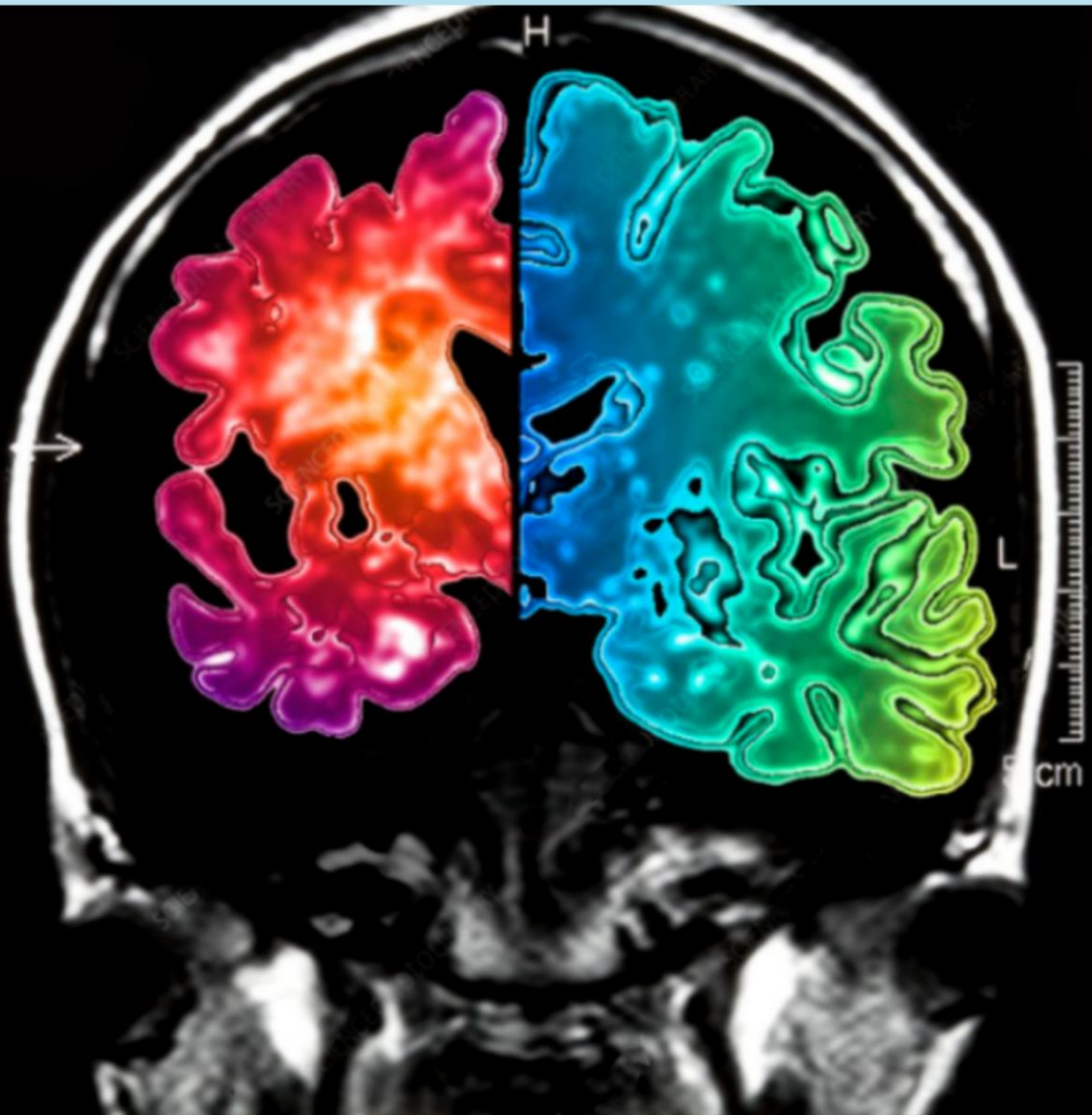


TREBALL DE RECERCA

LA MALALTIA D'ALZHEIMER



L.K

FOR
CES

Foment de la Recerca en els Centres de Secundària

IDP **icg**
Institut de Desenvolupament
Professional

RESUM

Aquest treball de recerca té l'objectiu de donar importància a la malaltia d'alzheimer (MA) i al fet que actualment no hi ha cap tractament eficient, és una malaltia incurable i terminal.

El treball està dividit en dues parts: el marc teòric i el marc pràctic. Al marc teòric explicaré com van descobrir l'alzheimer, què és exactament, els símptomes que provoca, com és diagnosticat, la prevenció, els dos grans tipus que n'hi ha i els tractaments actuals. Faré èmfasi en les teories que existeixen sobre quina és la causa de l'alzheimer, ja que encara no se sap realment. Per acabar, explicaré el fàrmac en el qual se centrarà la meua part pràctica.

Gràcies a un grup de farmacologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, he pogut investigar l'efectivitat d'un possible fàrmac per a tractar l'alzheimer: la Licochalcona A. L'objectiu principal de l'estudi és saber la qualitat d'aquest tractament, però també es vol investigar si l'alzheimer podria ser una malaltia semblant a la diabetis, és a dir, una síndrome metabòlica.

A l'estudi he analitzat tres variables: la presència o no d'un gen que provoca MA artificial, una dieta rica en lípids o una dieta control i si se'ls administra o no Licochalcona A als subjectes d'estudi, que en aquest cas, són ratolins. Combinant aquestes variables s'obtenen vuit grups d'estudi diferents.

Explicaré els quatre experiments que s'han realitzat i una prova prèvia que s'efectua per a preparar els models biològics, el genotipat. Aquests experiments ens donen un punt de vista de l'efecte del fàrmac des de tres visions diferents: una metabòlica, una cognitiva i una anatòmica i fisiològica.

Degut al gran volum de mostres, no s'han pogut analitzar tots els resultats de cada prova, però em centraré en les que sí s'ha pogut per a arribar a les conclusions finals de la investigació.

Cal esmentar que les conclusions del treball no reflecteixen la realitat, ja que no n'hi ha suficient quantitat de resultats, fet que dona molt marge d'error. Malgrat això, després de l'elaboració de la meua investigació he pogut extreure les següents conclusions:

- El genotipat ha demostrat ser una prova molt eficient i això és molt important per a tot l'estudi, ja que un mal genotipat, comportaria una mala classificació dels ratolins i llavors uns resultats invàlids.
- La dieta rica en lípids causa obesitat als ratolins, i per conseqüència, aquests no poden utilitzar correctament la insulina, és a dir, presenten una mena de diabetis semblant a la tipus II.
- Sembla ser que l'alzheimer sí que podria ser una síndrome metabòlica similar a la diabetis. Els ratolins que presentaven alzheimer artificial i tenien una dieta rica en greixos, presentaven uns valors de glucosa en sang de gairebé el doble que els altres.

- La Licochalcona A, tot i semblar que si millora aquest tipus de “diabetis”, no ho fa significativament. Aleshores, en cas que la MA fos una síndrome metabòlica, no seria la millor opció per a tractar-ho.

Paraules clau: malaltia d'alzheimer, Licochalcona A, síndrome metabólica, diabetis.

RESUMEN

Este trabajo de investigación tiene el objetivo de dar importancia a la enfermedad del alzheimer (EA) y al hecho de que actualmente no existe ningún tratamiento eficiente, es una enfermedad incurable y terminal.

El trabajo está dividido en dos partes: el marco teórico y el marco práctico. En el marco teórico explicaré cómo descubrieron el alzheimer, qué es exactamente, los síntomas que provoca, cómo es diagnosticado, la prevención, los dos grandes tipos que existen y los tratamientos actuales. Pondré énfasis en las teorías que existen sobre cuál es la causa del alzheimer, ya que todavía no se sabe realmente. Por último, explicaré el fármaco en el que se centrará mi parte práctica.

Gracias a un grupo de farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, he podido investigar la efectividad de un posible fármaco para tratar el alzheimer: la Licochalcona A. El objetivo principal del estudio es saber la calidad de este tratamiento, pero también se quiere investigar si el alzheimer podría ser una enfermedad similar a la diabetes, es decir, un síndrome metabólico.

En el estudio he analizado tres variables: la presencia o no de un gen que provoca EA artificial, una dieta rica en lípidos o una dieta control y si se les administra o no Licochalcona A a los sujetos de estudio, que en este caso son ratones. Combinando estas variables se obtienen ocho grupos de estudio distintos.

Explicaré los cuatro experimentos que se han realizado y una prueba previa que se efectúa para preparar los modelos biológicos, el genotipado. Estos experimentos nos dan un punto de vista del efecto del fármaco desde tres visiones distintas: una metabólica, una cognitiva y una anatómica y fisiológica.

Debido al gran volumen de resultados, no se han podido analizar todos los productos de cada prueba, pero me centraré en las que sí se ha podido para llegar a las conclusiones finales de la investigación.

Es necesario mencionar que las conclusiones del trabajo no reflejan la realidad, ya que no hay suficiente cantidad de resultados, lo que da mucho margen de error. Sin embargo, después de la elaboración de mi investigación, he podido extraer las siguientes conclusiones:

- El genotipado ha demostrado ser una prueba muy eficiente, esto es muy importante para toda la investigación, ya que un genotipado erróneo comportaría una clasificación de ratones equivocada y entonces, unos resultados inválidos.
- La dieta rica en lípidos causa obesidad a los ratones, y por consecuencia, éstos no pueden utilizar correctamente la insulina, es decir, presentan una especie de diabetes parecida a la tipo II.

- Parece ser que el alzheimer sí podría ser un síndrome metabólico similar a la diabetes. Los ratones que presentaban alzheimer artificial y tenían una dieta rica en grasas, presentaban unos valores de glucosa en sangre de casi el doble que los otros.
- La Licochalcona A, aunque parece que si mejora este tipo de “diabetes”, no lo hace significativamente. Entonces, en caso de que la EA fuera un síndrome metabólico, no sería la mejor opción para tratarlo.

Palabras clave: enfermedad de alzheimer, Licochalcona A, síndrome metabólico, diabetes.

ABSTRACT

This research project in its present form has as a main objective to emphasize the importance of Alzheimer disease (AD) and also to signal the fact that nowadays Alzheimer disease hasn't got any effective cure or other treatment.

This project is divided in two parts: the theoretical and the practical framework. The theoretical part includes the manner in which the AD was discovered, what Alzheimer is, the symptoms, how it is diagnosed, the measures of prevention, the two AD types discovered and how Alzheimer is treated at the present. I will focus my work on the theories concerned on the causes of the AD, despite the fact that for the moment the origins are still unknown. To end up, I will explain about the treatment in which my practicum will be centered.

Thanks to a pharmacological group of the Faculty of Medicine from the University of Barcelona, I could investigate the effectiveness of a possible treatment which may treat AD: la Licochalcone A. The main objective of the present project is to find out the quality of this possible drug, but I also intend to demonstrate if AD could be a similar disease to diabetes, that is to say, a metabolic syndrome.

In my project I analyzed three variables: the presence or non-presence of a gene that provokes artificial AD, the second implies a high-fat diet or a controlled diet and the last one showing if Licochalcone A is administrated or not to the studies subjects, which in the present case are mice.

I will explain the four experiments performed and a previous test which is to prepare the biological models, the genotyping. These experiments give us a point of view about the effectiveness of the treatment of three different views: metabolical, cognitive and anatomical and physiological.

Due to the enormous amount of outcome, it was impossible to analyze all the results of every test, however I will focus my work on the ones that could be studied with the purpose to arrive at my final conclusion of this investigation.

It is necessary to mention that the conclusions of the investigation do not reflect the reality, because there are not enough results, which gives a lot of error range. However, after the elaboration of my research, I have been able to extract the following conclusions:

- The genotyping has proven to be an efficient test. This is very important for all the research, because a wrong genotyping means an incorrect classification of mice and therefore to invalid results.
- The high-fat diet causes obesity to mices, and as a result, they are unable to use insulin properly because they have developed a kind of type II diabetes.

- It seems that Alzheimer can be a metabolic syndrome similar to diabetes. The mice with artificial AD and high-fat diets presented blood glucose values almost twice than the others.
- Licochalcone A, although it does seem to improve this type of "diabetes", does not improve it significantly. So, if AD is a metabolic syndrome, it won't be the best option to treat it.

Keywords: alzheimer disease, Licochalcone A, metabolic syndrome, diabetes.

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ	10
II. MARC TEÒRIC	11
1. INTRODUCCIÓ A L'ALZHEIMER	11
1.1 Història	11
1.2 Què és la malaltia d'alzheimer?	12
1.3 Present i futur	12
1.4 Simptomatologia	13
1.5 Diagnòstic	14
1.6 Com podem prevenir l'alzheimer?	17
2. ELS DOS GRANS TIPUS D'ALZHEIMER	18
2.1 Alzheimer esporàdic	18
2.1.1 Causes	18
2.1.1.1 Hipòtesi colinèrgica	18
2.1.1.2 Hipòtesi de la proteïna β -amiloide	20
2.1.1.3 Hipòtesi de la proteïna tau	22
2.1.1.4 Hipòtesi diabetis III	24
2.2 Alzheimer familiar	28
3. TRACTAMENTS	29
3.1 Tractaments actuals	29
3.1.1 Inhibidors de l'acetilcolinesterasa	30
3.1.2 Memantina	31
3.2 Tractaments en estudi: la Licochalcona A	32
III. MARC PRÀCTIC	34
1. INTRODUCCIÓ	34
2. DISSENY EXPERIMENTAL	34
3. PREPARACIÓ DELS MODELS BIOLÒGICS I GENOTIPAT	36
3.1 EXPERIMENT 0: GENOTIPAT	36
3.1.1 Objectius	37

3.1.2	Hipòtesi.....	37
3.1.3	Material.....	37
3.1.4	Procediment.....	38
3.1.5	Resultats.....	40
3.1.6	Discussió.....	43
3.1.7	Conclusió.....	43
4.	EXPERIMENT 1: TEST DE RESISTÈNCIA LA GLUCOSA.....	43
4.1	Objectius.....	43
4.2	Hipòtesi.....	43
4.3	Material.....	44
4.4	Procediment.....	45
4.5	Resultats.....	46
4.6	Discussió.....	48
4.7	Conclusió.....	49
5.	EXPERIMENT 2: TESTS DE COMPORTAMENT.....	50
5.1	EXPERIMENT 2.1: MORRIS WATER MAZE.....	50
5.1.1	Objectius.....	50
5.1.2	Hipòtesi.....	50
5.1.3	Material.....	51
5.1.4	Procediment.....	52
5.1.5	Resultats.....	53
5.2	EXPERIMENT 2.2: NOVEL OBJECT RECOGNITION TEST.....	53
5.2.1	Objectius.....	53
5.2.2	Hipòtesi.....	54
5.2.3	Material.....	55
5.2.4	Procediment.....	55
6.	EXPERIMENT 3: OBSERVACIÓ D'ESPINES DENDRÍTIQUES	56
6.1	Objectius.....	56
6.2	Hipòtesi.....	57
6.3	Material.....	58
6.4	Procediment.....	59
6.5	Resultats.....	61
IV.	CONCLUSIÓ	65
V.	AGRAÏMENTS.....	66
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	67

I. INTRODUCCIÓ

Aquest treball de recerca tracta sobre la malaltia d'alzheimer (MA) i un fàrmac que actualment es troba en una fase primerenca d'estudi: la Licochalcona A. El treball es divideix en dues parts: el marc teòric i el marc pràctic.

Al marc teòric explicaré com es va descobrir l'alzheimer, sobre que tracta exactament aquesta malaltia, els dos grans tipus que n'hi ha i quines són les causes de cadascun, quins símptomes presenta, com es diagnostica, com es pot prevenir, els tractaments que existeixen actualment i un fàrmac en estudi que posaré a prova a la meua part pràctica: la Licochalcona A.

Al marc pràctic explicaré la investigació que he desenvolupat sobre la Licochalcona A. Presentaré com s'han preparat els models biològics, una prova prèvia que se'ls realitza abans de començar l'estudi i els quatre experiments efectuats. Un d'ells analitza el fàrmac des d'un punt de vista metabòlic, dos experiments ho fan des d'un punt de vista cognitiu i l'últim des d'una visió anatòmica i fisiològica.

Els objectius d'aquest treball són principalment dos: el primer és estudiar si realment la Licochalcona A podria ser un tractament efectiu per a la MA i el segon, saber si l'alzheimer podria tractar-se d'una síndrome metabòlica semblant a la diabetis.

Una de les coses que més m'ha motivat a fer aquest treball ha sigut la malaltia del meu avi. Va ser diagnosticat amb alzheimer fa 3 anys i actualment es troba en l'etapa més greu de la malaltia. Crec que és molt important donar a conèixer la situació que hi ha actualment amb l'alzheimer i totes les conseqüències que comporta, ja que és una situació molt dura, tant pels pacients, com per a tots els familiars i amics. Milers de persones són diagnosticades cada any, però el gran problema és que no n'hi ha cap fàrmac efectiu per a tractar-lo. Malgrat hagin hagut moltíssimes investigacions, encara no se sap que el causa realment i llavors les vies d'estudi per a trobar un fàrmac són molt limitades.

Per últim, l'altra gran motivació per a fer aquest treball ha estat el fet que meu camp d'interès està centrat en les malalties i el meu enfoc cap al futur són la medicina i la biomedicina. Poder posar el meu gra de sorra en el progrés de la investigació d'aquesta malaltia que afecta a tantes persones és el que més m'ha motivat.

II. MARC TEÒRIC

1. INTRODUCCIÓ A L'ALZHEIMER

1.1 Història

La demència ha estat associada amb la vellesa des dels temps dels antics grecs i romans, però no va ser fins al 1901 que gràcies a Alois Alzheimer es va reconèixer el primer cas d'alzheimer.



Figura 1: Imatge d'Alois Alzheimer

L' Alois Alzheimer, psiquiatre i neuròleg alemany, el 25 de novembre es reuní amb el marit d'Auguste Deter. Ell havia portat la seva dona a l'hospital pels seus recents canvis de comportament: no podia dur a terme tasques domèstiques simples, veia objectes ocults, se sentia perseguida i molestada per la gent, i sobretot molt gelosa amb el seu marit.

L'especialista va mantenir una conversa amb Auguste en la qual ella no va saber respondre correctament el seu cognom, el nom del seu marit i tampoc la forma correcta d'escriure el número cinc.

Durant els pròxims quatre anys i mig va anar fent un seguiment de la pacient on cada vegada la seva regressió mental anava avançant: desorientació en temps i espai, deliris, al·lucinacions, cridava durant hores, s'amagava, etc. Va acabar confinada en un llit en posició fetal i completament apàtica, finalment va morir.

Després de la seva mort, el neuròleg va examinar el cervell de la seva pacient amb un microscopi i va anotar totes les alteracions que va trobar.

Durant els següents anys es van identificar molts casos semblants, però només es relacionava amb persones d'entre 45 i 65 anys amb demència.

Amb el pas del temps el diagnòstic de l'alzheimer es feia independentment de l'edat a tots els pacients amb el mateix patró de símptomes. Finalment va ser aprovat per la nomenclatura mèdica com a la malaltia de l'alzheimer.

1.2 Què és la malaltia d'alzheimer?

La malaltia d'alzheimer (MA) és el tipus de demència més comuna causada per un procés de neurodegeneració, és a dir, d'una mort progressiva de neurones, que es manifesta principalment com a una pèrdua de memòria i capacitats mentals.

Normalment es comença a desenvolupar als 65 anys, però en alguns casos ho comença a fer abans, inclús a la dècada dels 40 anys. Això és degut a l'existència de dues variants de la malaltia:

- **Alzheimer Esporàdic:** apareix a partir dels 65 anys, és el més comú i de causes desconegudes.
- **Alzheimer Familiar:** apareix abans dels 65 anys, és poc freqüent i de causes relacionades amb la genètica.

El primer símptoma que es manifesta és la pèrdua de memòria immediata repetidament. Altres signes poden ser: canvis de personalitat, deteriorament del moviment, dificultat per comunicar-se, problemes d'atenció i orientació, etc. A mesura que la malaltia avança, els símptomes són cada vegada més greus. Des que és diagnosticada, l'esperança de vida del pacient és d'uns 10 anys, aproximadament.

Actualment, la lluita contra l'alzheimer continua, ja que és una malaltia incurable i terminal. Malgrat això, milers de persones segueixen treballant i avançant en la recerca per a una cura definitiva.

