



# **LA TERÀPIA GÈNICA AMB shRNA APLICADA A LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

AUTORA: ALBA VARGAS DUQUE  
CURS: 2N BATXILLERAT A  
ANY: 2022-2023  
TUTORA: MERCÈ LÓPEZ DOMÍNGUEZ  
INSTITUT EUGENI D'ORS

Amb la col·laboració de:



Institut de Neurociències  
UNIVERSITAT DE BARCELONA



## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

*La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralizing invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence. But science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation for life.”

— Rosalind Franklin

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*



## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc, m'agradaria agrair l'Esther Gratacós per haver-me posat en contacte amb la Dra. Malagelada i per la seva predisposició a ajudar-me quan ho he necessitat.

A continuació voldria agrair especialment la Dra. Cristina Malagelada, per haver fet possible aquest treball donant-me l'oportunitat de realitzar-lo a la Universitat de Barcelona amb el seu grup de recerca, i per tot el seu ajut i amabilitat. També vull agrair als membres del seu equip (l'Almudena, el Genís, la Júlia i el Pol), per haver-me ajudat i assessorat sempre que ho he necessitat i per haver-me acollit com una més. Gràcies per haver fet de la meva estada la millor experiència possible, m'emporto un gran record i grans expectatives pel futur.

Seguidament, vull agrair a la meva tutora, la Mercè López, per la seva confiança des del primer moment i per haver-me guiat i assessorat al llarg d'aquests mesos.

Finalment, vull donar les gràcies als meus pares, pel seu suport incondicional i per la seva paciència. Gràcies per creure sempre en mi.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

## **ABSTRACT**

Alzheimer's Disease is a progressive neurological disorder that causes severe memory loss due to neuronal death. It is the most common form of dementia among people over the age of 65 and affects more than 50 million people worldwide.

Nowadays, the existing drugs are designed to slow the progression of this pathology. However, no treatment capable of stopping or reversing the neurodegeneration caused by this illness has been developed yet. Consequently, I decided to study gene therapy as a possible technique for treating Alzheimer's.

The main purpose of this research was to check and compare the effectiveness of two shRNA models to reduce the expression of two specific proteins, DDX1 and HSPC117, in HEK293 cells. This was done in the practical part of the research, where I conducted a series of experiments designed to determine and analyse the effectiveness of shRNA in genetic silence, both at protein and mRNA levels.

The final results verify the initial hypothesis, which stated that transfecting an shRNA into HEK293 cells significantly decreases the expression of the target gene.

Therefore, after analysing the results, we can conclude that gene therapy with shRNA is a promising therapeutic approach to Alzheimer's Disease, as it can be used to silence specific Alzheimer's proteins such as  $\beta$ -amyloid, tau, or RTP801.

**Keywords:** *Alzheimer's Disease, neurodegeneration, gene therapy, shRNA, HEK293*

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

## **RESUMEN**

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurológico progresivo que causa una grave pérdida de memoria, originada por la muerte neuronal. Es la forma más común de demencia entre personas mayores de sesenta y cinco años, y afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo.

En la actualidad, hay algunos medicamentos efectivos para ralentizar la progresión de esta patología. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado ningún tratamiento capaz de detener o invertir la neurodegeneración que causa esta enfermedad. Por ello, decidí estudiar el rol de la terapia genética como posible técnica para tratar el Alzheimer.

El propósito principal de esta investigación era comprobar y comparar la efectividad de dos modelos de shRNA para reducir la expresión de dos proteínas específicas, DDX1 y HSPC117, en células HEK293. Este objetivo se desarrolla en el marco práctico del trabajo, a partir de una serie de experimentos diseñados para determinar y analizar la eficacia del shRNA en el silenciamiento genético, tanto a nivel proteico como de mRNA.

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis inicial, la cual afirmaba que, transfectando un shRNA en células HEK293, disminuiría significativamente la expresión del gen diana.

Por lo tanto, después de analizar los resultados, podemos concluir que la terapia genética con shRNA es un enfoque terapéutico prometedor para la enfermedad de Alzheimer, puesto que se puede utilizar para silenciar proteínas específicas relacionadas con el Alzheimer como:  $\beta$ -amiloide, tau, o RTP801.

**Palabras clave:** *Enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración, terapia genética, shRNA, HEK293*

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

## **ÍNDEX**

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>12</b>
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>13</b>
<b>3. EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL</b>	<b>15</b>
3.1. L'encèfal	15
3.2. La medul·la espinal	16
3.3. Principals cèl·lules cerebrals	16
3.3.1. Neurones	16
3.3.2. Astròcits	19
3.3.3. Micròglia	20
3.3.4. Oligodendròcits	20
<b>4. L'ALZHEIMER</b>	<b>22</b>
4.1. Definició	22
4.2. Història de l'Alzheimer	22
4.3. Característiques de la malaltia	24
4.3.1. Síntomes clínics	24
4.4. Tipus d'Alzheimer	25
4.5. Anatomia patològica	26
4.5.1. Etiologia	26
4.5.2. Desenvolupament de la malaltia	29
4.5.3. Conseqüències de la malaltia	30
4.6. Diagnòstic	31
4.7. Tractaments	32
<b>5. La proteïna RTP801 o REDD1</b>	<b>34</b>
5.1. Què és?	34
5.2. El gen codificant DDIT4	34
5.3. Relació amb l'Alzheimer	34

5.4. mTORC1, un complex proteic implicat en la mort neuronal	35
<b>6. Cèl·lules HEK293</b>	<b>36</b>
6.1. Què són?	36
6.2. Història	36
6.3. Aplicacions	37
<b>7. LA TERÀPIA GÈNICA APLICADA A L'ALZHEIMER</b>	<b>38</b>
7.1. En què consisteix la teràpia gènica?	38
7.2. CRISPR-Cas9 com a eina d'edició genètica	38
7.3. Sistema de recombinació Cre-loxP	40
7.4. El mecanisme de silenciament amb shRNA	41
<b>8. METODOLOGIA</b>	<b>44</b>
8.1. Transfecció de cèl·lules HEK293 amb Polietilenimina	44
8.2. Western Blot	46
8.3. Extracció d'RNA	47
8.4. Retrotranscripció	48
8.5. qPCR	49
<b>9. CONCLUSIÓ I DISCUSSIÓ</b>	<b>51</b>
<b>10. REFERÈNCIES</b>	<b>54</b>
<b>11. ANNEX I</b>	<b>63</b>
<b>12. ANNEX II</b>	<b>65</b>
<b>13. ANNEX III</b>	<b>68</b>
<b>14. ANNEX IV</b>	<b>71</b>
<b>15. ANNEX V</b>	<b>72</b>



## 1. INTRODUCCIÓ

L'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa progressiva, és a dir, els seus símptomes empitjoren amb el pas dels anys, fins a arribar a necessitar cures totals. És la forma de demència més comuna entre les persones de més de seixanta-cinc anys, representant-ne el 60-80% dels casos [MedlinePlus, 2020; *Enfermedad de Alzheimer*]. Es caracteritza per la pèrdua de la memòria immediata i d'altres capacitats mentals a mesura que moren les cèl·lules nervioses i s'atrofien diferents zones del cervell.

Actualment, no existeix cap tractament definitiu per a la malaltia d'Alzheimer, i és per això que en aquest treball es va plantejar la possibilitat d'estudiar com editar genèticament els gens alterats dels individus afectats, per a poder evitar l'expressió de la malaltia o reduir-la.

L'edició genètica és una eina amb un gran potencial per al tractament i la prevenció de malalties genètiques. Amb l'edició genètica, els investigadors poden silenciar els gens seleccionats, corregir mutacions i canviar l'activitat de gens específics. En l'actualitat, l'edició de gens ja s'ha utilitzat per a modificar les cèl·lules immunes de persones per a combatre el càncer o per ser resistents a la infecció per VIH [Herrera, M., 2019. *¿Qué es la edición genética y cómo puede solventar enfermedades en el futuro?*].

Segons l'article científic "RTP801/REDD1 contributes to neuroinflammation severity and memory impairments in Alzheimer's disease" realitzat pels investigadors de l'Institut de Neurociències de la Universitat de Barcelona, s'ha detectat que els nivells de la proteïna RTP801<sup>1</sup> estan elevats a la regió de l'hipocamp dels pacients d'Alzheimer. Es va observar que reduint els nivells d'aquesta proteïna en un model animal d'Alzheimer (ratolins 5XFAD), aquests milloraven i aconseguien recuperar-se parcialment [Pérez-Sisqués, L. *et al.*, 2021.]. Entre els investigadors d'aquest article científic es troba la Dra. Cristina Malagelada, qui em va donar l'oportunitat de poder elaborar el marc pràctic d'aquest treball als laboratoris de la Universitat de Barcelona, amb ajuda del seu equip.

---

<sup>1</sup> RTP801 és una proteïna que augmenta en condicions d'estrès i provoca la mort neuronal.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

A inicis de gener de 2022 vaig contactar amb Esther Gratacós, doctora en neurociència per la Universitat de Barcelona, i em va oferir l'opció de fer l'experimentació del Treball de Recerca amb la Cristina Malagelada, doctora en bioquímica i professora agregada de la Universitat de Barcelona. A finals d'aquest mes va tenir lloc la primera reunió amb la Cristina, on em va explicar que actualment la seva principal línia de recerca és l'estudi de la proteïna RTP801 en malalties neurodegeneratives; concretament en Alzheimer, Parkinson i Huntington.

En un primer moment va ser difícil triar en quina d'aquestes malalties basar el meu treball, però finalment vaig decidir centrar-lo en l'Alzheimer; ja que és una malaltia que afecta mundialment a moltes persones i tenia interès a aprendre sobre les característiques d'aquesta en profunditat.

Un cop decidit el tema del treball, es va voler dedicar el marc pràctic a estudiar l'ús d'shRNA com a eina per reduir l'expressió de proteïnes específiques, partint de la hipòtesi que aquesta molècula era eficaç pel seu silenciament. D'aquesta manera, la meva part pràctica ha servit per validar dos models d'shRNA que seran utilitzats en la recerca de malalties neurodegeneratives.

Durant els mesos de juny i juliol, vaig tenir l'oportunitat d'anar al laboratori de neuroquímica de la Universitat de Barcelona (UB) a elaborar el meu treball pràctic i a aprendre diferents tècniques bioquímiques. Allà vaig estar treballant amb el grup de recerca de la Cristina, i em van ajudar a realitzar els diferents experiments que consten a la part pràctica i a desenvolupar correctament les qüestions teòriques més específiques.

## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

En el treball es validaran dos models d'shRNA, per tal de comparar quin d'ells funciona millor i confirmar que és possible baixar els nivells de proteïnes específiques transfectant shRNA en cèl·lules HEK293.

La hipòtesi afirma que, si transfectem plasmidis que expressin shRNA en unes cèl·lules renals embrionàries humanes, baixen els nivells de les proteïnes diana determinades.

El propòsit principal del treball és investigar l'efectivitat de l'edició genètica en cèl·lules humanes i, mitjançant shRNA, baixar els nivells de dues proteïnes (DDX1 i HSPC117) en cèl·lules humanes. Aquest mecanisme es podria utilitzar també per a baixar els nivells de RTP801 en neurones, fet que està demostrat que afavoreix la millora de l'Alzheimer en ratolins.

Algunes de les finalitats secundàries del treball són:

- Prendre contacte amb els diferents instruments i eines de laboratori.
- Adquirir experiència i autonomia treballant en un laboratori.
- Aprendre a fer una anàlisi crítica dels resultats obtinguts en els diferents experiments.

Cal esmentar que amb aquest treball no es pretén trobar una cura per l'Alzheimer, ja que seria un objectiu poc realista i molt difícil de complir tenint en compte les nombroses investigacions que s'estan realitzant actualment per arribar a assolir aquesta meta. Tot i això, el model que validaré s'utilitzarà per a la recerca de les malalties neurodegeneratives.

### 3. EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

El sistema nerviós central (SNC) és una de les parts en què es divideix el sistema nerviós, i està format per l'encèfal i per la medul·la espinal. El SNC és la part del sistema nerviós que s'encarrega de controlar totes les nostres funcions corporals. És en aquesta zona on es produeixen els processos mentals necessaris per a analitzar i integrar la informació que rebem de l'exterior i generar respostes als estímuls rebuts pel cos. També s'encarrega de transmetre impulsos cap als nervis i els músculs, dirigint els seus moviments [Britannica, (s.d.). *Central nervous system*].

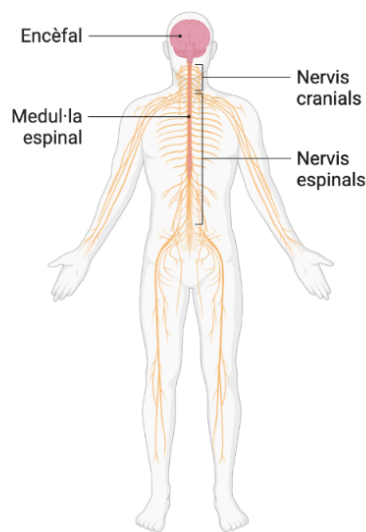


Fig. 1: Localització del sistema nerviós humà.  
Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (05.09.2022)

#### 3.1. L'encèfal

L'encèfal és la part del SNC situada a l'interior del crani. És la massa nerviosa més important del SNC i està compost bàsicament per tres parts: prosencèfal, mesencèfal i romboencèfal. Aquest òrgan és molt delicat, i necessita estar molt protegit; la protecció està proporcionada pel crani que l'envolta i per tres membranes anomenades meninges. L'encèfal controla totes les funcions vitals del cos i totes les emocions humanes, i també és l'encarregat de rebre i interpretar els senyals que provenen dels sentits i de les funcions cognitives, com la memòria, la creativitat o el desenvolupament del llenguatge [Sancler, V., 2018. *Encéfalo*].

## **3.2. La medul·la espinal**

La medul·la espinal és una llarga i fràgil estructura tubular que comença al final del tronc de l'encèfal i continua aproximadament fins al final de la columna vertebral. Igual que l'encèfal, la medul·la espinal està recoberta per les meninges. Tant la medul·la espinal com les meninges estan contingudes a l'interior del conducte raquidi, que discorre pel centre de la columna vertebral [Maiese, K., 2021. *Médula espinal*].

## **3.3. Principals cèl·lules cerebrals**

### **3.3.1. Neurones**

Les neurones són la unitat bàsica de treball del cervell. Són cèl·lules especialitzades que s'encarreguen de transmetre informació a altres cèl·lules nervioses, músculs o glàndules<sup>2</sup>. Les neurones dels mamífers estan constituïdes per un cos cel·lular (o soma), les dendrites i un axó principal [BrainFacts, 2012. *The Neuron*].

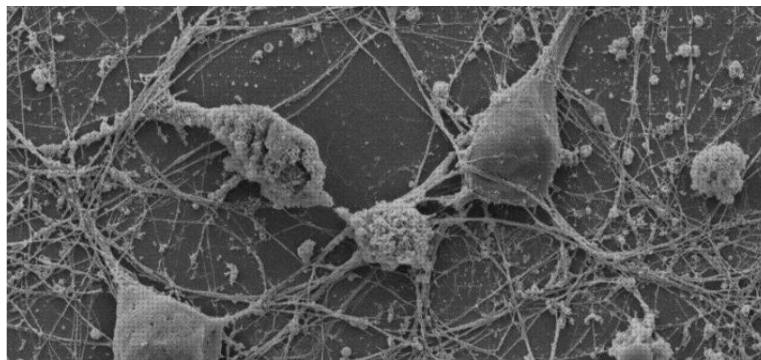


Fig. 2: Neurona vista en microscopi electrònic de transmissió (MET).

Font: <https://www.top10microscopios.com> (24.08.2022)

Els axons permeten a les neurones transmetre senyals elèctrics i químics a altres cèl·lules; en molts casos estan coberts amb una beina de mielina, que accelera la transmissió dels senyals elèctrics al llarg de l'axó. Les dendrites s'estenen des del

---

<sup>2</sup> Una glàndula és un grup de cèl·lules epitelials amb la funció de segregar substàncies químiques, com les hormones, per a alliberar-les en el corrent sanguini (glàndula endocrina) o a l'interior d'una cavitat corporal o la seva superfície exterior (glàndula exocrina).

