

# Parkinson

## Mitocondris, mutacions i mort neuronal



## *Agraïments*

Vull agrair al Dr Miquel Vila que em donés la possibilitat de col·laborar amb el seu grup de recerca i que em tractés tant bé quan vaig estar treballant al seu laboratori, fent-me participar en tot el que feien i tractant-me com una més. Gràcies a ell he pogut realitzar aquest treball. Vull agrair-li també al meu tutor del treball de recerca i professor de biologia Enric Roca la seva ajuda i el seu interès pel meu treball. Com a últim però no menys important vull agrair a la meva família, sobretot a la meva mare, el suport que m'ha donat durant tot el temps que he estat realitzant el treball i els seus ànims sempre que he tingut la sensació que sola no podria amb tot.

*Dedico aquest treball a les persones que pateixen la malaltia de Parkinson o qualsevol altre malaltia neurodegenerativa perquè cada petit pas és una mica menys en el que queda per aconseguir curar-les.*

# 1. Índex

---

Introducció.....	6
Part teòrica.....	10
1. La malaltia del Parkinson.....	11
1.1. Característiques principals de la malaltia de Parkinson.....	9
1.2. Síntomes de la malaltia de Parkinson .....	10
Tremolor.....	11
Brdicinesia .....	11
Rigidesa o hipertonia parkinsoniana .....	11
Inestabilitat postural .....	11
Altres símptomes del Parkinson.....	12
1.3. Diagnòstic del Parkinson .....	12
1.4. Aspectes patològics de la malaltia de Parkinson .....	13
1.5. Causes de la malaltia de Parkinson .....	16
1.5.1. Causa ambiental.....	17
1.5.2. Gens associats amb el Parkinson .....	17
1.6. Tractament de la malaltia de Parkinson.....	18
1.6.1. Tractaments farmacològics .....	18
1.6.2. Levodopa.....	19
1.7. La recerca actual sobre la malaltia de Parkinson .....	20
1.7.1 Causes de la malaltia de Parkinson .....	20
1.7.2. Neuroprotecció .....	22
1.7.3. Millora dels tractaments actuals.....	22
1.7.4. Regeneració de les vies nervioses.....	22
2. Els mitocondris i la malaltia del Parkinson.....	26
2.1. Els mitocondris .....	24
2.2. Disfunció mitocondrial i malaltia de Parkinson.....	25
2.2.1. Mutacions a l'ADN mitocondrial .....	26
2.2.2. Neurotoxines .....	27
MPTP .....	27
Rotenone.....	28

2.2.3.	Proteïnes mitocondrials .....	28
	Alfa-sinucleïna .....	29
	Parkina, DJ-1 i PINK1 .....	29
3.	Models animals.....	32
3.1.	Model de ratolí MPTP .....	30
3.2.	Model de ratolí PolG KO.....	31
	Part pràctica.....	34
4.	Hipòtesis i objectius.....	35
5.	Disseny de l'experiment.....	36
6.	Fases de l'experimentació.....	38
6.1.	Obtenció i tractament de les mostres.....	36
6.1.1.	Perfusió .....	36
6.1.2.	Talls del cervell .....	38
6.1.3.	Immunohistoquímica .....	39
6.2.	Comptatge i obtenció de dades .....	42
6.2.1.	Comptatge de neurones DA .....	43
6.2.2.	Densitat òptica de les terminals DA .....	47
6.3.	Comparació de les quantitats de neurones dopaminèrgiques i de les densitats òptiques de l'estriat .....	49
7.	Resultats.....	52
7.1.	Resultats recompte neurones dopaminèrgiques.....	50
7.2.	Resultats densitat òptica de l'estriat del cervell .....	53
7.3.	Resultats en relació als objectius plantejats .....	55
	Objectiu 1: .....	55
	Objectiu 2: .....	56
8.	Conclusions.....	60
9.	Bibliografia.....	62
10.	Glossari.....	64
11.	Annex.....	66
	Dades del recompte de neurones dopaminèrgiques .....	63
	Dades de densitat òptica de l'estriat del cervell .....	64

# INTRODUCCIÓ

---

Aquest treball de recerca està centrat en la malaltia de Parkinson i, concretament, en l'estudi de la relació entre les mutacions en l'ADN mitocondrial i aquesta malaltia.

Quan em vaig plantejar el tema per a aquest treball de recerca vaig tenir clar que seria sobre una malaltia neurodegenerativa. M'interessen molt tots els temes de biomedicina i, especialment els que tenen a veure amb la neurologia. No volia fer un treball sobre els aspectes clínics de la malaltia, volia estudiar els mecanismes interns que provoquen la malaltia. Fer un treball en aquest àmbit em permetria conèixer millor un món que trobo apassionant: el funcionament de les neurones i del cervell.

Però fer un treball de recerca en neurologia no és fàcil ja que aconseguir fer una experimentació pràctica en aquest àmbit és molt difícil per una estudiant de batxillerat. El doctor Miquel Vila, que dirigeix el Laboratori de Recerca en Malalties Neurodegeneratives a l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron ([www.vilalab.org](http://www.vilalab.org)), em va obrir les portes del seu laboratori perquè pogués realitzar la part experimental del meu treball en una de les seves línies de recerca.

La recerca en el laboratori del Dr Vila està centrada principalment en la malaltia de Parkinson, concretament, en l'estudi dels mecanismes moleculars que provoquen la neurodegeneració característica d'aquesta malaltia. El Parkinson és la segona malaltia neurodegenerativa més comuna després de l'Alzheimer i provoca problemes motors i moviments involuntaris en les persones que la pateixen. Una de les principals línies de recerca del grup és la relació entre la malaltia i el funcionament incorrecte dels mitocondris. I en aquest línia, una de les hipòtesis és que la neurodegeneració que provoca el Parkinson està causada per l'acumulació de mutacions en l'ADN mitocondrial en les neurones.

El meu estudi experimental ha estat centrat precisament en aquesta hipòtesi i, concretament, en determinar si el gran nombre de mutacions que s'acumulen en l'ADN mitocondrial de les neurones en els malalts de Parkinson és la causa primària

que provoca la neurodegeneració o bé si aquest gran nombre de mutacions és la conseqüència de la neurodegeneració.

Així doncs, la meva hipòtesi de partida és que l'alt nombre de mutacions en l'ADN mitocondrial (ADNmt) és el causant de la neurodegeneració en el Parkinson. Per poder contrastar aquesta hipòtesi em vaig marcar dos objectius claus, determinar si l'acumulació de mutacions en l'ADNmt provoca la mort de les neurones dopaminèrgiques i les seves terminals i, a més, determinar si aquesta acumulació augmenta la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a la toxina MPTP, una toxina que provoca una neurodegeneració similar a la del Parkinson que s'utilitza en models animals.