1.3 Present i futur

Uns dels reptes als quals s'enfronta tota la comunitat científica i mèdica és com solucionar el problema de que cada vegada l'esperança de vida és més alta i les demències més freqüents. Aquesta situació en un futur serà insostenible a nivell econòmic, sanitari i social.

Cada any hi ha entre 5 i 8 mil nous casos d'alzheimer, que representen un 50% aproximadament de les demències diagnosticades anualment, que són entre 10 i 15 mil.

L'any 2015 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va estimar uns 47,5 milions de casos de demències a escala global. També va calcular que un 0.397% de persones a nivell mundial patien algun tipus de demència, que la prevalença en 2030 seria del 0.556% i que es triplicaria per l'any 2050.

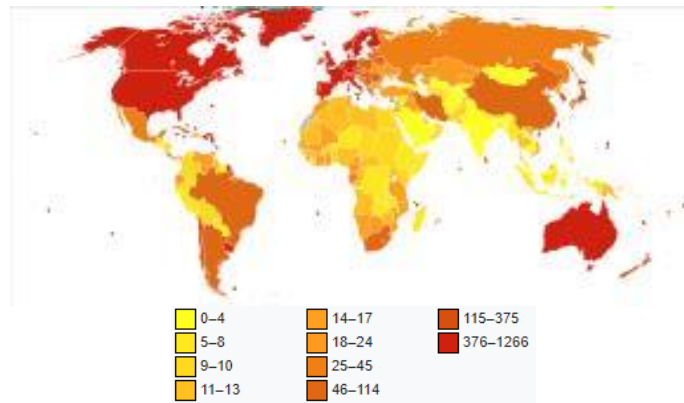


Figura 2: Morts per milió de persones causades per alguna demència en 2012.

Actualment les causes de l'alzheimer són pràcticament desconegudes i això comporta que, encara que hi hagi molts tractaments en estudi, no hi ha cap que realment aturi el desenvolupament de la malaltia. Tots els tractaments actuals només aconseguixen pal·liar lleugerament els símptomes.

1.4 Simptomatologia

La malaltia de l'alzheimer no és pas immediata sinó que és progressiva, és a dir, amb el pas del temps va empitjorant les capacitats cognitives dels pacients.

Durant la malaltia podem distingir tres etapes on es presenten diferents símptomes depenent en quina fase es trobin.

▪ **Etapa lleu:**

- pèrdues mínimes de memòria
- reacció i aprenentatge lents
- canvis d'humor
- dificultat amb l'organització, la planificació, l'orientació, la comunicació i les tasques rutinàries
- menys enèrgics i espontanis
- eviten persones i llocs nous, tendeixen al que se'ls faci familiar

▪ **Etapa moderada:**

- pèrdua de memòria a curt termini
- oblit de la seva història personal i de persones familiars
- desorientació en temps i lloc, i desconexió de la realitat
- problemes amb la parla, l'escriptura, la lectura i la comprensió
- dificultat per vestir-se, rentar-se i menjar
- si s'adonen de la situació poden tornar-se depressius, inquiets, apàtics, irritables, aïllats
- trastorns de la son

- **Etapa greu:**
 - pèrdua de memòria pràcticament completa
 - incapacitat per menjar, parlar, reconèixer persones
 - no hi ha control sobre les funcions corporals
 - estat físic molt debilitat que els fa vulnerables a altres malalties

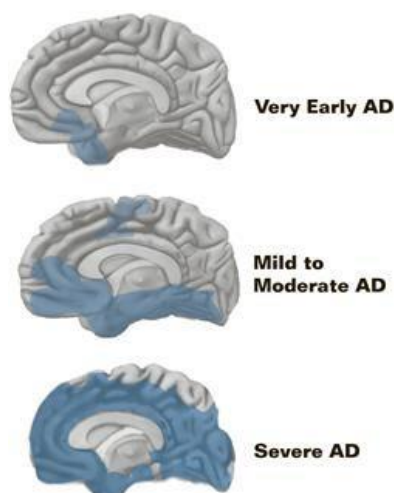


Figura 3: Representació de les zones afectades durant la progressió de la MA.

En les dues variants de la malaltia els pacients, malgrat sigui a diferents edats, passen per aquestes tres etapes, però cadascun ho farà a un ritme diferent. L'alzheimer no sempre avança a la mateixa velocitat en tots els que la pateixen.

1.5 Diagnòstic

Per a l'alzheimer, com per moltes altres malalties, un diagnòstic precoç és clau per a tractar-la, ja que els tractaments tendeixen a donar millors resultats quan la persona es comença a tractar des de l'etapa lleu.

Per a aconseguir diagnosticar la MA, els metges avaluen els símptomes del pacient i realitzen diverses proves:

- **Proves cognitives:** l'especialista realitzarà diferents tests per valorar d'una manera objectiva la capacitat cognitiva del pacient. Les proves curtes (5-15 min) s'anomenen test de criba i les llargues (30-90 min) avaluacions cognitives completes. Una vegada realitzades es comparen els resultats amb altres de gent d'edat i nivell d'escolaritat semblant.

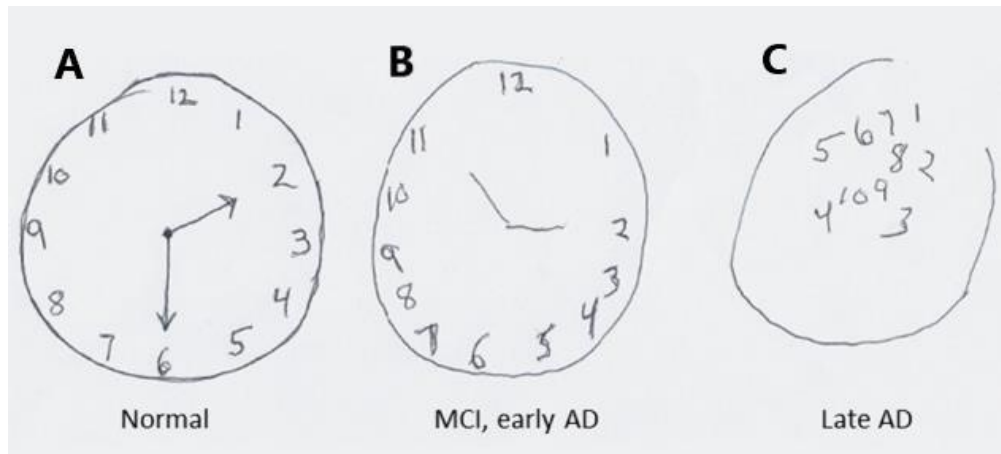


Figura 4: Test del rellotge: es demana al pacient que dibuixi un rellotge amb una hora determinada.

A: persona sana B: MA etapa lleu C: MA etapa greu

- **Entrevistes:** el metge preguntarà a familiars i amics del pacient sobre aquest per comparar el canvi de comportament, habilitats de raonament i capacitats cognitives.
- **Anàlisi de laboratori:** no serveixen per aconseguir un diagnòstic d'alzheimer, però sí per descartar altres malalties que provoquen símptomes similars.
- **Imatges del cervell:** existeixen 3 tipus de tecnologia diferents per obtenir imatges del cervell:

-Ressonància magnètica (RM) i tomografia computada (TC): obtenen una imatge detallada del cervell que permet valorar si hi ha una pèrdua de neurones a les àrees que normalment són afectades per l'alzheimer.

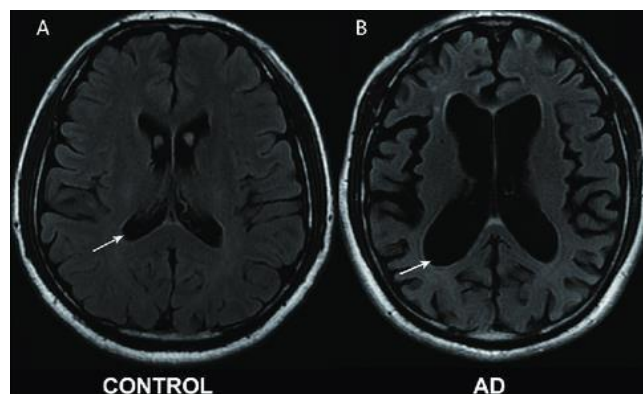


Figura 5: RM d'una persona sana (A) i d'una que pateix MA (B)

-Tomografia per emissió de positrons (TEP): Existeixen dos tipus de TEP, una que valora el metabolisme disminuït de la glucosa i l'altre que detecta la presència de la proteïna β -amiloide. Aquests dos marcadors són lesions típiques que pateix el cervell de les persones amb alzheimeri que explicaré en profunditat durant els pròxims apartats.

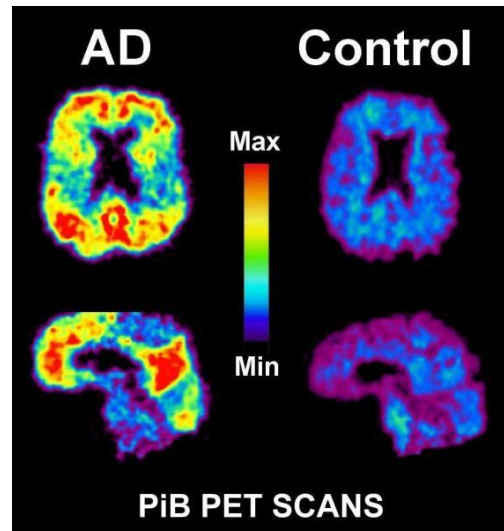


Figura 6: TEP de β -amiloide. A l'esquerra s'observa el cervell d'un pacient amb MA i a la dreta el d'un pacient sa. Els tons taronges i grocs indiquen una gran presència de la proteïna i els blaus uns valors normals.

- **Anàlisi del líquid cefalorraquidi:** és un líquid que rodeja el cervell i la medulla espinal. S'analitza per veure si hi ha presència d'unes proteïnes que s'acumulen al cervell de pacients amb MA. Posteriorment parlaré d'aquestes dues proteïnes: la proteïna β -amiloide i la proteïna tau.
- **Proves genètiques:** en aquest cas només serviran per detectar els casos d'alzheimer familiar.

Molts cops el diagnòstic de l'alzheimer no es pot fer amb seguretat fins després de la mort del pacient. En la següent imatge es pot observar la gran diferència entre un cervell d'una persona sana (esquerra) i un que patia MA (dreta).

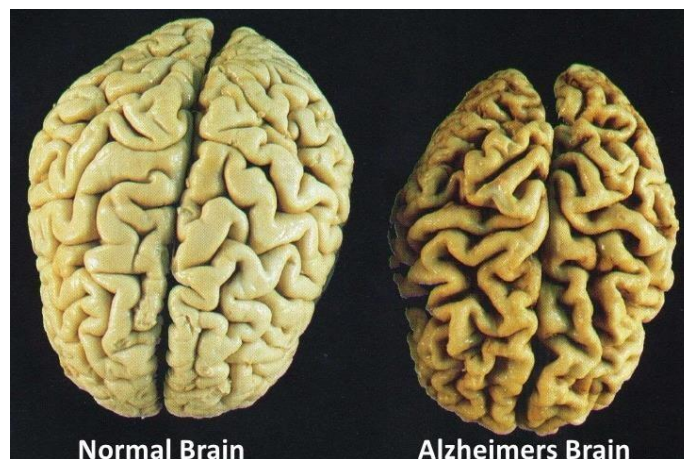


Figura 7: Cervell d'una persona sana / Cervell d'una persona amb alzheimer.

1.6 Com podem prevenir l'alzheimer?

“Com podem prevenir l'alzheimer?” Aquesta pregunta porta de cap a tots els especialistes des del descobriment d'aquesta malaltia i, encara que no siguin definitives, s'han descobert varies conductes i condicions que podrien ser factors de risc.

L'any 2012 l'investigador J. Dartigues et al va publicar un estudi anomenat PAQUID. Aquest va analitzar durant 24 anys, en 3777 individus de més de 65 anys quines són aquestes condicions i conductes que afavoreixen l'aparició de l'alzheimer.

Aquests són els factors de risc que es van determinar a l'estudi:

- Edat avançada
- Ser dona
- Baix nivell educatiu
- Gen ApoE 4
- Consum de tabac
- Presentar símptomes depressius
- Presència d'herpes
- Consumir benzodiazepines (fàrmacs per tractar ansietat, insomni, convulsions, etc.)

El president de l'Associació Internacional de la Malaltia d'Alzheimer, al 2014, va afirmar que l'alzheimer també té una connexió estreta amb la hipertensió, la diabetis, la dieta, l'obesitat i les relacions socials. Llavors, tenint en compte aquests possibles factors de risc, aquestes són algunes conductes que ajudarien a prevenir la MA:

- Controlar factors de risc cardiovasculars: hipertensió, diabetis, obesitat, colesterol, etc.
- Portar una dieta variada i equilibrada, la mediterrània seria un exemple.
- Realitzar exercici físic.
- Prevenir l'abandonament escolar.
- Mantenir la ment activa: llegir, aprendre noves habilitats, apuntar-se a tallers o cursos, mots encreuats, jugar als escacs, etc.
- Evitar el consum de tabac i benzodiazepines.
- Relacionar-se amb la gent, tindre vida social.

Encara que malauradament no hi hagi una prevenció establerta i eficaç, es continuen estudiant els factors de risc i s'espera trobar-ne respostes per disminuir el nombre de casos.

2. ELS DOS GRANS TIPUS D'ALZHEIMER

2.1 Alzheimer Esporàdic

L'alzheimer esporàdic es manifesta normalment a partir dels 65 anys, però han existit casos puntuals on ha aparegut abans. Aquest tipus d'alzheimer representa més del 99% dels casos totals de la malaltia, sent així el més comú.

Encara que la genètica no sigui determinant en aquest tipus d'alzheimer, s'ha demostrat que una mutació al gen ApoE 4 seria un factor de risc per desenvolupar la malaltia.

La gran incògnita d'aquesta variant de l'alzheimer sempre ha estat la causa, ja que encara que hi ha milers d'estudis que porten estudiant-la molts anys, cap ha pogut especificar les causes amb claredat. Malgrat això, han servit per: apropar-se a moltes hipòtesis que podrien explicar les causes, determinar els factors de risc i obtenir fàrmacs pal·liatius.

Com acabo de mencionar i he dit al principi, al no conèixer les causes concretes, els fàrmacs que existeixen actualment no serveixen per a acabar amb l'alzheimer, convertint-se així en una malaltia incurable.

2.1.1 Causes

Les causes de l'alzheimer esporàdic han sigut un gran interrogant des del seu descobriment. Tot i que s'han formulat moltes hipòtesis de quina podria ser aquesta causa, s'ha arribat a la conclusió que és multifactorial, és a dir, una combinació de diverses teories.

Hi han moltes hipòtesis i se segueixen estudiant i descobrint de noves, però en aquest apartat he escollit explicar les més acceptades i que em serviran per desenvolupar la part pràctica d'aquest treball.

2.1.1.1 Hipòtesi colinèrgica

La hipòtesi colinèrgica, la més antiga de totes, sorgida als anys 80, es basa en el fet que la reducció de la síntesi del neurotransmissor acetilcolina és la causa de l'aparició de l'alzheimer.

Un neurotransmissor és una substància química encarregada de transmetre senyals des de la neurona presinàptica fins a la neurona postsinàptica.

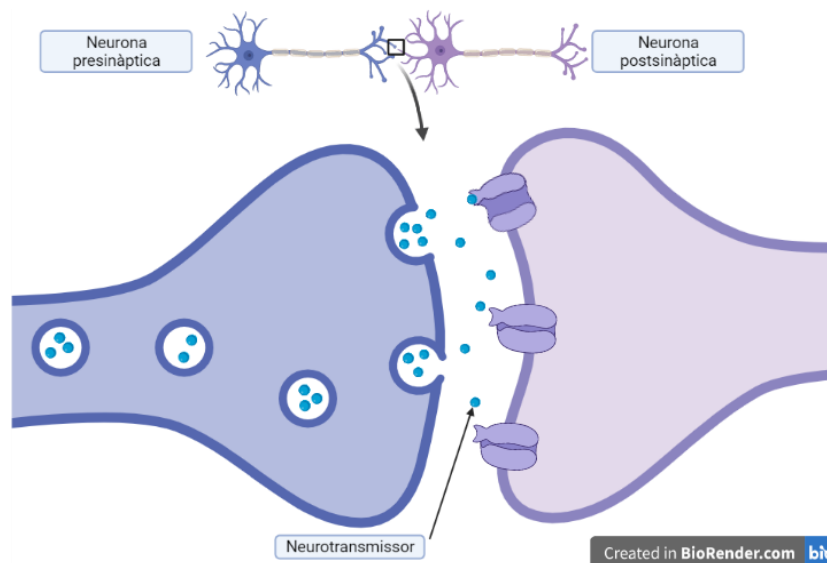


Figura 8: Representació de la sinapsi: és un tipus d'unió especialitzada mitjançant la qual les neurones transmeten un impuls nerviós. S'inicia amb una descàrrega química que origina un corrent elèctric. La neurona presinàptica (esquerra) allibera els neurotransmissors quan li arriba l'impuls, que transmetran el senyal adequat (excitar o inhibir) a la neurona postsinàptica (dreta).

En aquest cas, l'acetilcolina se sintetitza a les neurones colinèrgiques, ja que aquestes l'utilitzen com a neurotransmissor. L'enzim que les sintetitza s'anomena colinacetiltransferasa i ho fa a partir de la colina, que és un nutrient essencial, i l'àcid acètic.

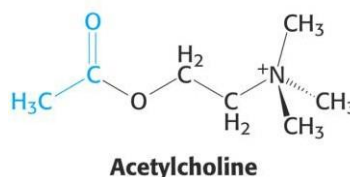


Figura 9: Estructura química de l'acetilcolina: la part blava pertany a l'àcid acètic i la negra a la colina.

Un cop ja s'ha sintetitzat, s'emmagatzema a vesícules a l'interior de neurones presinàptiques i quan es produeix l'impuls nerviós, s'allibera a l'espai intersinàptic i interacciona amb receptors colinèrgics de la neurona postsinàptica. Aquests receptors en interactuar amb l'acetilcolina transmeten l'impuls i després s'encarreguen d'indicar a la neurona que ja no cal alliberar més neurotransmissors a l'exterior.

Per una altra banda tenim l'acetilcolinesterasa, que és l'enzim encarregat de degradar l'acetilcolina una vegada ha finalitzat la seva funció com a neurotransmissor. La colina serà reciclada per tornar a sintetitzar de nou l'acetilcolina.

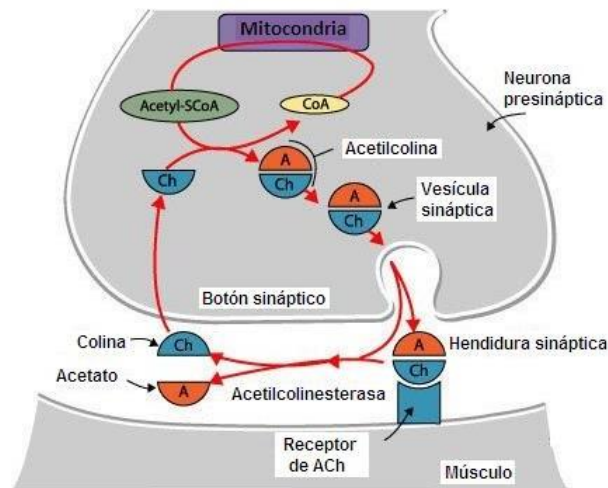


Figura 10: Representació del procés de síntesi d'acetilcolina i de la sinapsi entre neurones colinèrgiques.

Llavors, aquesta hipòtesi ens indica que la causa de la malaltia és un nivell baix de la quantitat d'aquest neurotransmissor, que està fortament relacionat amb un dèficit de memòria, atenció i aprenentatge, és a dir, de la capacitat cognitiva. No se sap quin factor és el que causa aquesta falta d'acetilcolina i per això encara hi han diferents vies d'estudi obertes.

La hipòtesi colinèrgica no està recolzada globalment, ja que els tractaments enfocats a inhibir l'acetilcolinesterasa i així augmentar el nivell d'acetilcolina, els quals explicarem més endavant, només han servit per fer més lleus alguns símptomes de l'alzheimer a etapes primerenques.

2.1.1.2 Hipòtesi de la proteïna β -amiloide

La hipòtesi de la proteïna β -amiloide ha estat la més acceptada juntament amb la de la proteïna tau, la qual explicaré al següent apartat. Aquesta hipòtesi es basa en el fet que el procés neurodegeneratiu que pateix el cervell durant la MA és causat per l'acumulació de plaques senils.

