaques dels gossos que han rebut la vacuna (A) hi ha menys astròcits positius per GFAP i S100B ($p = 0.016$ de S100β vs d'estadi III-IV) (B). Aquests astròcits S100B(+) estan menys activats i presenten un marcatge menys intens ($p = 0.026$ vs estadi III-IV) (C). Barra=10μm

4.3.2.5 *La concentració del [3H]PK11195 unit al PBR es correlaciona amb l'edat, el dèficit cognitiu i estadi de plaques a escorça pre-frontal*

Per analitzar la reacció microglial, es va mesurar la concentració del [3H]PK11195 a l'hipocamp, escorça entorrinal i escorça pre-frontal, comparant-la segons edat, grau de dèficit cognitiu, estadi de plaques i immunització.

La concentració del lligand a hipocamp era més elevada que a l'escorça entorrinal i pre-frontal, ($p=0.0025$), sense diferències significatives entre gossos vacunats i no vacunats (fig.4.15E).

A l'hipocamp, la concentració de [3H]PK11195 unit al PBR no correlacionava amb l'edat, grau de dèficit cognitiu, estadi de plaques ni la immunització. A l'escorça entorrinal, la concentració del lligand correlacionava positivament amb l'edat ($p=0.011$; $r^2=0.574$), però no amb el dèficit cognitiu ni amb l'estadi de deposició de les plaques (Fig.4.15B). A l'escorça pre-frontal, la concentració de [3H]PK11195 també es correlacionava amb l'edat ($p= 0.037$; $r^2=0.437$), el dèficit cognitiu ($p= 0.0214$; $r^2=0.441$) i amb l'estadi de deposició de les plaques ($p= 0.0186$; $r^2=0.526$), un cop corregit per l'edat (fig.4.15C, D). Aquesta correlació era molt més evident en les capes més internes de l'escorça pre-frontal (capes III-IV) (fig.4.15A).

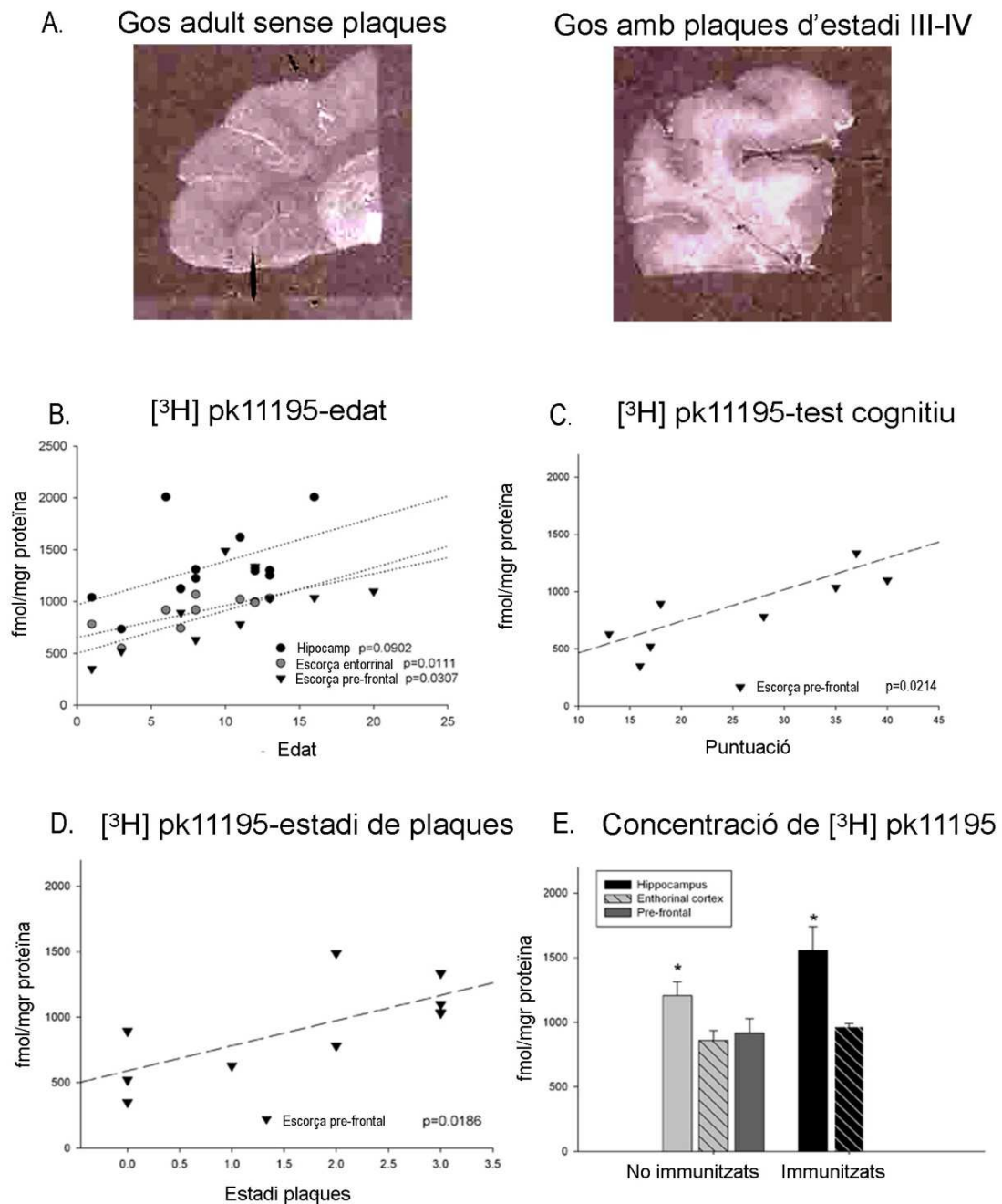


Fig.4.15 Concentració $[^3\text{H}]$ PK11195 segons edat, dèficit cognitiu, estadi de deposició de plaques i immunització. Observis la diferència d'intensitat de blanc, sobretot a les capes internes de l'escorça (IV-VI), entre gossos joves sense plaques i gossos amb CDS amb plaques d'estadi III-IV (A). La concentració $[^3\text{H}]$ PK11195 unida al PBR es correlaciona positivament amb l'edat a escorça entorrinal i pre-frontal ($p=0.011$; $r_2=0.574$ i $p=0.037$; $r_2=0.437$ respectivament) (B). Tanmateix, es correlaciona positivament amb el dèficit cognitiu i estadi de deposició de plaques a escorça pre-frontal un cop corregit per l'edat, ($p=0.0214$; $r_2=0.441$ i $p=0.0186$; $r_2=0.526$ respectivament)(C,D). En general la concentració de $[^3\text{H}]$ PK11195 és més elevada a hipocamp que a escorça ($p=0.025$) (E), sense diferències significatives després d'immunització.

Capítol 5

DISCUSSIÓ

Per tal de desenvolupar una vacuna original adient per tractar el dèficit cognitiu en gossos, primer es va realitzar una àmplia recerca bibliogràfica per poder decidir el disseny d'una vacuna activa que sigui eficaç i sense efectes secundaris (Lichtlen and Mohajeri, 2008). Seguint el protocol de preparació suggerit per (Lane et al., 1988) i d'altres autors (Head et al., 2006) es decidí investigar en conills 5 vacunes formades de diferents fragments d'A β , i amb el mateix adjuvant (alum®) a fi de seleccionar-ne la de major interès immunogen per poder vacunar gossos. L'Alum és un dels adjuvants més usats i segurs en la formulació de la majoria de vacunes per a humans i veterinària (Exley et al.; Lindblad, 2004), gràcies a la resposta immunògena anti-inflamatòria induïda, i als pocs efectes secundaris que presenta.

5.1 *La barreja d'A β ₁₋₄₀+KLH-A β _{y-40} presenta una resposta immunògena potenciada i amb més capacitat per a reconèixer diverses formes d'amiloide. Aquesta capacitat es veu modificada en gossos per processos de maduració per afinitat i per edat.*

El seguiment del procés d'immunització en els conills permet observar que la vacuna dissenyada amb la combinació dels 2 fragments A β ₁₋₄₀+KLH-A β _{y-40} genera les titulacions d'anticossos més altes que amb els dos pèptids aïllats, i sense presentar els efectes secundaris descrits amb les respostes a fragments N o C terminals. L'estudi de reconeixement d'epítops linears mostra que els anticossos generats per la vacuna formada amb el pèptid A β _{y-40} reconeixen majoritàriament el fragment C-terminal d'A β ₄₀, però passen a reconèixer majoritàriament el fragment N-terminal d'A β ₄₀ i amb una resposta immunògena potenciada si la vacuna inclou també el pèptid A β ₁₋₄₀. Diversos estudis amb vacunes dissenyades a partir de diferents fragments aïllats d'A β demostren que els epítops més immunògens es troben a la regió N-terminal de l'A β (Cribbs et al., 2003; Asami-Odaka et al., 2005; Axelsen et al., 2009; Lemere and Masliah, 2010). Per lo tant, els nostres resultats demostren que determinats fragments d'A β indueixen diferents respostes immunògenes i que la seva combinació pot canviar aquesta resposta, generant anticossos amb diferent capacitat de reconeixement cap a les formes linears i conformacionals d'A β

(formes monomèriques i/o fibril·lars d'amiloide de 40 i 42 aminoàcids). La selecció d'aquests fragments per formar una vacuna serà, doncs, un factor especialment important per assegurar la reducció de la càrrega d'amiloide central (Ramakrishnan et al. 2009).