Per poder dur a terme aquesta investigació es va dissenyar un experiment amb dos models animals: ratolins MPTP, amb símptomes de neurodegeneració molt semblants al Parkinson induïts per l'administració de la toxina MPTP, i ratolins PolG KO, ratolins que acumulen moltes mutacions en l'ADN mitocondrial.

Durant la meva estada al laboratori del Dr. Vila, el mes de juliol de 2012, he tingut l'oportunitat de participar en totes les fases de l'experimentació: obtenció i tractament de les mostres (perfusió, talls de cervells i immunohistoquímica), obtenció de les dades (comptatge de neurones dopaminèrgiques i mesura de la densitat òptica dels terminals dopaminèrgics) i anàlisi dels resultats (comparació estadística de les quantitats de neurones i de les densitats òptiques entre els diferents tipus de ratolins).

Aquest treball està dividit en dues parts, la part teòrica i la part pràctica. En la part teòrica he fet una revisió bibliogràfica extensa sobre els conceptes més importants de la malaltia de Parkinson, centrant-me en aquells aspectes més rellevants per als objectius del meu treball. Primerament explico les característiques principals de la malaltia, aspectes clínics, patològics, tractament i recerca, i posteriorment, em centro en la relació entre la malaltia de Parkinson i la disfunció dels mitocondris causada per l'acumulació de mutacions en l'ADNmt o per altres motius. Finalment faig referència a la utilització de models animals en la recerca sobre el Parkinson i en la recerca sobre altres malalties degeneratives relacionades amb l'envelliment. Concretament explico

dos tipus de models animals que són precisament els que he utilitzat en la part experimental del meu treball.

La part teòrica doncs es divideix en tres parts: la malaltia, la relació entre els mitocondris i la malaltia i els models animals, totes tres indispensables per la realització de la part pràctica al laboratori.

La segona part del treball descriu la part experimental realitzada al laboratori del Dr. Vila. En primer lloc especifico clarament la hipòtesi de partida i els objectius concrets del treball, després faig una descripció de l'experiment i de la metodologia utilitzada per obtenir les mostres. Finalment presento els resultats de les anàlisis i acabo amb un apartat de conclusions.

*Les paraules en cursiva estan descrites al glossari.*

# PART TEÒRICA

---



# 1. LA MALALTIA DE PARKINSON

## 1.1. Característiques principals de la malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson (MP) rep el nom del Dr. James Parkinson que al 1817 va escriure el treball “*Essay on the Shaking Palsy*” on va descriure els aspectes clínics de la segona *malaltia neurodegenerativa* relacionada amb l’edat més comuna després de l’Alzheimer. El Parkinson és una malaltia degenerativa del sistema nerviós central caracteritzada clínicament per problemes motors com tremolor, alentiment progressiu del moviment voluntari, rigidesa i inestabilitat postural.

El Parkinson afecta a un 2% de les persones majors de 65 anys. S’estima que a Espanya hi ha unes 80.000 persones que pateixen aquesta malaltia i cada any es diagnostiquen uns 8.000 nous casos (incidència de 20 casos nous/100.000 habitants /any). La majoria de malalts té entre 50 i 80 anys. L’edat mitjana d’aparició dels primers símptomes està al voltant dels 55 anys, tot i que en un 15% dels casos els símptomes comencen abans dels 40 anys. La malaltia és progressiva i augmenta la mortalitat.

L’aspecte patològic clau en la malaltia de Parkinson és la pèrdua de neurones a la *substància negra pars compacta* (SNpc). Aquesta regió del cervell és la responsable de la fabricació de *neurotransmissors*, com la dopamina, essencials per al transport de missatges d’una cèl·lula nerviosa a una altra. La dopamina juga un paper essencial en el control del moviment, en l’estímul o gratificació en l’aprenentatge i en les emocions. La mort de neurones dopaminèrgiques (responsables de la síntesi i transmissió de dopamina) en la substància negra en malalts de Parkinson fa que els nivells de dopamina en el cervell siguin insuficients i apareguin els símptomes de problemes

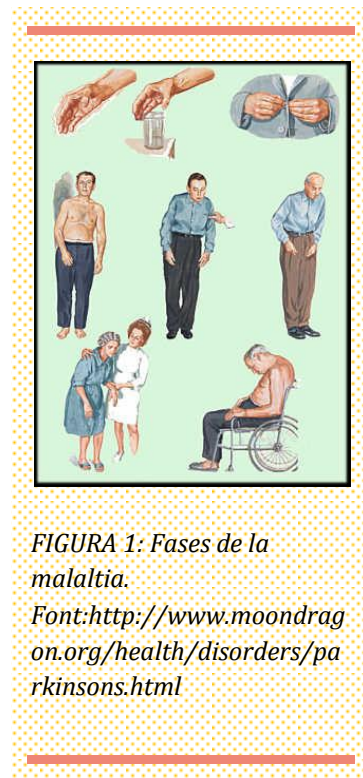


FIGURA 1: Fases de la malaltia.

Font: <http://www.moondragon.org/health/disorders/parkinsons.html>

motors característics de la malaltia. Aquests símptomes solen ser visibles a partir d'una pèrdua d'aproximadament el 70-80% de neurones dopaminèrgiques en la substància negra. De manera clínica, qualsevol malaltia que presenti deficiència en la dopamina pot ser anomenada com a "parkinsonisme".

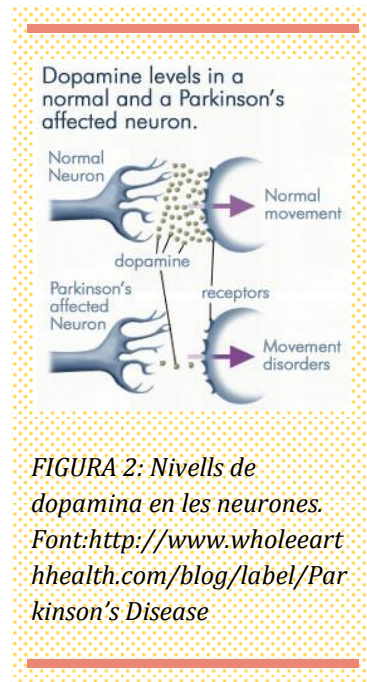
El 95% aproximadament dels casos de Parkinson són esporàdics, és a dir, no hi ha una relació genètica aparent, mentre que en la resta dels casos la malaltia és hereditària.

El tractament actual del Parkinson és l'administració de levodopa (un precursor de dopamina) per restablir els nivells de dopamina al cervell. Aquest tractament alleugereix la majoria dels símptomes de la malaltia però no la cura. Al cap d'uns quants anys de tractament la majoria dels pacients desenvolupaven moviments involuntaris, anomenats "discinèsies", que són difícils de controlar i que fan disminuir la qualitat de vida. La recerca actual està dirigida a la prevenció de la degeneració de les neurones dopaminèrgiques, però de moment tots els tractaments disponibles són simptomàtics.