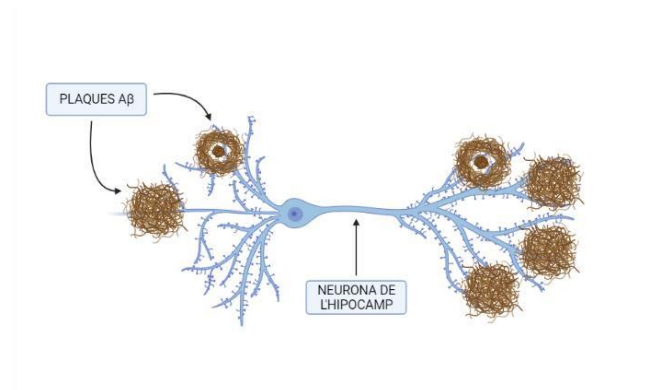


Figura 11: Representació d'una neurona de l'hipocamp afectada per les plaques senils

Les plaques senils són acumulacions del pèptid β -amiloide ($A\beta$) i es troben principalment a l'hipocamp aquesta àrea del cervell està implicada a la memòria, l'orientació, l'aprenentatge i el comportament emocional.

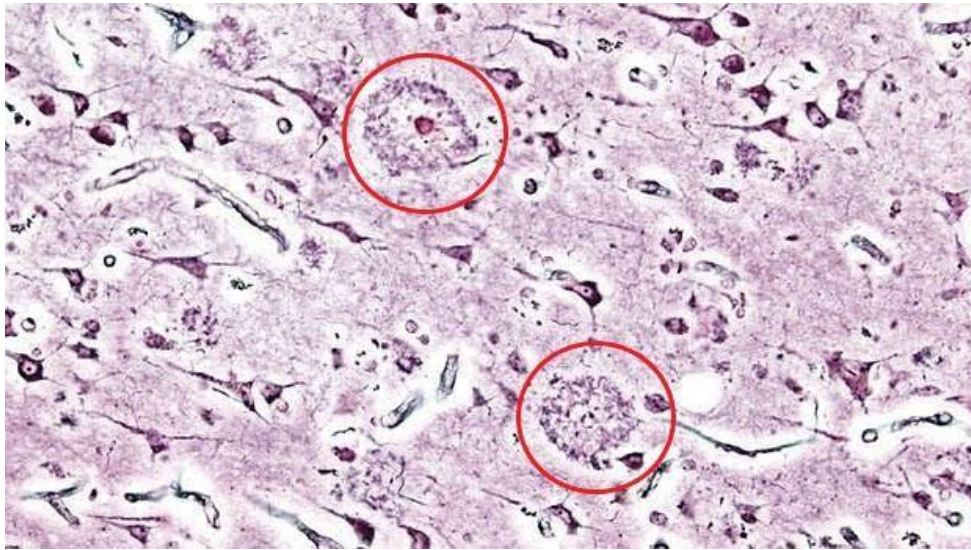


Figura 12: Imatge realitzada amb un microscopi del cervell d'una persona que patia alzheimer. Els cossos destacats són plaques senils.

Els $A\beta$ normalment s'originen a partir de la proteïna precursora de l'amiloide (APP), que és una proteïna transmembrana que es troba a diferents tipus de cèl·lules, entre elles, les neurones.

La proteïna APP té dues vies proteolítiques, és a dir, dues formes de degradar-se. En la degradació d'aquesta proteïna actuen tres enzims: la α -secretasa, la γ -secretasa i la β -secretasa.

Les dues vies proteolítiques són:

- **Via no amiloidogènica:** primer una α -secretasa l'escindeix i seguidament ho fa una γ -secretasa. Es forma un pèptid soluble ($sAPP\alpha$) que l'organisme pot eliminar amb facilitat, és innocu. Aquesta primera via no causa cap mena de problema.
- **Via amiloidogènica:** primer és escindida per una β -secretasa i després per una γ -secretasa. Es formen pèptids solubles ($sAPP\beta$) i els $A\beta$. Els $A\beta$ estan constituïts de 40 a 42 aminoàcids, sent el de 42 el més hidrofòbic i neurotòxic. Aquests pèptids s'uneixen entre ells i s'acumulen formant les plaques senils.

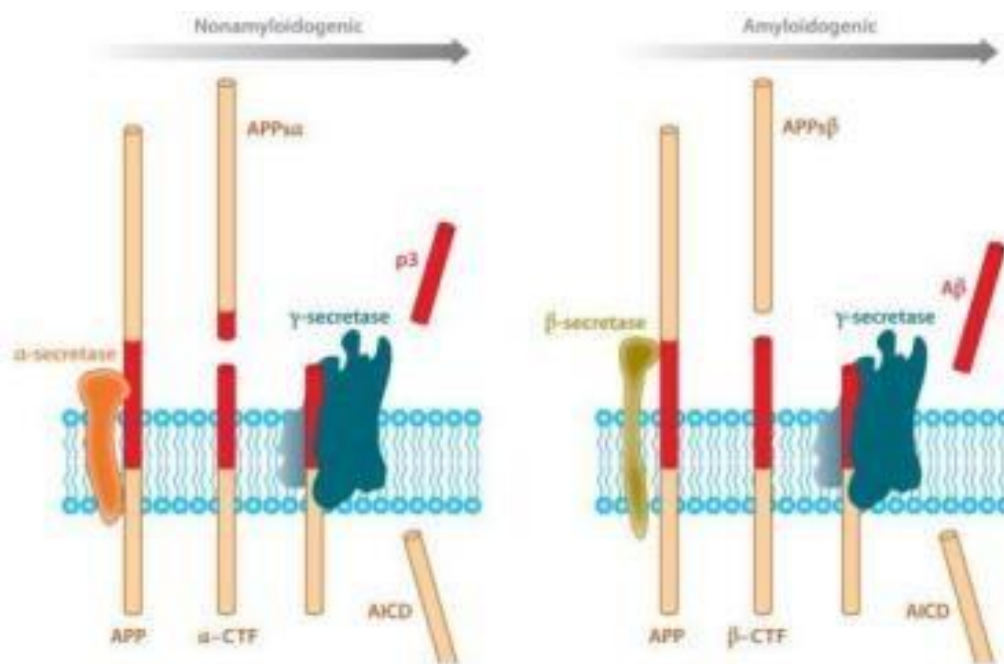


Figura 13: Representació gràfica de les dues vies proteolítiques de la APP. A la imatge de l'esquerra s'observa la via no-amiloidogènica i a la de la dreta la via amiloidogènica

Les cèl·lules de la glia (astròcits i micròglies) són cèl·lules del sistema nerviós essencials per al funcionament correcte d'aquest. Aquestes cèl·lules intenten eliminar les acumulacions de Aβ sense èxit, això provoca un efecte inflamatori, que juntament amb la toxicitat de les fibres d'Aβ, provoquen un efecte oxidatiu que desencadena la mort cel·lular per apoptosi. L'apoptosi és una mort cel·lular programada pel propi organisme.

Aquesta hipòtesi apuntava a ser una gran diana terapèutica per estudiar, però tot i aconseguir fàrmacs que eliminen les plaques, no s'ha vist que l'alzheimer aturi el seu progrés neurodegeneratiu.

2.1.1.3 Hipòtesi de la proteïna tau

La hipòtesi de la proteïna tau, com he dit anteriorment, és una de les més rellevants i acceptades pels investigadors globalment. Es creu que la formació i acumulació de cabdells neurofibril·lars de proteïna tau a les dendrites i al nucli neuronal de les neurones serien la causa d'aquesta malaltia.

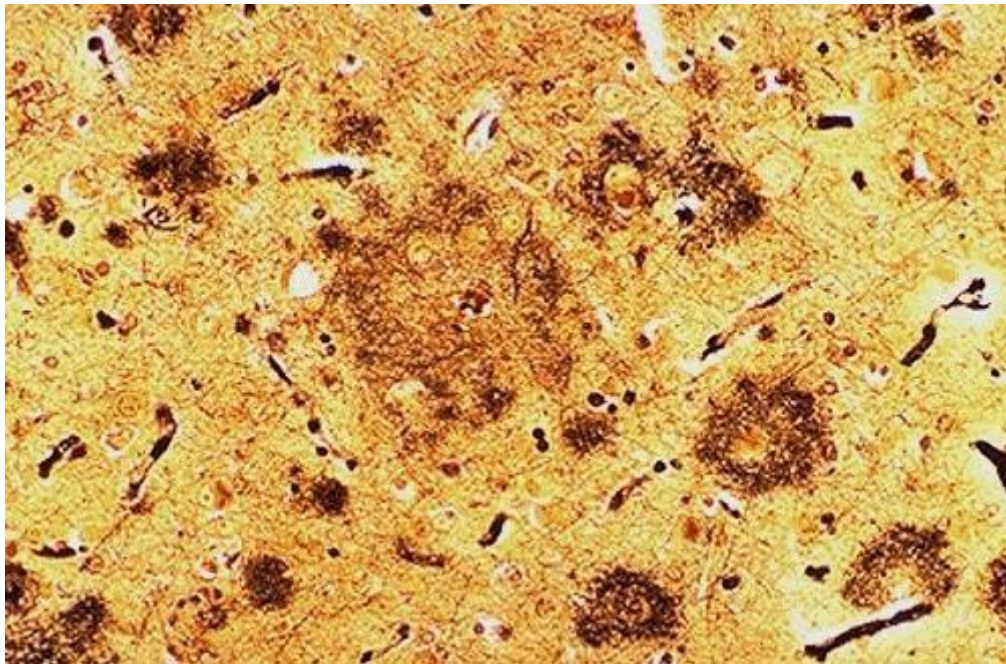


Figura 14: Imatge d'un cervell amb alzheimer realitzada amb microscopi. Les plaques senils apareixen com a taques rodones i els cabdells neurofibril·lars com a línies més fosques.

La proteïna tau està present al sistema nerviós central, concretament i majoritàriament a les neurones. La seva funció principal és estabilitzar els microtúbuls que constitueixen els axons de les neurones. S'uneix a la superfície dels microtúbuls per estabilitzar-los i promoure el seu assemblatge a partir de les subunitats de tubulina, que és la proteïna que forma els microtúbuls.

Els microtúbuls són necessaris per a una correcta funció neuronal i que l'impuls nerviós tingui lloc correctament, per tant, un bon manteniment d'aquests és clau pel funcionament i vida de les neurones.

La proteïna tau és una fosfoproteïna, això vol dir que després de ser sintetitzada, es fosforila, és a dir, se li afegeixen grups fosfats. La fosforilació la duen terme les cinases, que són enzims encarregats de transferir un grup fosfata a una molècula. Les cinases de la proteïna tau reben el nom de glucogen sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β).

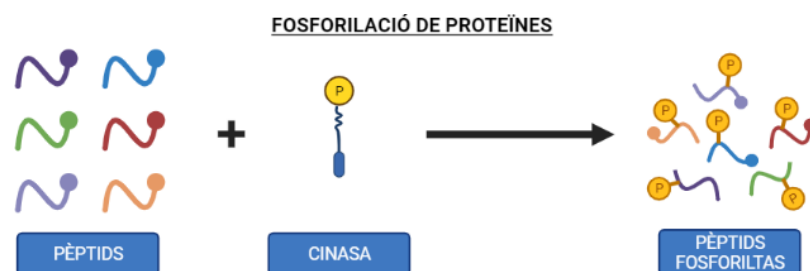


Figura 15: Procés de fosforilació d'una proteïna

Quan hi ha una cascada d'activació de cinases, és a dir, quan unes cinases al fosforilar activen altres cinases, la proteïna tau s'hiperfosforila anormalment. Les tau hiperfosforilades s'agrupen formant acumulacions de filaments helicoidals aparellats, aquests s'agreguen i donen lloc a cabdells neurofibril·lars. Com a conseqüència hi ha una alteració de l'estructura dels microtúbuls, ja que ara aquesta proteïna no pot unir-se a la tubulina. Aquest fet els cabdells provoquen un bloqueig del transport de substàncies en els axons de les neurones, acabant finalment amb la mort d'aquestes.

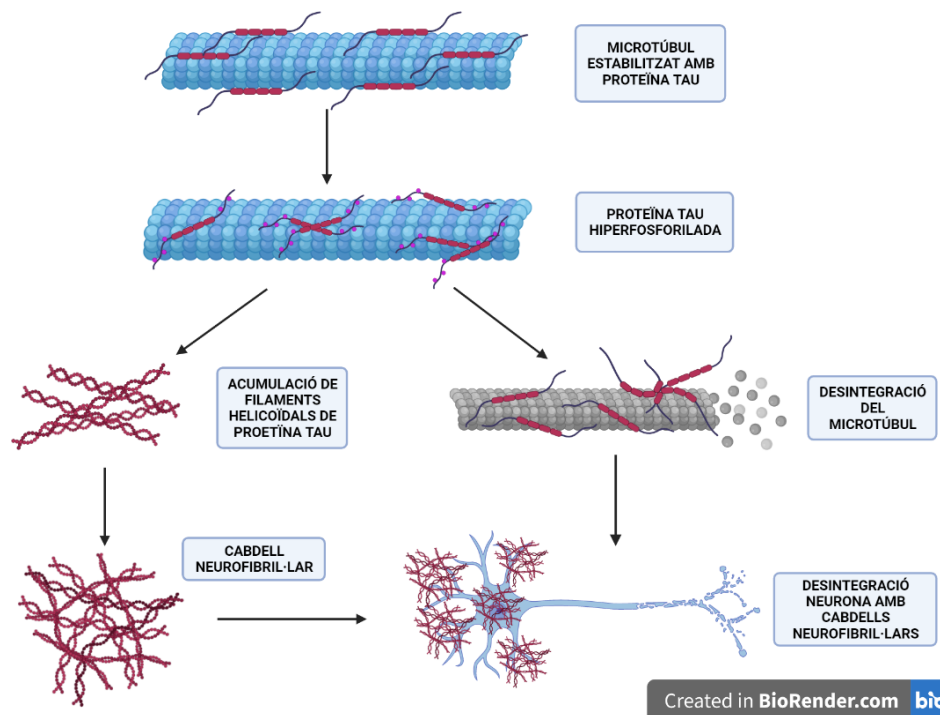


Figura 16: Esquema de la formació de cabdells neurofibril·lars.

A més, alguns d'aquests agregats de proteïnes tau queden lliures al citosol i indueixen la hiperfosforilació de tau en la forma normal, causant així un progrés de la malaltia per la mateixa presència d'aquests agregats tòxics.

La hipòtesi de la proteïna tau ha demostrat ser una de les causes potencials de la malaltia, i per tant, una gran via d'estudi per aconseguir nous tractaments, però pel moment tots segueixen en desenvolupament.

2.1.1.4 Hipòtesi diabetis III

Aquesta última hipòtesi proposa la possibilitat que l'alzheimer fos una mena de diabetis III, establint així una relació entre la Diabetis Mellitus (DM) i la MA. Suggereix que l'alzheimer pot ser causa d'una mala senyalització de la insulina al cervell, per això la hipòtesi rep aquest nom.

La DM és una malaltia que es genera quan el nostre cos presenta uns alts nivells de glucosa en sang, ja que o no pot produir la suficient insulina (DM tipus 1) o no sap utilitzar-la d'una manera eficaç (DM tipus 2).

La insulina és una hormona produïda per les cèl·lules beta del pàncrees. A nivell perifèric, permet l'entrada de la glucosa a les cèl·lules del cos perquè sigui utilitzada com a font d'energia. Però també exerceix funcions a nivell cerebral, on regularà processos d'alliberació de neurotransmissors a la sinapsi i també on hi ha receptors d'insulina a zones implicades en la memòria i l'aprenentatge, com l'hipocamp.

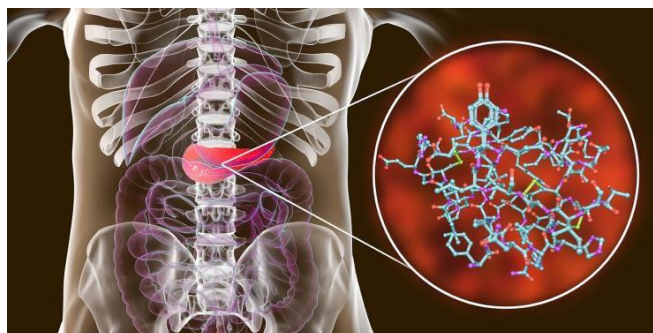


Figura 17: La molècula de la dreta es tracta de la insulina i l'òrgan destacat és el pàncrees, encarregat de produir-la.

S'ha observat que les persones que pateixen alzheimer presenten una resistència a la insulina al cervell i que en algunes zones d'aquest existeix un dèficit d'aquesta. Diversos estudis demostren que l'expressió dels gens que codifiquen per a la insulina i els factors insulínics al cervell està sorprenentment reduïda. Això vol dir que els gens que donen la informació per a la fabricació de insulina i factors insulínics no són interpretats, i llavors trobem un dèficit d'aquestes proteïnes al cervell de les persones que pateixen la MA. Aquest fet suggereix que pot ser un trastorn semblant a la DM i per aquesta raó es proposa el nom de 'Diabetis tipus 3' (De La Monte et al, 2005).

Recordem que la glucosa és la principal font d'energia de les cèl·lules del nostre cos i que les cèl·lules del cervell són les que més en consumeixen. Perquè la glucosa penetri les neurones necessita l'ajuda de la insulina, però com s'acaba d'explicar, les persones que pateixen alzheimer presenten nivells baixos d'insulina al cervell. El fet que les neurones no puguin accedir a la glucosa provocaria la mort de les neurones, un excés de glucosa al cervell, el qual portaria a un deteriorament neuronal i llavors a la pèrdua de funcions cognitives.

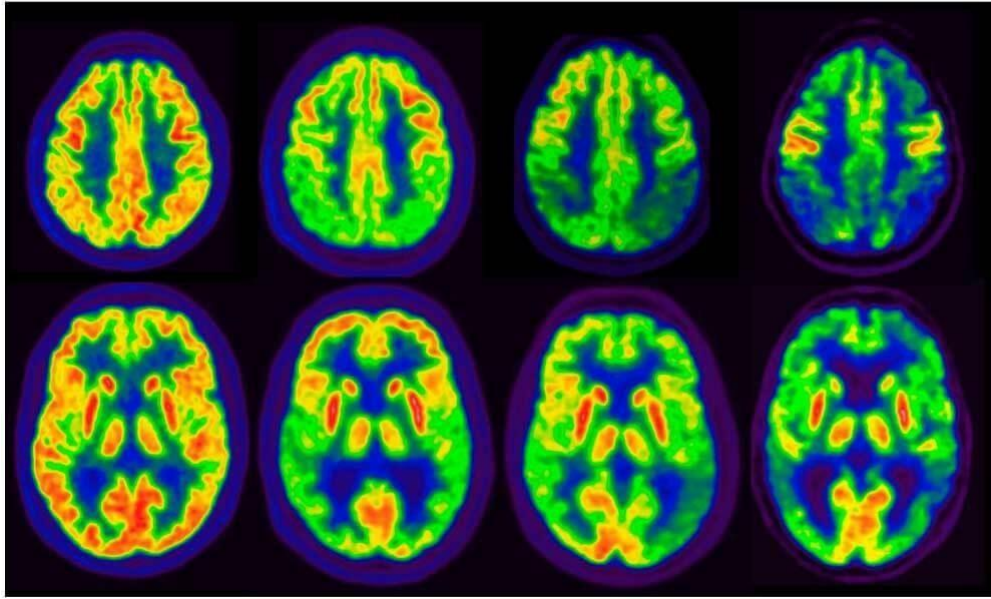


Figura 18: PET que reflexa el metabolisme de la glucosa en una persona amb alzheimer. D'esquerra a dreta: cervell sa/ MA fase lleu / MA fase moderada/ MA fase greu.

L'obesitat és una malaltia caracteritzada per una acumulació anormal o excessiva de greix, és un factor de risc per a malalties cardiovasculars, hipertensió i diabetis. També està associada amb la MA, ja que implica una inflamació crònica que afecta al pàncrees, al fetge i al cervell.

A l'estudi realitzat per Cope et al (2018) van sotmetre a ratolins a una dieta rica en greix durant 12 setmanes, obtenint que augmentessin el seu pes un 40% respecte als ratolins alimentats amb pinso convencional. Van observar que els ratolins amb obesitat presentaven una disminució de la intel·ligència cerebral: dificultats per a sortir dels laberints i recordar on estaven objectes, proves que els altres ratolins superaven amb normalitat.