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

cos cel·lular de les neurones i reben missatges dels axons d'altres neurones. El cos cel·lular és la part central de la neurona, on estan situats el nucli i el citoplasma de la neurona. El soma conté informació genètica, manté l'estructura de la neurona i proporciona energia per fer activitats [Vandergriendt,C., Zimlich, R., 2022. *An Easy Guide to Neuron Anatomy with Diagrams*].

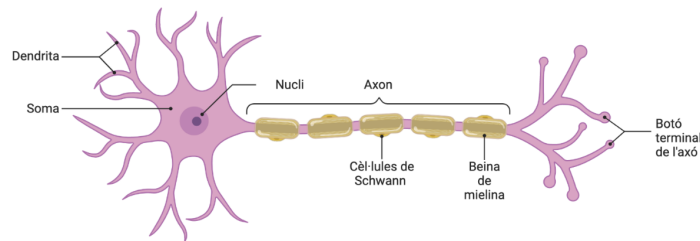


Fig. 3: Anatomia d'una neurona.

Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (24.08.2022)

Les neurones envien senyals utilitzant potencials d'acció. El potencial d'acció és un procés fisiològic que permet transmetre informació i emetre una resposta motora per part d'un múscul. Aquest període cel·lular es caracteritza per l'entrada de sodi a l'interior de la cèl·lula, i la posterior sortida del potassi (bomba sodi-potassi). Quan es genera un potencial d'acció, aquest és portat per l'axó a un final presinàptic<sup>3</sup>. La sinapsi és un mecanisme de comunicació que es produeix entre dues o més neurones amb la finalitat de poder transmetre un impuls nerviós [FisioOnline, (nd). *Potencial de acció*].

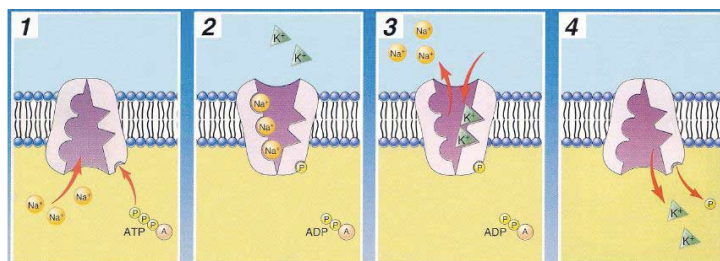


Fig. 4: Bomba de sodi-potassi.

Font: <https://www.hsnstore.com> (24.08.2022)

<sup>3</sup> La neurona que envia el senyal es diu neurona presinàptica i la que rep el senyal es diu neurona postsinàptica.

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

El procés pel qual es formen noves neurones és anomenat neurogènesi. Aquesta ocorre sobretot en l'estat embrionari i la infantesa. No obstant això, i en molt menor mesura, també hi ha neurogènesi adulta en dues regions específiques: els ventricles laterals i l'hipocamp [Gage, F., 2022. *Neurogenesis in the Adult Brain*].

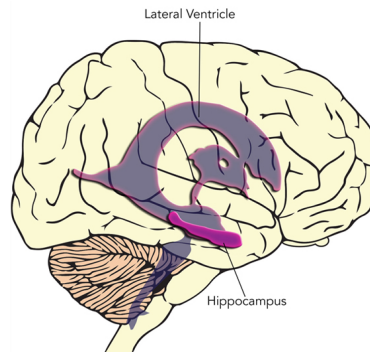


Fig. 5: Localització del ventricle lateral i l'hipocamp al cervell humà.

Font: <https://kids.frontiersin.org> (24.08.2022)

Les neurones, en ser cèl·lules totalment diferenciades<sup>4</sup>, han perdut la capacitat de reproduir-se, però això no impedeix que es formin noves neurones, ja que hi ha unes certes zones del cervell que contenen cèl·lules mare<sup>5</sup> neuronals, les quals són capaces de generar noves neurones en tres etapes: proliferació (creixement o reproducció), diferenciació (especialització) i supervivència (protecció i autorregeneració) pel procés il·lustrat a la següent figura. [Gencel, J., 2016. *¿Las neuronas se reproducen?*].

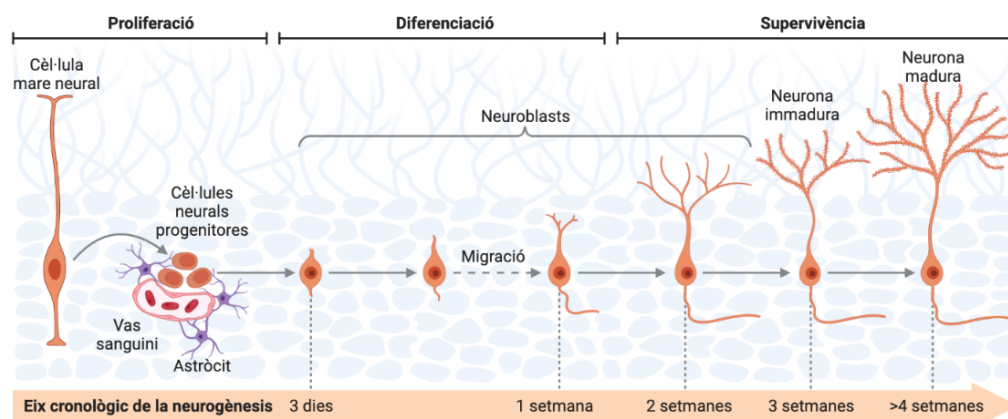


Fig. 6: Procés de formació de noves neurones al cervell adult.

Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (25.08.2022)

<sup>4</sup> Les cèl·lules totalment diferenciades són aquelles que compleixen una funció específica i expressen molècules específiques, necessàries per a complir aquesta funció.

<sup>5</sup> Les cèl·lules mare són les cèl·lules capaces de donar lloc a altres tipus cel·lulars.



### **3.3.2. Astròcits**

Els astròcits són les cèl·lules glials<sup>6</sup> més abundants al cervell. Són cèl·lules del sistema nerviós amb forma d'estrella que tenen la capacitat d'oferir diverses funcions protectores al sistema nerviós central. Els astròcits contribueixen a la producció i manteniment de la barrera hematoencefàlica<sup>7</sup>, fent una funció de filtratge. Igual que les neurones, els astròcits tenen dendrites i poden formar sinapsis que permeten la comunicació química i elèctrica entre cèl·lules. [Ferri, B., 2021. *The Anatomy of Astrocytes*].

Abans, es creia que la funció dels astròcits era únicament estructural, ocupant els llocs lliures que deixaven les neurones, però realment les seves funcions van més enllà, centrades a donar suport a les neurones:

Els astròcits donen suport físic a les neurones i les mantenen en el seu lloc, regulant la transmissió dels impulsos elèctrics. També, la connexió dels astròcits amb el sistema vascular permet que obtinguin nutrients (com la glucosa o l'àcid làctic) de la sang i puguin proporcionar-los a les neurones; són capaços d'emmagatzemar glicogen per tal que les neurones puguin accedir a les reserves en cas de necessitar-les. Una altra funció dels astròcits és la de fagocitar els residus generats per les neurones i transportar-los a la sang perquè puguin ser eliminats. En últim lloc, s'encarreguen de regular l'espai extracel·lular, revertint l'acumulació excessiva del potassi, una molècula a la qual són molt permeables [Torres, A., 2017. *Astrocytes: ¿qué funciones cumplen estas células gliales?*].

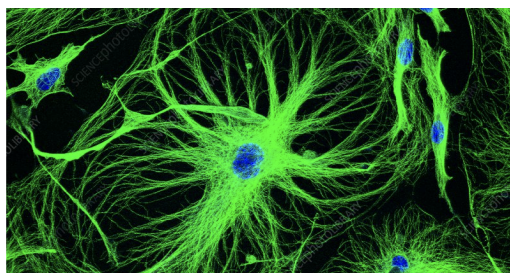


Fig. 7: Astròcits vists en microscopi confocal

Font: <https://www.sciencephoto.com> (24.08.2022)

---

<sup>6</sup> Les cèl·lules glials són cèl·lules del sistema nerviós que formen part d'un sistema de suport i són essencials per a l'adequat funcionament del teixit del sistema nerviós; proporcionen nutrició, suport i protecció a les neurones.

<sup>7</sup> La barrera hematoencefàlica és una membrana semipermeable que evita que certs components de la sang es desbordin al fluid extracel·lular del sistema nerviós central.



### 3.3.3. Micròglia

La micròglia és un tipus de cèl·lula glial amb funcions relacionades amb la defensa immunitària i la fagocitació d'elements tòxics per a les neurones. Estan situades a l'encèfal, la medulla espinal i els nervis cranials i espinals [Figueroba, A., 2017. *Microglía: funciones principales y enfermedades asociadas*]. Són cèl·lules petites que es mouen entre les neurones i altres tipus de cèl·lules gials. En situacions normals, la quantitat de cèl·lules de micròglia és baixa, però quan es produeix una lesió o inflamació en el teixit nerviós, aquestes cèl·lules s'activen, proliferen, i migren a la zona afectada on eliminen els patògens i les cèl·lules danyades. [Instituto de Educación Secundaria Ramón Pignatelli, (s.d.). *El sistema nervioso*].

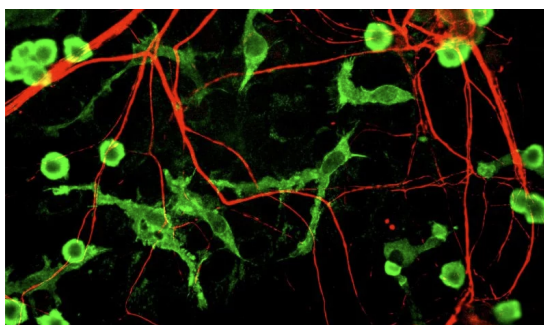


Fig. 8: Micròglia (en verd) i neurones (en vermell) al teixit nerviós de rata.

Font: <https://curiosoando.com> (05.09.2022)

### 3.3.4. Oligodendròcits

Els oligodendròcits són un tipus de neuròglia exclusiva del sistema nerviós central que s'encarrega de crear les beines de mielina, les quals cobreixen els axons de les neurones [Britannica, (s.d.). *Oligodendrocyte*].

En el sistema nerviós perifèric<sup>8</sup>, les cèl·lules equivalents als oligodendròcits s'anomenen cèl·lules de Schwann; amb la diferència que els oligodendròcits poden arribar a cobrir uns 50 axons diferents gràcies a les seves múltiples prolongacions mentre que les cèl·lules de Schwann recobreixen un únic axó.

Es distingeixen dos tipus d'oligodendròcits: els interfasciculars i els satelitals. Estructuralment i molecularment són molt similars, però els interfasciculars s'ocupen

---

<sup>8</sup> El sistema nerviós perifèric està format per tots els nervis perifèrics que recorren el cos, i els ganglis, que són grups de neurones.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

de la formació de les beines de mielina mentre que els satel·lals no estan implicats en la mielinització ni tampoc s'adhereixen a les neurones, de manera que serveixen com a aïllants. En l'actualitat encara es desconeixen amb exactitud les funcions d'aquest tipus d'oligodendròcits [Torres, A., 2017. Oligodendrocitos: qué son, tipos y funciones de estas células].

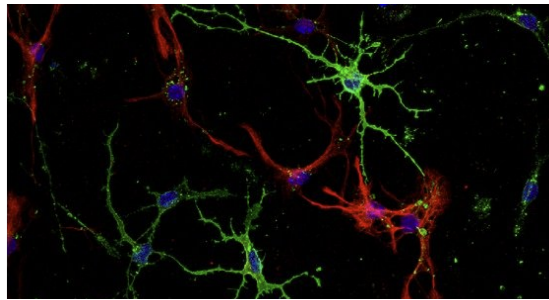


Fig. 9: Astròcits (en vermell) i oligodendròcits (en verd) observats en microscopi confocal.

Font: <https://www.sciencephoto.com> (05.09.2022)

## 4. L'ALZHEIMER

### 4.1. Definició

L'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa que es produeix per la mort progressiva de les neurones que, alhora, perden la seva funcionalitat. És la forma de demència més comuna entre les persones majors de seixanta-cinc anys [MedlinePlus, 2020; *Enfermedad de Alzheimer*]. És un trastorn cerebral que produeix el deteriorament progressiu de la memòria i, amb el temps, impedeix dur a terme fins les tasques més senzilles. Les persones amb Alzheimer també experimenten canvis en la conducta i la personalitat. L'Alzheimer no forma part de l'envelliment, sinó que és el resultat d'alteracions complexes en el cervell que comencen anys abans que apareguin els símptomes i que originen la pèrdua de neurones i les seves connexions [PortalClínic, 2018. *Alzheimer*].

### 4.2. Història de l'Alzheimer

L'Alzheimer va ser descrit per primera vegada el 1906 pel Doctor Alois Alzheimer (d'ell prové el nom), basant-se en una pacient que va experimentar pèrdua de memòria, paranoia i canvis psicològics [Godman, H., 2017. *A Brief History of Alzheimer's Disease*]. A l'autòpsia, el doctor va veure que l'interior i el voltant de les cèl·lules nervioses del cervell d'Auguste Deter (el primer cas registrat d'Alzheimer), s'havia encogit. [Sauer, A., 2013. *History of Alzheimer's: Major Milestones*]



Fig. 10: Alois Alzheimer.

Font: <http://gconse.blogspot.com> (19.08.2022)

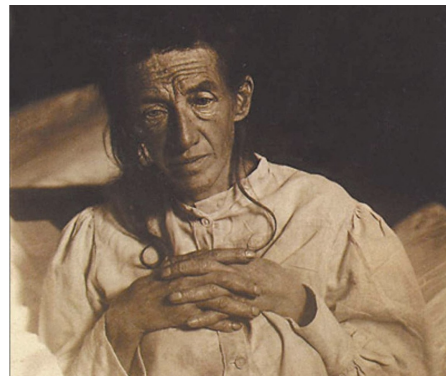


Fig. 11: Auguste Deter al llit d'un hospital psiquiàtric a Frankfurt, Alemanya.

Font: <https://www.publimetro.co> (19.08.2022)

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

El 1974 el Congrés dels Estats Units va establir el *National Institute on Aging* (NIA), amb l'objectiu d'entendre millor l'envelliment i promoure una millor qualitat de vida entre les persones grans.

Dos anys després, el 1976, el neuròleg Robert Katzman va declarar l'Alzheimer com la forma més comuna de demència, fet que va conscienciar sobre la malaltia i va afavorir la recerca de la malaltia a través del *National Institutes of Health* (NIH) [Sauer, A., 2013. *History of Alzheimer's: Major Milestones*].

L'any 1978 es va realitzar el primer assaig clínic d'un medicament per a tractar els símptomes de l'Alzheimer, i el 1984, va ser descoberta beta-amiloide ( $\beta$ -amiloide), una proteïna relacionada amb l'Alzheimer. Dos anys més tard, es van descobrir els cabdells neurofibril·lars de tau en persones amb Alzheimer. Durant la dècada del 1990 es van aprovar quatre medicaments [Ellison, J., 2021. *The History of Alzheimer's Disease*]. Aquests eren de dos tipus: Inhibidors de la colinesterasa (com el Donepezil, la rivastigmina i la galantamina), que tenen efectes suaus en la reducció de símptomes, i antagonistes del receptor NMDA, que estableixen el funcionament del sistema de glutamat (Vegeu 2.7. Tractaments).

A partir del 2003, es va començar a estudiar genèticament la malaltia per tal de trobar els gens que fan que una persona tingui més probabilitat que una altra de patir Alzheimer.

Actualment, s'està fent molta recerca per tal de trobar la causa exacta de la malaltia i desenvolupar tractaments que no només en millorin els símptomes, sinó que aconseguixin acabar amb la neurodegeneració. L'atomoxetina, per exemple, s'ha presentat en els últims mesos com un tractament prometedor per acabar amb la neurodegeneració, augmentant els nivells del neurotransmissor noradrenalina. Un estudi realitzat per un grup d'investigadors de l'*Emory Brain Health Center* a Atlanta (Estats Units) mostra una reducció dels nivells de la proteïna tau (Vegeu 2.5.1. Etiologia) en el líquid cefalorraquidi en 39 persones amb deterioració cognitiva lleu després de sis mesos de tractament amb atomoxetina (Allan I Levey, et al., 2022. *A phase II study repurposing atomoxetine for neuroprotection in mild cognitive impairment*).

### **4.3. Característiques de la malaltia**

#### **4.3.1. Síntomes clínics**

Algunes de les primeres característiques que poden mostrar les persones amb aquesta malaltia en fase lleu són: pèrdues de memòria, desorientació espacial i temporal, alteració de l'estat d'ànim, problemes d'atenció i alentiment de la parla i la comprensió.