D'altra banda, els nostres resultats mostren que mentre que les IgG anti-A β ₄₀ generades pel pèptid KLH-A β _{y-40} reconeixen només les plaques difuses (formades majoritàriament per amiloide de 42 aminoàcids), les generades per la barreja dels pèptids reconeixen les plaques difuses i les neurítiques (formades per amiloide de 40 i 42 aminoàcids), i co-localitzen amb les plaques tioflavina positives. Contràriament als resultats obtinguts amb els anticossos generats en conills, les IgG anti-A β generades per la immunització amb A β ₁₋₄₀-KLH-A β _{y-40} a gos detecten millor les plaques difuses a mostres humanes i no co-localitzen amb les plaques tioflavina positives. A més, el nombre de plaques difuses correlaciona positivament amb el percentatge de reconeixement de l'A β conformacional. La conformació que adopta l'A β als gossos generaria anticossos més afins a plaques difuses de gos mitjançant processos de maduració per afinitat (Miller et al., 2007; von Bubnoff, 2010). D'altra banda, estudis fets sobre plaques difuses a humans han demostrat que es poden diferenciar plaques fibril·lars i no fibril·lars, tot i que siguin tioflavina negatives (Kayed et al., 2007). S'haurien de dur a terme estudi similars per aclarir els resultats contradictoris sobre l'aspecte fibril·lar de les plaques difuses a gos (Yu et al.; Miyawaki et al., 2001).

D'acord amb altres autors (Vasilevko et al., 2010), el reconeixement d'epítops per part de les IgG anti-A β en el gos varia durant el procés d'immunització, per lo que l'afinitat cap a les diferents formes d'A β (monòmers, oligòmers o fibril·les) també hauria de variar en el temps. En els nostre estudi, a més a més, s'observen diferències en la detecció d'epítops segons l'edat del grup de gossos degudes, en part, a la variació amb l'edat de l'animal del grau de maduresa del sistema immune.

5.2 *S'ha establert una relació entre processos de dany oxidatiu, processos inflamatoris i de disposició d'amiloide característics d'estadis inicials de la CDS i de la MA, i diversos biomarcadors relacionats amb l'edat*

Estudis previs nostres han associat la patologia amiloide amb la CDS, demostrant una correlació positiva entre els estadis de maduració de la placa i el grau de disfunció cognitiva (Pugliese et al., 2006a, 2006b). A fi de poder monitoritzar els canvis moleculars induïts pel procés d'immunització en els diferents grups de gossos, es va investigar primer si uns biomarcadors perifèrics relacionats amb l'envelliment i l'homeòstasi d'A β podien variar segons el grau de disfunció cognitiva i l'edat dels animals.

Així doncs es va poder demostrar que només el grup LCD1 presentava nivells elevats de proteïnes plasmàtiques i baixos de reticulòcits, per lo que variacions en aquests dos paràmetres poden associar-se amb els estadis inicials de deposició amiloide en els quals participen l'estrès oxidatiu i la inflamació (Skoumalova et al., 2003; Pugliese et al., 2004). De fet, altres autors havien demostrat prèviament que els dos biomarcadors proposats estaven associats amb l'edat i l'estrès oxidatiu (Vajdovich et al., 1997).

En aquest mateix grup, també es trobà nivells elevats a plasma d'A β_{40} i plaquetes, lo que suggereix una relació entre els nivells d'A β_{40} plasmàtics i la disfunció cognitiva inicial. En humans, més específicament amb la DCLa, a on el progrés cap a la MA s'acompanya d'un augment de plaquetes determinades (Prodan et al., 2011). Aquesta hipòtesi estudiada per diversos grups en rosegadors i gossos, (Pomara et al., 2005; van Oijen et al., 2006; González-Martínez et al., 2011). no s'ha pogut validar encara degut als resultats contradictoris trobats, deguts en part, a les interferències analítiques causades per les propietats hidrofòbiques de l'A β que provoquen la seva unió massiva a l'albumina i altres proteïnes plasmàtiques.

Resultats no concloents s'han trobat també relacionant els nivells d'A β plasmàtic i la permeabilitat de la BHE, augmentada amb l'edat en humans, rosegadors i gossos. Segons diversos estudis, l'increment de la permeabilitat de la BHE s'ha associat a malalties inflamatòries (Blennow et al., 1990; Tipold et al., 1994; Hampel et al., 1999; Webb and Muir, 2000), però no s'ha pogut establir una relació clara entre la permeabilitat de la BHE i la disfunció

cognitiva (Kleine et al., 1993; Hampel et al., 1999). Els nostres resultats evidencien que la permeabilitat de la BHE només està acrescuda amb l'envelliment si els gossos són sans, reflectint que l'augment de permeabilitat de la BHE no està associada amb els processos inflamatoris presents en la disfunció cognitiva. Més estudis per poder explicar aquest punt són necessaris, ja que amb les dades presents només es podria especular sobre les causes d'aquesta situació.

Finalment, no es va trobar una relació entre l'A β ₄₂ a LCR i la disfunció cognitiva, observant-se uns nivells elevats d' A β ₄₂ al grup LCD2. La concentració d' A β ₄₂ s'ha proposat com a biomarcador per al diagnòstic i monitorització de la MA per, contràriament als nostres resultats, correlacionar negativament amb les fibril·les i plaques d'A β a cervell, així com amb l'estadi de disfunció cognitiva (Strozyk et al., 2003; Fagan et al., 2006; Rami et al., 2011). D'altra banda els nostres resultats són similars als descrits recentment en gossos vells establats d'entre 4 i 16 anys d'edat, en els quals els nivells d' A β ₄₀ resten constants i els d'A β ₄₂ presenten una lleugera disminució (Head et al., 2010). No obstant això, la manca de dades per relacionar amb els nivells d' A β ₄₀ i A β ₄₂ plasmàtics fa difícil una explicació de l'homeòstasi amiloide. Diferències en processos dinàmics (Sánchez et al., 2011) i d'agregació de l'A β (Lemere et al., 1996; Tekirian et al., 1996; Miyawaki et al., 2002; Irvine et al., 2008) en gossos i humans poden explicar aquestes diferències entre espècies.

Tots aquests resultats reforcen l'interès del gos com a model per ajudar a entendre els fenòmens centrals i perifèrics associats a la maduració de les plaques difuses, i la seva relació amb l'envelliment i la disfunció cognitiva humana (Bosch et al., 2012).

5.3 *La immunització amb la barreja dels pèptids A β ₁₋₄₀-KLH-A β _{y-40} indueix una millora cognitiva, associada a una resposta immunògena que du a l'eliminació d'A β del SNC a perifèria per efecte sifó i sense efectes secundaris associats.*

La immunització dels gossos amb la barreja dels pèptids A β ₁₋₄₀-KLH-A β _{y-40} indueix una millora cognitiva en els gossos amb CDS, associada a diversos

canvis en els biomarcadors, i confirma el potencial de la vacuna A β com a tractament de la CDS. Els nostres resultats mostren els efectes beneficiosos de la immunoteràpia: estimula l'eliminació d'A β a través de la BHE i millora el quadre cognitiu des d'un mes després de la primera dosi. En aquest període, en els gossos amb CDS, es detectà un augment d'A β_{40} a plasma paral·lel a la reducció dels nivells d'A β_{42} i 40 a LCR, i seguit d'un augment en la ràtio A β plasma/LCR en el grup LCD1. Aquest increment de la ràtio A β plasma/LCR indica el pas de l'A β central a plasma. D'altra banda, els canvis en els nivells d'A β a plasma i LCR anaven acompanyats de l'augment –en 10 vegades - de les IgG anti-A β_{40} a sèrum, arribant al seu pic màxim a dia 51 en els gossos adults i a dia 71 en els CDS després de la primera dosi. Aquest augment d'IgG a sèrum, a més a més, anava acompanyat de l'entrada d'IgG anti-A β_{40} a LCR en 0.01%, essent significativa en el grup d'adults immunitzats. La resposta immunògena alentida en els gossos amb CDS s'observa també en humans vells deguda al deteriorament del seu sistema immune (Burns et al., 1993). Malgrat això, els canvis en els nivells d'amiloide i d'IgG produïts en ambdós compartiments central i perifèric faciliten l'eliminació d'A β cap a perifèria, demostrant una capacitat suficient de resposta del sistema immune dels animals amb CDS. Aquest resultat suggereix també l'interès de la immunoteràpia en poblacions envellides amb MA malgrat tenir un sistema immunitari deprimat (Schnabel, 2011)

La ràtio d'1/25 establerta entre les IgG anti-A β_{40} i l'A β_{40} a plasma trobada només en els gossos amb CDS immunitzats, suggereix la formació de complexos antígen-anticòs per afavorir l'eliminació de l'A β cap a la perifèria (Lemere and Masliah, 2010). Diversos són els estudis amb anticossos que reconeixen l'extrem N i C terminal d'A β i que proposen aquest efecte a nivell perifèric (Banks et al., 2002; Gray et al., 2007). El fet que la vacuna estigui composta per fragments N- i C-terminals del pèptid permet generar diversos anticossos, uns més immunògens que reconeixen l'extrem N-terminal, i els altres l'extrem C-terminal de l'A β . Així doncs, a nivell perifèric, els anticossos que units al fragment C-terminal de l'A β , formen complexos antígen-anticòs facilitarien l'eliminació d'amiloide per "efecte sifó" del centre a perifèria. I els anticossos que units al fragment N-terminal de l'A β formen complexos antígen-anticòs

evitarien l'entrada des de la perifèria de l'A β a través dels receptors RAGE (Deane et al., 2009; Bachmeier et al., 2011).

Finalment, el major reconeixement de les IgGs del fragment N-terminal, juntament amb les característiques de l'adjuvant usat en la vacuna, i la manca d'efectes secundaris i de micro-hemorràgies indiquen que la resposta immunògena seria anti-inflamatòria i de tipus Th2.

5.4 L'eliminació d'A β i la millora cognitiva en els gossos vacunats, estan relacionades amb la reactivitat glial

En els gossos no vacunats, l'estadi de deposició i maduració de les plaques correlaciona amb el grau de dèficit cognitiu. La reactivitat astrogliàl al voltant de la placa, varia segons l'estadi de maduració de la placa, de manera que els astròcit S100B(+) estan implicats en estadis inicials de maduració i els astròcits únicament GFAP(+) estan implicats en estadis de maduració més avançats. Treballs anteriors en el nostre grup amb gossos vells i amb dèficit cognitiu (Pugliese et al., 2006a, 2006b), validen aquests resultats.