El major obstacle en el desenvolupament de medicaments neuroprotectors és el desconeixement del procés molecular específic que provoca la neurodegeneració a la malaltia de Parkinson.

## 1.2. Síntomes de la malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson es caracteritza per l'aparició lenta i progressiva de problemes motors. Els quatre símptomes principals són: tremolor, bradicinèsia, rigidesa, i alteració dels reflexos posturals. A més, a mesura que la malaltia va avançant es van afegint altres signes de problemes motors, cognitius i sensorials.



### **Tremolor**

El tremolor és un dels primers símptomes que s'observen en els primers estadis de la malaltia. Afecta principalment a mans i peus, però també pot afectar la cara i els músculs de la llengua. Sol començar per un braç i després passa a afectar el braç o la cama contrària.

### **Bradicinesia**

La bradicinesia consisteix en un alentiment progressiu dels moviments voluntaris, sobretot al començar certs moviments com caminar, girar-se en el llit. Aquest símptoma provoca en els malalts un caminar lent en petits passos. La bradicinesia és l'element més incapacitant de la malaltia, ja que dificulta molt les tasques diàries quotidianes com vestir-se, cordar-se o escriure.

La fase més greu de la bradicinesia és la anomenada "congelació" on el pacient es queda bloquejat en un lloc, sense que els peus li responguin per fer un nou pas.

### **Rigidesa o hipertonia parkinsoniana**

La rigidesa muscular, o resistència al moviment, afecta la majoria de les persones amb la malaltia de Parkinson. El moviment corporal es basa en el principi de que tots els músculs tenen un múscul que s'hi oposa: el moviment es produeix quan un múscul s'activa mentre que el seu oposat es relaxa. En la malaltia de Parkinson el cervell no envia els senyals necessaris i els músculs oposats no es relaxen. Els músculs estan constantment tensos i contrets i la persona té dolor, o sent rigidesa o debilitat.

### **Inestabilitat postural**

Amb la progressió de la malaltia es produeix un deteriorament de l'equilibri, els pacients se senten inestables i tenen dificultat per mantenir-se drets posició recta. Quan intenten caminar el cap i el tronc es mouen descompassats amb els peus. Els pacients cauen fàcilment. Les persones afectades poden desenvolupar una postura encorbada en la qual el cap està inclinat i els espatlles caigudes.

### Altres símptomes del Parkinson

La malaltia de Parkinson pot anar acompanyada de molts altres símptomes, que poden variar molt d'un pacient a un altre. La depressió és un problema molt comú que pot aparèixer al principi de la malaltia, fins i tot abans del diagnòstic i abans que es notin altres símptomes. També es produeixen canvis emocionals, com por i inseguretats davant noves situacions com viatjar, assistir a festes o reunions amb molta gent. Altres símptomes freqüents són dificultat per empassar i mastegar, trastorns de la parla, trastorns del son, demència (en un 15-25% dels pacients) i disfunció sexual.

### 1.3. Diagnòstic del Parkinson

La malaltia de Parkinson pot ser difícil de diagnosticar amb precisió. Actualment no hi ha proves de laboratori que proporcionin un diagnòstic precís de la malaltia; el diagnòstic es basa en la història clínica i en un examen neurològic. De vegades els primers símptomes de la malaltia es poden confondre amb signes propis de l'envelliment normal. El criteri clínic per al diagnòstic de la malaltia es basa en:

- a) L'existència de com a mínim dos dels quatre elements característics del Parkinson (tremolor, bradicinesia, rigidesa, i inestabilitat postural)
- b) absència de dades incompatibles amb el diagnòstic de Parkinson, com ara la presa de fàrmacs amb efectes parkinsonians o haver patit determinades intoxicacions.

El diagnòstic també es pot millorar observant la resposta a la medicació amb substàncies dopaminèrgiques, com la levodopa.

Precisament, una de les línies d'investigació actuals en Parkinson és el descobriment d'un *marcador biològic* específic que serveixi com a test diagnòstic per aquesta malaltia, que permetés fer uns diagnòstics més precisos i en fases inicials de la malaltia. En absència d'un test diagnòstic, el diagnòstic del Parkinson només es pot fer amb tota certesa amb una autòpsia.

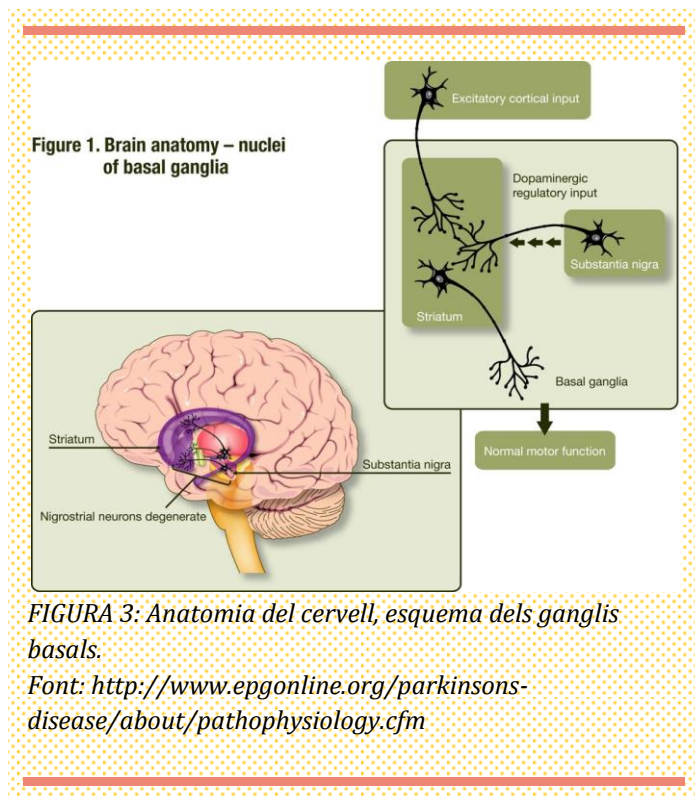
## 1.4. Aspectes patològics de la malaltia de Parkinson

Com ja he comentat abans, l'aspecte patològic que caracteritza la malaltia de Parkinson és la mort de les neurones dopaminèrgiques a la substància negra pars compacta (SNpc).

La substància negra forma part dels *ganglis basals* (GB), un conjunt d'estructures nervioses situades a la base del cervell que tenen com a funció el manteniment de la postura del cos i de les extremitats, la producció de moviments espontanis (com el parpadeig) i automàtics que acompanyen els moviments voluntaris (com el balanceig de braços al caminar). Una de les estructures que forma part dels ganglis basals és el cos estriat format pel nucli caudat i el putamen.