Després d'analitzar els seus cervells van descobrir que els ratolins obesos presentaven menys espines dendrítiques a l'hipocamp que els que no tenien obesitat. Les espines dendrítiques són petites protuberàncies de l'arbre dendrític de certes neurones, on es produeix la sinapsi.

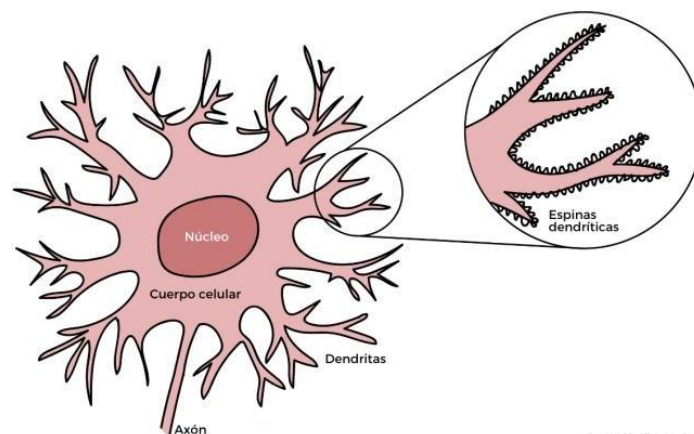


Figura 19: Dibuix representatiu d'on i com són les espines dendrítiques.

Segons proposen els investigadors, aquesta manca d'espines seria causada per les micròglies, que com s'ha mencionat anteriorment, són cèl·lules del sistema nerviós essencials per al funcionament correcte d'aquest. S'observa que n'hi ha una quantitat més elevada d'aquestes cèl·lules als cervells dels obesos. Quan no deixen a les micròglies desempènyer la seva funció, les espines romanen intactes, millorant també la capacitat cognitiva dels ratolins, ja que podran tindre lloc les sinapsis a les neurones de l'hipocamp.

Són molts els estudis que han demostrat aquesta relació entre la MA i l'obesitat, però que causa realment aquest vincle? Es creu que el vincle patològic més probable entre ambdues malalties és un estat de resistència a la insulina intervingut per inflamació. La majoria de investigacions confirmen que els pacients amb DM2 induïda per l'obesitat, tenen una elevada incidència de MA.

Els següents estudis que mencionaré establiran aquestes relacions DM-MA i també demostraran la multifactorialitat de les causes de l'alzheimer:

➤ **DM1-MA:**

L'investigador Corinne et al (2010) van utilitzar uns ratolins que patien un tipus de DM1 artificial per a aquest estudi. També se'ls va introduir el gen que codifica per a la proteïna APP perquè hi hagués fabricació de plaques senils al cervell, simulant així un tipus d'alzheimer artificial. Després d'estudiar els ratolins durant un cert temps van observar que l'activitat de GSK3, enzim participa en la hiperfosforilació de la proteïna tau, augmentava i l'aparició de plaques senils també. Però, en canvi, els receptors de la insulina van reduir la seva activitat. Això vol dir que la presència de DM1 feia augmentar la quantitat de plaques senils i de cabdells neurofibril·lars, demostrant així la relació entre ambdues malalties.

➤ **DM2-MA:**

L'equip de l'International Diabetes Federation (2013) es va centrar a explicar la connexió entre el segon tipus de diabetis, la MA i l'obesitat. Es creu que l'obesitat és causada per una hormona alterada que rep el nom de leptina i la seva funció és inhibir la ingesta d'aliments i promoure la despesa d'energia per mantenir constant el pes corporal. És l'encarregada de generar el senyal de sacietat al cervell. S'ha demostrat que la insulina i la leptina tenen la funció de regular funcions neuronals i sinàptiques de l'hipocamp per protegir les neurones de la neurodegeneració i la mort cel·lular. També que regulen els nivells del pèptid A β a través d'enzims. Això vol dir que qualsevol alteració en aquestes hormones afecta la capacitat cognitiva, establint així la relació entre l'alzheimer, l'obesitat i la diabetis II.

En conclusió, cada vegada són més els investigadors que recolzen aquesta hipòtesi que l'alzheimer és una malaltia metabòlica en la qual l'ús de la insulina es veu afectat de forma progressiva, provocant mort neuronal, disfunció sinàptica, més aparició de cabdells neurofibril·lars i plaques senils i neuroinflamació. Justificant i demostrant que no es tracta només d'una causa, sinó que és el conjunt de tots els factors el que acaba provocant l'aparició i avenç de la neurodegeneració.

Aquesta darrera hipòtesi suposa una gran via d'estudi per a nous tractaments, com explicaré més endavant a la meua part pràctica, on s'ha posat a prova un d'aquests fàrmacs: la Licochalcona A.

2.2 Alzheimer Familiar

La variant familiar només representa un percentatge inferior a l'1% de tots els casos d'alzheimer i cal especificar que només es tractarà d'alzheimer familiar quan la genètica sigui determinant.

Malauradament aquest tipus d'alzheimer apareix molt abans que l'anterior, s'han vist casos de persones que comencen a manifestar símptomes a l'edat dels 40 anys.

Els pacients que pateixen aquesta variant presenten mutacions a tres gens diferents:

- gen de la proteïna precursora amiloide (APP)
- gen de la presenilina 1 (PSEN1)
- gen de la presenilina 2 (PSEN2)

Segons creu Hardy et al, (2018), aquestes mutacions fan que el cos comenci a formar APP alterada que condueix a la formació de dipòsits anormals d'amiloide, que al seu torn formen plaques senils i cabdells neurofibril·lars en les neurones, les que fan que aquestes deixin de funcionar o morin, causant així la demència. Aquest fenomen rep el nom de Cascada Amiloide.

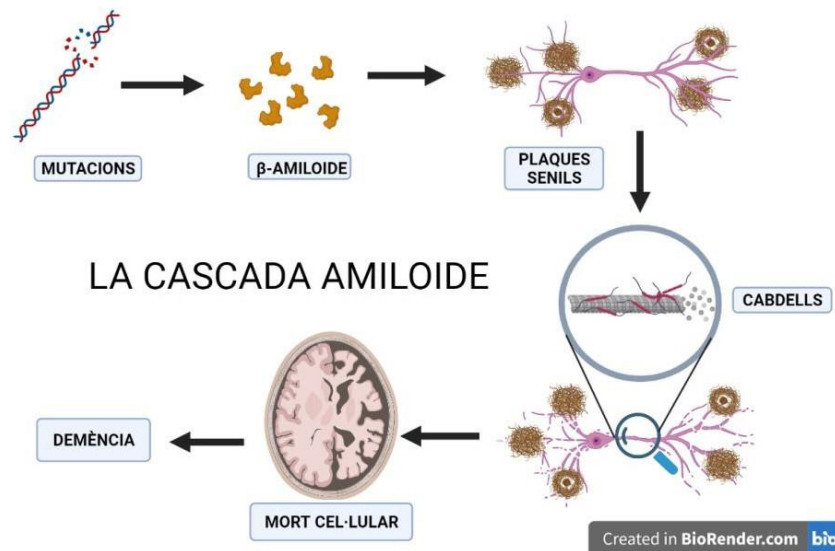


Figura 20: Representació gràfica de la cascada amiloide.

L'alzheimer esporàdic i el familiar només es diferencien en la causa, l'edat d'aparició i el diagnòstic, ja que aquest últim requereix proves genètiques per a ser diagnosticat. Però pel que fa als símptomes i el tractament no presenten cap diferència significativa.

3. TRACTAMENTS

Actualment, encara que l'alzheimer té tractaments que ajuden a abreujar alguns dels símptomes, no hi ha cap fàrmac realment efectiu per frenar l'avenç d'aquesta malaltia. Això la converteix en incurable i terminal.

Tot i això, les hipòtesis explicades anteriorment i totes les que existeixen, estan servint com a vies d'estudi per a continuar buscant una cura i tornar aquesta malaltia reversible.

3.1 Tractaments actuals

Principalment els tractaments utilitzats es poden dividir en dos grups, per una banda tenim els inhibidors d'acetilcolinesterasa: donepezil, rivastigmina i galantamina. D'altra banda tenim la memantina, que és un antagonista del receptor NMDA (N-metil-D-aspartat).

3.1.1 Inhibidors de l'acetilcolinesterasa

Els inhibidors de l'acetilcolinesterasa actuen basant-se en la primera hipòtesi que he desenvolupat, la hipòtesi colinèrgica, i només serveixen per a tractar els símptomes que produeix la malaltia durant el període de la fase lleu a la fase moderada.

Actualment són tres inhibidors els que s'utilitzen com a fàrmacs: la galantamina, la rivastigmina i el donepezil. Tots funcionen de la mateixa manera i presenten molt poques diferències entre ells.

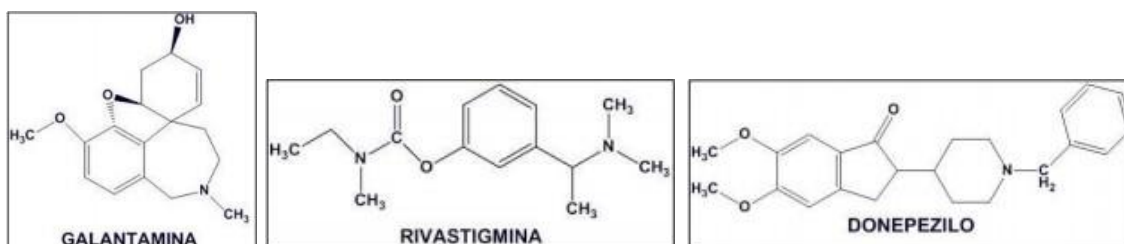


Figura 21: Estructures químiques dels tres inhibidors

Un inhibidor és una substància que evita una reacció química, i en aquest cas tindrà l'objectiu d'inhibir l'acetilcolinesterasa, enzim encarregat d'hidrolitzar al neurotransmissor acetilcolina.

Els cervells de les persones que pateixen alzheimer presenten nivells d'acetilcolina particularment baixos, ja que es veuen afectats per l'aparició i la toxicitat de les plaques senils i els cabdells neurofibril·lars, que perjudiquen les sinapsis entre neurones colinèrgiques.

Llavors l'objectiu d'aquests fàrmacs inhibidors d'acetilcolinesterasa és endarrerir la hidrolització de l'acetilcolina, aconseguir concentracions més altes d'aquest neurotransmissor al cervell i detenir la seva pèrdua causada per la mort de neurones colinèrgiques.

Com a resultat tenim que els fàrmacs han millorat els símptomes cognitius que provoca la MA: problemes de memòria, llenguatge, atenció, apatia, iniciativa, al·lucinacions, etc. Millorant així la qualitat de vida dels pacients i de les persones que conviuen amb ells. Com més aviat es comença a fer ús d'ells, més efectes positius podran tindre sobre el pacient, però no se sabrà si realment seran eficaços fins a iniciar el tractament.

No obstant això, aquests fàrmacs presenten efectes secundaris que solen ser: alteracions gastrointestinals (náusees, diarrea, falta de gana), trastorns del ritme cardíac, mal de cap, marejos, insomni, etc.

3.1.2 Memantina

La memantina és un fàrmac antagonista del receptor NMDA (N-metil-D- aspartat) que s'utilitza per a tractar els símptomes que produeix la malaltia d'alzheimer durant el període de fase moderada a fase greu. Molts cops és feta servir en combinació amb algun dels inhibidors d'acetilcolinesterasa.

Aquest, com els anteriors fàrmacs, s'encarrega de regular un neurotransmissor, però en aquest cas es tracta d'un aminoàcid: el glutamat. El glutamat és el principal neurotransmissor excitatori del cervell, és reconegut per unes proteïnes anomenades receptors de glutamat. Quan un cervell es veu afectat per la MA hi ha una major producció de glutamat que s'acumula en aquests receptors, concretament a uns anomenats receptors NMDA (NMDAr).

Els receptors NMDA són canals dependents de voltatge i lligand. Això vol dir que, per una banda, s'obren en resposta a canvis en el potencial elèctric i, per l'altra banda, també a partir de la unió amb determinades molècules, que són el glutamat i la glicina. Mentre que el glutamat "activa" el receptor, la glicina s'encarrega de modular la seva activitat.

Durant el potencial de repòs, ions de magnesi es disposen als porus del canal dels receptors, impedit el pas de molècules. Una vegada el glutamat s'adhereix al receptor, els ions de magnesi desallotgen el canal i ions de calci passen a través d'ell cap al medi intracel·lular.

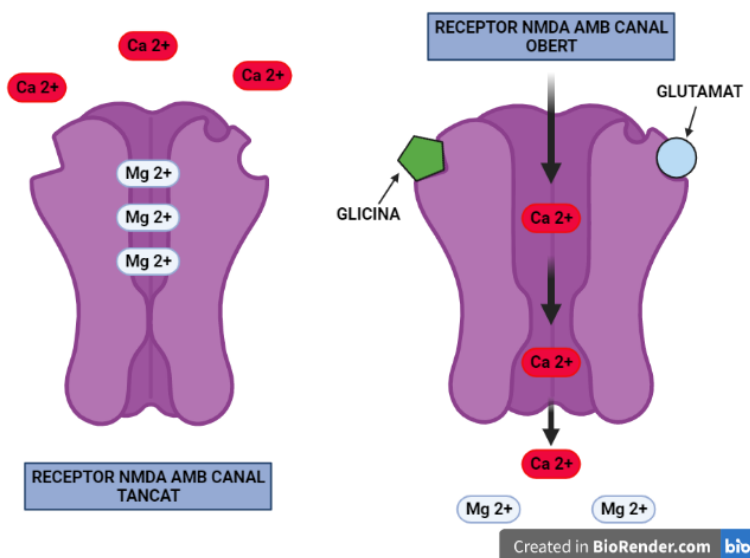


Figura 22: Representació del funcionament d'un receptor de NMDA

La hiperfunció dels NMDAr provoca un flux iònic mal regulat, el qual dona lloc a una concentració de Ca^{2+} excessiva (excitotoxicitat). Aquest excés d'ions de calci té com a resultat una cascada de senyals proapoptòtiques que provoca mort cel·lular prematura.

La funció de la memantina és bloquejar els receptors de NMDA per regular l'increment de glutamat i així reduir l'excitotoxicitat, ja que és negativa per la funció neuronal.

Els efectes del fàrmac sempre varien segons la persona, però en molts casos s'obté un millor rendiment de memòria, atenció, raonament i llenguatge. Malauradament no sempre té bons resultats, hi ha pacients que no noten cap classe de canvi després d'utilitzar-lo durant un temps com a tractament.

Per altra banda, com qualsevol mena de medicació, presenta alguns possibles efectes secundaris: al·lucinacions, confusió, mareig, mal de cap, restrenyiment, etc. Normalment són lleus i no romanen molt de temps.

3.2 Tractaments en estudi: la Licochalcona A

Com ja he mencionat durant tot el treball, l'alzheimer actualment no té cap mena de cura ni medicació gaire efectiva. Malgrat això, n'hi han milers d'estudis que continuen insistint en la recerca per a un tractament definitiu. En aquest apartat explicaré un d'aquests possibles futurs fàrmacs: la Licochalcona A.

Les calcones són compostos naturals fenòlics molt estesos a fruites, verdures, tes i aliments fets a base de soja. Aquestes i els seus derivats mostren un ampli rang d'activitat biològica antiinflamatòria. La Licochalcona A és una molècula derivada de les calcones i s'extreu concretament de la regalèssia.



Figura 23: Regalèssia, planta de la qual s'extreu la Licochalcona A.

La Licochalcona A actualment està sent estudiada per un grup d'investigadors de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona com a fàrmac per a tractar l'alzheimer. Podria ser una molècula prometedora pel tractament de les complicacions derivades per l'obesitat associades amb el deteriorament cognitiu. (M. Ettcheto et al 2019) La seva via d'actuació és antidiabètica i antiinflamatòria. Això vol dir que hauria de reduir els alts nivells de glucosa provocats pel dèficit d'insulina que hi ha al cervell de les persones amb la MA. També hauria de millorar la inflamació del cervell provocada per l'intent d'eliminar les plaques senils.

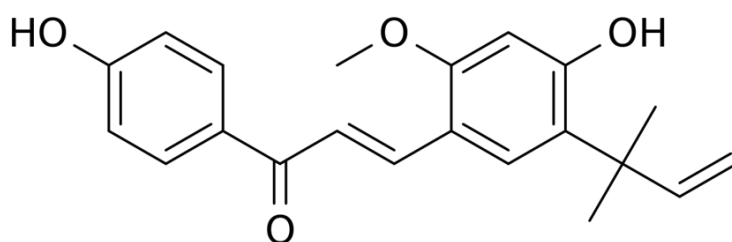


Figura 24: Molècula de la Licochalcona A

En els estudis realitzats fins al moment han demostrat que té potencial per al tractament de la diabetis de tipus II i que millora el procés cognitiu del cervell. També cal destacar que també ha tingut efectes positius per a tractar l'epilepsia, ja que ha reduït la mort cel·lular i la neuroinflamació.

De moment, la Licochalcona A segueix en una fase molt primerenca d'estudi, però s'esperen bons resultats i que en un futur arribi a ser un tractament efectiu per a l'alzheimer.

III. MARC PRÀCTIC

1. INTRODUCCIÓ

Durant el mes de juliol de 2021 he tingut l'oportunitat de treballar amb un grup de farmacologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona en la recerca d'un fàrmac per a la malaltia de l'alzheimer: la Licochalcona A. La meua part pràctica consisteix a explicar aquesta investigació en profunditat i analitzar si la Licochalcona A realment pot ser un possible tractament per a l'alzheimer.

Per realitzar l'estudi del fàrmac s'han dut a terme quatre experiments que estudien com afecta el fàrmac des del punt de vista de tres factors diferents: a nivell metabòlic, cognitiu i anatòmic i fisiològic. A causa del gran volum de dades que n'hi ha, encara estan analitzant molts dels resultats i llavors no he pogut interpretar els productes d'alguns experiments. Tot i això, faré una anàlisi detallada de totes les proves i em centraré en els resultats que sí que tinc per a determinar l'efectivitat de la Licochalcona A.

2. DISSENY EXPERIMENTAL

En aquesta investigació s'han utilitzat ratolins com a subjectes d'estudi, concretament el model C57/B26. Hi ha 8 grups de ratolins amb totes les combinacions possibles de tres variables i amb cadascuna es pretén estudiar un aspecte diferent:

- **Genoma:** El genoma, que és tot el material genètic contingut en els cromosomes d'un organisme en particular, és la primera variable. A alguns ratolins se'ls ha modificat genèticament i se'ls hi ha introduït el gen de la proteïna APP, aquests ratolins reben el nom d'**APP**. Altres no han sofert cap canvi en el seu genoma, llavors reben el nom de *wild-type* (**WT**, tipus salvatge). La introducció del gen APP té l'objectiu de generar plaques senils al cervell dels ratolins i així provocar un tipus d'alzheimer familiar artificial. En canvi, els ratolins WT s'utilitzen com a grup control.
- **Dieta:** Trobarem dos tipus de dieta. La primera és una dieta de pinso de ratolins convencional, aquesta dieta rep el nom de dieta control (**CT**). La segona dieta es tracta d'un pinso fet al 60% d'oli de coco, és a dir, és una dieta rica en lípids. Aquesta última s'anomena dieta *high-fat* (**HF**, alta en greix). La dieta rica en lípids té l'objectiu d'estudiar la relació entre l'obesitat, la diabetis i l'alzheimer. Com he explicat anteriorment, l'obesitat és un factor de risc per a la diabetis i recents estudis han demostrat que per l'alzheimer també ho és. Aquesta variable ens servirà per saber si la MA és realment una síndrome metabòlica. La dieta de pinso convencional serveix com a control.

- **Fàrmac:** Alguns ratolins seran tractats amb el fàrmac en estudi, la Licochalcona A (**LCA**). Altres no seran tractats amb cap fàrmac, però sí que reben una solució salina (**SAL**) per tal de que faci el conegut 'efecte placebo'. L'aplicació del fàrmac serveix per estudiar si realment la Licochalcona A té un efecte positiu sobre l'alzheimer, i llavors, si podria servir com a futur tractament. La solució salina s'utilitza com a grup control.