Hem demostrat que en gossos no vacunats de diferent edat i dèficit cognitiu, l'activació de la micròglia correlaciona positivament amb el grau de maduració de les plaques difuses i per tant del grau de dèficit cognitiu. Contràriament a d'altres estudis fets per histoquímica (Heneka et al., 2010), hem pogut demostrar i quantificar de forma precisa la presència d'activació microglial mesurant la unió del [^3H]pk11195 al PBR per autoradiografia "in vitro". Els assajos fets per nosaltres amb diferents marcadors histoquímics varen resultar també negatius, indicant la falta d'un marcador vàlid, i la necessitat de revisar els conceptes de manca de toxicitat de la placa difusa deduïts d'aquests resultats. A més de la formació i maduració de plaques, la major activació microglial podria ser potenciada per l'augment de components d'A β soluble tòxics observat en gossos envellits i humans (Block et al., 2007; Crews and Masliah, 2010)..

En els gossos vacunats, les plaques són més petites i més denses i, per tant, l'estadi de disposició i maduració no correlaciona amb el dèficit cognitiu. En aquests gossos es detecta un menor reactivitat astrogliàl, associada a un menor

nombre d'astròcits S100B(+), i menys activats, tant al voltant de la placa com en zones més apartades. Els resultats obtinguts en el gos confirmen la participació dels astròcits S100B(+) en la formació i maduració de les plaques d'amiloide, prèviament descrits en la (Mrak et al., 1996), i en un model murí d'Alzheimer(MORI et al., 2010). Així doncs, una disminució dels nivells S100B reduiria l'amiloïdosi i la formació i manteniment de neurites distròfiques. D'altra banda, S100B com a proteïna de secreció regula les interaccions neurona-glia mitjançant els receptors RAGE (Steiner et al., 2011) i també participa interactuant amb proteïnes de creixement, el domini regulador de la PKC, bcl-2 i p53. Els receptors RAGE estant implicats en l'entrada d'A β a través de BHE, i en la transducció de senyals inflammatòries neurona-glia (Fig.5.1)

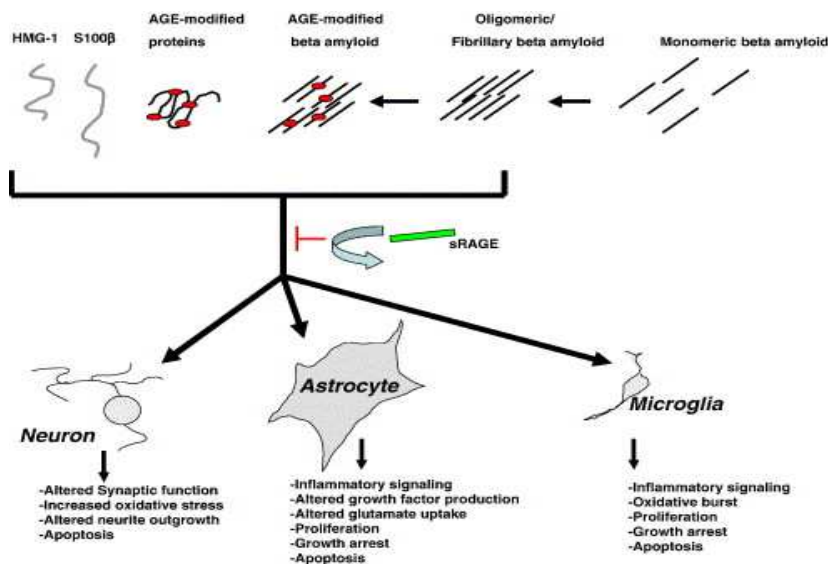


Fig.5.1. Implicació del receptors RAGE en el diferents tipus cel·lulars del SNC. (Adami et al 2001).

Per tant, la reducció de S100B i de l'activitat de RAGE, de l'agressió neuronal, a la vegada que la disminució de reactivitat astrogliàl provocaria una modificació de la resposta microglial (Batlle M et al.; Ortega Francisco J et al.). Conseqüentment, el grau de compactació de les plaques augmentaria associada a una disminució de la toxicitat (Mrak et al., 1996; Lansbury, 1999; Sakono and Zako, 2010). Aquests efectes també induirien canvis en les senyals inflammatòries neurona-glia, acompanyades d'una disminució en la secreció de citocines pro-inflamatòries, i en l'estrès oxidatiu (Donato, 2007; Valente et al., 2010). A més, l'adaptació de la resposta microglial als canvis del seu entorn li permet adoptar

un fenotip més neuroprotector si la intensitat del dany es menor (Batlle M et al.; Adami et al., 2001; Bianchi et al., 2010). Tots aquests canvis durien a una estabilització i/o millora progressiva del deteriorament neuronal i cognitiu.

Per tot això, la immunització amb la vacuna V5 genera diferents tipus d'anticossos determinats que activen una sèrie de mecanismes centrals i perifèrics molt coordinats entre sí. Amb una reducció dels nivells d'activació d'astròcits S100B(+), canvis en els nivells d'A β (central i perifèric), la possible participació dels receptors RAGE, i el manteniment de la activació de la micròglia, aquests mecanismes provoquen una millora cognitiva en els gossos amb CDS i amb absència d'efectes secundaris a llarg termini (Fig.5.2).

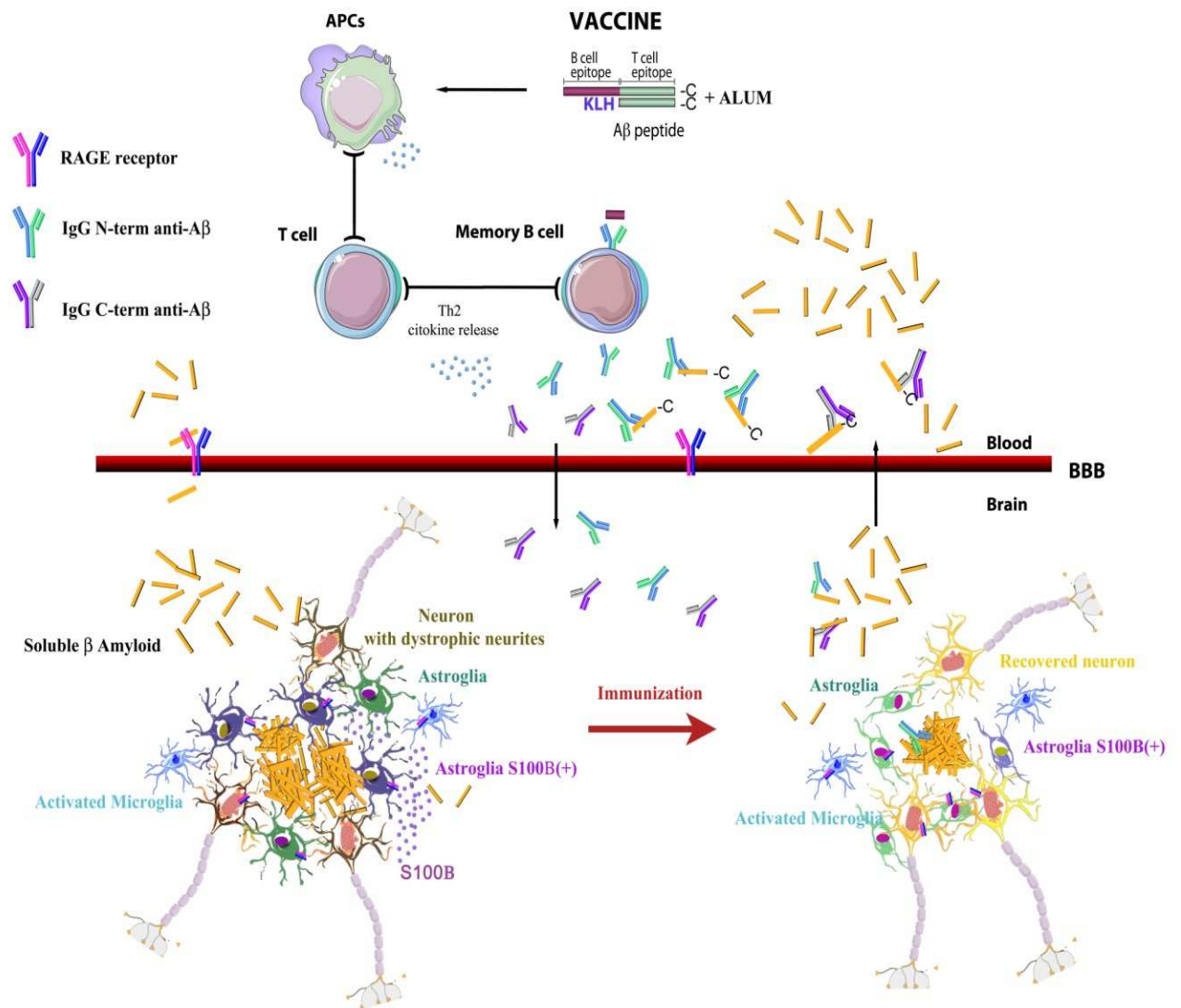


Fig.5.2 Efectes centrals i perifèrics de la immunització amb la barreja dels pèptids $A\beta_{1-40}$ -KLH- $A\beta_{y-40}$ (V5) en el gos amb CDS. A partir del dia 31 després de la primera dosi, els limfòcits B generen IgGs anti- $A\beta$ que reconeixen l' $A\beta$ soluble i plaques d'amiloide. Els anticossos que reconeixen el fragment N- terminal de l' $A\beta$ formen complexes antigen-anticòs que eviten l'entrada des de la perifèria de l' $A\beta$ a través dels receptors RAGE. I els anticossos que reconeixen fragments C-terminal de l' $A\beta$, formen complexes antigen-anticòs facilitant l'eliminació d'amiloide per "efecte sífó". A SNC la immunització redueix el nombre i activació d'astròcits GFAP(+) i S100B(+) relacionats amb la placa que presenta d'aspecte més petit i compacte. Tots aquests canvis reduirien l'amiloïdosi i la formació i manteniment de neurites distròfiques, així com la toxicitat amiloide. Tot això permetria adoptar un fenotip més neuroprotector a la microglia, millorant els potencials d'acció neuronals i reflectint-se amb la millora cognitiva dels gossos.