La substància negra té dues parts, la pars compacta (SNpc) i la pars reticulada (SNr). La SNpc és la part posterior de la substància negra, és molt fosca ja que conté un gran

nombre de neurones amb grànuls de pigment (neuromelamina) en el seu citoplasma; aquestes neurones es troben molt juntes i compactades i d'aquí ve el nom de pars compacta. La SNr és la part anterior de la substància negra; és més clara, ocupa més espai i conté menys neurones.



Les neurones dopaminèrgiques es troben principalment a la SNpc (representen gairebé un 90% del total de neurones) i formen part del que s'anomena la *via nigrostriatal*, que comunica la substància negra amb el cos estriat. Tal com es pot veure a la figura 4 A, els cossos de les neurones dopaminèrgiques es troben a la SNpc i projecten els seus terminals al cos estriat (putamen i nucli caudat) on alliberen la dopamina. En la figura 4 B, es representa la via nigrostriatal afectada per la malaltia de Parkinson. En primer lloc s'observa una despigmentació de la SNpc característica del Parkinson, deguda a la

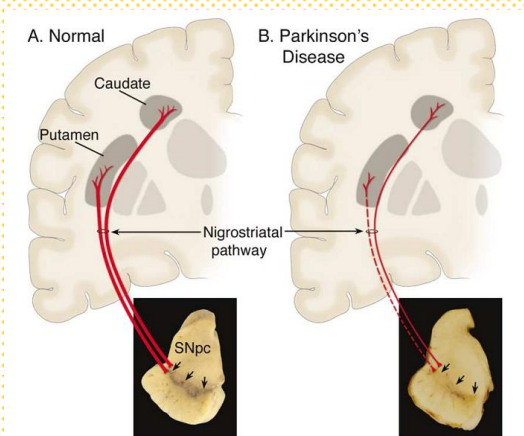


FIGURA 4: Diferències entre els terminals en un cervell sà i un afectat amb Parkinson.

Font: Dauer2003

mort de les neurones dopaminèrgiques que tenien un alt contingut de melamina. D'altra banda, la degeneració dels *axons* de les neurones dopaminèrgiques que projecten en l'estriat provoca una disminució de l'activitat sinàptica en aquesta zona i una deficiència de dopamina.

De fet, el que causa els problemes de mobilitat en la malaltia de Parkinson és el desequilibri entre la quantitat de

dopamina i la quantitat d'un altre neurotransmissor, la acetilcolina. És essencial que existeixi un equilibri entre aquests dos neurotransmissors per tal que la *sinapsis* (transferència del senyal d'una neurona a l'altra) es realitzi correctament. El deteriorament en la substància negra provoca un desequilibri entre els nivells de dopamina i acetilcolina que impedeix el control del moviment.

La figura 6 mostra de manera esquemàtica el procés complet que va des de la mort de les neurones dopaminèrgiques als problemes de moviment. En

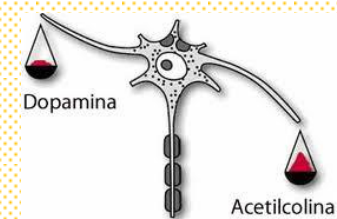


FIGURA 5: Il·lustració del desequilibri de neurotransmissors.

Font: [http://leandrafono.blogspot.com.es/2012\\_03\\_01\\_archive.html](http://leandrafono.blogspot.com.es/2012_03_01_archive.html)



condicions normals les neurones dopaminèrgiques de la substància negra projecten els seus axons al *cos estriat* i des d'aquí s'envia la informació als ganglis basals, responsables del control del moviment. Quan les neurones dopaminèrgiques de la substància negra es deterioren la cadena d'informació es veu afectada i deriva en els problemes motors característics de la malaltia de Parkinson.

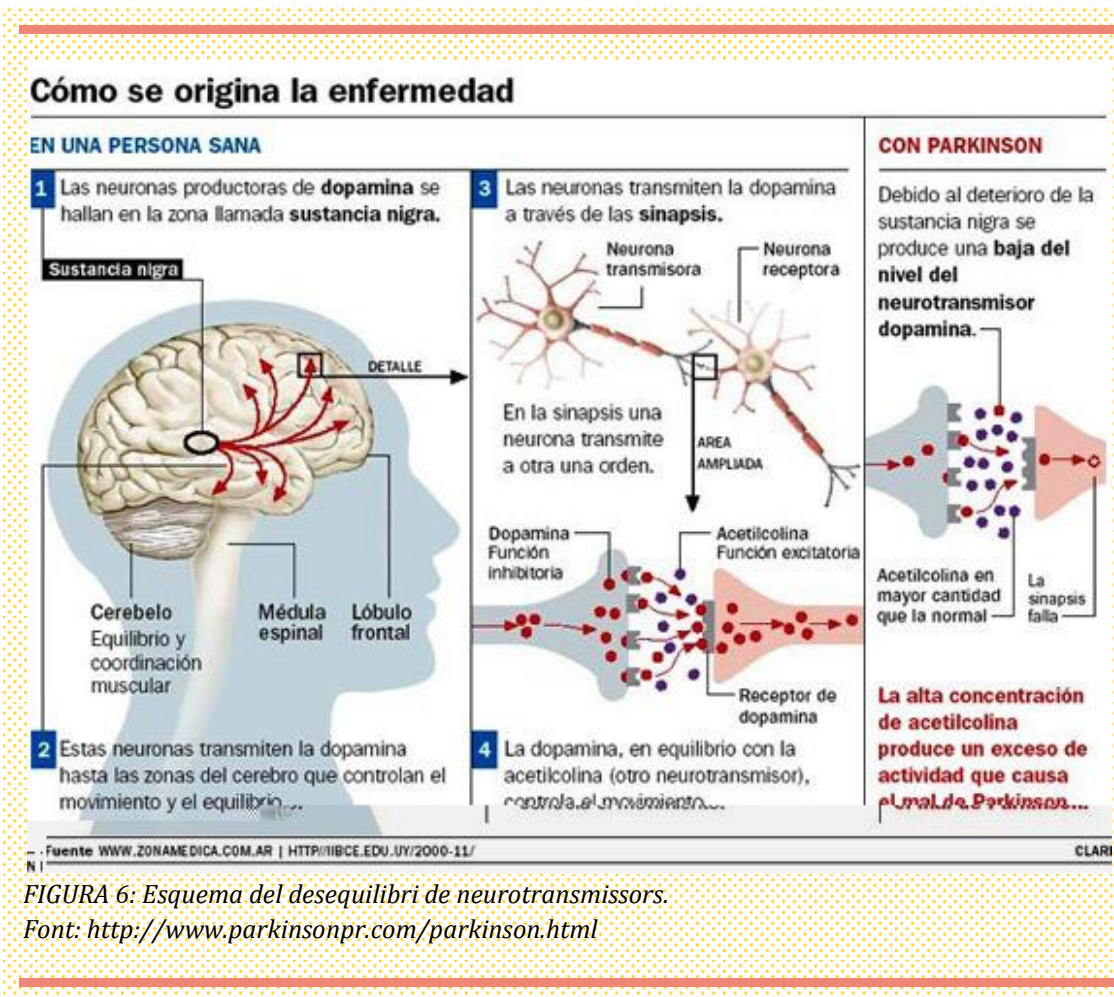


FIGURA 6: Esquema del desequilibrio de neurotransmisores.