A mesura que la malaltia va avançant aquests símptomes es van fent progressivament més greus fins a arribar al punt en què el pacient perd la seva autonomia i necessita ajuda per dur a terme les tasques quotidianes [Mayo Clínic, 2022. *Alzheimer's disease*].

Segons la web *Clínicas Neural*, els símptomes de la malaltia es poden dividir en tres etapes:

- Etapa inicial: Aquesta és la primera etapa, en la qual el pacient comença a patir pèrdues de memòria a curt termini; no recorda paraules, els noms de persones que acaba de conèixer o el que ha de fer. Es noten canvis en la manera de ser dels malalts, i és habitual que es presentin símptomes associats a la depressió i a l'apatia<sup>9</sup>.
- Etapa mitjana: És l'etapa de major durada, en la que el pacient pot presentar símptomes com: l'oblit de la informació personal, mal humor, i desorientació temporal i espacial. En aquesta etapa el pacient experimenta moments de lucidesa combinats amb la desorientació. És possible que repeteixi actes que acaba de realitzar o que perdi la noció del temps.
- Etapa avançada: En últim lloc, a l'etapa avançada, els símptomes s'agregen notablement i el pacient té moltes complicacions per a interactuar amb el seu entorn; és incapaç de mantenir una conversa fluida i pot tenir problemes per a controlar els seus moviments naturals. Finalment, a causa del seu deteriorament cognitiu, necessita ajuda per a executar les tasques

---

<sup>9</sup> L'apatia és un estat d'ànim en el qual un individu mostra falta d'emoció, de motivació o d'entusiasme pels esdeveniments o persones del seu àmbit quotidià.

quotidianes i perd la seva autonomia [Clínicas Neural, 2020. *Alzheimer: etapas y características*].

#### **4.4. Tipus d'Alzheimer**

L'Alzheimer es pot classificar en diferents tipus segons els símptomes, el moment de l'aparició, i les reaccions inflamatòries associades.

Segons els símptomes trobem l'Alzheimer límbic (subtipus 1), el mig temporal (subtipus 2/ MTL), el posterior (subtipus 3) i el lateral temporal (subtipus 4).

El subtipus 1 és la variant observada en el 33% dels pacients, és considerat "l'Alzheimer típic". Apareix tard i és el que provoca una pèrdua de memòria més greu. El subtipus 2 està present en el 18% dels casos i afecta especialment a les funcions executives<sup>10</sup>. És el que menys afecta la memòria. El subtipus 3 es veu en el 30% dels casos i afecta especialment a l'escorça visual. La seva progressió és lenta i apareix cap als seixanta-cinc anys, un tret clínicament destacable són els efectes nocius en les habilitats visuals-espacials. Finalment, el subtipus 4 és el tipus vist en el 19% dels casos. Es caracteritza especialment per l'asimetria cerebral, ja que l'hemisferi esquerre és el que està més afectat. El seu progrés és més ràpid i apareix molt d'hora, abans dels seixanta anys.

Si ens centrem en les reaccions inflamatòries associades, trobem dos tipus, l'Alzheimer inflamatori i el no inflamatori. En el de tipus inflamatori, s'observa una quantitat elevada de la proteïna C-reactiva, una proteïna produïda pel fetge que s'envia a la circulació sanguínia com a resposta a una inflamació; mentre que en el no inflamatori no s'aprecien nivells més elevats de C-reactiva ni està associat amb reaccions inflamatòries.

En últim lloc, segons el moment d'aparició de la malaltia es pot classificar en inici tardà i inici primerenc. L'Alzheimer d'inici tardà és el més comú, apareix després dels seixanta-cinc anys i representa el 95% dels casos. En el d'inici primerenc, l'Alzheimer apareix abans dels seixanta-cinc anys (generalment entre els quaranta i

---

<sup>10</sup> Les funcions executives són un conjunt de capacitats cognitives necessàries per a controlar i autoregular la mateixa conducta.

els cinquanta), comprèn el 5% dels casos i és degut a factors genètics heretables. [Bertran, P., 2022. *Los 11 tipos de Alzheimer (y cómo diferenciarlos)*]

## **4.5. Anatomia patològica**

### **4.5.1. Etiologia**

Les causes exactes de l'Alzheimer no estan completament definides amb precisió, però, a escala bàsica, l'Alzheimer es produeix perquè les proteïnes del cervell no funcionen amb normalitat i impedeixen el funcionament correcte de les neurones, causant que les neurones es deteriorin, perdin les seves connexions amb altres neurones i, finalment, morin. Per a la majoria de les persones, l'Alzheimer és causada per una combinació de factors genètics, de vida i ambientals que afecten el cervell amb el temps [NIH, 2017. *¿Qué causa la enfermedad de Alzheimer?*].

En menys del 5% dels casos, l'Alzheimer es presenta per canvis genètics específics que determinen que una persona desenvoluparà la malaltia. En aquests casos la malaltia sol aparèixer entre els 30 i els 65 anys.

Per intentar entendre la causa de l'Alzheimer, els científics se centren en el paper de les formes tòxiques de dues proteïnes: la proteïna  $\beta$ -amiloide i la proteïna tau.

- La  $\beta$ -amiloide: és un fragment d'una proteïna més gran que, amb el temps, va unint-se entre si formant unes fibres que s'acumulen al voltant de les neurones anomenades cossos senils. Aquests dipòsits van formant unes plaques entre les neurones que resulten tòxiques i són responsables del deteriorament cognitiu progressiu [El médico interactivo, 2013. *Revelan cómo beta-amiloide puede causar la enfermedad de Alzheimer*].
- Les proteïnes tau: en la seva forma normal, les tau s'enllacen als microtúbuls del citoesquelet neuronal i tenen un paper en el suport intern i en el sistema de transport d'una neurona per transportar nutrients i altres materials essencials. En l'Alzheimer, les proteïnes tau canvien de forma i s'organitzen en estructures anomenades cabdells neurofibril·lars (NFTs per les seves sigles en anglès). Aquests cabdells interrompen el sistema de transport i són



## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

tòxics per a les cèl·lules [Rodríguez, L., 2018. *La proteína tau: qué es y cómo influye en la neurodegeneración*].

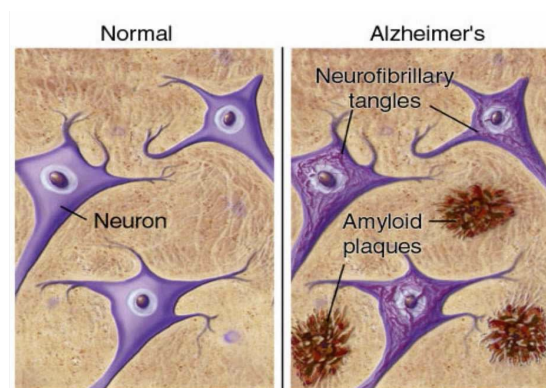


Fig. 12: NFTs i plaques amiloides entre les neurones del cervell amb Alzheimer.

Font: <https://www.hipocampo.org> (25.07.2022)

Els factors de risc de l'Alzheimer, és a dir, els factors que augmenten la probabilitat que una persona el pateixi, són molt variats, i poden ser tant ambientals com genètics.

L'edat és un factor de risc molt important i el més conegut, ja que, a mesura que augmenta l'edat d'un individu, també augmenta la seva probabilitat de desenvolupar la malaltia.

Un altre factor de risc és tenir Síndrome de Down (SD), perquè moltes persones que pateixen SD la desenvolupen. Això pot estar relacionat amb el fet de tenir tres còpies del cromosoma 21 i, per tant, tres còpies del gen per a la proteïna que provoca la creació de  $\beta$ -amiloides. Els símptomes de l'Alzheimer tendeixen a aparèixer entre 10 i 20 anys abans en persones amb síndrome de Down que en la població general.

També s'han realitzat diversos estudis en animals en els quals s'ha observat que les partícules de contaminació de l'aire estan associades amb un risc més elevat de patir demència. Així mateix, el consum excessiu d'alcohol està demostrat que pot causar l'aparició prematura de la malaltia i una major gravetat d'aquesta.

En altres investigacions, s'ha demostrat que la dificultat per adormir-se o romandre adormits estan associats a un major risc de patir Alzheimer. Segons el diari "Health",



## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

les persones que tenen moltes dificultats per dormir a la nit o que passen massa temps sense dormir tenen un 27% més de probabilitats de patir malalties com l'Alzheimer; les persones que tenen falta de son, un 24%; i aquells amb apnea del son<sup>11</sup>, fins a un 29% de probabilitat de patir una pèrdua severa de memòria [Mayo Clínic, 2022. *Alzheimer's disease*].

En el camp de la genètica, el gen més comunament associat amb l'Alzheimer d'inici tardà és un gen de risc anomenat apolipoproteïna E (APOE). El gen ApoE, està localitzat en el cromosoma 19. El gen és pleomòrfic (pot presentar dues o més formes estructurals durant el seu cicle de vida), amb tres al·lels<sup>12</sup> principals: ApoE2, ApoE3 i ApoE4, que tradueixen tres isoformes<sup>13</sup> de la proteïna: una proteïna ApoE-E3 normal, ApoE-E2 i ApoE-E4 disfuncionals. Aquestes isoformes difereixen una de l'altra només per un aminoàcid substituït en les posicions 112 i 158. Aquestes petites variacions tenen grans conseqüències fisiològiques. L'E2 s'associa amb un desordre genètic anomenat hiperlipoproteïnèmia tipus III<sup>14</sup> i amb un augment del risc d'ateroesclerosi<sup>15</sup> desenvolupada a una edat primerenca. L'E4 està implicada en l'ateroesclerosi, i és la isoforma més comunament associada a la malaltia d'Alzheimer i desenvolupament cognitiu inadequat [Mayo Clínic, 2019. *Genes de la enfermedad de Alzheimer: ¿estás en riesgo?*].

Recentment, s'ha estat investigant el paper de la proteïna RTP801 en aquesta malaltia. La proteïna RTP801 es troba en nivells elevats en els pacients amb malalties neurodegeneratives com el Parkinson, el Huntington i l'Alzheimer, i s'ha demostrat que regulant-la en models animals disminueixen els símptomes de la malaltia. Aquesta proteïna s'explicarà a fons més endavant en l'apartat 4 (la proteïna RTP801 o REDD1).

---

<sup>11</sup> L'apnea del son és un trastorn comú en el qual la respiració s'interromp o es fa molt superficial durant les hores de son. Es produeix quan els músculs de la part posterior de la gola es relaxen massa i no permeten una respiració normal.

<sup>12</sup> Un al·lel és cadascuna de les formes que pot presentar un gen que ocupa el mateix lloc en un cromosoma determinat, i que expressa diferentment un mateix caràcter.

<sup>13</sup> Les isoformes són les diferents formes estructurals que pot presentar una proteïna.

<sup>14</sup> La hiperlipoproteïnèmia tipus III és un trastorn hereditari recessiu en el qual les lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL) s'acumulen en la sang.

<sup>15</sup> L'ateroesclerosi és l'acumulació de greixos, colesterol i altres substàncies dins de les artèries i en les seves parets.

#### 4.5.2. Desenvolupament de la malaltia

L'Alzheimer es caracteritza per la pèrdua de neurones i sinapsis<sup>16</sup> en l'escorça cerebral i en certes regions subcorticals<sup>17</sup>. Aquesta pèrdua causa una atròfia de les regions afectades, incloent-hi una degeneració en el lòbul temporal i parietal i parts de l'escorça frontal i la circumvolució cingulada<sup>18</sup>.

Els primers símptomes de l'Alzheimer són les alteracions de la memòria episòdica<sup>19</sup>. Aquest fet concorda amb els estudis que demostren que la malaltia comença a l'hipocamp i l'escorça entorínica<sup>20</sup>, importants per a la memòria episòdica. L'hipocamp és la zona del cervell implicada en la memòria, l'orientació espacial i la regulació emocional. Per la seva banda, l'escorça entorínica és l'àrea del cervell que actua com a xarxa per a la memòria, la navegació i la percepció del temps.

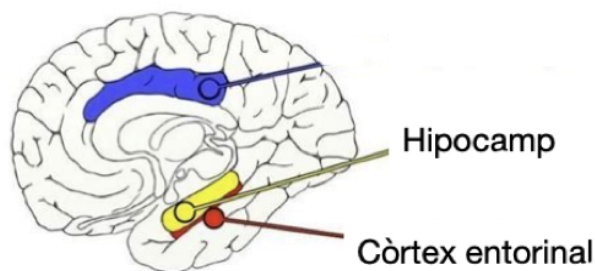


Fig. 13: Localització del còrtex entorínal i l'hipocamp al lòbul temporal.

Font: <https://www.tekcrispy.com> (25.07.2022)

Amb la progressió de la malaltia, aquesta comença a estendre's a altres zones del cervell, cosa que provoca que altres habilitats cognitives es vegin afectades. La difusió de la malaltia pot causar l'afàsia: un trastorn que afecta la capacitat de produir o comprendre el llenguatge, dificultant la comunicació de la persona amb el seu entorn. També es pot veure afectada la fluïdesa verbal i la memòria semàntica<sup>21</sup>.

<sup>16</sup> La sinapsi és un mecanisme de comunicació que es produeix entre dues o més neurones per poder transmetre un impuls nerviós

<sup>17</sup> Les regions subcorticals són aquelles que se situen por sota de la superfície del cervell.

<sup>18</sup> La circumvolució cingulada es troba involucrada en la formació d'emocions i en el processament de dades bàsiques referides a la conducta, aprenentatge i memòria.

<sup>19</sup> La memòria episòdica és la memòria relacionada amb successos autobiogràfics (moments, llocs, emocions associades, experiències, etc.).

<sup>20</sup> El còrtex entorínal distribueix la informació que entra-i-surt de l'hipocamp i actua com a pont entre aquesta i altres àrees del cervell.

<sup>21</sup> La memòria semàntica és aquella que conté tota la informació relativa als significats i coneixements conceptuals no relacionats amb experiències concretes.

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

A mesura que l'Alzheimer continua desenvolupant-se, apareixen dèficits també en les funcions executives<sup>22</sup>, les habilitats visuoespacials<sup>23</sup> i en la capacitat d'atenció. [Pérez-Sisqués, Leticia, et al., 2021]. En les etapes més avançades de la malaltia, la majoria de les zones del cervell es troben atrofiades, i es produeixen dificultats en el moviment perquè es veuen afectades les zones motores del cervell.

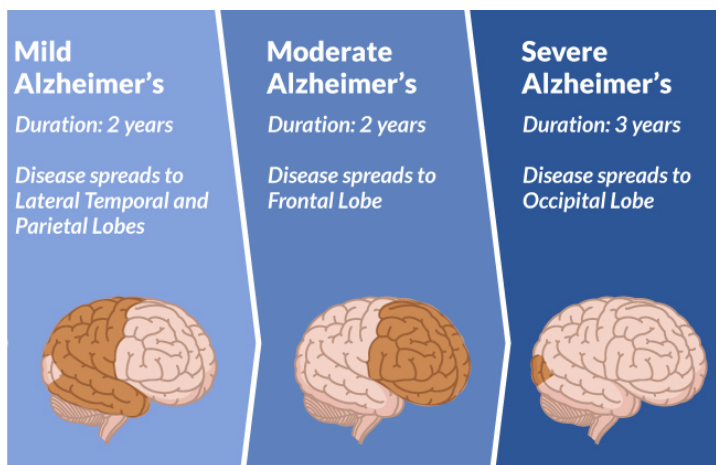


Fig. 14: Zones afectades per l'Alzheimer en les etapes inicial, mitjana i avançada de la malaltia (d'esquerra a dreta)

Font: <https://happyknowledgeblog.wordpress.com> (19.08.2022)

### 4.5.3. Conseqüències de la malaltia

L'Alzheimer és una malaltia que comporta moltes conseqüències tant pel pacient com per a la família i persones properes a aquest, ja que aquesta haurà d'encarregar-se de moltes de les tasques que realitzava el pacient.

El pacient d'Alzheimer experimentarà canvis en la seva personalitat, pot perdre la capacitat de comunicar-se correctament (afàsia), tindrà dificultats per a fer les tasques quotidianes i patirà pèrdues de memòria a curt i llarg termini. Eventualment, el pacient haurà de dependre de la seva família o cuidador per a poder fer les accions que ja no pot fer per ell mateix [Maximiliana, (s.d.). *Consecuencias del Alzheimer: cómo afecta la enfermedad a las personas*].