Capítol 6
CONCLUSIONS

Els nostres resultats confirmen els efectes beneficiosos i segurs de la immunoteràpia original dissenyada, estimulant l'eliminació d'A β central a través de la BHE i millorant el dèficit cognitiu en gossos. D'altra banda torna a validar els nostres tests cognitius en el gos de companyia com a una bona eina per avaluar fàcilment i de forma fiable canvis en el seu comportament. Per lo tant, les conclusions que se'n deriven d'aquest treball són

1. De totes les vacunes testades en conill, la vacuna V5, dissenyada amb hidròxid d'alumini + la barreja dels pèptids A β_{1-40} +KLH-A β_{y-40} , és la més eficaç i segura. Els conills immunitzats amb V5, presenten les titulacions més elevades amb diferents anticossos que reconeixen els dos extrems de l'A β , activant mecanismes de reducció de l'amiloide central que es potencien entre sí, i sense presentar efectes no desitjats com micro-hemorràgies o encefalitis.
2. Els biomarcadors de dany oxidatiu i inflamació identificats en els estadis més inicials de la CDS, faciliten el diagnòstic dels estadis primerencs de la CDS i podrien ser d'interès pel diagnòstic precoç de la MA.
3. La immunització amb la barreja dels pèptids A β_{1-40} -KLH-A β_{y-40} indueix una millora cognitiva, resultant del drenatge d'A β del SNC a perifèria per efecte sífó i possiblement de l'entrada reduïda d'A β soluble a SNC per interacció amb receptors RAGE. El major reconeixement de les IgGs del fragment N-terminal, juntament amb les característiques de l'adjuvant usat en la vacuna, i la manca d'efectes secundaris indesitjables recolzen la presència d'una resposta immunògena anti-inflamatòria de tipus Th2.
4. En els gossos immunitzats, l'associació entre la menor reactivitat astroglial, la disminució de S100B i les plaques més compactes i petites, suggereix una disminució de la toxicitat de l'amiloide que permetria l'adopció d'un fenotip més neuroprotector a la micròglia i facilitaria la millora cognitiva.

5. La millora cognitiva significativa obtinguda en els gossos, en absència de tot efecte secundari indesitjable, la seva relació amb el procés d'immunització, juntament amb el reconeixement de les plaques d'amiloide humanes per els anticossos canins purificats, permeten proposar aquesta immunoteràpia com a tractament preventiu i/o curatiu de MA .

Capítol 7

REFERÈNCIES

A

- Adami, C., Sorci, G., Blasi, E., Agneletti, A.L., Bistoni, F., and Donato, R. (2001). S100b expression in and effects on microglia. *Glia* 33, 131–142.
- Adams, B., Chan, A., Callahan, H., and Milgram, N.W. (2000a). The canine as a model of human cognitive aging: recent developments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 24, 675–692.
- Adams, B., Chan, A., Callahan, H., Siwak, C., Tapp, D., Ikeda-Douglas, C., Atkinson, P., Head, E., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2000b). Use of a delayed non-matching to position task to model age-dependent cognitive decline in the dog. *Behav. Brain Res* 108, 47–56.
- Akiyama, H., Hosokawa, M., Kametani, F., Kondo, H., Chiba, M., Fukushima, M., and Tabira, T. (2011). Long term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A β PP and A β PP/tau transgenic mice. *Neuropathology*. Epub ahead of print.
- Alafuzoff, I., Helisalmi, S., Heinonen, E.H., Reinikainen, K., Hallikainen, M., Soininen, H., and Koivisto, K. (2000). Selegiline treatment and the extent of degenerative changes in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 55, 815–819.
- Alarcón, R., Fuenzalida, C., Santibáñez, M., and von Bernhardt, R. (2005). Expression of Scavenger Receptors in Glial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30406–30415.
- Alberdi, E., Sanchez-Gomez, M.V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M., and Matute, C. (2010). Amyloid-beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47, 264–272.
- Alkadhi, K.A., Alzoubi, K.H., Srivareerat, M., and Tran, T.T. (2011). Chronic Psychosocial Stress Exacerbates Impairment of Synaptic Plasticity in β -Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease: Prevention by Nicotine. *Curr Alzheimer Res*. Epub ahead of print
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein α secretases. *Journal of Neuroscience Research* 74, 342–352.

American Psychiatric Association (1994). *Manual of Mental Disorders*.

Araujo, J.A., Greig, N.H., Ingram, D.K., Sandin, J., de Rivera, C., and Milgram, N.W. (2011). Cholinesterase Inhibitors Improve Both Memory and Complex Learning in Aged Beagle Dogs. *J Alzheimers Dis* 26, 143-55.

Asami-Odaka, A., Obayashi-Adachi, Y., Matsumoto, Y., Takahashi, H., Fukumoto, H., Horiguchi, T., Suzuki, N., and Shoji, M. (2005). Passive immunization of the A β ₄₂(43) C-terminal-specific antibody BCO5 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2, 36-43.

Asuni, A.A., Boutajangout, A., Scholtzova, H., Knudsen, E., Li, Y.S., Quartermain, D., Frangione, B., Wisniewski, T., and Sigurdsson, E.M. (2006). Vaccination of Alzheimer's model mice with A β derivative in alum adjuvant reduces A β burden without microhemorrhages. *European Journal of Neuroscience* 24, 2530-2542.

Axelsen, T.V., Holm, A., Birkelund, S., Christiansen, G., Ploug, M., and Holm, I.E. (2009). Specific recognition of the C-terminal end of A β ₄₂ by a high affinity monoclonal antibody. *Molecular Immunology* 46, 2267-2273.

B

Bachmeier, C.J., Beaulieu-Abdelahad, D., Mullan, M.J., and Paris, D. (2011). Epitope-dependent effects of beta-amyloid antibodies on beta-amyloid clearance in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Microcirculation* 18, 373-9.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019-1031.

Banati, R.B. (2002). Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40, 206-217.

Banks, W.A., Terrell, B., Farr, S.A., Robinson, S.M., Nonaka, N., and Morley, J.E. (2002). Passage of amyloid β protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides* 23, 2223-2226.

Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., et al. (2003). Epitope and isotype specificities of antibodies to β -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2023-2028.

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916–919.

Batlle, M., Ferri, L., Andrade, C., Ortega, F.J., Pugliese, M., Mahy, N. and Rodríguez, M.J. (2012). Astroglial S100B Potentiates the Microglial Cytotoxic response to excitotoxicity in rat hippocampus. *Sotmès a journal of neurotrauma*.

Bernedo, V., Insua, D., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., and Pesini, P. (2009). Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. *J. Comp. Neurol* 513, 417–429.

Bernhardi (von), R. (2010). Immunotherapy in Alzheimer’s Disease: Where Do We Stand? Where Should We Go? *Journal of Alzheimer’s Disease* 19, 405–421.

Bi, X., Head, E., Cotman, C.W., and Lynch, G. (2003). Spatial patterns of mammalian brain aging: distribution of cathepsin D-immunoreactive cell bodies and dystrophic dendrites in aging dogs resembles that in Alzheimer’s disease. *J. Comp. Neurol* 464, 371–381.

Bianchi, R., Giambanco, I., and Donato, R. (2010). S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol. Aging* 31, 665–677.

Bianchi, R., Kastrisianaki, E., Giambanco, I., and Donato, R. (2011). S100B Protein Stimulates Microglia Migration via RAGE-dependent Up-regulation of Chemokine Expression and Release. *J Biol Chem* 286, 7214–7226.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* advance online publication 6, 131-44.

Blennow, K., Wallin, A., Fredman, P., Karlsson, I., Gottfries, C.G., and Svennerholm, L. (1990). Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer’s disease is related to vascular factors. *Acta Neurol. Scand.* 81, 323–326.

Blessed, G., Tomlinson, B.E., and Roth, M. (1968). The Association Between Quantitative Measures of Dementia and of Senile Change in the Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *The British Journal of Psychiatry* 114, 797 –811.

Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57–69.

Blom, E.S., Giedraitis, V., Zetterberg, H., Fukumoto, H., Blennow, K., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., Wahlund, L.-O., Lannfelt, L., and Ingelsson, M. (2009). Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 458–464.

Blount, D.G., Pritchard, D.I., and Heaton, P.R. (2005). Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108, 399–407.

Bobinski, M., Wegiel, J., Tarnawski, M., Bobinski, M., Reisberg, B., de Leon, M.J., Miller, D.C., and Wisniewski, H.M. (1997). Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 414–420.

Borràs, D., Ferrer, I., and Pumarola, M. (1999). Age-related Changes in the Brain of the Dog. *Veterinary Pathology Online* 36, 202–211.

Bosch, M.N., Pugliese, M., Gimeno-Bayón, J., Rodríguez, M.J., and Mahy, N. (2012). Dogs with Cognitive Dysfunction Syndrome: A Natural Model of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 9, 298–314.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.

Braak, H., and Braak, E. (1997). Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 18, S85–88.

Bubnoff (von), A. (2010). Vaccines to antibodies: grow up! *IAVI Rep* 14, 4–9.

Burns, E.A., Lum, L.G., L'Hommedieu, G., and Goodwin, J.S. (1993). Specific humoral immunity in the elderly: in vivo and in vitro response to vaccination. *J Gerontol* 48, B231–236.

C

Callahan, H., Ikeda-douglas, C., Head, E., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2000). Development of a protocol for studying object recognition memory in the dog. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 24, 693–707.