Font: <http://www.parkinsonpr.com/parkinson.html>

Encara que l'edat sigui un factor de risc important per la malaltia de Parkinson, la pèrdua de neurones dopaminèrgiques associada a la malaltia de Parkinson segueix un patró diferent del que s'observa habitualment en l'envelliment normal. La pèrdua de terminals a l'estriat sembla ser més pronunciada que la pèrdua de neurones dopaminèrgiques de la SNpc. Això suggereix que els terminals dopaminèrgics estriatals són el primer punt del procés degeneratiu i que la mort neuronal del Parkinson pot ser el resultat d'un procés de "mort endarrere".

Un altre aspecte característic del Parkinson és la presència de cossos de Lewy, dipòsits o acumulacions anormals de proteïnes entre les neurones. Una de les proteïnes més abundants en els cossos de Lewy és la proteïna alfa-sinucleïna.

Els investigadors encara no saben perquè es formen els cossos de Lewy ni quin paper juguen en el desenvolupament de la

malaltia, però sí que són un element característic de la malaltia. De fet, el diagnòstic definitiu de la malaltia requereix tant la detecció de la pèrdua de neurones dopaminèrgiques a la SNpc com la presència de cossos de Lewy. Els cossos de Lewy no

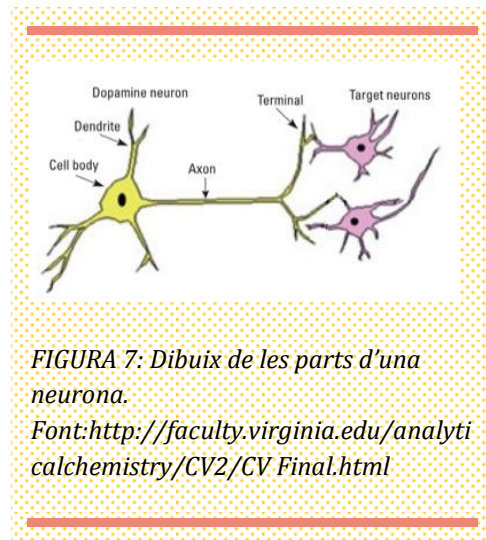


FIGURA 7: Dibuix de les parts d'una neurona.

Font: <http://faculty.virginia.edu/analyticalchemistry/CV2/CV.Final.html>

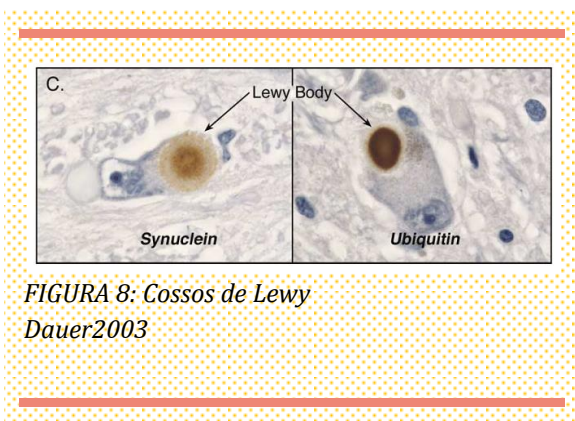


FIGURA 8: Cossos de Lewy  
Dauer2003

són específics del Parkinson, sinó que es troben en diverses malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer.

## 1.5. Causes de la malaltia de Parkinson

La causa de la malaltia de Parkinson esporàdica és desconeguda. Durant el segle 20 va dominar la hipòtesi d'una toxina ambiental, sobretot pel descobriment de que la toxina *MPTP* produeix parkinsonisme. Tant mateix, es va renovar l'interès pels factors de susceptibilitat hereditària amb el descobriment d'alguns gens associats al Parkinson. Segurament els dos factors, genètic i ambiental, tenen un paper en la malaltia. De fet, una de les hipòtesis que cada vegada pren més força és que la combinació de factors ambientals i genètics provoca una disfunció mitocondrial que condueix a la mort neuronal. Aquesta és la hipòtesi central d'aquest treball i per això



en parlaré amb més detall en la secció 2. A continuació descriu les causes ambientals i genètiques associades fins al moment amb la malaltia de Parkinson.

### 1.5.1. Causa ambiental

Segons la teoria ambiental, una exposició crònica o limitada a una neurotoxina pot iniciar una sèrie d'alteracions negatives que provoquin la neurodegeneració progressiva característica de la malaltia. La primera toxina que es va relacionar amb la malaltia de Parkinson va ser la MPTP, de la qual parlaré amb més detall a la secció 2. Una altra font de tòxics ambientals que poden derivar en Parkinson són alguns insecticides, com per exemple, la rotenona.

### 1.5.2. Gens associats amb el Parkinson

Encara que la malaltia de Parkinson hereditària només representa el 5% dels casos, l'estudi de la component genètica d'aquesta malaltia és molt important ja que pot ajudar a entendre quins processos moleculars estan involucrats en la neurodegeneració que caracteritza la malaltia de Parkinson.

S'han identificat diversos gens que estan associats al Parkinson, el primer va ser el gen *alfa-sinucleïna*. En primer lloc es va determinar una mutació en aquest gen que es va associar amb la malaltia. Més tard, un altre estudi va descobrir en una família amb molts membres afectats de Parkinson que tenien una triplicació del gen alfa-sinucleïna en una còpia del cromosoma 4. Aquesta triplicació causava una producció excessiva de alfa-sinucleïna. Aquest estudi va demostrar que un excés de la forma normal de la proteïna podia produir la malaltia, de la mateixa manera que ho feia la forma mutada.

Altres gens associats al Parkinson són la *parkina*, *DJ-1*, *PINK1* i *LRRK2*. Els tres primers, la Parkina, DJ-1 i PINK-1, causen formes rares i amb edats més joves de la malaltia.

Els investigadors continuen estudiant les funcions i interaccions normals d'aquests gens per tal de trobar pistes sobre com es desenvolupa la malaltia de Parkinson.

També han identificat un nombre d'altres gens i regions cromosòmiques que poden jugar un paper en la malaltia, però encara no és clara la naturalesa d'aquests enllaços.

## 1.6. Tractament de la malaltia de Parkinson

Actualment no existeix una cura per a la malaltia de Parkinson, però de vegades els medicaments o la cirurgia poden aconseguir un alleujament molt important dels símptomes.