<sup>22</sup> Les funcions executives són un conjunt de processos cognitius i habilitats mentals que permeten un individu planificar i executar els seus objectius.

<sup>23</sup> Les habilitats visuoespacials són la capacitat per a representar, analitzar i manipular objectes mentalment.

Per a la família i les persones més properes del malalt, l'Alzheimer també té conseqüències que van més enllà d'alterar la logística familiar per a encarregar-se d'ell. Aquesta malaltia afecta també emocionalment al seu entorn proper, ja que ha de viure les pèrdues de memòria cada vegada més greus i eventualment la defunció del pacient.

Cal tenir en compte que l'Alzheimer no causa la defunció de forma directa, però sí que degenera l'organisme i incapacita a la persona per a superar altres patologies; per la qual cosa la principal causa de mort entre els pacients amb Alzheimer són les infeccions [Gratacós, M., 2016. *10 Consecuencias del Alzheimer en paciente y familia*].

#### **4.6. Diagnòstic**

Diagnosticar l'Alzheimer en les etapes inicials de la malaltia és important perquè hi ha una major probabilitat que el pacient pugui beneficiar-se d'un tractament i que pugui participar en assajos clínics i contribuir a la recerca de la malaltia.

Per a diagnosticar l'Alzheimer són necessàries avaluacions mèdiques exhaustives que inclouen: analitzar els antecedents mèdics del pacient, avaluar el seu estat mental, un examen físic i neurològic i realitzar diferents proves (per exemple anàlisis de sang i estudis d'imatges cerebrals) per a descartar altres causes de símptomes similars als de la demència [Alzheimer's Association, (s.d.). *Diagnóstico del Alzheimer*].

En alguns casos, els doctors poden recomanar un examen de fluid cerebroespinal per a mesurar les proteïnes amiloides i tau relacionades amb la malaltia. Aquest examen no acostuma a ser necessari, però en casos atípics o ràpidament progressius pot ser útil. [Mayo Clínic, 2022. *Diagnosing Alzheimer's: How Alzheimer's is diagnosed*]

## **4.7. Tractaments**

La malaltia de l'Alzheimer en l'actualitat no té cura. No existeix cap tractament definitiu que acabi amb la neurodegeneració progressiva que aquest comporta. És a dir, tots els tractaments existents són pal·liatius. Els possibles tractaments que s'han desenvolupat es poden classificar en tres tipus: tractaments no farmacològics, tractaments farmacològics i noves teràpies.

Els tractaments no farmacològics no fan servir medicaments, sinó que utilitzen intervencions professionals. En el cas de l'Alzheimer aquest tipus de tractament és la intervenció cognitiva, l'activitat física i els hàbits de vida saludables. La intervenció cognitiva té tres possibles enfocaments: L'estimulació cognitiva (implica activitats per a la millora de la cognició en entorns socials), l'entrenament cognitiu (es realitza a partir de la repetició de tasques estandarditzades) i la rehabilitació cognitiva (té com a objectiu millorar les conseqüències de la deterioració cognitiva).

Els tractaments farmacològics, amb medicaments, tenen un efecte simptomàtic, això vol dir que actuen sobre els efectes de la malaltia però no sobre les causes. Els fàrmacs poden ser de dos tipus: Inhibidors de l'enzim acetilcolinesterasa (IACE) i antagonistes dels receptors de N-metil-D-Aspartat (NMDA), com la memantina.

Els IACE es basen en la «hipòtesi colinèrgica» de l'Alzheimer, la qual atribueix els símptomes de l'Alzheimer a un dèficit del neurotransmissor acetilcolina<sup>24</sup>. Aquesta hipòtesi va impulsar la investigació de medicaments que augmentaven els nivells d'acetilcolina al cervell, augmentant la seva producció o bloquejant la seva degradació. Aquests fàrmacs han demostrat una eficàcia lleu tant en la reducció de la pèrdua de la funció cognitiva, com en les activitats diàries i alteracions de conducta en pacients amb Alzheimer de grau lleu a moderadament greu. Els principals efectes secundaris d'aquest medicament són els problemes digestius (nàusees, diarrea, pèrdua de pes, malestar abdominal).

---

<sup>24</sup> L'acetilcolina és un missatger químic essencial per l'adequat funcionament de la memòria.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

La memantina<sup>25</sup> està relacionada amb un dels missatgers químics que traslladen informació d'una neurona a una altra, el glutamat<sup>26</sup>. Quan un cervell està afectat per l'Alzheimer es produeix més glutamat del normal, el qual s'acumula en els receptors provocant l'entrada d'un excés de calci en les neurones, contribuint a la seva degeneració, fenomen anomenat excitotoxicitat. La memantina s'adhereix a aquests mateixos receptors, bloquejant el glutamat i evitant aquesta excessiva entrada de calci en les neurones. Aquest procés aconsegueix reduir la degeneració de les neurones i pot millorar els símptomes o aportar estabilitat a la malaltia quan s'esperaria una progressió més ràpida dels símptomes. Aquest fàrmac forma part del tractament de pacients amb Alzheimer en fases moderades o greus. Habitualment presenta pocs efectes secundaris, però, en determinats casos pot causar: al·lucinacions, confusió, mareig, mal de cap o restrenyiment.

Les noves teràpies són nous tractaments en fase experimental que busquen desenvolupar fàrmacs que, a diferència dels actuals, frenin o alenteixin el curs de la malaltia per a prolongar la qualitat de vida i l'autonomia del pacient.

Alguns d'aquests fàrmacs busquen eliminar o disminuir les acumulacions de proteïnes patològiques que s'associen amb els malalts d'Alzheimer, principalment la proteïna  $\beta$ -amiloide o la proteïna tau. Aquestes proteïnes s'acumulen al cervell dels pacients, i la seva disminució es pot realitzar eliminant les proteïnes, disminuint la seva producció, o bloquejant la seva agregació. Aquests experiments s'han comprovat en models animals, però encara no s'ha extrapolat a humans i no està confirmat que l'eliminació de proteïnes en el cervell humà comporti una millor evolució clínica, que és l'objectiu final desitjat. [PortalClínic, 2018. *Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*].

---

<sup>25</sup> La memantina pertany a una classe de medicaments anomenats antagonistes del receptor de NMDA. Funciona bloquejant el receptor NMDA, cosa que modula els efectes de l'elevació patològica del glutamat que perjudica la funció neuronal.

<sup>26</sup> El glutamat és el neurotransmissor excitador més abundant del cervell i del sistema nerviós central, i juga un paper important en la formació de l'aprenentatge i la memòria.

## **5. La proteïna RTP801 o REDD1**

### **5.1. Què és?**

RTP801 (també conegut com a REDD1) és una proteïna sensible a l'estrès que és codificada pel gen *DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)*. RTP801 és una proteïna de 232 aminoàcids que s'expressa normalment a nivells baixos en teixits adults humans. A part dels humans, aquesta proteïna també està present en altres organismes com la rata, el ratolí i el *Xenopus*<sup>27</sup> [Canal et al., 2014].

### **5.2. El gen codificant DDIT4**

El gen DDIT4 és el gen codificador de la proteïna RTP801, la qual regula el creixement, la reproducció i la supervivència cel·lular mitjançant la inhibició de la proteïna mTOR [GeneCards, (s.d.). *DDIT4 Gene - DNA Damage Inducible Transcript 4*]. És a dir, DDIT4 s'expressa en situacions d'estrès i codifica RTP801 que inhibeix l'activitat metabòlica de mTOR<sup>28</sup>. L'expressió del gen *DDIT4* disminueix per acció de la testosterona, l'exercici de resistència i el consum de nutrients [Tirado et al., 2018].

### **5.3. Relació amb l'Alzheimer**

La proteïna RTP801 es troba en nivells elevats en els limfòcits<sup>29</sup> i en la zona hipocampal dels pacients d'Alzheimer. Aquesta proteïna és important per la investigació de l'Alzheimer, ja que la seva expressió a nivells elevats provoca la mort neuronal, causant la pèrdua de memòria i la dificultat de dur a terme tasques quotidianes [Guerrí, M., 2019. *40 causas que provocan la muerte de las neuronas cerebrales*]. S'ha demostrat que baixar els nivells de RTP801 en els models animals de malalties neurodegeneratives millora la simptomatologia en aquests. [Pérez-Sisqués, L. et al., 2021.]

---

<sup>27</sup> El *Xenopus* és un gènere de granotes carnívores de la família Pipidae naturals de l'Àfrica subsahariana.

<sup>28</sup> La via mTOR és una via metabòlica emprada pel nostre organisme per l'anabolisme muscular i per la síntesi de proteïnes. També s'encarrega de regular l'apoptosi (mort cel·lular programada).

<sup>29</sup> Els limfòcits són les cèl·lules sanguínies responsables d'executar la resposta immunitària.

## 5.4. mTORC1, un complex proteic implicat en la mort neuronal

mTORC1 és un complex de proteïnes que actua com a sensor de nutrients, energia i controlador de la síntesi de proteïnes. La seva funció és activar la traducció de les proteïnes; perquè això passi i mTORC1 s'activi, cal que les cèl·lules tinguin els recursos necessaris disponibles per a la seva fabricació. Això implica: tenir els recursos energètics adequats, disponibilitat de nutrients, abundància d'oxigen i factors de creixement adequats perquè es produeixi la traducció del mRNA [Bar-Peled, L., et al., 2014].

Amb la inhibició de mTORC1, també s'inhibeix la diferenciació neuronal i el creixement de la neurita<sup>30</sup> mitjançada pel factor de creixement nerviós (NGF, per les seves sigles en anglès). Aquest creixement és necessari per a la migració normal de les neurones durant el desenvolupament embrionari del cervell. Per tant, l'expressió de RTP801, i conseqüentment la inhibició de mTORC1, té un paper important en la mort de les cèl·lules neuronals [UniProt, (s.d.). *DDIT4\_HUMAN*] com es pot observar en la figura 15.

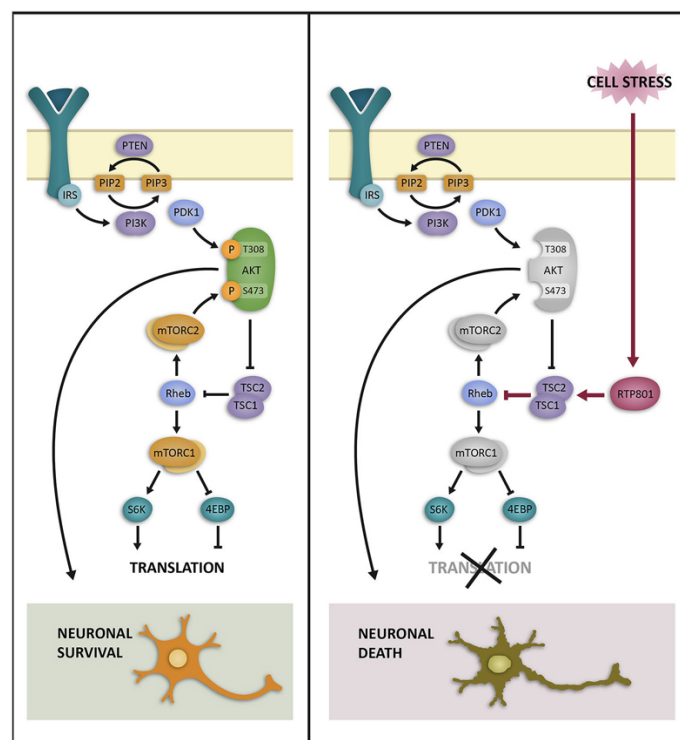


Fig. 15: Inhibició de mTORC1 per estrès cel·lular.

Il·lustració de: Olivares-Boldú L. (19.08.2022)

<sup>30</sup> Una neurita és una prolongació derivada del soma o cos neuronal que té com a meta aconseguir la sinapsi neuronal.



## 6. Cèl·lules HEK293

### 6.1. Què són?

Les HEK293 són un tipus de cèl·lules que deriven de cèl·lules embrionàries de ronyó humanes i sovint s'utilitzen per produir proteïnes terapèutiques i virus per a la teràpia gènica [Beckman Coulter, (s.d.). *An Overview of HEK-293 Cell Line*].

Aquesta línia cel·lular és molt popular perquè és fàcil de mantenir i presenta una reproducció ràpida i senzilla. Són un tipus de cèl·lules amb un creixement fiable en els cultius i fàcils de transfectar<sup>31</sup> amb diversos mètodes, aconseguint una efectivitat prop del 100%. [Thomas et al., 2005.]. Per tots aquests motius, són molt útils en recerca biomèdica i permeten obtenir resultats fiables.

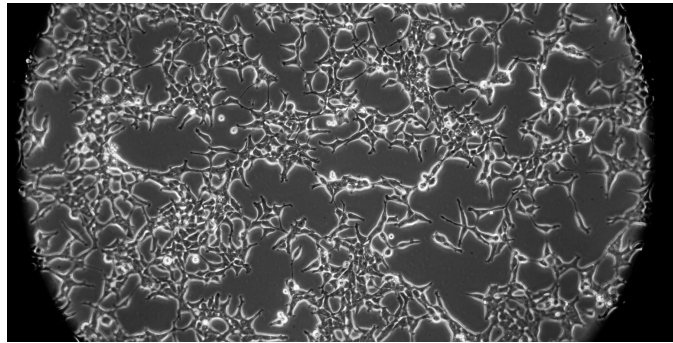


Fig. 16: Cèl·lules HEK293 vistes en microscopi  
Font: <https://blog.genofab.com> (30.08.2022)

### 6.2. Història

Les cèl·lules HEK293 són cèl·lules originàries d'un fetus femení, i actualment es troben entre les línies cel·lulars de mamífers més usades per la seva facilitat de transfecció i cultiu.

Van estar originalment aïllades a la dècada del 1970 per Alex Van der Eb, un biòleg holandès. El 1973 un estudiant de postdoctorat del grup de Van der Eb, Frank Graham, va cultivar les cèl·lules per generar una línia cel·lular immortalitzada<sup>32</sup> mitjançant la transfecció de DNA d'adenovirus de tipus 5 (Ad5). En integrar el virus

<sup>31</sup> La transfecció consisteix en la introducció de material genètic extern en cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis o altres eines per a la transferència.

<sup>32</sup> Les línies cel·lulars immortalitzades són cèl·lules que han estat manipulades per proliferar indefinidament i, per tant, es poden cultivar durant llargs períodes de temps.

en el genoma de les cèl·lules, aquest hauria d'evitar que el cicle cel·lular es detingués i, per tant, permetre un creixement continu de la línia cel·lular resultant.

Aquest experiment va requerir moltes rèpliques, i només va sobreviure un dels clons. El nom de la línia cel·lular (HEK293) prové d'un sistema de numeració, sent aquest clon l'experiment 293 [Bukonya, H., 2022. HEK293: an essential human cell line with an unexpected origin].

### **6.3. Aplicacions**

Aquesta línia cel·lular és àmpliament utilitzada en recerca científica, ja que és molt resistent, i s'utilitza per a diferents àrees d'investigació. Per exemple, les HEK293 s'han emprat per analitzar l'efecte dels medicaments en els canals de sodi<sup>33</sup>, les interaccions entre diferents proteïnes i per produir proteïnes i medicaments.

En la part experimental d'aquest treball de recerca es van fer servir aquestes cèl·lules per la transfecció de shRNA. Es van triar per la facilitat amb què es poden manipular sense provocar la seva mort. Altres cèl·lules, com les neurones, són molt delicades i no s'hi pot treballar amb tanta facilitat perquè hi ha un alt risc de mort cel·lular, i, per exemple, són molt més difícils de transfectar.

---

<sup>33</sup> Els canals de sodi són proteïnes integrals de membrana (travessen la membrana) que formen canals iònics, que condueixen ions de sodi (Na<sup>+</sup>) a través de la membrana cel·lular.

## **7. LA TERÀPIA GÈNICA APLICADA A L'ALZHEIMER**

### **7.1. En què consisteix la teràpia gènica?**

La teràpia gènica és un tipus de tractament mèdic que consisteix a manipular la informació genètica de cèl·lules per a corregir un defecte genètic o per a alterar-les de manera que puguin superar una mutació [Indacea, 2015. *Terapia Génica: ¿Qué es?*]. El seu objectiu és tractar o prevenir malalties genètiques eliminant o reemplaçant els gens mutats amb còpies que funcionin correctament [López, S., 2022. *Terapia génica: qué es, cómo funciona y qué enfermedades trata*].