Campbell, S., Trettien, A., and Kozan, B. (2001). A noncomparative open-label study evaluating the effect of selegiline hydrochloride in a clinical setting. *Vet. Ther* 2, 24–39.

Cannarozzi, G., Schneider, A., and Gonnet, G. (2007). A Phylogenomic Study of Human, Dog, and Mouse. *PLoS Comput Biol* 3, e2.

Carter, M.D., Simms, G.A., and Weaver, D.F. (2010). The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther* 88, 475–486.

Chan, A.D.F., Nippak, P.M.D., Murphey, H., Ikeda-Douglas, C.J., Muggenburg, B., Head, E., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2002). Visuospatial impairments in aged canines (*Canis familiaris*): the role of cognitive-behavioral flexibility. *Behav. Neurosci* 116, 443–454.

Ciobica, A., Padurariu, M., Bild, W., and Stefanescu, C. (2011). Cardiovascular risk factors as potential markers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub* 23, 340–346.

Colle M-A, Hauw J-J, Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., and Duykaerts, C. (2000). Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol. Aging* 21, 695–704.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.

Cotel, M.-C., Jawhar, S., Christensen, D.Z., Bayer, T.A., and Wirths, O. (2010). Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging*.

Cotman, C.W., and Head, E. (2008). The Canine (Dog) Model of Human Aging and Disease: Dietary, Environmental and Immunotherapy Approaches. *Journal of Alzheimer's Disease* 15, 685–707.

Cotman, C.W., Head, E., Muggenburg, B.A., Zicker, S., and Milgram, N.W. (2002). Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiol. Aging* 23, 809–818.

Coupé, P., Eskildsen, S.F., Manjón, J.V., Fonov, V., and Collins, D.L. (2011). Simultaneous segmentation and grading of hippocampus for patient classification with Alzheimer's disease. *Med Image Comput Comput Assist Interv* 14, 149–157.

Crews, L., and Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet* 19, R12–20.

Cribbs, D.H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N., Babikyan, D., Kessler, P., Kieber-Emmons, T., Cotman, C.W., et al. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int. Immunol.* 15, 505–514.

Cummings, B.J., Head, E., Afagh, A.J., Milgram, N.W., and Cotman, C.W. (1996). [beta]-Amyloid Accumulation Correlates with Cognitive Dysfunction in the Aged Canine. *Neurobiology of Learning and Memory* 66, 11–23.

Cummings, B.J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N.W., and Cotman, C.W. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiology of Aging* 17, 259–268.

D

Day, M.J. (2009). Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease. *Med Mycol* 47, S315–S323.

Deane, R., Bell, R., Sagare, A., and Zlokovic, B. (2009). Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 16–30.

Deane, R., Singh, I., Sagare, A.P., Bell, R.D., Ross, N.T., Larue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R.J., et al. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*.

Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-[beta] peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in

brain. *Nat Med* 9, 907–913.

Delaère, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., and Hauw, J.J. (1991). Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 81, 328–335.

DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2002). Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 295, 2264–2267.

DeWitt, D.A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., and Silver, J. (1998). Astrocytes Regulate Microglial Phagocytosis of Senile Plaque Cores of Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* 149, 329–340.

Dimakopoulos, A.C., and Mayer, R.J. (2002). Aspects of neurodegeneration in the canine brain. *J. Nutr* 132, 1579S–82S.

Dodart, J.-C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., et al. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain A[beta] burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5, 452–457.

Donato, R. (2007). RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 7, 711–724.

Duce, J.A., Tsatsanis, A., Cater, M.A., James, S.A., Robb, E., Wikhe, K., Leong, S.L., Perez, K., Johanssen, T., Greenough, M.A., et al. (2010) Iron-Export Ferroxidase Activity of [beta]- Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease. *Cell In Press, Corrected Proof* 142, 857-67.

Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118, 5–36.

E

El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., and Loike, J.D. (1996). Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382, 716–719.

El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S.E., Means, T.K., Terada, K., Geula, C., and Luster, A.D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and

accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13, 432–438.

Exley, C., Siesjö, P., and Eriksson, H. (2010). The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends in Immunology* In Press, Corrected Proof, Epub ahead of print.

Ezekiel, F., Chao, L., Kornak, J., Du, A.-T., Cardenas, V., Truran, D., Jagust, W., Chui, H., Miller, B., Yaffe, K., et al. (2004). Comparisons between Global and Focal Brain Atrophy Rates in Normal Aging and Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18, 196–201.

F

Fagan, A.M., Mintun, M.A., Mach, R.H., Lee, S.-Y., Dence, C.S., Shah, A.R., LaRossa, G.N., Spinner, M.L., Klunk, W.E., Mathis, C.A., et al. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann. Neurol.* 59, 512–519.

Fahnestock, M., Marchese, M., Head, E., Pop, V., Michalski, B., Milgram, W.N., and Cotman, C.W. (2010). BDNF increases with behavioral enrichment and an antioxidant diet in the aged dog. *Neurobiol Aging* 33, 546–54.

Fedrizzi, L., and Carafoli, E. (2011). Ca²⁺ dysfunction in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *BioFactors* 37, 189–196.

Fiala, M., Liu, P.T., Espinosa-Jeffrey, A., Rosenthal, M.J., Bernard, G., Ringman, J.M., Sayre, J., Zhang, L., Zaghi, J., Dejbakhsh, S., et al. (2007). Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12849–12854.

Fjell, A.M., Walhovd, K.B., Fennema-Notestine, C., McEvoy, L.K., Hagler, D.J., Holland, D., Brewer, J.B., Dale, A.M., and for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2010). CSF Biomarkers in Prediction of Cerebral and Clinical Change in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 30, 2088 –2101.

Fonseca, M., and Soriano, E. (1995). Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Research* 691, 83–91.

Frampton, M., Harvey, R.J., and Kirchner, V. (2003). Propentofylline for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* CD002853.

Frautschy, S.A., Yang, F., Calderón, L., and Cole, G.M. Rodent models of Alzheimer's disease: Rat a[β] infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiology of Aging* 17, 311–321.

Fryer, J.D., Taylor, J.W., DeMattos, R.B., Bales, K.R., Paul, S.M., Parsadanian, M., and Holtzman, D.M. (2003). Apolipoprotein E markedly facilitates age-dependent cerebral amyloid angiopathy and spontaneous hemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* 23, 7889–7896.

G

Gao, C.M., Yam, A.Y., Wang, X., Magdangal, E., Salisbury, C., Peretz, D., Zuckermann, R.N., Connolly, M.D., Hansson, O., Minthon, L., et al. (2010). A β 40 Oligomers Identified as a Potential Biomarker for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 5,

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., and Brooks, D.J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [^{11}C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 21, 404–412.

Ghochikyan A, A., Petrushina, I., Lees, A., Vasilesko, V., Movsesyan, N., Karapetyan, A., Agadjanyan, M.G., and Cribbs, D. (2006). A β -Immunotherapy for Alzheimer's Disease Using Mannan–Amyloid-Beta Peptide Immunoconjugates. *DNA Cell Biol* 25, 571–580.

Giardino, L., Giuliani, A., Battaglia, A., Carfagna, N., Aloe, L., and Calza', L. (2002). Neuroprotection and aging of the cholinergic system: a role for the ergoline derivative nicergoline (Sermion). *Neuroscience* 109, 487–497.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.

Golomb, J., Kluger, A., and Ferris, S.H. (2004). Mild cognitive impairment: historical development and summary of research. *Dialogues Clin Neurosci* 6, 351–367.

González-Martínez, A., Rosado, B., Pesini, P., Suárez, M.-L., Santamarina, G., García-Belenguer, S., Villegas, A., Monleón, I., and Sarasa, M. (2011). Plasma β -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 46, 590-6.

Gotz, J., and Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9, 532-544.

Graff-Radford, N.R., Crook, J.E., Lucas, J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Younkin, L.H., Petersen, R.C., and Younkin, S.G. (2007). Association of low plasma A β ₄₂/A β ₄₀ ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 64, 354-362.

Gray, A.J., Sakaguchi, G., Shiratori, C., Becker, A.G., LaFrancois, J., Aisen, P.S., Duff, K., and Matsuoka, Y. (2007). Antibody against C-terminal A β selectively elevates plasma A β . *Neuroreport* 18, 293-296.

Greeley, E.H., Ballam, J.M., Harrison, J.M., Kealy, R.D., Lawler, D.F., and Segre, M. (2001). The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82, 57-71.

Greeley, E.H., Spitznagel, E., Lawler, D.F., Kealy, R.D., and Segre, M. (2006). Modulation of canine immunosenescence by life-long caloric restriction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111, 287-299.

Gu, X., Jiang, Z., and Huang, H. (2010). Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease: from diagnosis to therapeutic evaluation. *Chin J Integr Med* 16, 276-282.

Güntert, A., Döbeli, H., and Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461-475.

H

Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid [β]-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

Hampel, H., Kötter, H.U., Padberg, F., Körschenhausen, D.A., and Möller, H.-J. (1999). Oligoclonal Bands and Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier Dysfunction in a Subset of Patients with Alzheimer Disease: Comparison with Vascular Dementia, Major Depression, and Multiple Sclerosis. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 13, 9-19.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.

Head, E., Barrett, E.G., Murphy, M.P., Das, P., Nistor, M., Sarsoza, F., Glabe, C.C., Kaye, R., Milton, S., Vasilevko, V., et al. (2006). Immunization with fibrillar A[β]₁₋₄₂ in young and aged canines: Antibody generation and characteristics, and effects on CSF and brain A β . *Vaccine* 24, 2824-2834.

Head, E., Callahan, H., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (1998). Visual-discrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. *Neurobiol. Aging* 19, 415-425.

Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., and Cotman, C.W. (2002). Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J. Neurochem* 82, 375-381.

Head, E., Mehta, R., Hartley, J., Kameka, M., Cummings, B.J., Cotman, C.W., Ruehl, W.W., and Milgram, N.W. (1995). Spatial learning and memory as a function of age in the dog. *Behav. Neurosci* 109, 851-858.