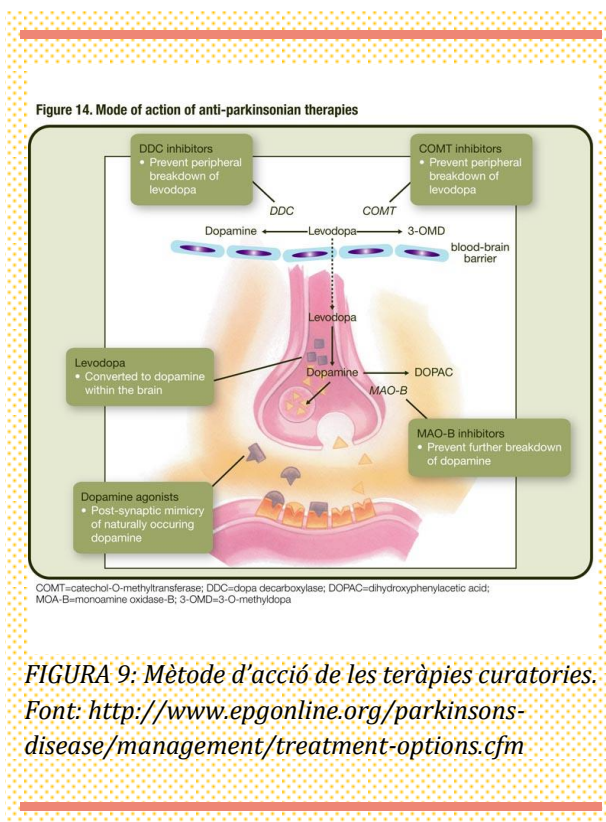
### 1.6.1. Tractaments farmacològics

Els medicaments per a tractar el Parkinson comprenen tres categories. La primera categoria són medicaments que funcionen directament o indirectament per augmentar el nivell de dopamina en el cervell. Els medicaments més comuns per a la malaltia són precursors de la dopamina, substàncies com la levodopa que

creuen la barrera sanguínia-cerebral i després canvien a dopamina. Altres medicaments imiten la dopamina o prevenen o retarden la seva descomposició.

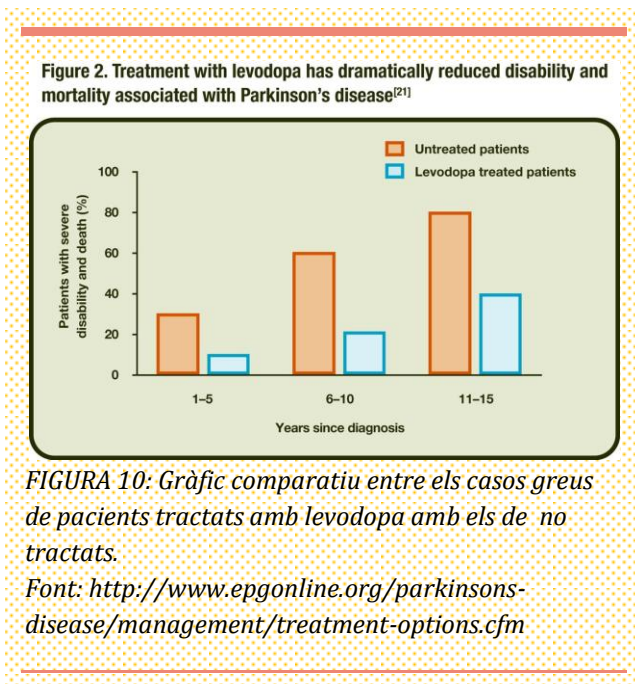
La segona categoria de medicaments per a la malaltia de Parkinson afecta altres neurotransmissors corporals amb la finalitat d'alleugerir alguns símptomes de la malaltia. Aquests medicaments ajuden a reduir els tremolors i la rigidesa muscular.

La tercera categoria de medicaments receptats per la malaltia són medicaments que ajuden a controlar els símptomes no motors de la malaltia, és a dir, els símptomes que no afecten al moviment. Per exemple, es pot receptar antidepressius a les persones amb depressió relacionada amb la malaltia.



### 1.6.2. Levodopa

El fonament de la teràpia per a la malaltia de Parkinson és el medicament levodopa



(anomenat també L-dopa).

Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) és una substància química simple trobada naturalment en les plantes i en els animals. Les cèl·lules nervioses poden utilitzar levodopa per fabricar dopamina i tornar a omplir el subministrament cerebral decreixent. Les persones no poden prendre simplement

píndoles de dopamina perquè aquesta no és capaç de creuar la barrera sanguínia-cerebral, un revestiment de cèl·lules dins dels vasos sanguinis que regula el transport d'oxigen, glucosa i altres substàncies cap al cervell.

La levodopa és molt eficaç en la reducció de tremolors i altres símptomes del Parkinson durant les etapes primerenques de la malaltia. Permet a la majoria de les persones amb Parkinson estendre el període de temps en el que poden portar vides relativament normals i productives.

Encara que la levodopa ajuda a la majoria de persones amb malaltia de Parkinson, no tots els símptomes responen d'igual manera al medicament. La levodopa generalment ajuda més amb la bradicinèsia i la rigidesa. En canvi, els problemes com l'equilibri i altres símptomes no motors poden no alleujar en absolut.

Sovint la levodopa és tan eficaç que algunes persones poden temporalment oblidar que tenen la malaltia de Parkinson durant les etapes primerenques de la malaltia. Però la levodopa no és una cura. Tot i que pot reduir els símptomes, no substitueix les

cèl·lules nervioses perdudes i no atura l'evolució de la malaltia. Tot i així, la levodopa pot tenir una varietat d'efectes secundaris.

Afortunadament, els metges tenen altres opcions de tractament per a alguns símptomes i etapes de la malaltia de Parkinson però tampoc són definitius i molts provoquen els mateixos efectes secundaris que la levodopa.

Al recomanar un tractament, el metge avaluarà si els símptomes trastornen molt la vida del pacient i ajustarà la teràpia a l'afecció particular de la persona. Com que no hi ha dos pacients que reaccionin a un medicament donat de la mateixa manera, pot portar temps i paciència aconseguir la dosificació adequada. Tot i això, en alguns casos els símptomes no s'acaben d'alleugerir completament.

## **1.7. La recerca actual sobre la malaltia de Parkinson**

Les principals investigacions que s'estan portant a terme actualment sobre la malaltia de Parkinson tenen per objectiu avançar en els següents aspectes:

- a) conèixer la causa del Parkinson;
- b) descobrir un tractament neuroprotector;
- c) millorar els tractaments actuals i
- d) regenerar les vies nervioses afectades.

### **1.7.1 Causes de la malaltia de Parkinson**

Moltes de les investigacions actuals estan orientades a descobrir aquestes causes, ja que conèixer l'origen de la malaltia és essencial tant per al diagnòstic precoç com per avançar en una possible curació o prevenció.