Existeixen dos tipus de teràpia gènica: la teràpia gènica de cèl·lules somàtiques i la teràpia gènica de cèl·lules germinals:

La teràpia gènica somàtica busca modificar els gens a les cèl·lules somàtiques (les cèl·lules no sexuals) per a eliminar les conseqüències clíniques d'una malaltia genètica heretada o adquirida. Aquest tipus d'edició genètica no afecta les generacions futures perquè el gen modificat no passa a elles.

La teràpia gènica germinal presenta molts conflictes ètics entre la comunitat científica i els organismes internacionals que no estan d'acord amb la seva utilització. La teràpia gènica germinal se centra en les cèl·lules de l'embrió primerenc (els òvuls, els espermatozoides o els seus precursors). En aquest cas, els gens introduïts en aquestes cèl·lules són transmesos també a la descendència de l'individu modificat [Austin-Ward, A., et al., 1998. *La terapia génica y sus aplicaciones*]. En el cas d'Espanya, el Codi Penal espanyol de 1995, tipifica com a delictiu manipular gens humans de manera que s'alteri el genotip si no és amb la finalitat d'eliminar o disminuir malalties greus [Codi Penal. [CP]. Llei Orgànica 10/1995, de 23 de novembre. Apartat 1 de l'article 159. (Espanya)].

### **7.2. CRISPR-Cas9 com a eina d'edició genètica**

El CRISPR-Cas9 (Clustered regularly interspaced palindromic repeats) és una eina que s'utilitza per a modificar genèticament els genomes de diverses espècies [Yang, W., et al., 2016.]. La capacitat del CRISPR-Cas9 per eliminar seqüències de

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

DNA, corregir mutacions i activar o desactivar gens en les cèl·lules i en els organismes de manera ràpida, barata i amb relativa facilitat el converteix en una gran esperança per al tractament de malalties genètiques causades per mutacions de DNA [Redman, M., et al., 2016.].

El mecanisme de tall del CRISPR-Cas9 és el següent:

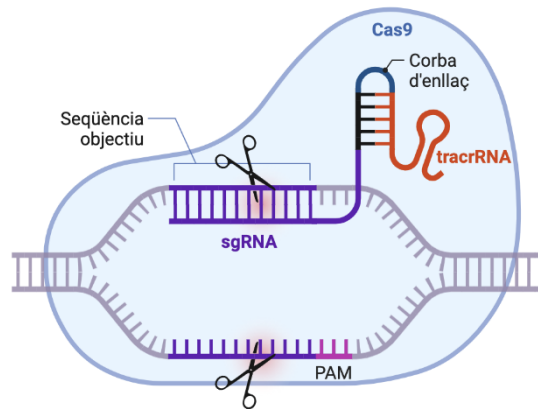


Fig. 17: Mecanisme de tall del CRISPR-Cas9  
Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (6.09.2022)

El primer pas és crear una seqüència d'RNA guia (sgRNA) que coincideixi amb la seqüència de DNA que conté la mutació. El segon pas és combinar aquesta seqüència amb la proteïna Cas9, una DNAasa<sup>34</sup> capaç de tallar les dues cadenes de la doble hèlix del DNA. En el tercer pas, el tracrRNA guiarà la proteïna Cas9 fins a trobar una seqüència complementària al sgRNA. Un cop trobada la seqüència complementària, el sgRNA s'unirà al DNA i el Cas9 s'activarà tallant el DNA [Asmamaw, M., 2021. *Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing*]

Un dels grans desavantatges del CRISPR-Cas9 és la falta d'especificitat de l'RNA del CRISPR. El genoma humà conté 3200 milions de parells de bases nitrogenades, per la qual cosa en crear un RNA amb una seqüència específica és molt probable que aquesta seqüència es trobi en més d'un lloc del genoma i el CRISPR-Cas9 acabi tallant una part del DNA que no era la zona triada (figura 18). Aquest és el principal motiu pel qual encara no es pot aplicar aquest mètode en humans, ja que

<sup>34</sup> Una DNAasa és un enzim que catalitza el trencament dels enllaços fosfodièster en el DNA.

tallar seqüències sense saber amb seguretat si estàs eliminant altres que no són les triades pot causar grans problemes als individus.

Tot i això, el CRISPR-Cas9 és una eina prometedora per al tractament de l'Alzheimer; es pot utilitzar amb finalitats terapèutiques tant en models d'Alzheimer d'inici primerenc com d'inici tardà. Actualment, s'està investigant una teràpia alternativa basada en cèl·lules per permetre la inversió de la neurodegeneració en Alzheimer.

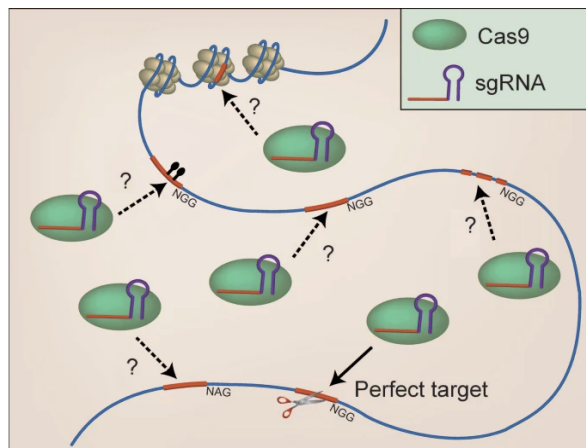


Fig. 18: Il·lustració representativa de la manca d'especificitat del CRISPR-Cas9.

Font: <https://doi.org> (07.09.2022)

### 7.3. Sistema de recombinació Cre-loxP

El sistema Cre-loxP deriva del bacteriòfag lisigènic<sup>35</sup> P1, i usa una proteïna recombinasa específica anomenada Cre que reconeix 34 parells de bases de loxP. És un sistema específic per controlar l'expressió gènica, ja que l'enzim Cre recombinasa pot reconèixer i empalmar seqüències de DNA específiques, anomenades llocs loxP [Hoess, R., Abremski, K., 1984]. L'orientació i ubicació dels llocs loxP (figura 19) determina com es reorganitzarà el material genètic. La recombinació entre parells de llocs loxP pot donar lloc a la inversió, l'eliminació o la translocació de la seqüència de DNA envoltada:

<sup>35</sup> Els bacteriòfags lisigènics són virus que infecten exclusivament als bacteris, que després tenen un període d'inactivitat durant el qual el material genètic del virus s'incorpora al material genètic del bacteri i es reduplica amb aquest durant generacions.

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

- Inversió: Si els llocs loxP estan en la mateixa cadena de DNA i en orientacions oposades, la regió de DNA entre els llocs loxP és invertida.
- Eliminació: Si els llocs loxP estan orientats en la mateixa direcció, la seqüència de DNA s'extreu com una peça circular de DNA.
- Translocació: Si els llocs loxP es troben en molècules de DNA separades, es produeix una translocació de les seqüències de DNA. [AddGene, (s.d.). *Cre-lox system*]

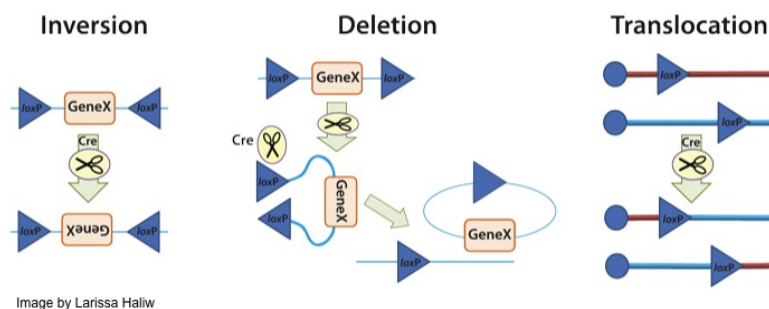


Fig. 19: Mecanismes d'inversió, eliminació i translocació (respectivament) de Cre-loxP.

Font: <https://blog.addgene.org> (14.06.2022)

Aquest sistema és una eina d'edició genètica molt emprada en la investigació genètica i la biologia cel·lular, ja que permet investigar la funció de gens específics en poblacions cel·lulars. Tot i això, el sistema no és perfecte i presenta alguns inconvenients com per exemple la inespecificitat (que pot portar a una interpretació incorrecta de les dades) o la toxicitat (que redueix la proliferació de les cèl·lules i causa defectes cromosòmics) [McLellan, M.A., et al. 2017].

### 7.4. El mecanisme de silenciament amb shRNA

El short hairpin RNA (shRNA) és una molècula d'RNA artificial en forma de llaç que pot ser utilitzada per reprimir l'expressió d'un gen objectiu. L'shRNA s'incorpora a les cèl·lules amb plasmidis (per un procés anomenat transfecció) o amb vectors virals/bacterians (mitjançant la transducció).

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

Els plasmidis són molècules de DNA circular trobades a bacteris i altres organismes microscòpics. Aquestes molècules es repliquen independentment del DNA cromosòmic, i es poden transmetre d'una cèl·lula a una altra. Aquesta característica és fonamental per la transfecció (figura 20), ja que en inserir el gen que es vol estudiar a un plasmidi, quan aquest es replica, també fa còpies del gen inserit.

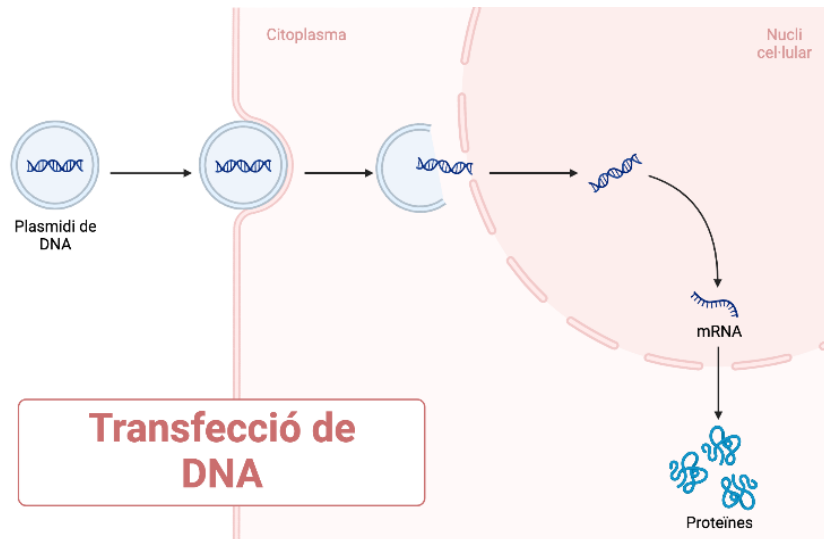


Fig. 20: Mecanisme de transfecció de DNA

Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (27.11.2022)

Una vegada que el vector o plasmidi és integrat a la cèl·lula, l'shRNA és transcrit (es genera una còpia d'RNA a partir de la seqüència de DNA) al nucli per la polimerasa II o la polimerasa III<sup>36</sup>. El resultat de la transcripció és processat per Drosha<sup>37</sup>. El producte obtingut és un pre-shRNA que és exportat del nucli al citoplasma per l'Exportina 5<sup>38</sup>. Aquest producte es talla per acció de Dicer<sup>39</sup> donant lloc al siRNA, el qual s'associa al complex silenciador induït per RNA (RISC, per les seves sigles en anglès) [Merck, (s.d.), *shRNA Process and Diagram*]. La cadena antisentit (no codificant) dirigeix el RISC a l'mRNA que té una seqüència complementària.

<sup>36</sup> Les polimerases II i III són enzims que catalitzen la transcripció del DNA a precursors d'RNA missatger (mRNA)

<sup>37</sup> Drosha és un enzim de ribonucleasa III que executa l'inici del processament de miRNA en el nucli.

<sup>38</sup> L'Exportina és una proteïna que està codificada pel gen XPO5. En les cèl·lules eucariotes, el seu propòsit principal és exportar el pri-miRNA fora del nucli fins al citoplasma.

<sup>39</sup> El Dicer és un enzim que talla l'RNA bicatenari (dsRNA) i el pri-miRNA en fragments curts d'RNA bicatenaris anomenats RNAi i microRNA.

## La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer

En el cas que la complementarietat fos perfecta, el RISC trencaria l'RNAm, però si la complementarietat fos imperfecta, el RISC reprimiria la traducció de l'RNAm. En ambdós casos, l'shRNA condueix al silenciament del gen determinat [Marinez, K., 2022. *shRNA (Short-hairpin RNA)*]. Tot aquest procés es troba il·lustrat a la imatge següent:

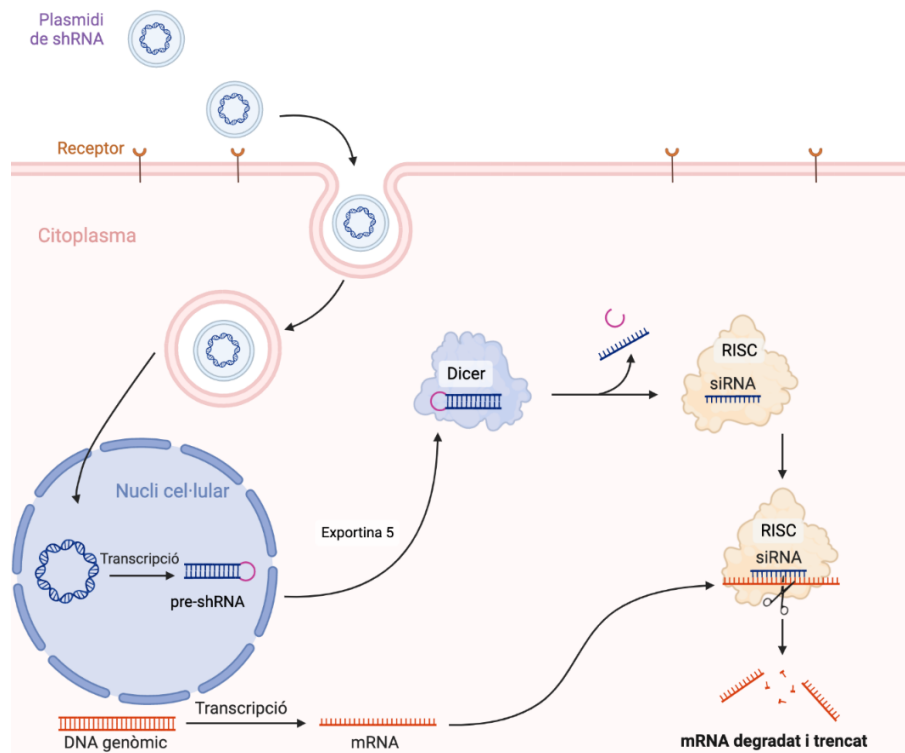


Fig. 21: Mecanisme de silenciament de l'shRNA  
Font pròpia: dissenyat amb Bio Render (20.06.2022)

El mecanisme de l'shRNA no és perfecte, i presenta alguns inconvenients. Per exemple, les cèl·lules dels pacients poden desenvolupar una forta resposta immunitària contra el shRNA per eliminar-lo. També, és possible que s'expressi sense control o que acabi silenciament proteïnes que no es volien modificar. Aquestes qüestions el converteixen en una eina imprevisible, i limiten les seves aplicacions [Genetic Education, (s.d.). *What Is shRNA (Short-hairpin RNA)?*].



## **8. METODOLOGIA**

Per tal de comprovar l'efectivitat de l'edició genètica en cèl·lules HEK293 amb shRNA es van seguir un total de cinc protocols, que es poden consultar als annexos de la memòria juntament amb els materials necessaris per a realitzar cadascun d'aquests.

En aquest treball es van estudiar dos tipus d'shRNA (shRNA1 i shRNA2), per determinar quin d'ells funciona millor en les dues proteïnes seleccionades (DDX1 i HSPC117). Per tant, es van estudiar un total de sis mostres.

Dues de les mostres corresponen a les cèl·lules on es volia silenciar la proteïna DDX1 amb els dos tipus d'shRNA (les anomenem DDX1 i DDX2 segons l'shRNA emprat). Altres dues corresponen a les mostres on es volia silenciar la proteïna HSPC117, cadascuna amb un model de shRNA (les anomenem HSPC1 i HSPC2). Les dues restants són un grup control (shCT), el qual expressa una seqüència codificant d'shRNA que no silenciacap gen de la mostra estudiada, i un grup no tractat (UT), al qual no s'havia transfectat cap plasmidi d'shRNA.