Head, E., Moffat, K., Das, P., Sarsoza, F., Poon, W.W., Landsberg, G., Cotman, C.W., and Murphy, M.P. (2005). [β]-Amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. *Neurobiology of Aging* 26, 749-763.

Head, E., Nukala, V.N., Fenoglio, K.A., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., and Sullivan, P.G. (2009). Effects of age, dietary, and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. *Exp. Neurol* 220, 171-176.

Head, E., Pop, V., Sarsoza, F., Kaye, R., Beckett, T.L., Studzinski, C.M., Tomic, J.L., Glabe, C.G., and Murphy, M.P. (2010). Amyloid- β Peptide and Oligomers in the Brain and Cerebrospinal Fluid of Aged Canines. *Journal of Alzheimer's Disease* 20, 637-646.

Head, E., Pop, V., Vasilevko, V., Hill, M., Saing, T., Sarsoza, F., Nistor, M., Christie, L.-A., Milton, S., Glabe, C., et al. (2008). A Two-Year Study with Fibrillar beta-Amyloid-A-beta Immunization in Aged Canines: Effects on

Cognitive Function and Brain Abeta. *J. Neurosci.* 28, 3555–3566.

Head, E., Thornton, P.L., Tong, L., and Cotman, C.W. (2000). Initiation and propagation of molecular cascades in human brain aging: Insight from the canine model to promote successful aging. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 24, 777–786.

Head, E., and Zicker, S.C. (2004). Nutraceuticals, aging, and cognitive dysfunction. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract* 34, 217–228.

Heneka, M.T., O'Banion, M.K., Terwel, D., and Kummer, M.P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117, 919–947.

Herring, A., Ambrée, O., Tomm, M., Habermann, H., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2009). Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp. Neurol* 216, 184–192.

Hipkiss, A.R. (2006). Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Exp. Gerontol* 41, 464–473.

Hof, P.R., Bogaert, Y.E., Rosenthal, R.E., and Fiskum, G. (1996). Distribution of neuronal populations containing neurofilament protein and calcium-binding proteins in the canine neocortex: regional analysis and cell typology. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 11, 81–98.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med* 4, 97–100.

Hölscher, C. (2011). Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 891–897.

Horiuchi, Y., Nakajima, Y., Nariai, Y., Asanuma, H., Kuwabara, M., and Yukawa, M. (2007). Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes--a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol* 118, 179–185.

Hou, Y., White, R.G., Bobik, M., Marks, J.S., and Russell, M.J. (1997). Distribution of beta-amyloid in the canine brain. *Neuroreport* 8, 1009–1012.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.

I

Iijima, K., and Iijima-Ando, K. (2008). Drosophila Models of Alzheimer's Amyloidosis: The Challenge of Dissecting the Complex Mechanisms of Toxicity of Amyloid- β 42. *Journal of Alzheimer's Disease* 15, 523–540.

Ikeda-Douglas, C.J., Zicker, S.C., Estrada, J., Jewell, D.E., and Milgram, N.W. (2004). Prior experience, antioxidants, and mitochondrial cofactors improve cognitive function in aged beagles. *Vet. Ther* 5, 5–16.

Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M., and Walsh, D.M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Med.* 14, 451–464.

Ishihara, T., Gondo, T., Takahashi, M., Uchino, F., Ikeda, S., Allsop, D., and Imai, K. (1991). Immunohistochemical and immunoelectron microscopical characterization of cerebrovascular and senile plaque amyloid in aged dogs' brains. *Brain Res* 548, 196–205.

J

Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., et al. (2000). A[beta] peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979–982.

Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R., and Little, S.P. (1991). Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res. Mol. Brain Res* 10, 299–305.

Jolival, C.G., Hurford, R., Lee, C.A., Dumaop, W., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2010). Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Experimental Neurology* 223, 422–431.

K

Kadir, A., Marutle, A., Gonzalez, D., Schöll, M., Almkvist, O., Mousavi, M., Mustafiz, T., Darreh-Shori, T., Nennesmo, I., and Nordberg, A. (2011). Positron emission tomography imaging and clinical progression in relation to molecular pathology in the first Pittsburgh Compound B positron emission tomography patient with Alzheimer's disease. *Brain* 134, 301–317.

Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10, 698–712.

Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Nacula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., et al. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* 2, 18.

Keeney, J.T.R., Swomley, A.M., Harris, J.L., Fiorini, A., Mitov, M.I., Perluigi, M., Sultana, R., and Butterfield, D.A. (2011). Cell Cycle Proteins in Brain in Mild Cognitive Impairment: Insights into Progression to Alzheimer Disease. *Neurotoxicity Research*, Epub ahead of print)

Khurana, V. (2008). Modeling Tauopathy in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Alzheimers Dis* 15, 541–553.

Kiatipattanasakul, W., Nakamura, S., Hossain, M.M., Nakayama, H., Uchino, T., Shumiya, S., Goto, N., and Doi, K. (1996). Apoptosis in the aged dog brain. *Acta Neuropathologica* 92, 242–248.

Kimotsuki, T., Nagaoka, T., Yasuda, M., Tamahara, S., Matsuki, N., and Ono, K. (2005). Changes of magnetic resonance imaging on the brain in beagle dogs with aging. *J. Vet. Med. Sci* 67, 961–967.

Kimura, T., Takamatsu, J., Araki, N., Goto, M., Kondo, A., Miyakawa, T., and Horiuchi, S. (1995). Are advanced glycation end-products associated with amyloidosis in Alzheimer's disease? *Neuroreport* 6, 866–868.

Kirkness, E.F., Bafna, V., Halpern, A.L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D.B., Delcher, A.L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C.M., et al. (2003). The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. *Science* 301, 1898–1903.

Kleine, T.O., Hackler, R., and Zöfel, P. (1993). Age-related alterations of the blood-brain-barrier (bbb) permeability to protein molecules of different size. *Z Gerontol* 26, 256–259.

Knoll, J. (1998). (-)Deprenyl (selegiline), a catecholaminergic activity enhancer (CAE) substance acting in the brain. *Pharmacol. Toxicol* 82, 57–66.

L

Landsberg, G. (2005). Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 471–479.

Lane D (1988). *Antibodies: A laboratory Manual* (Harlow).

Lansbury, P.T. (1999). Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3342–3344.

Lee, E.B., Leng, L.Z., Zhang, B., Kwong, L., Trojanowski, J.Q., Abel, T., and Lee, V.M.-Y. (2006). Targeting Amyloid- β Peptide ($A\beta$) Oligomers by Passive Immunization with a Conformation-selective Monoclonal Antibody Improves Learning and Memory in $A\beta$ Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4292–4299.

Lee, M., Bard, F., Johnson-Wood, K., Lee, C., Hu, K., Griffith, S.G., Black, R.S., Schenk, D., and Seubert, P. (2005). $A\beta$ 42 immunization in Alzheimer's disease generates $A\beta$ N-terminal antibodies. *Annals of Neurology* 58, 430–435.

Lemere, C.A., Blusztajn, J.K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T.C., and Selkoe, D.J. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* 3, 16–32.

Lemere, C.A., and Masliah, E. (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* 6, 108–119.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.

Li, S., Wang, H., Lin, X., Xu, J., Xie, Y., Yuan, Q., and Yao, Z. (2005). Specific humoral immune responses in rhesus monkeys vaccinated with the Alzheimer's disease-associated beta-amyloid 1-15 peptide vaccine. *Chin. Med. J.* *118*, 660–664.

Lichtlen, P., and Mohajeri, M.H. (2008). Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *Journal of Neurochemistry* *104*, 859–874.

Lin, Y., Slight, S.R., and Khader, S.A. (2010). Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Semin Immunopathol* *32*, 79–90.

Lindblad, E.B. (2004). Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* *82*, 497–505.

M

Martin, L.J., Pardo, C.A., Cork, L.C., and Price, D.L. (1994). Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *Am J Pathol* *145*, 1358–1381.

Maier, M., Seabrook, T.J., Lazo, N.D., Jiang, L., Das, P., Janus, C., and Lemere, C.A. (2006). Short Amyloid- β (A β) Immunogens Reduce Cerebral A β Load and Learning Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model in the Absence of an A β -Specific Cellular Immune Response. *The Journal of Neuroscience* *26*, 4717–4728.

Márquez, M., Pérez, L., Serafín, A., Teijeira, S., Navarro, C., and Pumarola, M. (2010). Characterisation of Lafora-like bodies and other polyglucosan bodies in two aged dogs with neurological disease. *The Veterinary Journal* *183*, 222–225.

Matsuoka, Y., Saito, M., LaFrancois, J., Saito, M., Gaynor, K., Olm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiratori, C., et al. (2003). Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J. Neurosci.* *23*, 29–33.

Matusевичius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler* *5*, 101–104.

McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M.E., Tian, X., Phinney, A.L., Manea, M., French, J.E., Lambermon, M.H.L., Darabie, A.A., Brown, M.E., et al. (2002). Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8, 1263–1269.

Mehta, P.D., Pirttilä, T., Mehta, S.P., Sersen, E.A., Aisen, P.S., and Wisniewski, H.M. (2000). Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid β proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol* 57, 100–105.

Metsaars, W.P., Hauw, J.-J., van Welsem, M.E., and Duyckaerts, C. (2003). A grading system of Alzheimer disease lesions in neocortical areas. *Neurobiol. Aging* 24, 563–572.

Milgram, N.W. (2003). Cognitive experience and its effect on age-dependent cognitive decline in beagle dogs. *Neurochem. Res* 28, 1677–1682.

Milgram, N.W., Adams, B., Callahan, H., Head, E., Mackay, B., Thirlwell, C., and Cotman, C.W. (1999). Landmark discrimination learning in the dog. *Learn. Mem* 6, 54–61.

Milgram, N.W., Head, E., Muggenburg, B., Holowachuk, D., Murphey, H., Estrada, J., Ikeda-Douglas, C.J., Zicker, S.C., and Cotman, C.W. (2002). Landmark discrimination learning in the dog: effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26, 679–695.