Una vegada es combinen aquestes tres variables, s'obtenen els 8 grups d'estudi:

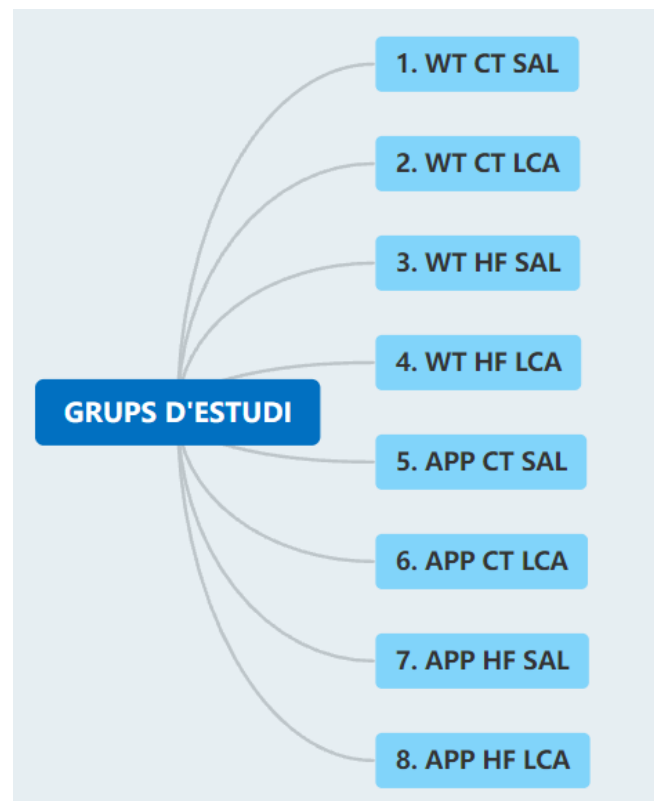


Figura 25: Disseny experimental de tots els tractaments

En conclusió, aquest experiment tindrà les següents característiques:

- **Variables independents:** presència del gen APP, dieta, fàrmac.
- **Variables dependents:** capacitat cognitiva dels ratolins.
- **Variables controlades:** sexe del ratolí (femelles), mateixes condicions d'hàbitat (temperatura, il·luminació, espai, etc.).
- **Grup control:** el grup 1 (WT CT SAL). Ratolins sense el gen APP, amb una dieta convencional i sense ser tractats.

3. PREPARACIÓ DELS MODELS BIOLÒGICS I GENOTIPAT

En aquest apartat explicaré tot el procés pel qual passen els ratolins mentre són utilitzats com a subjectes d'estudi.

1. **Induir MA artificial:** Als ratolins APP se'ls indueix una doble mutació genètica durant el seu estadi d'embrió. Està associada a casos familiars d'alzheimer, produeix un augment de la producció de pèptid A β que genera un deteriorament cognitiu progressiu. La mutació és causada per l'expressió d'una mutació (K94M/N595L) en el gen quimèric APP del ratolí i l'espècie humana, juntament amb una deleció de la variant humana de l'exó 9 del gen PS1 (PS1-dE9) (Marina Carrasco, 2021).
2. **Naixement**
3. **Genotipat:** se'ls realitza una prova per tal de saber si són ratolins APP o WT, és a dir, si se'ls ha induït la MA artificial o no.
4. **Dieta:** es deslleten de la mare i comencen amb una dieta HF o CT als 21 dies. Comencen a viure en grups d'entre 3 i 6 ratolins en gàbies més o menys grans depenent del nombre de ratolins.
5. **Inici tractament:** als 5 mesos comencen a rebre injeccions intraperitoneals de Licochalcona A o solució salina. Se'ls administra tres cops per setmana durant 4 setmanes. En el cas del fàrmac, han de rebre dues injeccions de 7.5 mg/kg cada cop degut a que el fàrmac és poc soluble. La concentració del fàrmac és d'1 mg/ml dissolt en aigua i dimetilsulfòxid al 2%.
6. **Tests de comportament:** als 6 mesos, després de finalitzar el tractament, se'ls realitzen dues proves que posen a prova les seves capacitats cognitives.
7. **Test de resistència a la glucosa:** als 6 mesos, realitzen una prova per a determinar si la MA és una síndrome metabòlica.
8. **Sacrifici:** es realitza el sacrifici en finalitzar les proves, als 6 mesos.
9. **Observació d'espines dendrítiques:** prova amb l'objectiu de veure la quantitat d'espines dendrítiques de les neurones dels ratolins, per tal de saber la qualitat de la sinapsi.

3.1 EXPERIMENT 0: GENOTIPAT

Aquesta prova prèvia als experiments es realitza per saber quins dels ratolins tenen el gen que codifica per a la proteïna APP, que té l'objectiu de simular un tipus d'alzheimer artificial. Els que obtinguin un resultat positiu es faran servir com a ratolins APP i els que obtinguin un resultat negatiu com a ratolins CT.

En aquest cas s'han estudiat 46 ratolins en dues tandes, la primera de 28 i la segona de 18. En les dues apareixen dues mostres més addicionals que corresponen als grups control, un positiu i l'altre negatiu.

3.1.1 Objectius

Determinar la presència del gen que codifica per la APP o l'absència d'aquest als ratolins.

3.1.2 Hipòtesi

Els ratolins que han sigut modificats genèticament, és a dir, els transgènics, haurien de tindre un resultat positiu en la presència d'aquest gen, ja que teòricament se'ls ha induït. En canvi, els ratolins no modificats haurien de tindre un resultat negatiu a la prova.

3.1.3 Material

Obtenció d'ADN

- Tisores
- Pinces
- Micropipeta
- Vials de centrifuga
- Reixeta
- Proteïnasa K
- PCR-tail
- Agitador
- Termobloc
- Nanodrop

Electroforesi

- Solució TAE TBE 5x
- Aigua MQ
- Cubeta
- Pintes
- Càmera d'electroforesi
- Cinta adhesiva
- Agarosa
- Microones
- Red Safe
- "Chemidoc"
- Micropipeta
- Proveta graduada
- Balança analítica



Figura 26: Material obtenció d'ADN: micropipeta, nanodrop, PCR-tail, agitador, reixeta amb vials.



Figura 27: Material d'electroforesi: càmera d'electroforesi, cubeta amb pintes introduïdes i “chemidoc”.

3.1.4 Procediment

Obtenció d'ADN

1. Tallar un extrem molt petit de la cua de tots els ratolins utilitzant unes tisores. Cada vegada que es talla aquest petit fragment es diposita als vials de centrífuga, fent ús de les pinces i amb el número del ratolí corresponent rotulat a la tapa.
2. Per cada mostra cal preparar amb ajut de la micropipeta 2 μ ml de proteïnasa K i 100 μ ml de tampó de PCR-tail en un mateix falcon, que és una mena de tub de plàstic. Després es posarà a l'agitador per mesclar-ho correctament. Aquesta solució servirà per desnaturalitzar les cues i aconseguir així l'ADN dels ratolins.
3. Introduir la solució de proteïnasa K i PCR-tail a la mostra.
4. Realitzar un bany humit a totes les mostres a 56 °C durant 4 hores.
5. Posar les mostres al termobloc a 86 °C durant 30 min.
6. Posar les mostres al nanodrop per mesurar la quantitat d'ADN que n'hi ha.
7. Congelar les mostres a -20 °C per al seu posterior anàlisi.

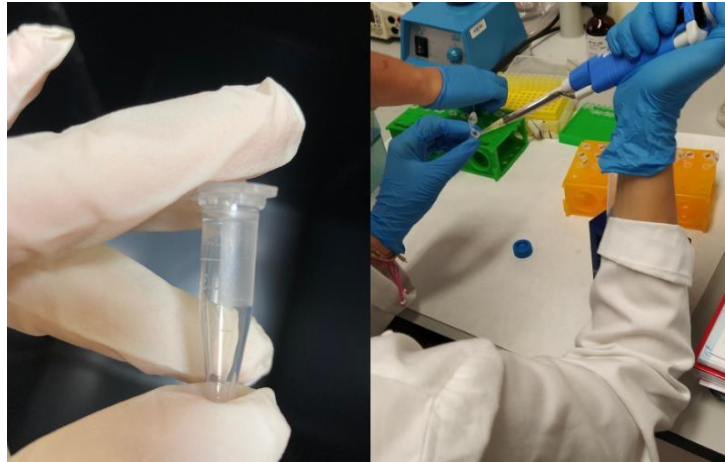


Figura 28: Vial de centrifuga amb l'extrem d'una cua d'un ratolí. A la segona fotografia estan introduint la solució de proteïnasa K i PCR-tail al vial anterior.

Electroforesi

1. Preparar 500 ml de la solució tampó TAE TBE x1 mesurant 100 ml de solució TAE TBE x5 i 400 ml d'aigua MQ amb ajuda d'una proveta graduada de 500ml. Col·locar la solució obtinguda a una ampolla de vidre.
2. Cobrir els laterals de la cubeta amb cinta adhesiva per a que no vesi el gel d'agarosa.
3. Preparar el gel d'agarosa.
 - Pesar 1 g d'agarosa a la balança analítica.
 - Mesurar 50 ml de la solució tampó.
 - Introduir l'agarosa i la solució tampó a un vas de precipitats i calentar-ho al microones fins a obtenir una solució homogènia i transparent.
 - Mesurar amb la micropipeta 5 μ ml de red safe, que és un reactiu que s'uneix al DNA i quan se l'aplica llum UV, s'excita i produeix fluorescència. Això ens ajudarà a determinar la presència d'ADN. Afegir aquest reactiu a la solució.
4. Col·locar la solució a la cubeta i després les pintes, deixar refredar uns 15 min fins que s'hagi format un tipus de gel i llavors retirar les pintes amb molta cura i verticalment per no fer malbé els pous que s'han format.
5. Amb ajuda d'una micropipeta carregar totes les mostres als diferents pous. Dues d'aquestes mostres són els grups control, un positiu en APPi l'altre negatiu, és a dir, és WT.
6. Retirar la cinta adhesiva i introduir la solució tampó a la cubeta d'electroforesi fins a la marca límit que hi ha per indicar la quantitat necessària.
7. Connectar la càmera d'electroforesi a el corrent durant 15 min a 100V i es deixa córrer. Els àcids nucleics de l'ADN al tindre ja una càrrega negativa migraran cap al pol positiu a través del gel d'agarosa, deixant unes bandes visibles de color blanc.

8. Introduir la cubeta al Chemidoc, un aparell que aplica rajos UV i que permetrà veure si hi ha presència del gen APP o no, ja que com he explicat anteriorment, el red safe reaccionarà.

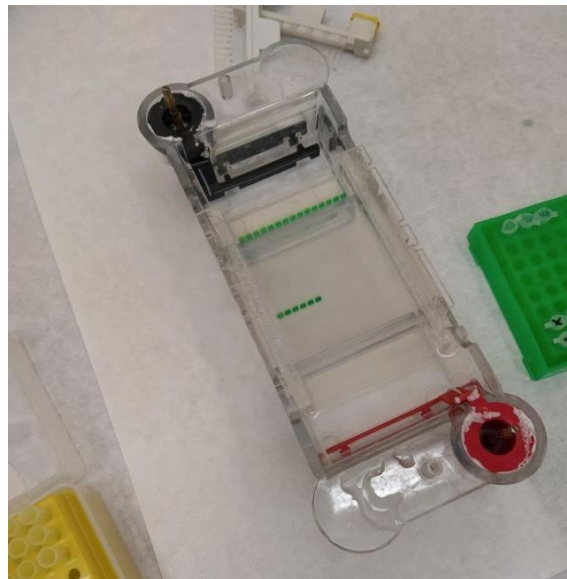
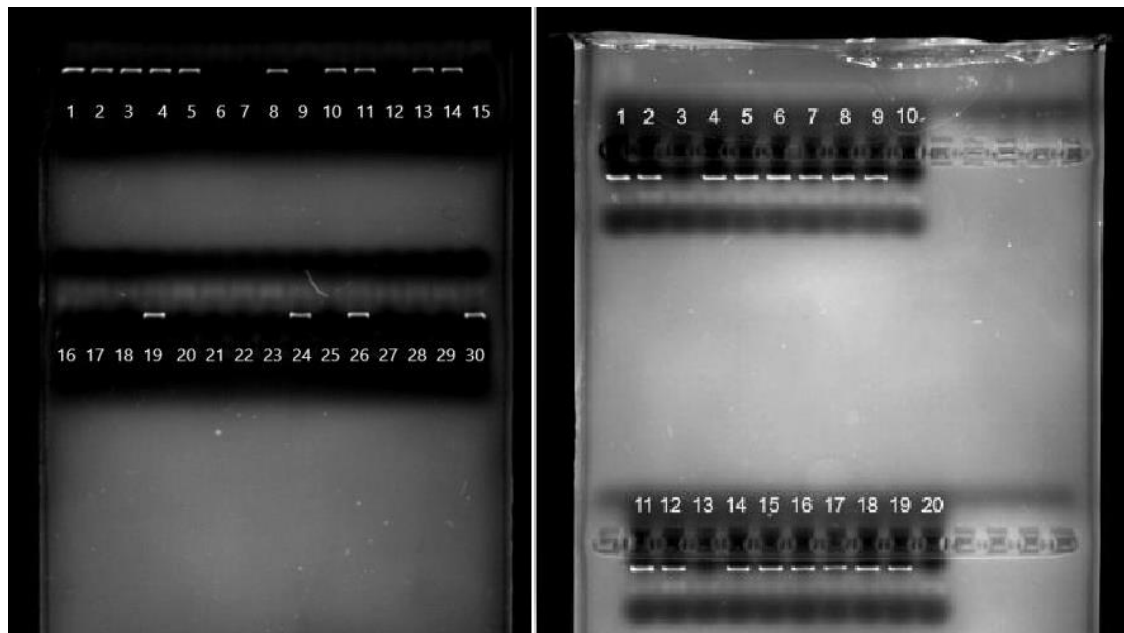


Figura 29: Electroforesi amb les mostres ja carregades i a punt per aplicar el corrent.

3.1.5 Resultats

Les següents fotografies corresponen a les dues proves realitzades. Cada pou correspon a un ratolí, menys els dos últims, que són els grups control.



Figures 30 i 31: Resultats de les electroforesis 1 i 2.

La Figura 30 correspon a la primera electroforesi, on s'ha analitzat la presència del gen APP en 28 ratolins. Els pous que presenten una banda blanca (ex: pou 1) són els que corresponen als resultats positius en APP. En canvi, els pous que no presenten cap banda blanca (ex: pou 6) corresponen a resultats negatius. Els pous 29 i 30 són dels grups control, el primer negatiu i el segon positiu.

A la Figura 31 s'observen els resultats dels 18 ratolins analitzats de la segona electroforesi. El funcionament és el mateix aquí, on s'observa una banda blanca hi ha un resultat positiu (ex: pou 1) i on no n'hi hagi, un resultat negatiu (ex: pou 3). El pou 19 correspon al grup control positiu i el 20 al grup control negatiu.

Taula 1: Resultats de l'electroforesi 1.

No	RESULTAT	No	RESULTAT	No	RESULTAT
1	+	11	-	21	-
2	+	12	+	22	-
3	+	13	+	23	-
4	+	14	+	24	+
5	+	15	-	25	-
6	-	16	-	26	+
7	-	17	-	27	-
8	+	18	-	28	-
9	-	19	+	29	-
10	+	20	-	30	+

Taula 2: Resultats de l'electroforesi 2.

No	RESULTAT	No	RESULTAT
1	+	11	-
2	+	12	-
3	+	13	-
4	+	14	+
5	+	15	-
6	-	16	-
7	-	17	-
8	+	18	-
9	-	19	+
10	+	20	-

A la Taula 1, corresponent a la primera electroforesi, s'observa que s'han obtingut 13 resultats positius, és a dir, 13 ratolins amb el gen APP correctament induït. Per altra banda, 15 ratolins han obtingut un resultat negatiu, és a dir, no han patit cap tipus de modificació. Els resultats número 29 i 30 corresponen als grups control.

A la Taula 2 observem 8 resultats positius i 10 negatius. Els resultats número 19 i 20 corresponen als grups control.

S'ha obtingut un 100% d'èxit en la introducció del gen APP. Tots els ratolins que estaven suposats d'haver incorporat aquest gen, ho han fet.

3.1.6 Discussió

La meua hipòtesi s'ha confirmat, ja que els ratolins que se'ls havia induït el gen que codifica per la proteïna APP han obtingut un resultat positiu. Per altra banda, els ratolins als quals no se'ls havia realitzat cap modificació genètica han tingut un resultat negatiu.

En aquesta prova prèvia no se sol tenir cap classe d'inconvenient o dificultat, ja que els resultats són bastant previsibles. Sempre que el gen d'APP s'hagi incorporat correctament s'obtenen resultats positius, si no hi ha hagut modificació s'obté un resultat negatiu. Alguns cops les bandes blanques no s'observen gaire bé i en aquest cas es repeteix la prova d'aquella mostra.

3.1.7 Conclusió

En total s'han obtingut 21 resultats positius i 25 negatius. Aquests primers ratolins amb resultats positius, és a dir, amb l'incorporació del gen APP, s'utilitzaran com a ratolins APP. Els que tenen un resultat negatiu s'utilitzaran com a ratolins CT, és a dir, com a grup control.

4. EXPERIMENT 1: TEST DE RESISTÈNCIA A LA GLUCOSA

El test de resistència a la glucosa és un experiment que consisteix a observar com de ràpid el metabolisme degrada la glucosa. S'administra una quantitat determinada d'insulina i de glucosa als ratolins i s'observa cada cert temps la quantitat de glucosa en sang per a saber si està sent processada o no. Aquest primer experiment és l'encarregat d'estudiar als ratolins des d'un punt de vista metabòlic.

4.1 Objectius

L'objectiu d'aquesta prova és avaluar les alteracions del metabolisme de la glucosa en els ratolins i observar com afecten els factors farmacològics, dietètics i genètics en el metabolisme de la glucosa.

4.2 Hipòtesi

Grup 1 WT CT SAL: als ratolins del grup control penso que la glucosa serà processada sense cap tipus de problema i després el valor es mantindrà en els nivells de glucosa adequats.

Grup 2 WT CT LCA: penso que el fàrmac tindrà un efecte antidiabètic i ajudarà a que la insulina treballi més eficientment i llavors els valors de glucosa es normalitzaran més ràpidament.

Grup 3 WT HF SAL: aquest grup té una dieta rica en greixos, i això els ha provocat obesitat. Com he explicat, l'obesitat és un factor de risc per a la diabetis. Penso que tots els ratolins amb dieta HF tindran diabetis i per tant, haurien de presentar uns nivells bastant més alts de glucosa en sang.

Grup 4 WT HF LCA: aquest grup, com l'anterior, és alimentat amb una dieta HF, fet que provocaria un alt nivell de glucosa en sang. Però a l'estar tractats amb la Licochalcona A, crec que aquesta ajudaria a degradar la glucosa pel seu efecte antidiabètic i llavors reduir els elevats nivells de glucosa en sang.

Grup 5 APP CT SAL: sabent que hi han molts estudis que relacionen l'alzheimer amb una mala senyalització de la insulina, penso que els nivells de glucosa en sang en aquests ratolins seran elevats, però no tant com als de la dieta HF.

Grup 6 APP CT LCA: aquests crec que presentaran uns nivells alts en glucosa en sang, per la raó donada a l'últim grup d'estudi (relació MA-diabetis) però que gràcies a ser tractats amb la Licochalcona normalitzaran aquests elevats valors.

Grup 7 APP HF SAL: els ratolins del penúltim grup penso que seran els que presentin un nivell de glucosa més elevat. En primer lloc causat per la dieta rica en greixos i segon lloc per la presència de la malaltia d'alzheimer artificial. Crec que aquesta combinació provocarà una degradació de la glucosa molt disminuïda.

Grup 8 APP HF LCA: l'últim grup hauria de presentar menys glucosa en sang que l'anterior, ja que el fàrmac faria un efecte antidiabètic que acceleraria la degradació de la glucosa.

4.3 Material

- Balança analítica
- Tisores
- Glucosa
- Insulina
- Glucòmetre
- Xeringues
- Tubs capil·lars
- Agulles d'alimentació
- Aigua potable i menjar



Figura 32: Tubs capil·lars, agulles d'alimentació i glucòmetre.