Aquests dos últims grups són imprescindibles en els treballs experimentals, ja que serveixen com a referència per contrastar els resultats i determinar l'efectivitat de l'experiment o, en aquest cas, del silenciament de l'expressió gènica.

Al llarg de tot el procediment és important mantenir la seguretat, per la qual cosa és necessari utilitzar guants i bata. Això no només garanteix la seguretat de qui realitza l'experiment, sinó que també assegura la de les mostres. D'aquesta manera es redueixen els possibles errors i s'obtenen resultats més precisos.

### **8.1. Transfecció de cèl·lules HEK293 amb Polietilenimina**

En primer lloc, per incorporar l'shRNA a les cèl·lules s'usen plasmidis, que s'integren mitjançant un procés anomenat transfecció. Aquest shRNA, actuarà reduint l'expressió del gen diana, pel procés explicat prèviament (vegeu apartat 7.4. El mecanisme de silenciament amb shRNA).

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

La transfecció es va realitzar amb Polietilenimina (PEI), el polímer orgànic més emprat com a vector gènic, que destaca per la seva eficiència de transfecció. Durant aquesta part del protocol és important treballar sota una campana estèril, i usar materials esterilitzats per garantir la seguretat i no contaminar les mostres.

Un cop feta la transfecció es va observar en el microscopi si les cèl·lules expressaven mCherry (en vermell), el marcador per veure si s'havia produït la transfecció amb èxit.

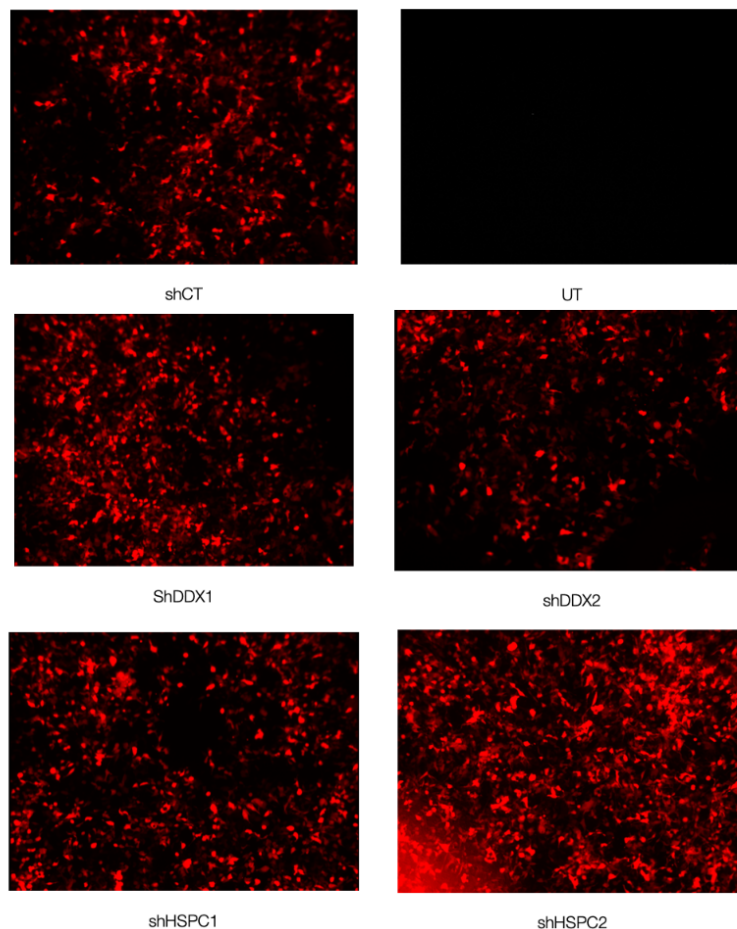


Fig. 22: Cèl·lules HEK293 transfectades.

Font pròpia (05.07.2022)

Com es pot veure en la figura 22, les cèl·lules expressen clarament el marcador mCherry. Les dues imatges superiors (shCT, UT) corresponen al grup control i a un grup no tractat, respectivament. En les cèl·lules no transfectades (UT) es va obtenir el resultat esperat, ja que com que no estaven tractades amb shRNA no podien expressar mCherry. Si la mostra hagués expressat el marcador, les cèl·lules haurien estat contaminades i, per tant, no s'assolirien resultats fiables.

Les dues imatges centrals (shDDX1, shDDX2) corresponen a les cèl·lules en les quals es pretenia reduir els nivells de la proteïna DDX1, i les dues inferiors (shHSPC1, shHSPC2) corresponen a les cèl·lules on es volia reduir l'expressió d'HSCP117.

En totes elles, excepte en les no tractades (UT), es veu el marcador, pel que se sap amb certesa que l'shRNA s'ha transfectat correctament.

## 8.2. Western Blot

Un cop les cèl·lules han estat transfectades amb èxit, es realitza un Western Blot, una tècnica analítica que permet quantificar la presència d'una proteïna específica en una mostra. Aquesta tècnica permet observar si els shRNA han funcionat a escala proteica i han servit per baixar els nivells de les proteïnes diana.

Com a control de càrrega, tant en Western Blot com posteriorment en la qPCR es va quantificar també l'actina, pel fet que la seva quantitat està molt controlada a escala cel·lular. Per tant, es pot assumir que la seva transcripció (el grau d'expressió dels seus gens) i traducció (la generació de proteïnes) és constant.

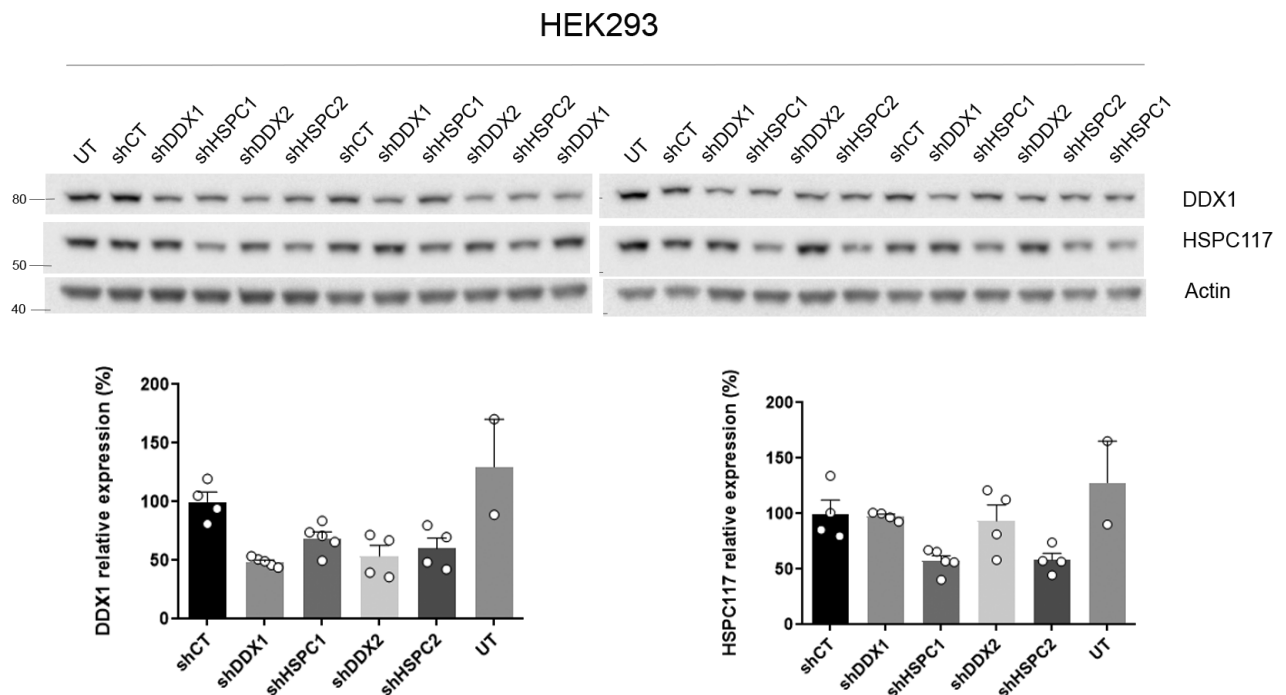


Fig. 23: Resultats Western Blot

Font pròpia (06.07.2022)

En la figura 23 es pot veure l'expressió relativa de les diferents proteïnes en les mostres estudiades. Les imatges superiors són les fotografies obtingudes en el moment del revelatge. Es tracta de les membranes on s'observen les bandes de les diferents proteïnes. Quan es revelen les membranes, es veuen diferents bandes ordenades en funció del pes molecular. Per saber quina de les bandes correspon a la proteïna estudiada, és necessari conèixer el pes molecular d'aquestes. Els valors de l'expressió relativa s'aconsegueixen a partir de la mitjana aritmètica dels resultats quantificats en les diferents mostres, que estan indicats a la gràfica en forma de punts.

El gràfic de l'esquerra correspon a la mostra on es volia reduir l'expressió de la proteïna DDX1. Com es pot veure, l'expressió relativa de la proteïna diana s'ha reduït en un 50% tant en el DDX1 com en el DDX2, passant d'un 100% en el control a un 50% en les tractades amb shRNA. El gràfic de la dreta correspon a les cèl·lules on es volia silenciar una altra proteïna, l'HSPC117. En aquest gràfic es veu també una reducció del 50% en l'expressió d'aquestes proteïnes, passant d'un 100% en el grup control a un 50% en els tractats amb shRNA. En ambdós casos s'observen reduccions iguals pels dos models d'shRNA.

### **8.3. Extracció d'RNA**

Després de comprovar si els shRNA funcionaven a escala proteica, es va voler veure si també funcionaven a escala d'mRNA. Per a comprovar-ho primer es va aïllar l'RNA i es va passar a cDNA, per poder analitzar els canvis en l'expressió per qPCR.

L'extracció d'RNA és el procés pel qual es purifica l'RNA de mostres biològiques. En aquest cas, l'extracció es va fer amb TRIzol, una solució amb la qual s'ha de treballar amb precaució, perquè està composta de fenol i cloroform, dos compostos orgànics tòxics. En conseqüència, tot el procediment amb TRIzol s'ha de realitzar sota una campana extractora, per reduir l'exposició al compost i evitar la inhalació.

Un cop extret l'RNA es mesuren les mostres al Nano Drop, un espectrofotòmetre que quantifica la mostra d'RNA a partir d'1 o 2  $\mu$ L. Un espectrofotòmetre és un

instrument de laboratori que serveix per a mesurar la concentració de les substàncies en una solució. La concentració es mesura en funció de l'absorbància a diferents longituds d'ona (nm) i les quantifica. És a dir, serveix per mesurar les concentracions d'ona on les mostres tenen una major absorbància, una característica que permet diferenciar les substàncies presents en una mostra.

Les sals absorbeixen a una longitud d'ona d'uns 230 nm, els àcids nucleics a aproximadament 260 nm i les proteïnes a uns 280 nm. Per tant, en el moment d'observar les mostres a l'espectrofotòmetre, s'ha d'observar un pic a 260/280 nm de 2,00 i a 260/230 nm de 2,00/2,2 corresponent a l'RNA aïllat, ja que els àcids nucleics absorbeixen a aquestes longituds d'ona, com es pot veure en la figura següent.

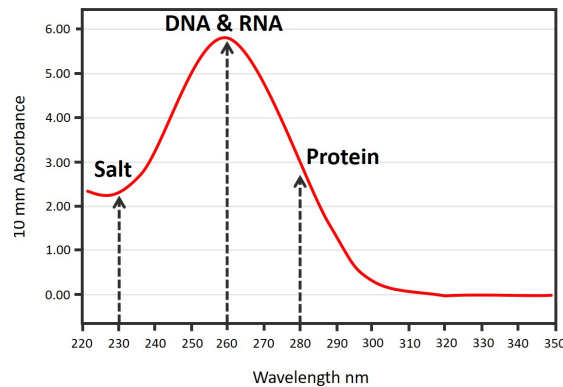


Fig. 24: Esquema exemplificatiu de l'anàlisi dels resultats obtinguts.

Font: <https://toptipbio.com> (14.11.2022)

## 8.4. Retrotranscripció

Per analitzar les mostres per qPCR és necessari tenir, en primer lloc, DNA. A causa d'això, un cop aïllat l'RNA es va passar a cDNA mitjançant un procés anomenat retrotranscripció. El procés implica la generació d'un DNA de doble cadena denominat DNA complementari (cDNA) a partir d'un RNA de cadena simple. La retrotranscripció està catalitzada per l'enzim transcriptasa inversa, que transforma l'RNA en cDNA.

En aquest cas es va utilitzar el kit de retrotranscripció *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*, de la marca Roche. Aquest kit proporciona tots els reactius necessaris

per realitzar el protocol, i posteriorment analitzar-lo per estudiar els nivells d'expressió gènica o clonar gens d'interès.

## 8.5. qPCR

Finalment, a partir del cDNA obtingut en la retrotranscripció, es fa una qPCR (en anglès, *quantitative polymerase chain reaction*), un mètode usat habitualment per amplificar el DNA. La qPCR permet quantificar el DNA que hi ha en una mostra, a diferència d'una PCR, que només identifica la presència d'aquest.

En aquest procediment s'utilitza una placa de 96 pous com la que es veu en la següent imatge:

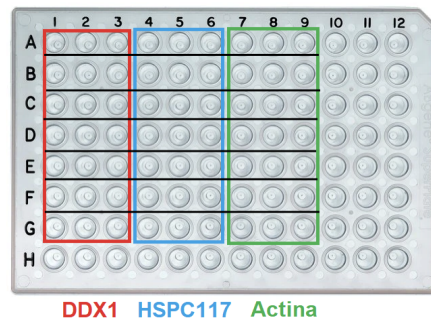


Fig. 25: Exemple de placa de qPCR.

Font pròpia. (16.11.2022)

Per cada condició es fa un triplicat, per reduir els possibles errors i assolir resultats més precisos. Les condicions estudiades són set: no tractat, grup control, DDX1 (1), DDX1 (2), HSPC117 (1), HSPC117 (2) i control negatiu. Un control negatiu és un grup que se sap que donarà un resultat negatiu. En aquest cas s'empra aigua destil·lada estèril.

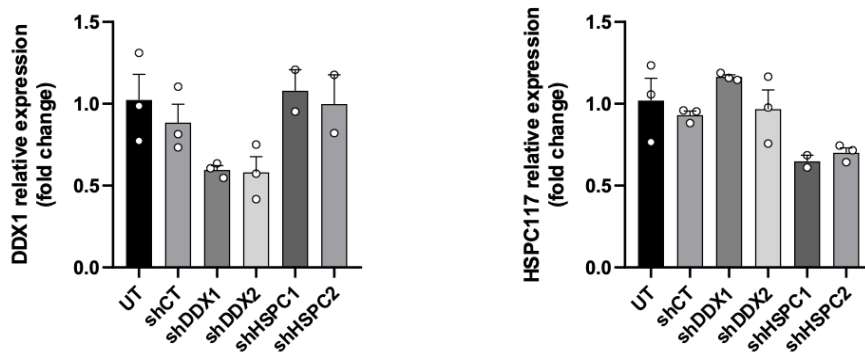


Fig. 26: Resultats qPCR

Font pròpia (19.07.2022)

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

La figura 26 correspon als resultats de la qPCR en les cèl·lules on es volia silenciar DDX1 (a l'esquerra) i les cèl·lules on es volia silenciar HSPC117 (a la dreta).

La variació de l'expressió relativa de la proteïna DDX1 és d'aproximadament 0,5 en les cèl·lules tractades amb l'shRNA respecte del grup no tractat. És a dir, l'expressió de la proteïna s'ha reduït aproximadament un 50% en aquest grup. El grup DDX1 i DDX2 presenten variacions pràcticament iguals, i en tots dos casos s'observa una disminució significant de l'expressió de la proteïna. Les mostres en què la proteïna diana era l'HSPC117, no mostren disminucions en l'expressió de DDX1, però en el cas de l'HSPC1 els nivells estan per sobre dels del grup control i del no tractat.