Milgram, N.W., Head, E., Weiner, E., and Thomas, E. (1994). Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. *Behav. Neurosci* 108, 57–68.

Milgram, N.W., Head, E., Zicker, S.C., Ikeda-Douglas, C., Murphey, H., Muggenberg, B.A., Siwak, C.T., Tapp, P.D., Lowry, S.R., and Cotman, C.W. (2004). Long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependent impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Exp. Gerontol* 39, 753–765.

Milgram, N.W., Head, E., Zicker, S.C., Ikeda-Douglas, C.J., Murphey, H., Muggenburg, B., Siwak, C., Tapp, D., and Cotman, C.W. (2005). Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. *Neurobiol. Aging* 26, 77–90.

Milgram, N.W., Ivy, G.O., Head, E., Murphy, M.P., Wu, P.H., Ruehl, W.W., Yu, P.H., Durden, D.A., Davis, B.A., and Paterson, I.A. (1993). The effect of L-

deprenyl on behavior, cognitive function, and biogenic amines in the dog. *Neurochem. Res* 18, 1211–1219.

Miller, D.L., Potempska, A., and Mehta, P.D. (2007). Humoral immune responses to peptides derived from the β -amyloid peptide C-terminal sequence. *Amyloid* 14, 39–50.

Miyawaki, K., Nakayama, H., Matsuno, S., Tamaoka, A., and Doi, K. (2002). Three-dimensional and fractal analyses of assemblies of amyloid beta protein subtypes [A β 40 and A β 42(43)] in canine senile plaques. *Acta Neuropathol* 103, 228–236.

Miyawaki, K., Nakayama, H., Nakamura, S., Uchida, K., and Doi, K. (2001). Three-dimensional structures of canine senile plaques. *Acta Neuropathol.* 102, 321–328.

Monsonogo, A., Zota, V., Karni, A., Krieger, J.I., Bar-Or, A., Bitan, G., Budson, A.E., Sperling, R., Selkoe, D.J., and Weiner, H.L. (2003). Increased T cell reactivity to amyloid β protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 112, 415–422.

Mori, T., Koyama, N., Arendash, G.W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., and Town, T. (2010). Overexpression of Human S100B Exacerbates Cerebral Amyloidosis and Gliosis in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Glia* 58, 300–314.

Mosier, J.E. (1989). Effect of aging on body systems of the dog. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract* 19, 1–12.

Mrak, R.E., Sheng, J.G., and Griffin, W.S. (1996). Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 273–279.

Münch, G., Westcott, B., Menini, T., and Gugliucci, A. (2010). Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids* 42, 1221–1236.

Munguia, M.E., Govezensky, T., Martinez, R., Manoutcharian, K., and Gevorkian, G. (2006). Identification of amyloid-beta 1-42 binding protein fragments by screening of a human brain cDNA library. *Neurosci. Lett* 397, 79–82.

N

Nakamura, S., Tamaoka, A., Sawamura, N., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Shoji, S., Yoshikawa, Y., and Doi, K. (1997). Deposition of amyloid beta protein (A beta) subtypes [A beta 40 and A beta 42(43)] in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 94, 323–328.

Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., and Ruehl, W.W. (2001). Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 218, 1787–1791.

Nippak, P.M.D., Mendelson, J., Muggenburg, B., and Milgram, N.W. (2007). Enhanced spatial ability in aged dogs following dietary and behavioural enrichment. *Neurobiol Learn Mem* 87, 610–623.

O

O'Brien, R.J., and Wong, P.C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34, 185–204.

van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., and Breteler, M.M.B. (2006). Plasma Aβ(1-40) and Aβ(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 5, 655–660.

Oppermann, U.C., Salim, S., Tjernberg, L.O., Terenius, L., and Jörnvall, H. (1999). Binding of amyloid beta-peptide to mitochondrial hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (ERAB): regulation of an SDR enzyme activity with implications for apoptosis in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 451, 238–242.

Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., et al. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Aβ42 immunization. *Neurology* 61, 46–54.

Ortega Francisco J, Vidal-Taboada Jose M, Mahy N, and Rodríguez Manuel J (2012). *Molecular Mechanisms of Acute Brain Injury and Ensuing Neurodegeneration* (ISBN: 978-953-51-0375-2: Alina González-Quevedo).

P

Pallas, M., Camins, A., Smith, M.A., Perry, G., Lee, H., and Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimers Dis* 15, 615–624.

Papaioannou, N., Tooten, P.C., van Ederen, A.M., Bohl, J.R., Rofina, J., Tsangaris, T., and Gruys, E. (2001). Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid* 8, 11–21

Parnetti, L., Reboldi, G.P., and Gallai, V. (2000). Cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology* 54, 735–737.

Peremans, K., Audenaert, K., Blanckaert, P., Jacobs, F., Coopman, F., Verschooten, F., Van Bree, H., Van Heeringen, C., Mertens, J., Slegers, G., et al. (2002). Effects of aging on brain perfusion and serotonin-2A receptor binding in the normal canine brain measured with single photon emission tomography. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 1393–1404.

Petersen, R.C., Smith, G.E., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., Schaid, D.J., Thibodeau, S.N., Kokmen, E., Waring, S.C., and Kurland, L.T. (1995). Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *Jama* 273, 1274–1278.

Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., and Jucker, M. (2002). Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298, 1379.

Pomara, N., Willoughby, L.M., Sidtis, J.J., and Mehta, P.D. (2005). Selective reductions in plasma Abeta 1-42 in healthy elderly subjects during longitudinal follow-up: a preliminary report. *Am J Geriatr Psychiatry* 13, 914–917.

Pop, V., Head, E., Hill, M.-A., Gillen, D., Berchtold, N.C., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Murphy, M.P., and Cotman, C.W. (2010). Synergistic Effects of Long-Term Antioxidant Diet and Behavioral Enrichment on β -Amyloid Load and Non-Amyloidogenic Processing in Aged Canines. *The Journal of Neuroscience* 30, 9831–9839.

Price, D.L., Martin, L.J., Sisodia, S.S., Wagster, M.V., Koo, E.H., Walker, L.C., Koliatsos, V.E., and Cork, L.C. (1991). Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. *Brain Pathol* 1, 287–296.

Prodan, C.I., Ross, E.D., Stoner, J.A., Cowan, L.D., Vincent, A.S., and Dale, G.L. (2011). Coated-platelet levels and progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* 76, 247–252.

Pugliese, M., Carrasco, J.L., Andrade, C., Mas, E., Mascort, J., and Mahy, N. (2005). Severe cognitive impairment correlates with higher cerebrospinal fluid levels of lactate and pyruvate in a canine model of senile dementia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29, 603–610.

Pugliese, M., Carrasco, J.L., Geloso, M.C., Mascort, J., Michetti, F., and Mahy, N. (2004). γ -aminobutyric acidergic interneuron vulnerability to aging in canine prefrontal cortex. *J. Neurosci. Res.* 77, 913–920.

Pugliese, M., Carrasco, J.L., Gomez-Anson, B., Andrade, C., Zamora, A., Rodríguez, M.J., Mascort, J., and Mahy, N. (2010). Magnetic resonance imaging of cerebral involucional changes in dogs as markers of aging: An innovative tool adapted from a human visual rating scale. *The Veterinary Journal* Epub ahead of print.

Pugliese, M., Gangitano, C., Ceccariglia, S., Carrasco, J.L., Del Fà, A., Rodríguez, M.J., Michetti, F., Mascort, J., and Mahy, N. (2007). Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. *Brain Res* 1139, 85–94.

Pugliese, M., Geloso, M.C., Carrasco, J.L., Mascort, J., Michetti, F., and Mahy, N. (2006a). Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100B(-) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. *Acta Neuropathol* 111, 519–528.

Pugliese, M., Mascort, J., Mahy, N., and Ferrer, I. (2006b). Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta Neuropathologica* 112, 175–183.

Q-R

Ramakrishnan, M., Kandimalla, K.K., Wengenack, T.M., Howell, K.G., and Poduslo, J.F. (2009). Surface plasmon resonance binding kinetics of Alzheimer's disease amyloid beta peptide-capturing and plaque-binding monoclonal antibodies. *Biochemistry* 48, 10405–10415.

Rami, L., Fortea, J., Bosch, B., Solé-Padullés, C., Lladó, A., Iranzo, A., Sánchez-Valle, R., and Molinuevo, J.L. (2011). Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Memory Present Distinct Associations along the Continuum from Healthy Subjects to AD Patients. *Journal of Alzheimer's Disease* 23, 319–326.

Ramlackhansingh, A.F., Brooks, D.J., Greenwood, R.J., Bose, S.K., Turkheimer, F.E., Kinnunen, K.M., Gentleman, S., Heckemann, R.A., Gunanayagam, K., Gelosa, G., et al. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 70, 374–383.

Ramonet, D., Pugliese, M., Rodríguez, M.J., de Yebra, L., Andrade, C., Adroer, R., Ribalta, T., Mascort, J., and Mahy, N. (2002). Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases. *J. Physiol. Paris* 96, 307–312.

Ramonet, D., Rodríguez, M.J., Fredriksson, K., Bernal, F., and Mahy, N. (2004). In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus* 14, 586–594.

Ramonet, D., de Yebra, L., Fredriksson, K., Bernal, F., Ribalta, T., and Mahy, N. (2006). Similar calcification process in acute and chronic human brain pathologies. *J. Neurosci. Res* 83, 147–156.

Reifinger, M. (1997). [Volumetric examination of senile brain involution in dogs]. *Anat Histol Embryol* 26, 141–146.

Ringheim, G.E. (2000). Glial modulating and neurotrophic properties of propentofylline and its application to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 903, 529–534.

Rofina, J., van Andel, I., van Ederen, A.M., Papaioannou, N., Yamaguchi, H., and Gruys, E. (2003). Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. *Amyloid* 10, 86–96.