4.4 Procediment

1. El dia abans a la prova de la tolerància a la glucosa per via oral, es posen els ratolins a la gàbia amb aigua potable però sense menjar, han d'estar en dejuni tota la nit abans de fer la prova.
2. Preparar 10 ml de dissolució de glucosa al 20%.
3. Mesurar el pes corporal de tots els ratolins i marcar-los amb un marcador per poder-los distingir. Després pesar als ratolins i marcar la cua, calcular el volum d'insulina necessari per administrar 0,75 unitats d'insulina per quilogram de pes corporal. Injectar la insulina per via intraperitoneal en el quadrant inferior dret de l'abdomen dels animals, se'ls injecta insulina per evitar un xoc hipoglucèmic.
4. Pel mostreig de referència de sang de cada ratolí, tallar 1 o 2 mm de la punta de la cua. Extreure una petita quantitat de sang per mesurar el nivell de glucèmia basal previ a l'administració de glucosa.
5. Administrar la solució de glucosa al ratolí agafant-lo fermament perquè inclini bé el cap cap enrere i assegurar-se que el ratolí pugui respirar correctament.
6. Dirigir amb precaució l'agulla d'alimentació a través de la boca cap a l'esòfag, després que l'agulla s'enfonsi en la part inferior de l'esòfag del ratolí, injectar la solució de glucosa.
7. Posar en marxa el cronòmetre immediatament després del primer mesurament de glucosa, i administrar la glucosa a tots els altres ratolins en intervals d'un minut.
8. Un cop iniciada l'administració de glucosa, és molt important una bona gestió del temps. Després de 15 minuts, mesurar els nivells de glucosa en sang amb el glucòmetre i repetir-ho als 30, 45, 60 i 90 minuts.
9. Un cop acabats els mesuraments, retornar els ratolins a les seves gàbies d'origen equipades amb menjar i aigua.

4.5 Resultats

D'aquesta prova s'han analitzat els resultats de 45 ratolins diferents. Dels quals:

- 18 ratolins són del grup control WT CT SAL
- 12 ratolins són del grup WT CT LCA
- 3 ratolins són del grup WT HF SAL
- 4 ratolins són del grup WT HF LCA
- 1 ratolí és del grup APP CT SAL
- 5 ratolins són del grup APP HF SAL
- 2 ratolins són del grup APP HF LCA

De cadascun d'aquests subjectes s'han realitzat les següents mesures:

- Pes corporal del ratolí (grams)
- Volum d'insulina injectat (unitats d'insulina/kg)
- Volum de glucosa administrat (mg/dl)
- Volum de glucosa en sang als 0, 15, 30, 45, 60 i 90 minuts (mg/dl)

He realitzat les mitjanes de tots els ratolins de cada mesura i he obtingut els següents resultats:

Taula 3: Mitjanes de cada grup de pes, volums d'insulina i glucosa administrat i resultats obtinguts als 0, 15, 30, 45, 60 i 90 minuts.

CONDICIÓ	PES	VOLUM INS	VOLUM GLU	0	15	30	45	60	90
WT CT SAL	30,7	215,4	271,3	141,6	136,9	106,3	67,3	87,5	80,7
WT CT LCA	36,0	208,5	270,0	153,4	84,2	78,7	70,5	65,9	67,2
WT HF SAL	53,1	318,6	470,2	163,0	169,3	108,0	111,7	114,0	146,7
WT HF LCA	47,0	282,0	402,0	179,0	131,5	115,8	104,8	110,0	123,0
APP CT SAL	36,7	220,2	275,2	189	79	82	62	62,0	72,0
APP HF SAL	58,5	345,0	430,5	166,8	153,8	118,0	132,8	141,4	166,6
APP HF LCA	58,9	353,4	441,8	186,5	127,5	134,5	122,5	113,0	146,5

Amb aquests resultats he pogut realitzar representacions gràfiques perquè es puguin observar millor les diferències entre els diferents grups.

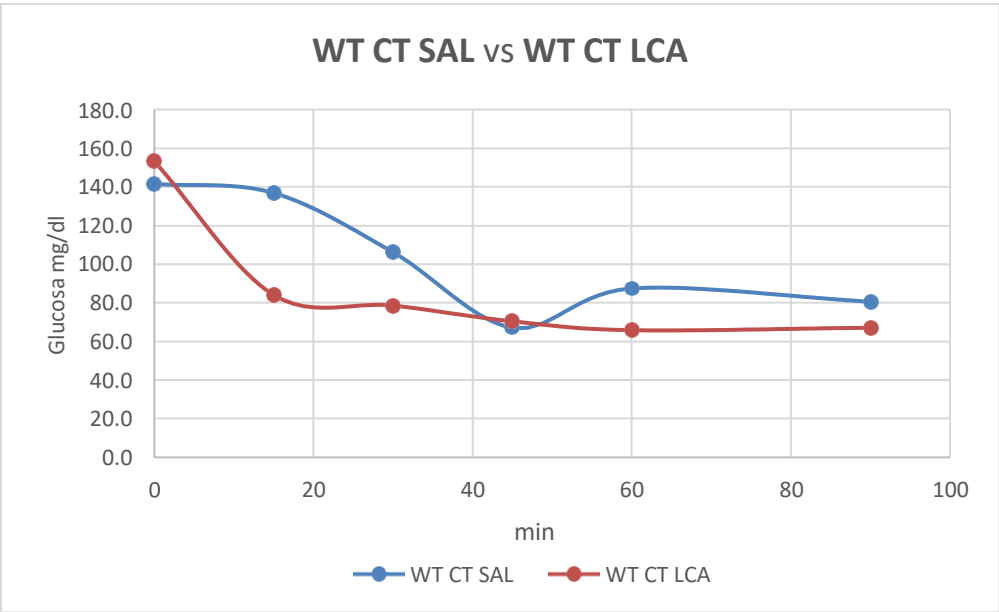


Figura 33: Corbes de glucosa dels grups WT CT SAL i WT CT LCA.

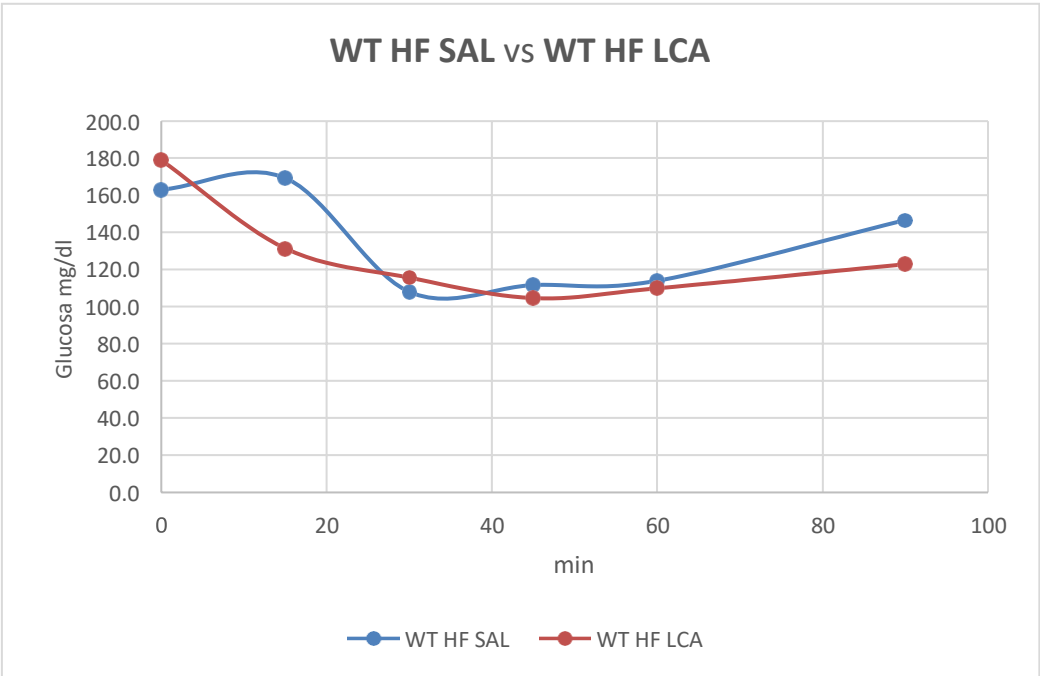


Figura 34: Corbes de glucosa dels grups WT HF SAL i WT HF LCA.

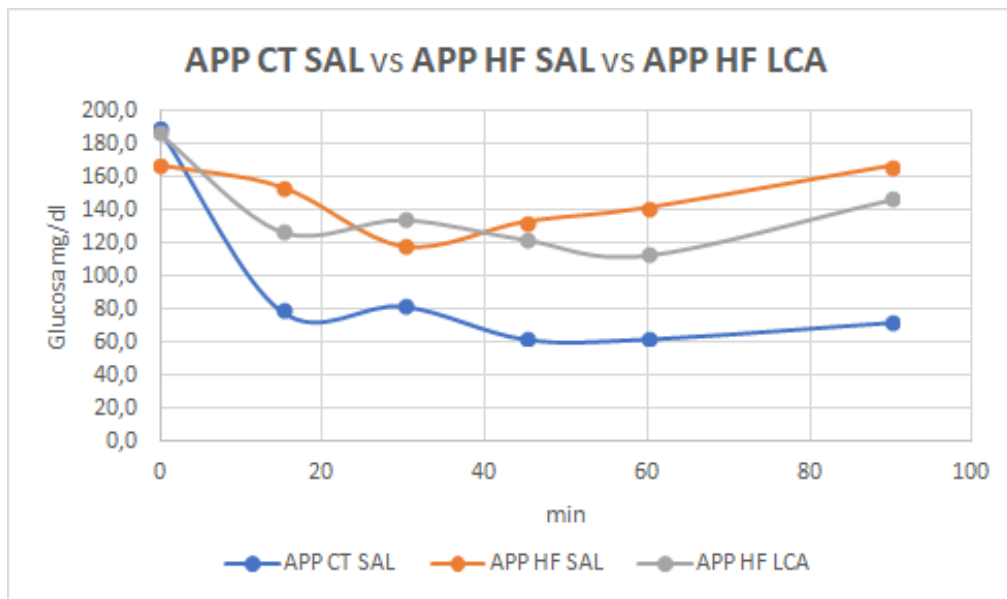


Figura 35: Corbes de glucosa dels grups APP CT SAL, APP HF SAL i APP HF LCA.

4.6 Discussió

A la taula número 3, si comparem els pesos, es pot apreciar clarament que els ratolins que han sigut alimentats amb la dieta HF, realment tenen un sobrepès respecte els altres. Per exemple, el primer grup (WT CT SAL), que ha tingut una dieta control, té una mitjana de pes de 30,7 g. Si ho comparem amb el tercer grup (WT HF SAL), que sí ha tingut una dieta HF, té una mitjana de pes de 53.1 g.

Tal com es veu, a la Figura 33, està representada la corba del grup control que serveix de referència per veure quins són els valors normals de glucosa en sang, que serien uns 80 mg/dl, i com de ràpid la degraden. Per altra banda, en aquesta mateixa gràfica veiem l'efecte del fàrmac sobre un ratolí igual que l'anterior. Es pot distingir perfectament com la corba de glucosa es normalitza cap als valors normals de glucosa en molt menys temps. Això es deu a l'efecte antidiabètic del fàrmac, aquest ha ajudat a processar la glucosa més ràpid. Per exemple, al minut 20 els WT CT SAL presenten uns 130 mg/dl aproximadament i els WT CT LCA menys de 80mg/dl.

A la Figura 34 es comparen els WT HF SAL i els WT HF LCA. Aquests en general ja d'inici presenten nivells de glucosa en sang més alts que els anteriors causats per la dieta HF. S'observa que el grup salí té uns valors més alts de glucosa que els del fàrmac, i tot i que la corba es normalitza una mica apropant-se als 100 mg/dl durant els 30-60 min, a partir dels 60 ja comencen a pujar els valors un altre cop. Aquest fet demostra que la dieta HF ha causat diabetis als ratolins, ja que el metabolisme del ratolí no pot normalitzar el nivell de glucosa en sang per si mateix. Els que estan sent tractats amb la Licochalcona A encara que normalitzen més i més ràpid la corba, als 90 min presenten 120 mg/dl de glucosa en sang, valor molt superior del normal. Això

vol dir que el fàrmac ha tingut un impacte positiu però no el suficient com per a tractar aquesta “diabetis”.

A la Figura 35 tenim els grups modificats genèticament: APP CT SAL, APP HF SAL, APP HF LCA. Els que no estan sent tractats amb cap dieta rica en greixos es diferencia clarament com presenten uns nivells de glucosa més baixos, inferiors a 80 mg/dl, que normalitzen la corba en uns 10 min i fins i tot als 45 min presenten només 60 mg/dl. Aquest fet no encaixa molt amb el que s’esperava, ja que la MA artificial hauria d’haver provocat un mal processament de la glucosa. Abans d’afirmar que l’alzheimer no seria una diabetis III, hem de tindre en compte que d’aquest grup només s’han analitzat els resultats d’un sol ratolí. Probablement aquestes xifres tan inferiors es tractin d’alguna mena d’errada, ja que els valors de glucosa que presenta són bastant més inferiors als normals. Als dos grups restants, amb dieta rica en greixos, s’observa que els nivells de glucosa són extremadament alts, arribant als 150-170 mg/dl. Malgrat al principi baixen una mica els valors, no s’apropen als valors normals de 80 mg/dl en cap moment. Al grup tractat amb el fàrmac, del qual només n’hi han 2 exemplars, presenten uns nivells una mica més baixos respecte als anteriors, però no una xifra significativa. Tot això demostraria que la dieta rica en greixos provoca un estat de diabetis, que la MA sí que presenta una relació amb la insulina i els nivells de glucosa i que el fàrmac no té un gran efecte antidiabètic.

4.7 Conclusió

Abans de treure les conclusions finals, cal mencionar que aquests resultats no demostren realment si l’alzheimer podria ser una malaltia metabòlica o no, ni tampoc l’efecte real de la Licochalcona A, ja que de la majoria de grups només n’hi han resultats d’ 1-5 ratolins i d’un grup no hi han resultats (APP CT LCA). Això deixa molt marge d’error i no representa la realitat totalment.

Després d’haver analitzat els resultats podem treure tres grans conclusions, una cada una de les variables estudiades:

1. S’ha demostrat clarament que la dieta rica en greixos, que causa obesitat als ratolins, provoca una diabetis en la qual els ratolins no saben utilitzar correctament la insulina, és a dir, semblant a la diabetis de tipus II.
2. Tot i no poder afirmar-ho amb seguretat perquè hi han uns resultats que mostren el contrari, sembla ser que l’alzheimer sí que podria ser una diabetis tipus III, ja que s’ha observat que els ratolins que combinaven MA i dieta HF presenten gairebé el doble dels valors normals de glucosa en sang.
3. El fàrmac, tot i semblar que si millora el metabolisme de la glucosa, no ho fa significativament. Aleshores, la Licochalcona A, en cas que la MA fos una síndrome metabòlica, no seria la millor opció per a tractar-ho.

5. EXPERIMENT 2: TESTS DE COMPORTAMENT

Els dos següents experiments corresponen a tests de comportament. En aquestes proves l'objectiu principal és estudiar la capacitat cognitiva de cada ratolí proposant una sèrie d'activitats.

5.1. EXPERIMENT 2.1: MORRIS WATER MAZE

La primera prova de comportament rep el nom de Morris Water Maze (Laberint Aquàtic de Morris), ja que va ser desenvolupat per Richard Morris i serveix per a poder avaluar l'aprenentatge espacial de rates i ratolins.

Consisteix a deixar els ratolins a una piscina i calcular quant tarden arribar a una plataforma, aquest procés es repeteix des de punts diferents de la piscina i durant una setmana. Aquests animals no solen gaudir de l'aigua, per aquesta raó sempre haurien de voler arribar a la plataforma el més ràpid possible.

5.1.1 Objectius

L'objectiu d'aquest test és mesurar l'aprenentatge i la memòria espacial del ratolí per tal de saber si el fàrmac, la dieta i la presència d'APP han tingut algun aspecte tant positiu, com negatiu o neutre a la capacitat cognitiva del ratolí.

5.1.2 Hipòtesi

Grup 1 WT CT SAL: al ser el grup control, no presenten cap mena de degeneració neuronal, per això penso que arribaran a la plataforma sense cap tipus d'inconvenient totes les vegades.

Grup 2 WT CT LCA: aquests ratolins tampoc haurien de presentar cap classe de limitació a les capacitats cognitives i crec que el fàrmac no tindrà un efecte positiu ni negatiu. Per tant, arribarien a la plataforma sense complicacions.

Grup 3 WT HF SAL: al tindre una dieta rica en greixos tindran obesitat. Coneixent els estudis que demostren la relació entre l'obesitat i les demències, penso que aquest grup de ratolins tindrà problemes a l'hora de recordar on estava la plataforma.

Grup 4 WT HF LCA: aquest grup, com l'anterior, presentarà obesitat i llavors segurament també demència, però en canvi estan tractats amb el fàrmac. Per això crec que necessitaran més temps per recordar-se d'on estava la plataforma, però que potser quan ja ho hagin realitzat més cops podran arribar sense molts problemes.

Grup 5 APP CT SAL: aquest cinquè grup té la presència del gen APP, això vol dir que possiblement hauran format plaques senils als seus cervells que estaran provocant un deteriorament cognitiu. Per aquesta raó i pel fet de no estar tractats amb cap fàrmac els ratolins haurien de tindre bastants problemes per recordar on està aquesta plataforma.

Grup 6 APP CT LCA: aquest grup presenta el mateix problema que l'anterior però, en canvi, aquests estan sent tractats amb la Licochalcona A. Per tant, penso que el fàrmac està tenint un efecte positiu en l'eliminació de plaques i que llavors els ratolins a pesar de tindre algun inconvenient, arribaran a la plataforma després d'haver realitzat la prova uns quants cops.

Grup 7 APP HF SAL: crec que aquest grup serà el que més problemes tingui en arribar a la plataforma i que probablement cap dels cops que realitzin la prova recordaran on estava. Les tres raons principals són la probable presència de plaques senils, l'obesitat que causarà segurament una neurodegeneració i finalment el fet que no estiguin sent tractats.

Grup 8 APP HF LCA: aquest últim grup, encara que estigui sent tractat amb el fàrmac, hauria de tindre signes de neurodegeneració, això vol dir que presentarien problemes per recordar la ubicació de la plataforma, però que pot ser amb la repetició de la prova aconseguissin arribar relativament ràpid.

5.1.3 Material

Consisteix en una piscina amb forma esfèrica d'uns 1.2 m a 1.5 m de diàmetre i uns 60 cm d'alçada, plena d'aigua amb làtex i una petita plataforma oculta, ja que no arriba a sobresortir per sobre el nivell de l'aigua. En aquest estudi s'utilitzarà la piscina amb el diàmetre inferior, 1.2 metres, ja que els ratolins són d'un menor tamany.

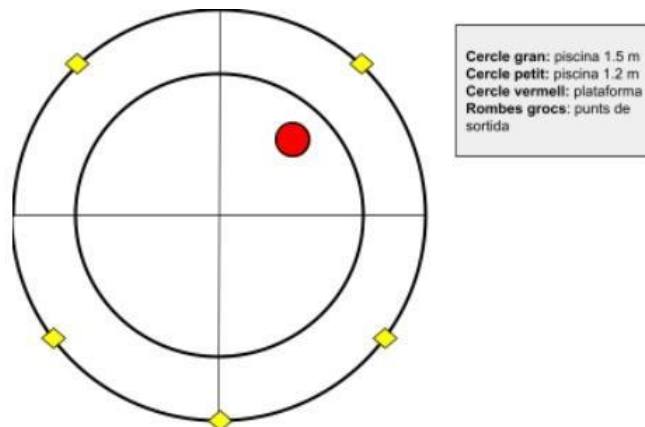


Figura 36: Representació esquemàtica de la piscina



Figura 37: Imatge de la piscina utilitzada durant l'experiment

5.1.4 Procediment

Es col·loca al ratolí a un punt de la piscina durant un minut amb l'objectiu de nedar cap a la plataforma. L'aigua conté làtex perquè els ratolins no utilitzin la transparència de l'aigua per dirigir-se directament cap a aquesta plataforma. Es realitza aquesta prova cinc cops des dels cinc punts diferents de sortida inicials, en finalitzar cada prova es treu a l'animal del laberint i es torna a començar des d'un altre punt.

Aquest procés es repeteix cada dia durant una setmana, però a l'arribar al setè dia, a diferència dels altres, es treu la plataforma per veure si el ratolí neda igualment cap on se suposaria que hi estava.

Gràcies a un sensor que hi ha al sostre per captar el moviment, velocitat i direccionalitat de l'animal i a través d'un programa que ho calcula es podrà saber la qualitat de les capacitats d'aprenentatge i la memòria espacial de cada ratolí.