En el cas de la proteïna HSPC117, l'expressió relativa ha disminuït en aproximadament 0,4 punts en l'HSPC1 respecte del grup no tractat en les mostres transfectades amb l'shRNA i d'uns 0,3 punts en l'HSPC2. En les mostres tractades amb l'shRNA per silenciar DDX1 no s'han disminuït els nivells d'HSPC117, però igual que en el cas anterior, el DDX1 (el grup tractat amb l'shRNA1) presenta una expressió per sobre del grup control i del no tractat.

## **9. CONCLUSIÓ I DISCUSSIÓ**

Per a concloure el Treball de Recerca, primerament resumiré breument els aspectes més rellevants i significatius que s'han tractat al llarg de la memòria escrita, per tal d'enllaçar-los posteriorment amb els resultats de l'experimentació, i, en últim lloc, faré una petita reflexió personal sobre el treball i la meva experiència.

Les neurones són les principals cèl·lules afectades per la malaltia d'Alzheimer. Les causes exactes de la malaltia no estan completament definides, però bàsicament es produeix perquè les proteïnes del cervell no funcionen amb normalitat i provoquen que les neurones es deteriorin, i acabin morint. En conseqüència a la mort neuronal, es produeix la pèrdua progressiva de la memòria.

En l'actualitat s'estan realitzant nombroses investigacions per desenvolupar fàrmacs que eliminin o disminueixin les acumulacions de proteïnes patològiques associades amb l'Alzheimer, principalment la proteïna  $\beta$ -amiloide i la proteïna tau. També s'està investigant el paper de la proteïna RTP801 en aquesta malaltia, ja que es troba en nivells elevats en el cervell dels pacients de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer. La regulació d'aquestes proteïnes en models animals disminueix els símptomes de la malaltia. Per tant, es pot deduir que la reducció de l'expressió de les proteïnes patològiques associades a l'Alzheimer podria ser un tractament potencial per als pacients d'aquesta malaltia.

Una línia de recerca que s'està duent a terme actualment i que pot donar resultats prometedors en un futur és la teràpia gènica, en la qual es basa aquest treball. L'objectiu de la teràpia gènica és manipular la informació genètica de cèl·lules perquè puguin superar una mutació. Una molècula emprada per editar la informació genètica és l'shRNA, una molècula d'RNA artificial que reprimeix la traducció de l'RNAm i condueix al silenciament d'un gen específic.

En la part experimental del treball es va estudiar la teràpia gènica amb aquesta molècula com a mecanisme per silenciar proteïnes específiques. Les cèl·lules en què es va realitzar l'estudi són cèl·lules HEK293, que es van triar per la seva facilitat de transfecció i cultiu.

Com s'ha observat en la part pràctica del treball, els resultats obtinguts han servit per confirmar la hipòtesi inicial i afirmar que és possible reduir l'expressió de



## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

proteïnes específiques amb la transfecció d'shRNA en cèl·lules HEK293. Amb l'experimentació no només s'ha assolit l'objectiu principal, sinó que també ha servit per complir els objectius secundaris, i adquirir coneixements sobre diferents tècniques emprades usualment en l'àmbit de la biomedicina, com Western Blot, Bradford o la Immunofluorescència.

A partir dels resultats analitzats, podem concloure que els dos models estudiats són igualment efectius, i funcionen adequadament en el silenciament de proteïnes específiques. També, sabem que els shRNA han complert la seva funció correctament perquè únicament es veuen disminucions en l'expressió de les proteïnes diana, i no s'han alterat els nivells de les altres. Per tant, l'shRNA reconeix adequadament les seqüències complementàries i no silencia proteïnes aleatòries. Aquests dos models validats s'utilitzaran en un futur en la recerca de malalties neurodegeneratives.

En definitiva, la teràpia gènica amb shRNA és una eina terapèutica prometedora per al tractament de la malaltia d'Alzheimer, ja que es pot usar per a silenciar proteïnes patològiques associades amb l'Alzheimer. Tot i això, s'han de tenir en compte les limitacions d'aquest sistema d'edició genètica, que com hem vist al marc teòric no és perfecte. És important esmentar que els resultats corresponen a un cultiu cel·lular, i no necessàriament seran iguals en tots els tipus cel·lulars.

D'aquesta recerca deriven altres qüestions que seria interessant investigar. Com les dades indiquen, l'edició genètica amb shRNA és eficaç en cèl·lules humanes HEK293. Per tant, una possible continuació a aquest treball seria comprovar l'efectivitat d'aquesta en models animals de la malaltia (per exemple ratolins 5XFAD) per regular els nivells de les proteïnes associades a l'Alzheimer i relacionar-los amb el comportament d'aquests. També, caldria continuar investigant el mecanisme de l'shRNA per tal de buscar maneres de reduir la seva inespecificitat i perfeccionar-lo per poder aplicar-lo de manera més segura, ja que silenciar proteïnes aleatòries podria originar conseqüències perjudicials per a la salut.

Finalment, m'agradaria dir que fer aquest treball m'ha ajudat a créixer molt tant en l'àmbit acadèmic com personal. En l'àmbit acadèmic, arran del treball he après moltes qüestions relacionades amb l'Alzheimer i amb les diferents tècniques d'edició genètica, cosa que m'ha agradat molt perquè sempre m'havia interessat el tema de

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

la neurociència i la genètica, però mai havia trobat el moment d'endinsar-me en aquesta qüestió. També, he après a utilitzar instruments de laboratori que no havia fet servir mai, com les micropipetes o un mesurador de pH.

No obstant això, crec que el treball m'ha aportat més en l'àmbit personal, ja que he tingut l'ocasió d'experimentar la dinàmica de treball en un laboratori per primera vegada i he pogut treballar de manera autònoma. Des de fa molts anys tinc clar que em vull dedicar a la recerca biomèdica, però una petita part de mi estava preocupada per si la realitat no es corresponia amb les meves expectatives. Després d'haver pogut viure en primera persona l'experiència d'estar cada dia en un laboratori aquesta preocupació ha desaparegut, i estic encara més segura que és el que vull fer en un futur.

## 10. REFERÈNCIES

10 *Consecuencias del Alzheimer en paciente y familia.* (2016). Lifeder. Recuperat 15 juliol 2022, de <https://www.lifeder.com/consecuencias-alzheimer/>

40 *causas que provocan la muerte de las neuronas cerebrales.* (2020). PsicoActiva. Recuperat 19 agost 2022, de <https://www.psicoactiva.com/blog/40-causas-provocan-la-muerte-las-neuronas-cerebrales/>

*A Brief History of Alzheimer's Disease.* (2013). Healthline. Recuperat 13 juliol 2022, de <https://www.healthline.com/health/alzheimers-history>

*Alzheimer | PortalCLÍNICA.* (s.d.). Clínic Barcelona. Recuperat 12 juny 2022, de <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/alzheimer>

*Alzheimer: Etapas y características.* (2020). Neural. Recuperat 21 juny 2022, de <https://neural.es/alzheimer-etapas-y-caracteristicas/>

*Alzheimer's disease.* (s.d.). Mayo Clinic. Recuperat 15 agost 2022, de <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447>

*An Easy Guide to Neuron Diagrams and Types.* (2022). Healthline. Recuperat 24 agost 2022, de <https://www.healthline.com/health/neurons>

*An Overview of HEK-239 Cell Line.* (s.d.). Beckman Coulter Life Sciences. Recuperat 12 setembre 2022, de

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

<https://www.beckman.es/resources/product-applications/lead-optimization/ce-ll-line-development/human-embryonic-kidney-293>

Asmamaw, M., & Zawdie, B. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy* (2021(15), pp. 354-355). Recuperat de <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>

*Astroцитos: ¿qué funciones cumplen estas células gliales?* (2017). *Psicología y Mente*. Recuperat 24 agost 2022, de <https://psicologiymente.com/neurociencias/astrocitos>

Austin-Ward, E. D., & Villaseca, C. (1998). Gene therapy and its applications. *Revista médica de Chile* (126(7), pp. 838-845). Recuperat de <https://doi.org/10.4067/S0034-98871998000700013>

Bar-Peled, L., Sabatini, D. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology* (24(7), pp. 400-406). Recuperat de <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.003>

Canal, M., Romani-Aumedes, J., Martín-Flores, N., Pérez-Fernández, V., & Malagelada, C. (2014). RTP801/REDD1: A stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (8(313), pp. 1-2). Recuperat de <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00313>

*Central nervous system | Description, Anatomy, & Function.* (2022). Britannica. Recuperat 5 setembre 2022, de <https://www.britannica.com/science/central-nervous-system>

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

Cre-lox system. (s.d.). Addgene. Recuperat 25 juliol 2022, de <https://www.addgene.org/collections/cre-lox/#reference>

*Consecuencias del alzheimer.* (s.d.) Maximiliana. Recuperat 15 juliol 2022, de <https://maximiliana.es/consecuencias-del-alzheimer-como-afecta-la-enfermedad-a-las-personas/>

*DDIT4 Gene - DNA Damage Inducible Transcript 4.* (2022). GeneCards: The Human Gene Database. Recuperat 15 juliol 2022, de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DDIT4>

*DDIT4 - DNA damage-inducible transcript 4 protein—Homo sapiens (Human).* (s.d.). UniProt. Recuperat 15 juliol 2022, de <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NX09/entry#function>

*Diagnóstico del Alzheimer.* (s.d.). Alzheimer's Association. Recuperat 11 juliol 2022, de <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/diagnostico>

*El Sistema Nervioso.* (s.d.). Agrega Educación. Recuperat 31 agost 2022, de [http://agrega.educacion.es/repositorio/14062013/46/es\\_2013061412\\_9103939/SistemaNervioso/la\\_gla.html](http://agrega.educacion.es/repositorio/14062013/46/es_2013061412_9103939/SistemaNervioso/la_gla.html)

*Encéfalo | Qué es, características, partes, funciones, estructura, ubicación.* (s.d.). Euston. Recuperat 5 setembre 2022, de <https://www.euston96.com/encefalo/>

*Enfermedad de Alzheimer: MedlinePlus en español.* (s.d.). National Library of Medicine. Recuperat 6 maig 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/alzheimersdisease.html>

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the Adult Brain. *Journal of Neuroscience*, (22(3), pp. 612-613). Recuperat de <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00612.2002>

*Genes de la enfermedad de Alzheimer: ¿estás en riesgo?* (s.d.). Mayo Clínic. Recuperat 12 juny 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-genes/art-20046552>

Gencel, J. (2016). *¿Las neuronas se reproducen?* Noisy Science. Recuperat 24 agost 2022, de <https://noisyscience.wixsite.com/noisyscience/single-post/2016/08/07/-las-neuronas-se-reproducen>

*HEK293: An Essential Human Cell Line with an Unexpected Origin.* (s.d.). GenoFAB. Recuperat 16 setembre 2022, de <https://blog.genofab.com/hek293-cell-line>

Hoess, R. H., & Abremski, K. (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (81(4), pp. 1026-1029). Recuperat de <https://doi.org/10.1073/pnas.81.4.1026>

*La proteína tau: Qué es y cómo influye en la neurodegeneración.* (2018). Afabaix. Recuperat 15 agost 2022, de <https://afabaix.org/es/la-proteina-tau-que-es-y-como-influye-en-la-neurodegeneracion/>

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

*Learn how Alzheimer's is diagnosed.* (s.d.). Mayo Clinic.

Recuperat 13 juliol 2022, de

<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>

Levey, A. I., Qiu, D., Zhao, L., Hu, W. T., Duong, D. M., Higginbotham, L., Dammer, E. B., Seyfried, N. T., Wingo, T. S., Hales, C. M., Gámez Tansey, M., Goldstein, D. S., Abrol, A., Calhoun, V. D., Goldstein, F. C., Hajjar, I., Fagan, A. M., Galasko, D., Edland, S. D., Hanfelt, J., Lah, J., Weinshenker, D. (2022). A phase II study repurposing atomoxetine for neuroprotection in mild cognitive impairment. *Brain* (145(6), pp. 1924-1938). Recuperat de <https://doi.org/10.1093/brain/awab452>

*Los 11 tipos de Alzheimer (y cómo diferenciarlos).* (s.d.). Médico+. Recuperat 28 juliol 2022, de <https://medicoplus.com/neurologia/tipos-alzheimer>

McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current protocols in mouse biology* (7(1), pp. 1–12). Recuperat de <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>

*Médula espinal - Enfermedades cerebrales, medulares y nerviosas.* (s.d.). Manual MSD. Recuperat 5 setembre 2022, de <https://www.msdmanuals.com/es-es/hogar/enfermedades-cerebrales,-medulares-y-nerviosas/biolog%C3%ADa-del-sistema-nervioso/m%C3%A9dula-es-pinal>

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

*Microglía: Funciones principales y enfermedades asociadas.* (2017). Psicología y mente. Recuperat 31 agost 2022, de <https://psicologiaymente.com/neurociencias/microglia>

*Motivo adyacente de protoespaciador (PAM).* (s.d.). Innovative Genomics Institute (IGI). Recuperat 7 setembre 2022, de <https://innovativegenomics.org/glossary/motivo-adyacente-de-protoespaciador-pam/>

*Oligodendrocyte | physiology* (s.d.). Britannica. Recuperat 31 agost 2022, de <https://www.britannica.com/science/oligodendrocyte>

Pérez-Sisqués, L., Sancho-Balsells, A., Solana-Balaguer, J., Campoy-Campos, G., Vives-Isern, M., Soler-Palazón, F., Anglada-Huguet, M., López-Toledano, M. Á., Mandelkow, E. M., Alberch, J., Giralt, A., & Malagelada, C. (2021). RTP801/REDD1 contributes to neuroinflammation severity and memory impairments in Alzheimer's disease. *Cell Death and Disease* (12(616), pp. 1-2). Recuperat de <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03899-y>

*Potencial de acción.* (s.d.). FisióOnline. Recuperat 24 agost 2022, de <https://www.fisioterapia-online.com/glosario/potencial-de-accion>

*¿Qué causa la enfermedad de Alzheimer?* (s.d.). National Institute on Aging. Recuperat 15 agost 2022, de <https://www.nia.nih.gov/espanol/causa-enfermedad-alzheimer>

*¿Qué es la edición genética? Principales avances.* (s.d.). 65 Y Más. Recuperat 19 agost 2022, de



## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

[https://www.65ymas.com/salud/preguntas/edicion-genetica-solventar-enfermedades-futuro\\_7225\\_102.html](https://www.65ymas.com/salud/preguntas/edicion-genetica-solventar-enfermedades-futuro_7225_102.html)

Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* (101(4), pp. 213-215). Recuperat de <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>

*Revelan cómo beta-amiloide puede causar la enfermedad de Alzheimer.* (2013). El médico interactivo. Recuperat 15 agost 2022, de <https://elmedicointeractivo.com/revelan-beta-amiloide-puede-causar-enfermedad-alzheimer-20130920133344063371/>

Sauer, A. (2013). *History of Alzheimer's: Major Milestones.* Alzheimers.net. Recuperat 13 juliol 2022, de <https://www.alzheimers.net/history-of-alzheimers>

*ShRNA Process and Diagram.* (s.d.). Merck. Recuperat 21 juliol 2022, de <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/shrna-process-and-shrna-diagram>

*ShRNA (Short-hairpin RNA) Structure, Definition, Mechanism.* (2022). Microbiology Note. Recuperat 20 juliol 2022, de <https://microbiologynote.com/shrna-short-hairpin-rna-structure-definition-mechanism/>

*Terapia Génica: ¿Qué es?* (2015). INDACEA Investigación Médica. Recuperat 25 juliol 2022, de <https://indacea.org/terapia-genica-que-es/>

*Terapia génica: Qué es, cómo funciona y qué enfermedades trata.* (2022). SaberVivir. Recuperat 25 juliol 2022, de

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

[https://www.sabervivirtv.com/medicina-general/terapia-genica-que-es-como-funciona-enfermedades-trata\\_5793](https://www.sabervivirtv.com/medicina-general/terapia-genica-que-es-como-funciona-enfermedades-trata_5793)

*The Anatomy of Astrocytes.* (2021). Verywell Health. Recuperat 24 agost 2022, de <https://www.verywellhealth.com/astrocytes-anatomy-4774354>

*The History of Alzheimer's Disease | Alzheimer's Disease Research.* (2021). BrightFocus Foundation. Recuperat 15 agost 2022, de <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/history-alzheimers-disease>

*The Neuron.* (s.d.). Recuperat 24 agost 2022, de <https://www.brainfacts.org/Brain-Anatomy-and-Function/Anatomy/2012/The-Neuron>

Thomas, P., Smart, T. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (51(3), pp. 187-200). Recuperat de <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>

Tirado-Hurtado, I., Fajardo, W., & Pinto, J. A. (2018). DNA Damage Inducible Transcript 4 Gene: The Switch of the Metabolism as Potential Target in Cancer. *Frontiers in Oncology* (8(106), pp. 1-2). Recuperat de <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00106>

*Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer | PortalCLÍNICA.* (s.d.). Clínic Barcelona. Recuperat 16 agost 2022, de <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/alzheimer/tratamiento>

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., McManus, M., Sharp, P. A., Van Parijs, L., Jaenisch, R., & Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (101(28), pp. 10380-10385). Recuperat de <https://doi.org/10.1073/pnas.0403954101>

*What Is shRNA (Short-hairpin RNA)?* (s.d.). Genetic Education. Recuperat 22 juliol 2022, de <https://geneticeducation.co.in/what-is-shrna-short-hairpin-rna/>

Yang, W., Tu, Z., Sun, Q., & Li, X. J. (2016). CRISPR/Cas9: Implications for modeling and therapy of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (9(30), pp. 1-3). Recuperat de <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00030>

## **11. ANNEX I**

### **Protocol de transfecció de cèl·lules HEK293 amb Polietilenimina**

Tot aquest protocol s'ha de realitzar a la campana estèril per garantir la seguretat, ja que s'està treballant amb virus.