Rofina, J.E., van Ederen, A.M., Toussaint, M.J.M., Secreve, M., van der Spek, A., van der Meer, I., Van Eerdenburg, F.J.C.M., and Gruys, E. (2006). Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain Research* 1069, 216–226.

Rosenbloom, M.H., Alkalay, A., Agarwal, N., Baker, S.L., O'Neil, J.P., Janabi, M., Yen, I.V., Growdon, M., Jang, J., Madison, C., et al. (2011). Distinct clinical and metabolic deficits in PCA and AD are not related to amyloid distribution. *Neurology* 76, 1789–1796.

Ruehl, W.W., Bruyette, D.S., DePaoli, A., Cotman, C.W., Head, E., Milgram, N.W., and Cummings, B.J. (1995). Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy.

Prog. Brain Res 106, 217–225.

Russell, M.J., Bobik, M., White, R.G., Hou, Y., Benjamin, S.A., and Geddes, J.W. (1996). Age-specific onset of beta-amyloid in beagle brains. *Neurobiol. Aging* 17, 269–273.

S

Sakata-Kaneko, S., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Usui, T., and Kita, T. (2000). Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 120, 267–273.

Sakono, M., and Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *Febs J* 277, 1348–1358.

Salvin, H.E., McGreevy, P.D., Sachdev, P.S., and Valenzuela, M.J. (2010). Under diagnosis of canine cognitive dysfunction: A cross-sectional survey of older companion dogs. *The Veterinary Journal* 184, 277–281.

Sämgård, K., Zetterberg, H., Blennow, K., Hansson, O., Minthon, L., and Londos, E. (2010). Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *Int J Geriatr Psychiatry* 25, 403–410.

Sampson, V.L., Morrison, J.H., and Vickers, J.C. (1997). The Cellular Basis for the Relative Resistance of Parvalbumin and Calretinin Immunoreactive Neocortical Neurons to the Pathology of Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* 145, 295–302.

Sánchez, L., Madurga, S., Pukala, T., Vilaseca, M., López-Iglesias, C., Robinson, C.V., Giralt, E., and Carulla, N. (2011). A β 40 and A β 42 amyloid fibrils exhibit distinct molecular recycling properties. *J. Am. Chem. Soc* 133, 6505–6508.

Sarasa, L., Gallego, C., Monleón, I., Olvera, A., Canudas, J., Montañés, M., Pesini, P., and Sarasa, M. (2010). Cloning, sequencing and expression in the dog of the main amyloid precursor protein isoforms and some of the enzymes related with their processing. *Neuroscience* 171, 1091–1101.

Sarasa, M., and Pesini, P. (2009). Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 6, 171–178.

Satou, T., Cummings, B.J., Head, E., Nielson, K.A., Hahn, F.F., Milgram, N.W., Velazquez, P., Cribbs, D.H., Tenner, A.J., and Cotman, C.W. (1997). The progression of beta-amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine.

Brain Research 774, 35–43.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.

Schnabel, J. (2011). Vaccines: Chasing the dream. *Nature* 475, S18–S19.

Shepherd, A.J. (2008). Results of the 2007 AVMA survey of US pet-owning households regarding use of veterinary services and expenditures. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 727–728.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.

Shi, J.-Q., Chen, J., Wang, B.-R., Zhu, Y.-W., Xu, Y., Wang, J., Xiao, H., Shi, J.-P., Zhang, Y.-D., and Xu, J. (2011). Short amyloid-beta immunogens show strong immunogenicity and avoid stimulating pro-inflammatory pathways in bone marrow-derived dendritic cells from C57BL/6J mice in vitro. *Peptides* 32, 1617–25.

Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489–1499.

Shimada, A., Kuwamura, M., Awakura, T., Umemura, T., and Itakura, C. (1992). An immunohistochemical and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. *J. Vet. Med. Sci* 54, 29–36.

Shimada, A., Kuwamura, M., Umemura, T., Takada, K., Ohama, E., and Itakura, C. (1991). Modified Bielschowsky and immunohistochemical studies on senile plaques in aged dogs. *Neurosci. Lett* 129, 25–28.

Siwak, C.T., Callahan, H., and Milgram, N.W. (2000). Adrafinil: effects on behavior and cognition in aged canines. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 24, 709–726.

Siwak, C.T., Tapp, P.D., Head, E., Zicker, S.C., Murphey, H.L., Muggenburg, B.A., Ikeda-Douglas, C.J., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2005). Chronic

antioxidant and mitochondrial cofactor administration improves discrimination learning in aged but not young dogs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 461–469.

Siwak-Tapp, C.T., Head, E., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., and Cotman, C.W. (2007). Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. *Neurobiol Learn Mem* 88, 249–259.

Siwak-Tapp, C.T., Head, E., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., and Cotman, C.W. (2008). Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. *Neurobiol. Aging* 29, 39–50.

Skoumalova, A., Rofina, J., Schwippelova, Z., Gruys, E., and Wilhelm, J. (2003). The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. *Exp. Gerontol* 38, 711–719.

Smith, A.D., Smith, S.M., de Jager, C.A., Whitbread, P., Johnston, C., Agacinski, G., Oulhaj, A., Bradley, K.M., Jacoby, R., and Refsum, H. (2010). Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS ONE* 5, e12244.

Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., and Hanan-Aharon, E. (1997). Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4109–4112.

Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E., and Katzav, T. (1996). Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 452–455.

Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker, J.C., Liu, H., Landers, T., and Gross, D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like [beta]-Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary Cholesterol. *Experimental Neurology* 126, 88–94.

Steiner, J., Bogerts, B., Schroeter, M.L., and Bernstein, H.-G. (2011). S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 409–424.

Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1, 14–14.

Strozyk, D., Blennow, K., White, L.R., and Launer, L.J. (2003). CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy

study. *Neurology* 60, 652–656.

Struble, R.G., Ala, T., Patrylo, P.R., Brewer, G.J., and Yan, X.-X. (2010). Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer type? *J Alzheimers Dis* 22, 393–399.

Sturchler, E., Galichet, A., Weibel, M., Leclerc, E., and Heizmann, C.W. (2008). Site-Specific Blockade of RAGE-Vd Prevents Amyloid- β Oligomer Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 28, 5149–5158.

T

Tapp, P.D., Head, K., Head, E., Milgram, N.W., Muggenburg, B.A., and Su, M.-Y. (2006). Application of an automated voxel-based morphometry technique to assess regional gray and white matter brain atrophy in a canine model of aging. *Neuroimage* 29, 234–244.

Tapp, P.D., Siwak, C.T., Gao, F.Q., Chiou, J.-Y., Black, S.E., Head, E., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., Milgram, N.W., and Su, M.-Y. (2004). Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. *J. Neurosci.* 24, 8205–8213.

Tekirian, T.L., Cole, G.M., Russell, M.J., Yang, F., Wekstein, D.R., Patel, E., Snowdon, D.A., Markesbery, W.R., and Geddes, J.W. (1996). Carboxy terminal of beta-amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. *Neurobiol. Aging* 17, 249–257.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.

Tibbling, G., Link, H., and Ohman, S. (1977). Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 37, 385–390.

Tipold, A., Pfister, H., Zurbriggen, A., and Vandeveld, M. (1994). Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS. *Vet. Immunol. Immunopathol* 42, 149–159.

Tomic, J.L., Pensalfini, A., Head, E., and Glabe, C.G. (2009). Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with

cognitive dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 35, 352–358.

V

Vajdovich, P., Gaál, T., Szilágyi, A., and Harnos, A. (1997). Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Vet. Res. Commun.* 21, 463–470.

Valente, T., Gella, A., Fernández-Busquets, X., Unzeta, M., and Durany, N. (2010). Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol. Dis.* 37, 67–76.

Vasilevko, V., Pop, V., Kim, H.J., Saing, T., Glabe, C.C., Milton, S., Barrett, E.G., Cotman, C.W., Cribbs, D.H., and Head, E. (2010). Linear and conformation specific antibodies in aged beagles after prolonged vaccination with aggregated Aβ. *Neurobiology of Disease* 39, 301–310.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179–189.

Venneti, S., Lopresti, B.J., Wang, G., Hamilton, R.L., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Apte, U.M., and Wiley, C.A. (2009). PK11195 labels activated microglia in Alzheimer's disease and in vivo in a mouse model using PET. *Neurobiol. Aging* 30, 1217–1226.

Vukovich, R., Pernecky, R., Drzezga, A., Förstl, H., Kurz, A., and Riemenschneider, M. (2009). Brain metabolic correlates of cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 and tau in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 474–480.

W

Webb, A.A., and Muir, G.D. (2000). The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 399–411.

Wegiel, J., Wisniewski, H.M., and Sołtysiak, Z. (1998). Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res* 802, 259–266.

Weissman, B.A., and Raveh, L. (2003). Peripheral benzodiazepine receptors: on mice and human brain imaging. *J. Neurochem.* 84, 432–437.

Wilcock, D.M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Subbarao, S., Freeman, M.J., Gordon, M.N., and Morgan, D. (2004). Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation* 1, 24.

Wilcock, G.K., Birks, J., Whitehead, A., and Evans, S.J.G. (2002). The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. *Int J Geriatr Psychiatry* 17, 175–183.

Winblad, B., Fioravanti, M., Dolezal, T., Logina, I., Milanov, I.G., Popescu, D.C., and Solomon, A. (2008). Therapeutic use of nicergoline. *Clin Drug Investig* 28, 533–552.

X-Y-Z

Yu, C.-H., Song, G.-S., Yhee, J.-Y., Kim, J.-H., Im, K.-S., Nho, W.-G., Lee, J.-H., and Sur, J.-H. (2011) Histopathological and Immunohistochemical Comparison of the Brain of Human Patients with Alzheimer's Disease and the Brain of Aged Dogs with Cognitive Dysfunction. *Journal of Comparative Pathology* 145, 45-58.

Zhou, Z., Chan, C.H., Ma, Q., Xu, X., Xiao, Z., and Tan, E. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* 5, 280–292.