En aquest sentit, una de les àrees més actives en la investigació sobre el Parkinson és la genètica. Identificar els defectes genètics associats a la malaltia pot ajudar a entendre com es produeix la malaltia, a desenvolupar models animals que imitin amb precisió la mort neuronal en la malaltia humana, a identificar nous objectius

farmacològics i a millorar el diagnòstic. Com ja he dit anteriorment, actualment ja estan confirmats diversos gens que estan relacionats amb la malaltia. També s'han identificat altres gens que podrien jugar un paper important i actualment diversos estudis estan treballant per confirmar aquestes troballes.

A més de les mutacions o alteracions genètiques s'estan fent estudis d'expressió gènica per identificar gens anormalment actius o inactius en la malaltia. Les tècniques d'obtenció massiva de dades, com els *mRNA microarrays* que proporcionen els nivells de mRNA de milers de gens, permeten dur a terme aquests estudis a gran escala amb un cost relativament reduït. Aquests estudis s'han dut a terme amb èxit amb altres malalties, com el càncer de mama, i han permès determinar perfils d'expressió gènica que serveixen com a diagnòstic de la malaltia o com a pronòstic de l'evolució, més o menys agressiva i ràpida. S'espera que en el futur aquest tipus d'estudi permeti identificar perfils genètics propis de la malaltia de Parkinson, que millorin el diagnòstic de la malaltia, que facilitin la caracterització de subtipus de la malaltia i que serveixin també per predir la seva evolució. En qualsevol cas, caldrà confirmar tots aquests resultats de manera que els marcadors genètics identificats siguin fiables, accessibles i aplicables a tot el món.

Una altra línia d'investigació molt important és la relació entre la malaltia de Parkinson i el mal funcionament dels mitocondris, les estructures que proporcionen l'energia a les cèl·lules. Alguns científics han trobat indicis que variacions específiques en l'ADN dels mitocondris poden augmentar el risc de desenvolupar la malaltia de Parkinson. També han trobat que els pacients amb Parkinson tenen més mutacions a l'ADN mitocondrial (ADNmt) que els pacients amb altres trastorns del moviment o la malaltia d'Alzheimer. Les investigacions actuals en aquesta línia tenen per objectiu determinar si aquestes mutacions en l'ADN mitocondrial són causa o efecte de la malaltia i quin és el mecanisme que relaciona aquestes mutacions amb el Parkinson. Aquesta línia d'investigació és precisament una de les àrees de recerca del Laboratori del Dr. Vila a l'Institut de Recerca del Vall d'Hebrón i en la que jo he estat col·laborant.

### 1.7.2. Neuroprotecció

La disponibilitat de fàrmacs neuroprotectors suposaria per als pacients l'alentiment del deteriorament progressiu que produeix la malaltia. Avui en dia, però, no s'ha pogut demostrar l'eficàcia neuroprotectora de cap fàrmac per al Parkinson. La dificultat en aquest tipus de tractament és que hauria d'atacar els diferents mecanismes que conjuntament acaben produint la mort neuronal. Per això es pensa que faran falta còctels de fàrmacs amb diferents tipus de protecció neuronal. Alguns d'aquests fàrmacs estan en fase d'investigació.

### 1.7.3. Millora dels tractaments actuals

Diverses investigacions estan orientades a trobar fàrmacs que tinguin la mateixa eficàcia que la levodopa però sense els seus efectes secundaris. Per tal d'evitar aquests efectes secundaris les investigacions en biotecnologia intenten sintetitzar fàrmacs que siguin més selectius i que només actuïn sobre els mecanismes específics de degeneració sense afectar altres vies que funcionen correctament.

També s'estan fent estudis de farmacogenòmica per tal de desenvolupar fàrmacs més personalitzats, en funció de les característiques genètiques dels pacients.

### 1.7.4. Regeneració de les vies nervioses

La medicina regenerativa mitjançant cèl·lules mare és també una àrea d'investigació en Parkinson. Les cèl·lules mare embrionàries es poden transformar en qualsevol tipus cel·lular i es podrien implantar per tal que es convertissin en neurones dopaminèrgiques en el cervell dels pacients. Això ja s'ha provat amb estudis animals, concretament en models experimentals de malaltia de Parkinson en ratolins i els resultats han estat molt positius. El problema és que les cèl·lules mare embrionàries poden donar lloc a tumors si no es tracten de manera adequada. Per això s'està estudiant com produir cèl·lules especialitzades, incapaces de produir tumors, i en com

separar les cèl·lules potencialment tumorals i trasplantar només les cèl·lules especialitzades. Les cèl·lules mare adultes no donen lloc a tumors, però el problema és que són menys efectives i només una porció petita d'aquestes cèl·lules s'acaba convertint en una neurona dopaminèrgica.

## 2. ELS MITOCONDRIIS I LA MALALTIA DE PARKINSON

### 2.1. Els mitocondris

Un mitocondri és un orgànel cel·lular de forma allargada i ovoide. Es troben a totes les cèl·lules del nostre cos repartits en el seu citoplasma. El nombre de mitocondris en cada cèl·lula és alt en general, encara que varia segons el tipus de teixit. La funció principal dels mitocondris és la de crear energia mitjançant un conjunt de vies metabòliques anomenat respiració cel·lular, per això és un orgànel clau per a la vida.

Els mitocondris són organoides de doble membrana. La membrana externa és rica en proteïnes enzimàtiques i és permeable a ions i a molècules de mida petita degut a

l'existència de canals proteics aquosos i permeases. La membrana interna, en canvi és força impermeable als ions, presenta un percentatge molt important de proteïnes i no presenta colesterol. La membrana interna es replega formant invaginacions anomenades crestes; d'aquesta manera hi ha més superfície útil de membrana.

L'existència d'aquestes dues membranes fa que hi hagi dos espais més dins el mitocondri: l'espai intermembrana, que té una composició molt semblant a la del citosol; i l'espai de l'interior del mitocondri anomenat matriu. Dins la matriu mitocondrial s'hi troba l'ADN mitocondrial (ADNmt), un ADN diferent al que hi ha al nucli de la cèl·lula.

L'ADNmt és un material genètic circular de doble cadena que només s'hereta per via materna. Això és perquè durant la fecundació, l'òvul és el que aporta el citoplasma al zigot i conseqüentment els mateixos mitocondris que tenia la mare passen a les

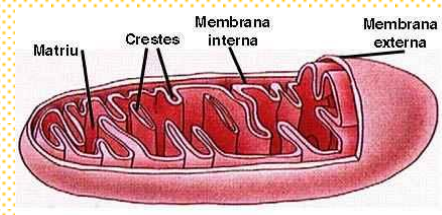


FIGURA 11: Esquema de les parts d'un mitocondri.

Font: <http://www.xtec.cat/~jgurrera/mcndri.htm>



cèl·lules del fill. L'ADNmt conté informació de 37 gens, 13 dels quals són estructurals i codifiquen diferents subunitats dels complexos enzimàtics del sistema de fosforilació oxidativa.