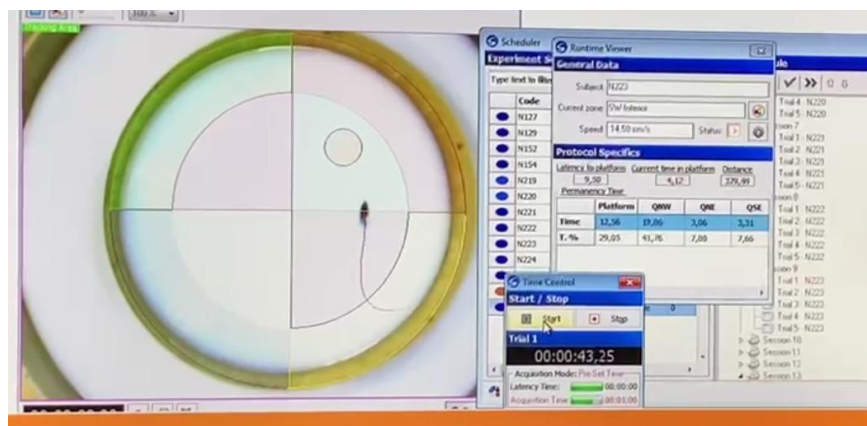
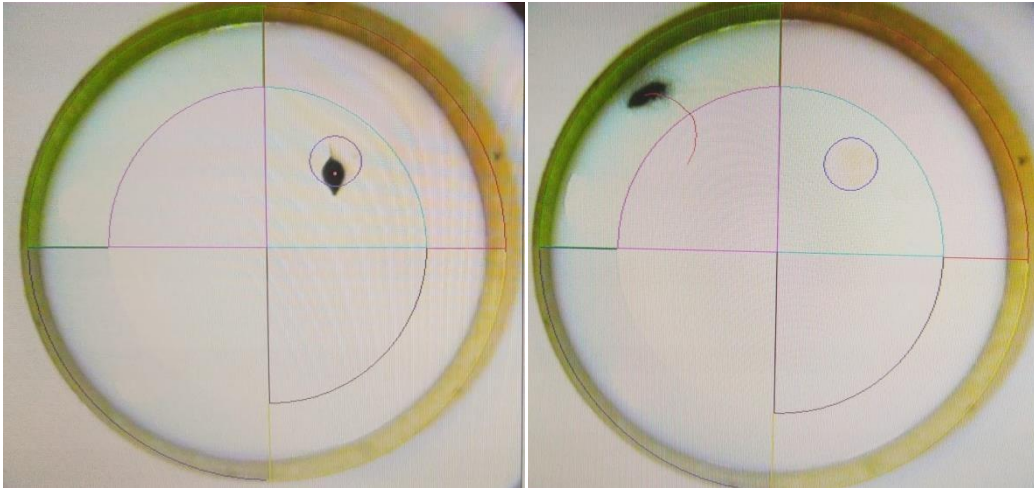


Figura 38: Imatge captada pel sensor i programa de mesura de moviment, velocitat i direccionalitat funcionant.

5.1.5 Resultats

Malgrat no tenir els resultats, he decidit mostrar algunes imatges captades pel sensor dels ratolins durant les proves.



Figures 40 i 41: Imatges captades pel sensor de moviment durant el test.

A la Figura 40 s'observa com el ratolí ha aconseguit arribar a la plataforma. En canvi, a la Figura 41, trobem un que encara està tractant d'arribar-hi.

5.2. EXPERIMENT 2.2: NOVEL OBJECT RECOGNITION TEST

El Novel Object Recognition Test (Test de Reconeixement d'Objectes Novedosos) va ser inventat pels investigadors A. Ennaceur i J. Delacour. Aquesta prova es realitza en dos parts. En la primera, el ratolí s'acostumarà a l'espai i també observarà dos objectes exactament iguals. En la segona part, observarà el mateix objecte que el dies anteriors i un de nou. Si els ratolins reconeixen l'objecte vell, passaran més temps observant el nou.

5.2.1 Objectius

L'objectiu d'aquest test és mesurar la memòria espacial a curt termini del ratolí per tal de saber si el fàrmac, la dieta i la presència d'APP han tingut algun aspecte tan positiu, com negatiu o neutre a la capacitat cognitiva del ratolí.

5.2.2 Hipòtesi

Grup 1 WT CT SAL: aquest primer grup és el grup control, i per tant, tots els ratolins haurien de reconèixer ràpidament el primer objecte i anar directament cap al nou.

Grup 2 WT CT LCA: penso que el fàrmac tindrà un efecte neutre a la capacitat cognitiva del ratolí i que, per això, haurien de mostrar més interès a investigar l'objecte nou.

Grup 3 WT HF SAL: com he explicat abans, aquests ratolins probablement tindran demència causada per l'obesitat. Aleshores penso que tardaran a reconèixer l'objecte vell o que directament no ho faran, i per això no mostrarien més curiositat per un objecte o altre.

Grup 4 WT HF LCA: aquests, com els anteriors, probablement presentin demència, però penso que el fàrmac tindrà un impacte positiu. Llavors acabaran reconeixent l'objecte vell i passant més temps observant el nou.

Grup 5 APP CT SAL: aquest grup de ratolins probablement presenti plaques senils al cervell per la presència del gen APP, i com que no estant sent tractats, seran incapaços de recordar l'objecte vell.

Grup 6 APP CT LCA: els ratolins aquí presentarien plaques al cervell, però penso que el fàrmac hauria aconseguit eliminar-ne moltes i que llavors podran reconèixer l'objecte familiar i la seva atenció serà captada pel nou. Malgrat això, també penso que tardaran una mica a reconèixer-lo.

Grup 7 APP HF SAL: penso que aquests ratolins no mostraran més curiositat per un objecte que per l'altre, ja que no seran capaços de recordar el vell. Les meves raons per a pensar-ho són el fet que probablement presentaran neurodegeneració causada per la presència de plaques senils i obesitat i per l'absència de Licochalcona A.

Grup 8 APP HF LCA: aquest últim grup està a la mateixa situació que l'anterior, però a diferència d'ells, aquests ratolins estan sent tractats. Penso que el fàrmac haurà sigut efectiu i que haurà millorat les seves capacitats cognitives, potser no podran fer-ho tan ràpidament, crec que acabaran recordant l'objecte vell i prestant més atenció al nou.

5.2.3 Material

Consisteix en un cilindre de 0.5 m de diàmetre i 1 m d'alçada, obert per la part superior. A l'interior se li introduiran dos objectes, en el meu cas, figuretes de joguina d'ossos.

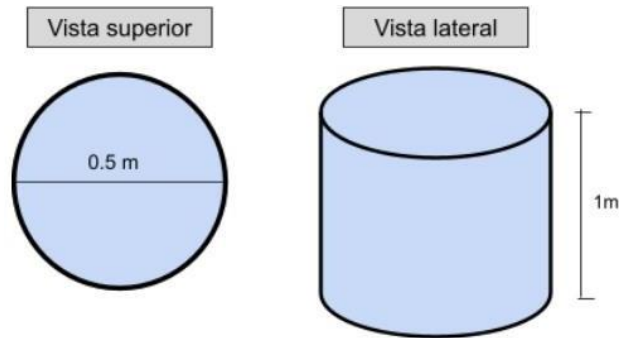


Figura 42: Representació esquemàtica del cilindre

5.2.4 Procediment

Es realitza durant un període de 5 dies:

- **Dies d'habitació:** els tres primers dies són d'habitació. Es deixen durant 10 min al cilindre perquè s'acostumin a l'espai, la llum, les olors, etc. És molt important que abans de posar un ratolí diferent a l'espai, aquest es renti tot amb etanol, ja que els ratolins tenen molt bon olfacte i ensumarien l'olor de l'últim participant. També cal procurar que sempre hi hagi la mateixa intensitat lumínica.

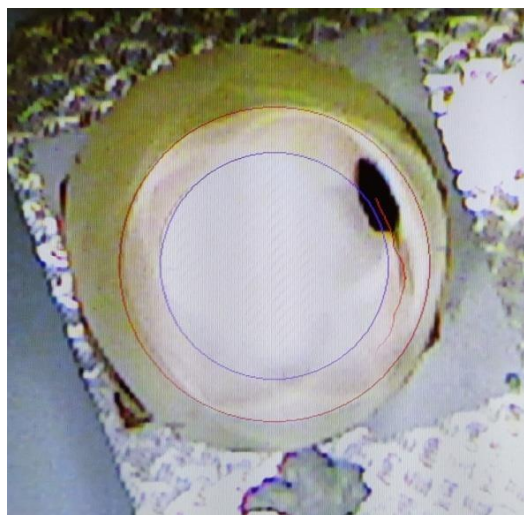


Figura 43: Imatge captada pel sensor d'un ratolí durant el primer dia d'habitació

- **Dia d'entrenament:** el quart dia s'introdueixen al cilindre un altre cop, però aquesta vegada trobaran 2 objectes exactament iguals. Gràcies a sensor de moviment col·locat al sostre es podrà observar per quin mostra més interès, a quin s'apropa més, quant de temps passa a cadascun, etc.
- **Dia de la prova:** el cinquè dia es tornaran a deixar al mateix lloc durant 2 minuts, però aquest cop trobaran el mateix objecte que ahir i un de nou. El sensor ens ajudarà a saber la quantitat de temps que passa observant el nou objecte i llavors, el seu índex de memòria de reconeixement, ja que si reconeix ràpidament l'objecte familiar, passarà més temps observant l'altre.

6. EXPERIMENT 3: OBSERVACIÓ D'ESPINES DENDRÍTIQUES

En aquest experiment es proposa observar les espines dendrítiques de les neurones de l'hipocamp dels ratolins. Recordem que les espines dendrítiques són les petites protuberàncies que es troben a les dendrites de les neurones i on succeeix la sinapsi. També que l'hipocamp és la zona del cervell implicada en les capacitats cognitives: memòria, aprenentatge, etc. Aquesta prova és la que ens donarà informació sobre l'efecte del fàrmac des d'un punt de vista anatòmic i fisiològic.

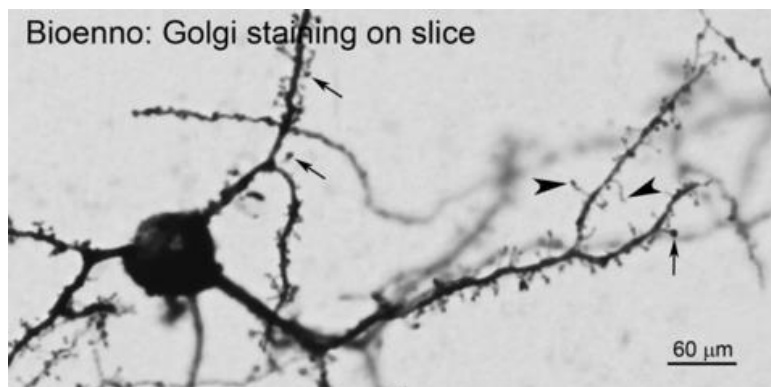


Figura 44: Neurona vista des d'un microscopi amb les espines dendrítiques senyalitzades amb fletxetes.

6.1 Objectius

Observar la quantitat d'espines dendrítiques de les neurones dels ratolins per tal de saber la qualitat de les sinapsis.

6.2 Hipòtesi

Grup 1 WT CT SAL: el grup control servirà per saber el nombre normal d'espines dendrítiques que sol presentar un ratolí.

Grup 2 WT CT LCA: penso que aquests ratolins presentaran una xifra similar a la del grup control, ja que crec que el fàrmac no tindrà un efecte positiu ni negatiu.

Grup 3 WT HF SAL: recents estudis han demostrat que els ratolins que presenten obesitat tenen bastants menys espines dendrítiques. Per aquesta raó penso que en aquest grup passarà el mateix, ja que segueixen una dieta rica en greixos.

Grup 4 WT HF LCA: penso que el nombre d'espines dels ratolins d'aquest grup serà inferior al del normal a causa de l'obesitat. Però no una xifra molt inferior, ja que crec que el fàrmac haurà sigut efectiu.

Grup 5 APP CT SAL: aquest grup al presentar la MA artificial i no estar tractat amb cap fàrmac, hauria de presentar una quantitat d'espines força inferior a la normal.

Grup 6 APP CT LCA: tot i que presenten el gen APP, crec que a l'haver estat tractats amb la Licochalcona A la neurodegeneració no serà tan greu. Per tant, presentaran menys espines de l'habitual, però no una xifra molt llunyana.

Grup 7 APP HF SAL: aquest grup crec que serà el que menys espines presenti amb diferència, ja que al tindre MA artificial, obesitat i absència de fàrmac, s'hauran perdut un gran nombre d'espines dendrítiques.

Grup 8 APP HF LCA: l'últim grup de ratolins penso que presentarà una deficiència d'espines causades per l'obesitat i l'alzheimer artificial, però que l'efecte del fàrmac serà positiu. Llavors serà una quantitat menor però no tant com la del grup anterior.

6.3 Material

Preparació de les mostres

- Solució de mercuri amb permanganat
- Isopentà
- Gel sec
- Vas de precipitats
- Tub d'assaig graduat
- Falcon
- Paper assecant
- Pines
- Pinzells
- Criòstat
- Portaobjectes

Tinció de Golgi

- Reactiu D i E
- Aigua MQ
- Paper d'alumini
- Etanol al 96%
- Suport de tinció
- Xilè
- Mitjà de muntatge DPX
- Cobreobjectes
- Proveta graduada
- Ampolla de vidre
- Vasos de precipitats
- Pipeta pasteur
- Agulla
- Cronòmetre



Figura 45: Imatge del criòstat.



Figura 46: Material per a realitzar la tinció: etanol, suport de tinció,

xilè, proveta de 100 ml, agulla, pipeta pasteur.

6.4 Procediment

Preparació de les mostres

1. Una vegada el ratolí ha sigut sacrificat, s'extreu el cervell i es conserva en un tub d'assaig graduat cobert en paper d'alumini en una solució de mercuri amb permanganat.
2. Es verteix la solució de mercuri a un vas de precipitats i amb ajuda de les pinces es passa per sobre d'un paper assecant el cervell per eliminar l'excés de líquid.
3. Es col·loca el cervell en un falcon que conté isopentà i aquest se sotmet a refredament durant uns 10 minuts en gel sec per aconseguir consistència.
4. Mentre es refreda, es preparen els portaobjectes escrivint la següent informació:
 - número assignat al ratolí
 - sexe
 - edat
 - condicions
 - data del dia
 - número de mostra (normalment es preparen dos portaobjectes per a cada cervell, sent així mostra 1 i mostra 2.)
5. Una vegada el cervell té la consistència adequada per poder-lo tallar correctament, es treu de l'isopentà i gràcies al criòstat s'aconsegueixen talls de 100 μm de l'hipocamp.
6. Amb ajuda de dos pinzells es van col·locant amb molta cura els diferents talls al portaobjectes.

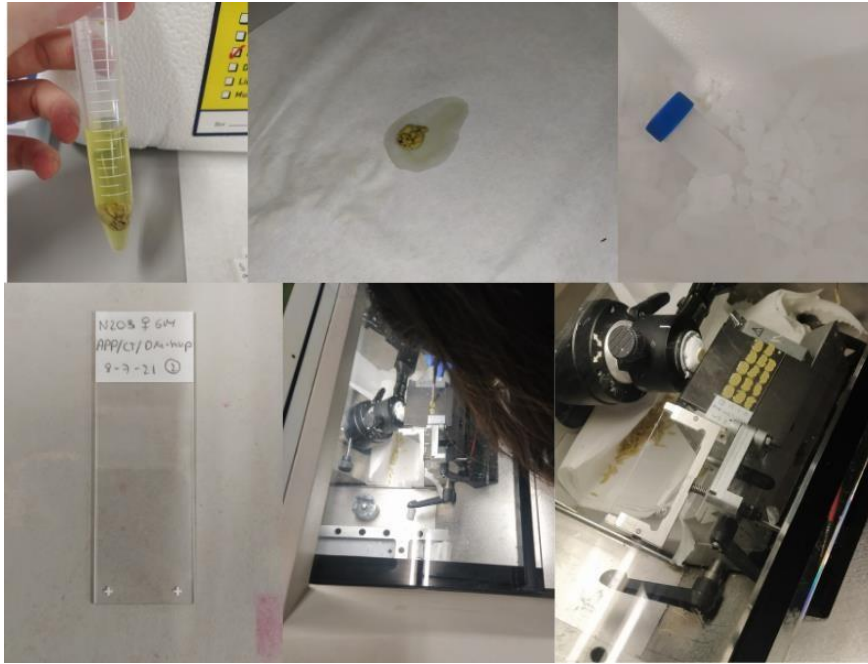


Figura 47: La primera imatge és un cervell de ratolí en una solució de mercuri amb permanganat. A la següent fotografia s'està eliminant l'excés de líquid del cervell. La tercera és un falcon amb un cervell al gel sec refredant-se, per tal d'aconseguir consistència. La quarta fotografia és un portaobjectes amb les característiques principals del ratolí al qual correspon aquell cervell. A la següent imatge estan tallant el cervell al criòstat. A l'última s'observa ja la mostra amb tots els talls de l'hipocamp d'un cervell.

Tinció de Golgi

1. Preparar la solució de reactius D i E amb l'ajuda d'una proveta graduada per a mesurar 50 mL de reactiu D, 50 mL de reactiu E i 100 mL d'aigua MQ. Es vessa tot a una ampolla de vidre i embolicar-la amb paper d'alumini.
2. Preparar 250 mL d'etanol al 50%: barrejar 130 mL etanol al 96% i 120 mL d'aigua MQ en un vas de precipitats.
3. Preparar 250 mL d'etanol al 75%: barrejar 195 mL etanol al 96% i 55 mL d'aigua MQ en un vas de precipitats.
4. Col·locar els portaobjectes als suports de tinció.
5. Realitzar 2 rentats amb aigua MQ durant 4 minuts.
6. Introduir la solució de reactius al suport de tinció amb els portaobjectes durant 10 min i cobrir-los amb paper d'alumini. Al finalitzar vessar la solució a un pot.
7. Realitzar 2 rentats amb aigua MQ durant 4 min.
8. Introduir etanol al 50% durant 4 min al suport i després vessar-lo en un pot.
9. Introduir etanol al 75% durant 4 min al suport i després vessar-lo en un pot.
10. Introduir etanol al 96% durant 4 min al suport i després vessar-lo en un pot. Repetir el procés 5 cops.
11. Introduir xilè al suport durant 4 min i després vessar-lo en un punt. Repetir el procés 3 cops, el xilè pot ser reutilitzat.

12. Treure els portaobjectes del suport de tinció i amb ajuda d'una pipeta pasteur estendre el mitjà de muntatge DPX. Després col·locar el cobreobjectes a sobre amb ajuda d'una agulla per evitar generar bombolles. Una vegada s'ha finalitzat aquest procés en totes les mostres, ja estan preparades per ser observades amb el microscopi.

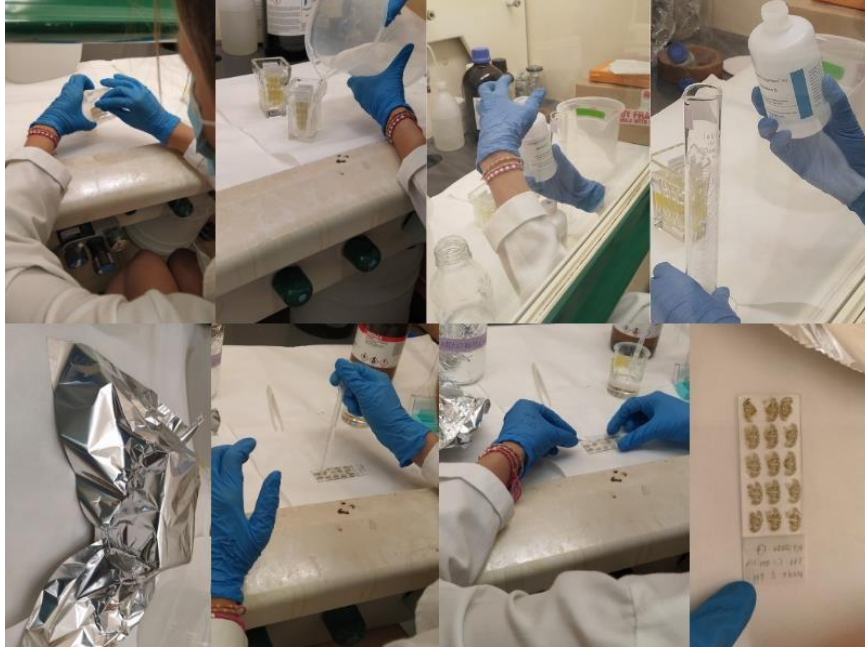


Figura 48: A la primera imatge estan col·locant els portaobjectes al suport de tinció. A la següent estan realitzant un rentat amb aigua MQ. A les tres següents fotografies estan introduint els reactius al suport de tinció i després els cobreixen amb paper d'alumini. A la cinquena imatge estenen el mitjà de muntatge DPX amb ajuda de la pipeta pasteur. Per finalitzar, estan col·locant el cobreobjectes a sobre de la mostra amb ajuda d'una agulla. L'última imatge correspon a com queda una mostra en conclure la tinció.