#### **Materials:**

- Bata
- Campana estèril
- Micropipeta de 100 µL
- Micropipeta de 1000 µL
- Micropipeta de 20 µL
- Aigua mQ
- Polietilenimina concentrat
- Filtre 0,22 µm PES
- Falcons
- Tubs Eppendorf
- Plaques de 100
- Medi DMEM suplementat
- PBS
- DNA
- Pipetor
- Puntetes de vidre de 10 mL
- Congelador

#### **1. Preparació de la Polietilenimina**

La Polietilenimina (PEI) és el polímer orgànic més emprat com a vector gènic per la seva eficiència de transfecció.

1. Per preparar el PEI es dilueix en aigua mQ fins a obtenir una concentració final de 10 mg/mL (1 g/100 mL).
2. Un cop diluït, es filtra a través d'un filtre 0,22 µm Polyethersulfone (PES).

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

3. Es preparen alíquotes (es reparteix el volum inicial en diverses parts iguals més petites per evitar contaminar el volum total i mantenir les propietats inicials) i es congelen a -20 °C.
4. Per treballar es dilueix el PEI en aigua mQ 1/10 per obtenir una concentració 1 mg/mL.
5. Es guarda el PEI a 4 °C. (Si en el moment de la transfecció l'última filtració va ser fa set dies o més, es torna a filtrar 0,22 µm.

El dia abans de la transfecció, es passen les cèl·lules HEK293 per aconseguir una confluència de 60-70% el dia de la transfecció. Es mantenen en 5 mL de medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementat. Es recomana utilitzar 3-5 plaques de 100 per cada tipus de virus.

### **2. Generació de virus**

Per cada 1 µg de DNA es necessiten 4 µg de PEI (= 4 µL)

1. Es calcula la quantitat de DNA per condició (i com a conseqüència, el volum de PEI).
2. Es barreja buffer fosfat salí (PBS) (solució amortidora i isotònica, manté el pH i la pressió osmòtica el més semblant a l'ambient biològic natural) (700 µL/placa), el PEI i el DNA en un Falcon, pipetejant amunt i avall.
3. S'incuba 20 minuts a temperatura ambient (27 °C).
4. S'afegeix el volum sobre la placa, en gotes (aproximadament 760 µL/placa).
5. A les 4-6 h es canvia el medi per 10 mL de DMEM suplementat.
6. Es deixa produir virus durant tres dies, abans de recollir-los.

## **12. ANNEX II**

### **Protocol de Western Blot**

En aquest mètode és necessari l'ús d'electroforesi en gel per separar les proteïnes de la mostra, que seran transferides del gel a la superfície d'una membrana. La membrana després s'exposa a un anticòs específic contra la proteïna en estudi, i la unió de l'anticòs<sup>40</sup> es detecta usant un marcador radioactiu o químic.

### **Materials:**

- Micropipeta de 100 µL
- Loading buffer (de Thermo Fisher Scientific)
- Tampó de càrrega (Thermo Scientific, # 39000, Pierce Reducing Sample Buffer (5x))
- Aigua mQ
- Placa calefactora
- Gels d'acrilamida (de Thermo Fisher Scientific, 4-12% d'acrilamida: 1,5 mm i 15 pous (referència: NP0336BOX, 15 wells))
- Running buffer MOPS SDS (Thermo Fisher Scientific, #NP0001, concentrat a 20x)
- Protein ladder (Thermo Scientific, #26616)
- Font d'alimentació (Fisherbrand, Mini 300 V Plus)
- Membrana de nitrocel·lulosa de Thermo Scientific (#IB23001).
- iBlot2
- Ponceau
- TBS-T (Tris buffered saline solution with Tween)
- Llet en pols
- BSA (5%) en TBS-T Buffer
- Anticòs primari
- Anticòs secundari
- Super Signal West FEMTO maximum sensitivity (Thermo Scientific, Ref. 34094)
- ChemiDoc Imaging System

---

<sup>40</sup> Un anticòs és una proteïna que reacciona contra un antigen en un organisme de tipus animal.

## **1. Preparació de mostres**

1. S'afegeix Loading buffer a 20 µg de proteïna fins a obtenir 22,5 µL de volum final. El tampó de càrrega utilitzat és el Pierce Reducing Sample Buffer (5x), es dilueix amb aigua mQ fins a aconseguir el volum final.
2. Una vegada preparada la mostra, s'escalfa a 96 °C durant 5 minuts.

## **2. Electroforesis**

1. Es prepara la cubeta amb els gels d'acrilamida ja preparats emmagatzemats a 4 °C. El gel que usem és: 4-12% d'acrilamida, 1,5 mm de gruix i 15 pous.

El running buffer emprat és MOPS SDS (Concentrat a 20x, s'ha de diluir en aigua mQ fins a 1x i mantenir a temperatura ambient).

2. Es carreguen totes les mostres i un pou amb 3-4 µl de protein ladder (es fa servir per estimar la mida de les proteïnes d'interès, també és conegut com a marcador proteic o marcador de pes molecular proteic).
3. Durant els primers 15 minuts aproximadament el gel es corre a 100 V perquè les proteïnes corrin adequadament pel stacking gel, és necessari per concentrar totes les proteïnes en una banda, de manera que comencin a separar-se en el gel al mateix temps. Quan les proteïnes han arribat al resolving gel augmentem el voltatge a 140 V, perquè se separin.

## **3. Transferència a membrana**

1. Una vegada finalitzada l'electroforesi es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa amb una pila de transferència ja preparada. Per a això s'utilitzarà l'instrument iBlot2, que realitza la transferència en aproximadament 7 minuts. S'empra de manera estàndard el programa 0 predeterminat per l'instrument.
2. Es comprova que la transferència s'ha dut a terme correctament amb Ponceau (és un mètode de tinció ràpid i reversible per localitzar bandes de proteïnes en Western Blot que produeixen bandes de color rosa vermellós). Posteriorment, es fa un rentat amb TBS-T (Tris buffered saline solution with

Tween) (es fa ús comunament com a solució de rentat per a les membranes de Western Blot).

#### **4. Bloqueig**

1. Es prepara el tampó de bloqueig (llet en pols al 10%-20% en TBS-Tween).
2. S'aboca el tampó de bloqueig en una cubeta i se submergeix la membrana en ell, en agitació durant 1 hora.
3. Es fan 3 rentades de 10 minuts amb TBS-T.
4. S'incuben els fragments de membrana en l'anticòs primari diluït 1:1000 en BSA (en TBS-T) 5% Blocking Buffer (una proteïna salina preparada pel bloqueig) durant la nit a 4 °C.
5. Es realitzen 3 rentades de 10 minuts en TBS-T.
6. S'incuba 1 h amb l'anticòs secundari, diluït 1:10.000 en llet.
7. Es fan tres rentades de 10 minuts en TBS-T.

#### **5. Revelatge**

1. Per últim, es revela al ChemiDoc amb Super Signal West FEMTO maximum sensitivity, un substrat quimioluminescent de màxima sensibilitat per a la detecció de nivells de proteïnes per l'anàlisi mitjançant Western Blot.



## **13. ANNEX III**

### **Protocol d'extracció d'RNA**

En aquest cas es parteix de cèl·lules, per tant, primer s'han de lisar per trencar les membranes o parets cel·lulars i alliberar les molècules biològiques. Per fer-ho s'afegeix 1 mL de TRIzol i es rasquen les cèl·lules. Un cop rascades es comença el protocol a partir de teixit triturat (pols) en TRIzol.

#### **Materials:**

- Micropipeta de 20 µL
- Micropipeta de 200 µL
- Tubs Eppendorf
- Vòrtex
- Cloroform
- Centrifugadora
- TRIzol
- Isopropanol
- Incubadora
- Etanol 75%
- Aigua DEPC
- Nanodrop (espectrofotòmetre)
- NaCl 4M
- Etanol absolut
- Congelador
- Heat Block (bloc de calor)
- Gel

#### **1. Separació de fases**

1. Es pipeteja la pols amunt i avall perquè es dissolgui millor a temperatura ambient (27 °C).
2. S'afegeixen 0,2 mL (200 µL) de cloroform per cada 1 mL de TRIzol.
3. Es posa la mostra al vòrtex durant 15 segons (és un instrument utilitzat per a barrejar petits tubs de líquid).

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

4. S'incuba la mostra 2-3 minuts a temperatura ambient (27 °C).
5. Se centrifuga 15 min a 12000 g (força centrífuga relativa) a 4 °C (sortiran 3 fases: la superior és incolora i aquosa, i és on està l'RNA).
6. S'agafa la fase aquosa amb una micropipeta de 20 µL i es posa en tubs Eppendorf nous.

### **2. Precipitació RNA**

1. S'afegeixen 0,5 mL d'isopropanol per cada 1 mL de TRIzol.
2. Es posa la mostra al vòrtex durant 5 segons.
3. S'incuba la mostra durant 10 minuts a temperatura ambient (27 °C).
4. Passats els 10 minuts se centrifuga, 10 min a 12000 g a 4 °C.

### **3. Rentat RNA**

1. S'elimina el sobrenedant (líquid que es troba sobre el precipitat) amb una pipeta vigilant de no eliminar el "pellet" (les partícules que precipiten en un tub després de la centrifugació).
2. S'afegeix 1 mL d'etanol 75% per cada 1 mL de TRIzol
3. Es posen les mostres al vòrtex.
4. Se centrifuguen 5 minuts a 7500 g, i s'elimina el sobrenedant.
5. El "pellet" es deixar assecar 5-10 minuts a l'aire (ha de passar de color blanc a un color més transparent, però no s'ha d'assecar massa).

### **4. Resuspensió d'RNA**

1. Es resuspèn l'RNA en 30-50 µL d'aigua DEPC (estèril i lliure de nucleases, tractada amb Dietilpirocarbonat) i es pipeteja amunt i avall suaument.
2. La mostra resuspesa s'incuba 5 minuts a 55 °C (a un heat block). Es passa a gel.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

3. Es mesura amb el Nano Drop (un espectrofotòmetre que mesura l'absorbància a diferents longituds d'ona en 1 µl de mostra). S'ha d'obtenir una absorbància a 260/280 nm de 2,00 i a 260/230 nm de 2,00/2,2.
4. Si surt bé es poden guardar les mostres a -80 °C, però si es veu un pic de sals a 230 nm, és necessari seguir.

### **5. Precipitació i rentat amb etanol**

1. S'afegeix un 10% del volum de NaCl 4M i 250% del volum d'etanol absolut.
2. Es diposita la mostra al vòrtex.
3. S'incuba 30 minuts a -80 °C (o tota la nit a -20 °C)
4. Es descongela i centrifuga 30 min a 16000 g a 4 °C i es descarta el sobrenedant.
5. S'afegeix 1 mL d'etanol 75% per cada 1 mL de TRIzol.
6. Es posen les mostres al vòrtex.
7. Se centrifuga 5 minuts a 7500 g i s'elimina el sobrenedant per decantació.
8. Es deixa assecar el "pellet" a l'aire 5-10 minuts.

### **6. Mesurar la concentració**

1. Es resuspèn el "pellet" amb 30-50 µL d'aigua DEPC (el volum pot variar en funció de la mida del "pellet").
2. S'escalfa 5 minuts a 55 °C al Heat Block. Es passa a gel.
3. Es torna a mesurar la concentració d'RNA al Nano Drop. S'ha d'obtenir una absorbància a 260/280 nm de 2,00 i a 260/230 nm de 2,00/2,2. La concentració hauria de ser d'1 µg/µL.
4. Si surt molt concentrat, es dilueix amb aigua DEPC.
5. Es guarda a -80 °C.

## **14. ANNEX IV**

### **Protocol de retrotranscripció**

#### **Materials:**

- Kit de retrotranscripció (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, marca Roche)
- Gel
- Tubs Eppendorf 0.2 ml (PCR Tubes Catalog #16950)
- RNA
- Heat Block

1. S'agafen els vials 1, 2, 3, 4, 5 i 9 del kit de retrotranscripció i es posen en gel.
2. Per a cada condició, es posa 1 µg d'RNA, 1 µL de primer (vial 5), i aigua (vial 9) fins a un volum de 13 µL en un tub Eppendorf.
3. S'escalfa 10 minuts a 65 °C i després es posa en gel.
4. Mentrestant es prepara una Master Mix (una solució concentrada amb tots els components per fer una PCR a temps real) dels vials 1 (0,5 µL/tub), 2 (4 µL/tub), 3 (0,5 µL/tub) i 4 (2 µL/tub).
5. Es pipeteja la mescla amunt i avall per homogeneïtzar.
6. S'afegeixen 7 µL de la Master Mix a cada tub Eppendorf.
7. S'escalfa 60 minuts a 50 °C i 5 minuts a 85 °C i un cop acabat es passa a gel.
8. Un cop obtingut el cDNA es guarda a 4 °C (2 h màxim) o a -20 °C.

## 15. ANNEX V

### Protocol de qPCR

#### Materials:

- Termociclador
- Tubs Eppendorf estèrils
- Alíquota d'aigua DEPC
- Placa per PCR (96 pous)
- Kit de PCR (marca Fisher, Fast SYBR Green Master Mix).

1. Es dilueix el cDNA en aigua DEPC fins a obtenir 10 ng/μL. En cDNA s'acostuma a partir de 1000 ng/20 μL (50 ng/μL).

Calculem el volum d'aigua DEPC necessari per diluïr el cDNA:

$$50 \text{ ng}/\mu\text{L} \cdot \frac{1 \mu\text{L}}{10 \text{ ng}} = 5 \mu\text{L} \text{ d'aigua DEPC per diluïr el cDNA } 1/5.$$

2. Es preparen les Master Mix. En aquest cas es preparen 3: 2 pels gens d'interès i 1 pel gen constitutiu (un gen que s'expressa a un nivell relativament baix i constant en totes les cèl·lules d'un mateix organisme i serveix com a control positiu).

La Master Mix conté:

- 10 μL de SYBR Green/ pou (és important que estigui protegit de la llum, ja que és un compost fluorescent).
  - 2 μL de Primer Mix 1 μM.
  - 7 μL d'aigua DEPC/ pou.
3. Es posa una placa de qPCR estèril (96 pous) sobre gel, recolzada en un adaptador i s'hi afegeix:
    - 1 μL de cDNA (o d'aigua DEPC per als controls negatius)
    - 19 μL de Master Mix.
  4. Un cop fet, es tapa la placa amb una funda de plàstic especial.
  5. Es manté la placa tapada de la llum fins al moment de fer la qPCR.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*

A partir d'aquest punt el procediment es realitza a la màquina de PCR:

1. Es fan servir les següents condicions:

HOLDING	CYCLING (40 cicles)			MELTING			
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	85 °C	60 °C	Step 0,3 °C	95 °C
		10 s	20 s				15 s
2 min	5 s	Read data	Read data	15 s	60 s	Read data	Read data

2. Es posa la placa a la màquina i es clica "Start run" a l'ordinador.
3. La qPCR triga unes 2 h a completar-se.
4. Quan s'ha completat, s'exporten les imatges.

## *La teràpia gènica amb shRNA aplicada a la malaltia d'Alzheimer*