6.5 Resultats

A causa de les circumstàncies i com ja he explicat anteriorment, no tinc l'oportunitat d'ensenyar els resultats de la prova. Però, en aquest apartat explicaré com hagués hagut d'interpretar-los.

Una vegada finalitzat tot el procés de preparació i tinció de les mostres, tocarà fer l'observació al microscopi.

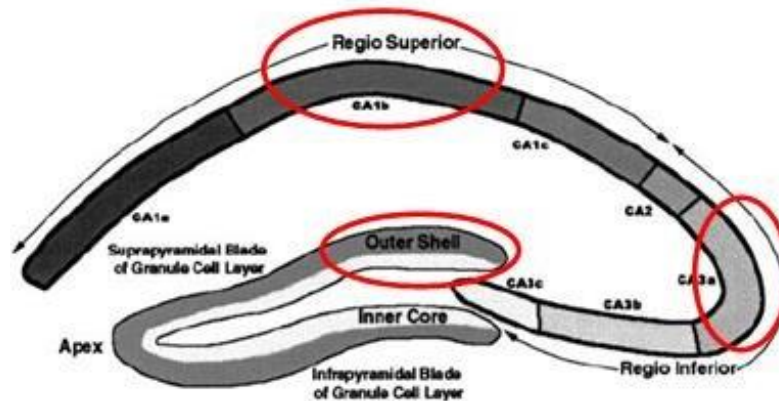


Figura 49: Il·lustració de l'hipocamp que descriu les diferents divisions que n'hi ha. En vermell estan senyalitzades les zones d'interès en les quals s'observaran les espines dendrítiques.

S'enfoca la mostra en les diferents zones d'interès, per cada zona s'hauran d'estudiar 5 neurones, observant finalment 15 per mostra. Però no totes les neurones serveixen per a realitzar l'observació d'espines, s'han de buscar les que tinguin les següents característiques:

- Que no es monti cap neurona o ramificació per sobre de la neurona que vols estudiar.
- Neurones en les quals les ramificacions de les dendrites es diferenciïn fàcilment.

De cada neurona es comptabilitzaran espines de 4 zones diferents, però primer explicaré les parts d'una neurona:

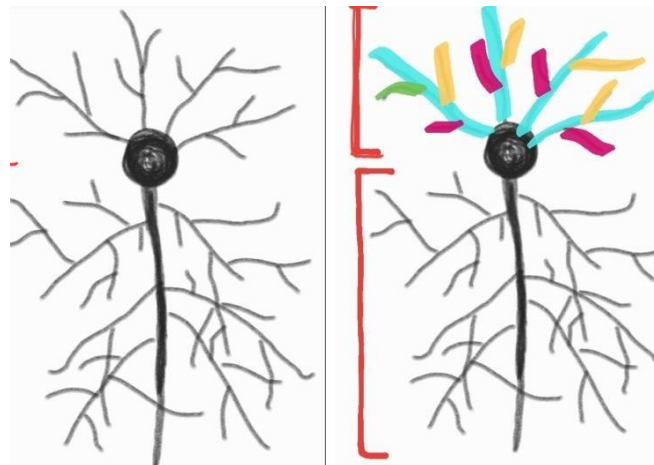


Figura 50: Dibuix d'una neurona de l'hipocamp.

Els dibuixos següents representen una neurona de l'hipocamp. La zona superior indicada en vermell rep el nom de zona basal i la inferior de zona apical. El cos circular que diferencia les dues zones és el nucli de la neurona. En color blau estan marcades les dendrites, en color rosa les primeres ramificacions, en groc les segones i en verd les terceres. Tot i no estar indicat, el funcionament de les dendrites i les seves ramificacions és el mateix a les de la zona apical.

1a Zona

- Localitzar la zona basal de la neurona.
- Localitzar la segona ramificació d'una dendrita.
- Col·locar la quadrícula i comptabilitzar les espines de tres quadrats.

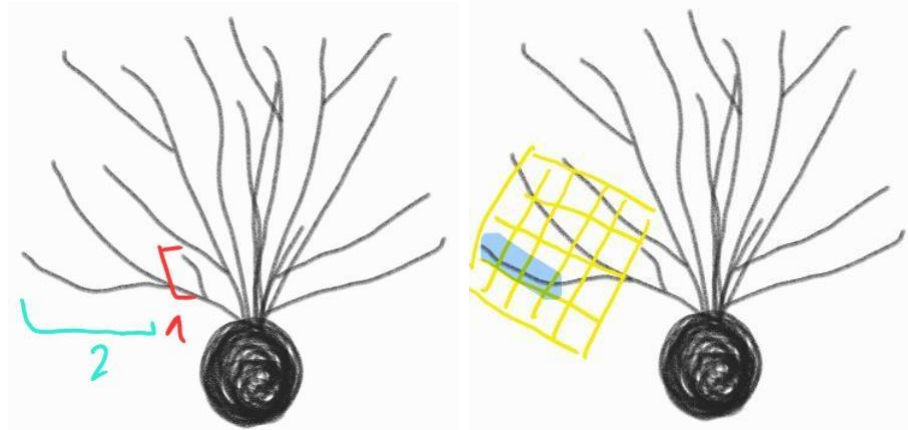


Figura 51: En blau indicada la 2a ramificació i després com es col·locaria la quadrícula.

2a Zona

- Localitzar la zona basal d'una neurona.
- Localitzar l'extrem d'una dendrita.
- Col·locar la quadrícula i comptabilitzar les espines de tres quadrats.

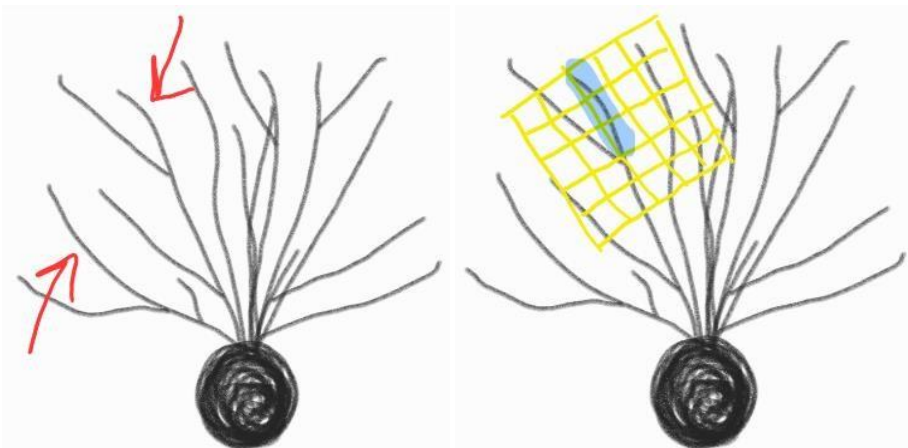


Figura 52: En vermell senyalitzat el final d'una dendrita i després com es col·locaria la quadrícula.

3a Zona

- Localitzar la zona apical d'una neurona.
- Localitzar la segona ramificació d'una dendrita.
- Col·locar la quadrícula i comptabilitzar les espines de tres quadrats.

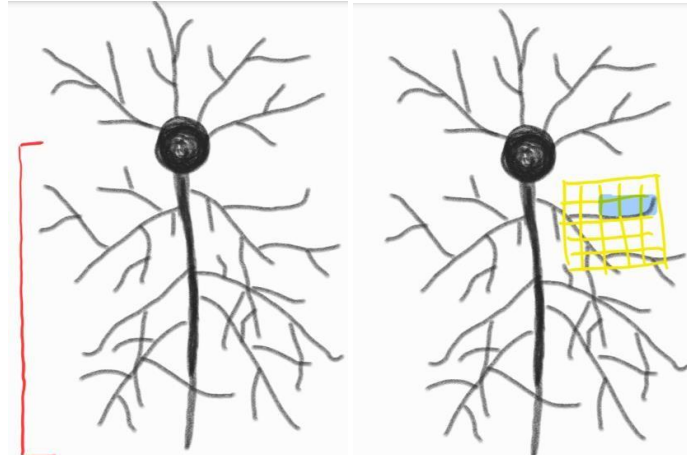


Figura 53: En vermell senyalitzada la zona apical i després com es col·locaria la quadrícula

4a zona

- Localitzar la zona basal d'una neurona.
- Localitzar una zona intermèdia d'una dendrita.
- Col·locar la quadrícula i comptabilitzar les espines de tres quadrats.

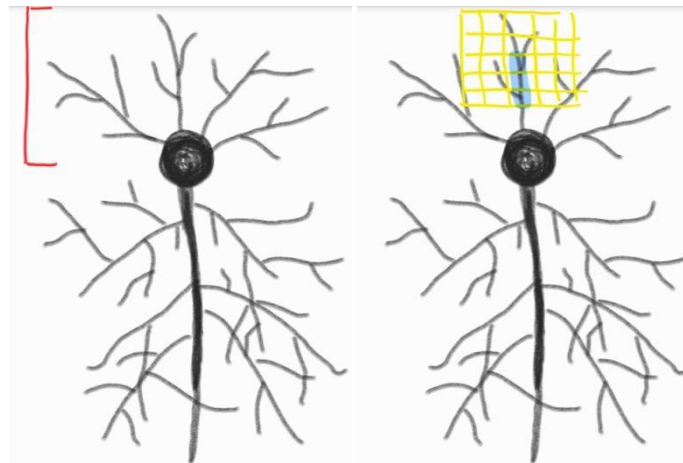


Figura 54: En vermell senyalitzada la zona basal i després com es col·locaria la quadrícula en la part mitja d'una dendrita.

Tots els resultats de la quantitat d'espines de cada zona de cada neurona es passen a una taula per interpretar-los posteriorment. Una major quantitat d'espines dendrítiques significa una millor qualitat de sinapsi, i per tant, una millor capacitat cognitiva.

IV. CONCLUSIÓ

Aquest treball de recerca, a part de voler donar importància a la malaltia d'alzheimer, tenia dos objectius principals: determinar si la Licochalcona Apodia ser un tractament en un futur per a tractar l'alzheimer i esbrinar si la MA podia tractar-se d'una síndrome metabòlica semblant a la diabetis.

Després d'haver realitzat aquest estudi i sempre tenint en compte que els resultats no reflecteixen la realitat per la manca de rèpliques i de repeticions dels experiments, n'he extret les següents conclusions:

- La primera conclusió que he extret ha sigut sobre la prova de genotipat. Al haver obtingut un 100% d'efectivitat en aquest experiment previ, es corrobora el fet que sí funciona i no acostuma a presentar cap mena d'inconvenient. Això és molt important a l'hora de realitzar l'estudi, ja que un genotipat erroni suposaria una classificació equivocada dels ratolins i, per tant, qualsevol resultat extret d'aquests seria invàlid.
- Aquesta conclusió tracta sobre la relació que n'hi ha entre l'obesitat i la diabetis. Una dieta rica en lípids provoca obesitat als ratolins, això provoca que n'hi hagi un ús incorrecte de la insulina i que llavors tinguin elevats nivells de glucosa en sang. Aquest cas és el que més s'aproximaria a una diabetis de tipus II, quan el nostre cos produeix insulina, però no la sap utilitzar eficientment.
- La següent conclusió ja respon a un dels objectius que tenia el treball: saber si la MA podria ser una síndrome metabòlica. Després de totl'anàlisi de resultats s'ha pogut observar que els ratolins que presentaven una dieta rica en lípids i l'alzheimer artificial induït tenien uns valors de glucosa en sang de quasi el doble que els ratolins control. Això demostra que l'alzheimer sí empitjora el mal funcionament de la insulina i que per tant, en un futur potser ens referirem a ell com a "diabetis tipus III". Aquest fet suposaria una nova gran via d'estudi plena d'esperança per al món de la medicina.
- Tot i que semblava que la Licochalcona A millorava lleument el metabolisme de la glucosa, no ho feia de manera significativa. Si finalment la MA es tractés d'una síndrome metabòlica, aquest fàrmac no seria gaire efectiu per a frenar l'avanç de la malaltia, segons els meus resultats. Malgrat això, en els estudis realitzats pel grup de farmacologia que m'ha ajudat a realitzar aquest treball, la Licochalcona A està obtenint molt bons resultats i s'espera que en un futur pugui ser un tractament viable per a totes les persones que pateixen alzheimer.
- Per últim, al no haver pogut obtenir tots els resultats pel gran volum de dades que n'hi ha, m'ha ajudat a donar-me compte de que les rèpliques i les repticions en un experiment són primordials. Si no són realitzades, les conclusions que puguis treure gairebé mai representaran la realitat, ja que no n'hi haurà cap marge d'error i a les investigacions molt cops s'en cometen bastants.

V. AGRAÏMENTS

Aquest treball de recerca m'ha servit per aprendre moltes coses: com es duu a terme un bon projecte, moltíssims coneixements sobre biologia molecular, he après a entendre el funcionament d'una malaltia bastant complexa, etc. També m'ha donat l'oportunitat de viure en primera persona com és una investigació de veritat i tot el treball que n'hi ha darrere. És per això que vull agrair a totes les persones que m'han ajudat i motivat durant aquests mesos:

En primer lloc, donar les gràcies a la meva família i amics per l'acompanyament, l'ajuda i el suport ofert.

A la meva tutora per haver-me animat i encoratjat en tot moment a fer el millor treball possible, ajudant-me i acompanyant-me en tot el procés.

Al Projecte Forces de la Universitat de Barcelona per haver-me donat l'oportunitat de col·laborar amb el grup de farmacologia de la Facultat de Farmàcia que ha fet possible la realització del meu estudi.

En concret, agrair la Miren Ettcheto, investigadora cap, la Marina Carrasco i la Triana Espinosa, estudiants de farmàcia, per haver invertit part del seu temps en ensenyar-me com funcionava la seva investigació, explicar-me cada experiment i resoldre tots els dubtes que m'han anat sorgint.

VII. BIBLIOGRAFIA

Carrera, S. (juny de 2017) *Diseño y síntesis de inhibidores de COX en la enfermedad de alzheimer*.

Club Nuevo Mundo. *La obesidad aumenta el riesgo de demencia*. [en línea]. [Consulta: 29 de setembre]. Disponible a: https://tendencias21.levante-emv.com/la-obesidad-aumenta-el-riesgo-de-demencia_a44752.html

Corbal, B. (febrer de 2017) *Avances en el tratamiento de la enfermedad del alzheimer*.

Corinne, J., Hurford, R., Corinee, L. (1 de juny de 2011) *Type-1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice*.

De la Monte, S. (2005) *Impaired insulin and insuli- like growth factor expression and signaling mechanisms in alzheimer's disease- is this a type 3 diabetes?*.

De la Monte, S., Wands, J. (2008) *Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes–Evidence Reviewed*.

Díaz, M. (juny de 2018) *Fármacos multidiana en el tratamiento del alzheimer*.

Discovery Salud. *¿Es el déficit de insulina en el cerebro la principal causa del alzheimer?* [en línea]. [Consulta: 21 d'agost]. Disponible a: <https://www.ds salud.com/reportaje/deficit-insulina-cerebro-la-principal-causa-del-alzheimer/>

Ettcheto, M., Cano, A. Busquets, O. (2019) *A metabolic perspective of late onset Alzheimer's disease*.

Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M. (6 d'agost de 2015) *Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment*.

Fundación Alzheimer de Venezuela. *El ladrón de los recuerdos: Hipótesis Colinérgica*. [en línea]. [Consulta: 23 de juny].

Fundación Alzheimer España. *Prevención de la enfermedad*. [en línea]. [Consulta: 9 de juliol]. Disponible a: <http://alzfae.org/fundacion/143/prevencion- alzheimer>

Fundació ACE. *Investigadores estudian el papel de la obesidad y la inflamación en el desarrollo dela enfermedad de alzheimer*. [en línea]. [Consulta: 29 de setembre]. Disponible a: <http://www.fundacioace.org/es/noticias/investigacion/papel-obesidad-inflamacion-alzheimer.html>

Fundación Pasqual Maragall. *Historia del alzheimer: cronolgia de la enfermedad y su investigación* [en línea]. [Consulta: 17 de juny]. Disponible a: [Historia del Alzheimer: cronología de la enfermedad y su investigación \(fpmaragall.org\)](http://historia-del-alzheimer.org).

Guerrero, C., Takvor, S., Frutos, J., Lombardo, V. (2020) *Estudio teórico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con terapia combinada: desarrollo e innovación.*

Infosalus. *Perspectivas de futuro del alzheimer.* [en línea]. [Consulta: 19 de juny]. Disponible a: [Perspectivas de futuro del Alzheimer \(infosalus.com\)](http://perspectivasdefuturodelalzheimer.infosalus.com).

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes atlas 6th edition.* [en línea]. [Consulta: 17 d'agost]. Disponible a: <https://diabetesatlas.org/en/>

Lilia, S., Hernandez, M., Manzo, J., Rojas, F. (7 de setembre de 2014) *Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus.*

Olivares, A. (13 de juny de 2019). *Probióticos como nueva alternativa en la prevención y tratamiento de la enfermedad de alzheimer.*

Portal Clínic. *Diagnóstico de la enfermedad de alzheimer [en línea].* [Consulta: 7 de juliol]. Disponible a: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/alzheimer/diagnostico>

Wikipedia. *Enfermedad de alzheimer* [en línea]. [Consulta: 15 de juny]. Disponible a: [https://es.wikipedia.org/wiki/Enfermedad de Alzheimer](https://es.wikipedia.org/wiki/Enfermedad_de_Alzheimer)

Figura 1: <https://upaninews.com/alois-alzheimer/>

Figura 2: [Alzheimer's disease - Wikipedia](#)

Figura 3: [Alzheimer's disease - Wikipedia](#)

Figura 4: [test del reloj.png \(630×420\) \(stimuluspro.com\)](#)

Figura 5: [Diagram \(researchgate.net\)](#)

Figura 6: <https://www.businessinsider.com/alzheimers-brain-scans-plaques-tangles-2016-3>

Figura 7: <http://discoveryeye.org/age-related-macular-degeneration-alzheimers/alzheimer-brain/>

Figura 8: Creació pròpia

Figura 9: <https://www.ecured.cu/index.php/Acetilcolina>

Figura 10: <https://h.exam-10.com/himiya/5028/index.html?page=3>

Figura 11: Creació pròpia

Figura 12: [Un fármaco experimental logra evitar la formación de las placas de beta-amiloide típicas del alzhéimer \(abc.es\)](#)

Figura 13: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRGKZmIsqrWwyzf861oamPRCWmMsRqm6Ebi2FSig3ZfiOnleQ>

Figura 14: <https://webpath.med.utah.edu/CNSHTML/CNS090.html>

Figura 15: Creació pròpia

Figura 16: Creació pròpia

Figura 17: <https://www.hormone.org/your-health-and-hormones/glands-and-hormones-a-to-z/hormones/insulin>

Figura 18: <https://www.alzheimeruniversal.eu/2015/10/15/diagnostico-alzheimer-recomendaciones-para-el-uso-del-estudio-pet-cerebral/>

Figura 19: <https://www.pauta.cl/ciencia-y-tecnologia/investigacion-memoria-funcion-neuronas-roberto-araya-universidad-montreal>

Figura 20: Creació pròpia

Figura 21: Díaz, M. (juny de 2018) *Fármacos multidiana en el tratamiento del alzheimer.*

Figura 22: Creació pròpia

Figura 23: <https://www.iafaforallergy.com/wp-content/uploads/2020/07/Yastimadhu-Glycyrrhiza-Glabra.jpg>

Figura 24: Licochalcone A2DCSD - Licochalcona A - Wikipedia, la enciclopedia libre

Figura 25-43: Creació pròpia

Figura 44: Protocols grup de farmacologia

Figura 45-47: Creació pròpia

Figura 48-54: Protocols grup de farmacologia