La *respiració cel·lular* o cadena del transport d'electrons està formada per aproximadament 100 proteïnes, 13 de les quals es codifiquen a partir de l'ADNmt i les altres a partir de l'ADN nuclear. Aquestes proteïnes formen 5 complexos que realitzen les diferents tasques de la respiració cel·lular.

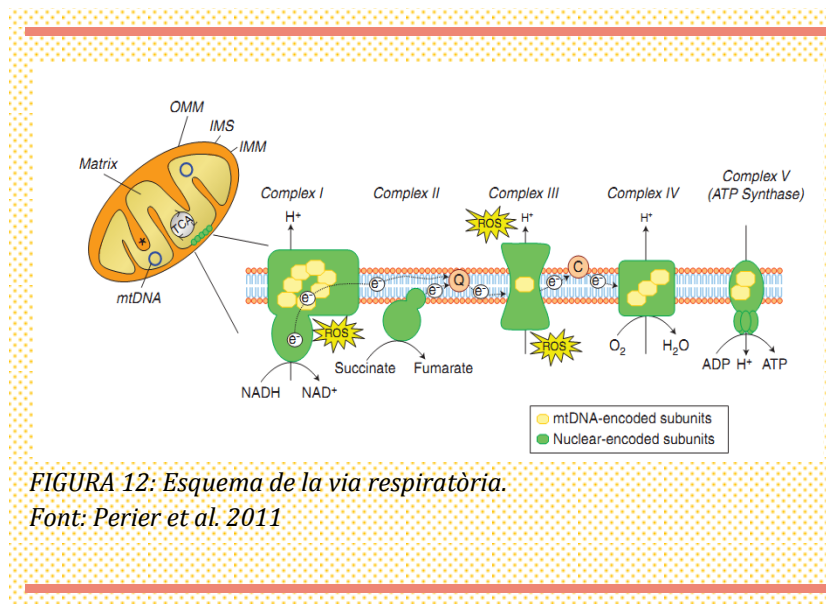


FIGURA 12: Esquema de la via respiratòria.  
Font: Perier et al. 2011

## 2.2. Disfunció mitocondrial i malaltia de Parkinson

Hi ha prou evidències científiques que relacionen la malaltia de Parkinson amb un mal funcionament dels mitocondris. Aquesta disfunció mitocondrial pot ser deguda a mutacions acumulades en l'ADNmt, a agents tòxics i a gens que codifiquen proteïnes mitocondrials. La combinació d'aquests factors, ambientals i genètics, provoca la disfunció mitocondrial que deriva en *estrès oxidatiu*<sup>1</sup> i la conseqüent mort neuronal. El que encara es desconeix és si aquesta disfunció mitocondrial és l'element primer que

<sup>1</sup>Estrès oxidatiu: Acumulació d'espècies reactives de l'oxigen que causen efectes tòxics a través de la producció de peròxids i radicals lliures que danyen tots els components de la cèl·lula. Les espècies reactives de l'oxigen (en anglès, ROS, reactive oxygen species) són molècules molt petites altament reactives (ions d'oxigen, radicals lliures i peròxids) que es formen de manera natural com a subproducte del metabolisme de l'oxigen i tenen un paper important en la senyalització cel·lular.

desencadena el dany neuronal en la malaltia de Parkinson o bé es tracta d'un element secundari conseqüència d'un altre factor encara per determinar.

### 2.2.1. Mutacions a l'ADN mitocondrial

L'entorn del mitocondri i de l'ADNmt està força exposat al dany oxidatiu produït pels radicals lliures resultants d'aquest metabolisme. A més, les seqüències que codifiquen les proteïnes implicades en la fosforilació oxidativa ocupen la major part de l'ADNmt i per tant són la diana principal d'un gran nombre de mutacions. Si tenim en compte la sensibilitat de la cadena d'ADNmt explicada abans i hi afegim que a cada cèl·lula hi pot haver fins a un centenar de mitocondris, i dins de cada mitocondri s'hi poden trobar entre 1000 i 10000 còpies de la cadena d'ADNmt, el número total de mutacions pot ser molt gran.



FIGURA 13: Esquema de les disfuncions mitocondrials en el Parkinson

Font: Keane et al. 2011

En estudis realitzats sobre l'ADNmt dels mitocondris de les neurones de la substància negra en malalts de Parkinson es van observar múltiples delecions en aquest ADNmt. Una delecio és una mutació que consisteix en la pèrdua d'un fragment de la seqüència de nucleòtids de la cadena d'ADN que pot anar des de la pèrdua d'un sol nucleòtid a

molts més. Aquesta mutació es pot donar per culpa d'un error en la duplicació de l'ADNmt o per agents mutàgens externs. La deleció és una mutació important ja que afecta a tota la seqüència de nucleòtids de la cadena. Per exemple:

Hipotètic ADNmt	AAT-GTC-AGC	Deleció AAT	AGT-CAG
Hipotètic ARN	UUA-CAG-UCG	<del>UUA</del>	UCA-GUC
Hipotètica proteïna	Leu-Gln-Ser	-	Ser-Val

Com es pot observar en la taula anterior, la proteïna resultant és diferent a la que havia de ser al principi sense la deleció. Això és perquè amb la pèrdua de nucleòtids els *codons* (triplets de nucleòtids) queden alterats i codifiquen aminoàcids diferents als originals o en ocasions pot ser que es sintetitzi el mateix aminoàcid que al principi (per exemple tant el codó UCG com el codó UCA codifiquen l'aminoàcid Serina) però la resta de la seqüència és diferent que la original. Aquest canvi pot provocar que la proteïna resultant no sigui útil i pot portar problemes a la cèl·lula.

### 2.2.2. Neurotoxines

Com ja he comentat anteriorment, hi ha evidències de que la malaltia de Parkinson pot estar causada per neurotoxines, com per exemple la MPTP i la rotenona. Aquests components interfereixen en el funcionament normal dels mitocondris:

#### MPTP

La MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina) és un compost secundari que es pot formar a partir de la síntesi de meperidina (heroïna sintètica). La seva relació amb la malaltia de Parkinson es va descobrir per casualitat als Estats Units quan un grup d'heroïnòmans es van injectar de forma accidental aquesta substància. Aquests

individus presentàvem els símptomes característics del Parkinson i la seva simptomatologia desapareixia amb l-dopa. Més tard es va comprovar que l'administració de la toxina MPTP en animals de laboratori un síndrome parkinsonià associat a la neurodegeneració de les neurones dopaminèrgiques de la SNpc dels animals. Actualment és un dels models animals més utilitzats en Parkinson.

L'efecte tòxic de la MPTP es produeix quan aquesta substància travessa la barrera sanguínia-cerebral i es converteix en MPP<sup>+</sup>. La MPP<sup>+</sup> inhibeix el complex I del mitocondri, això produeix dèficits d'energia, radicals lliures i formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) que acaben provocant la mort neuronal.

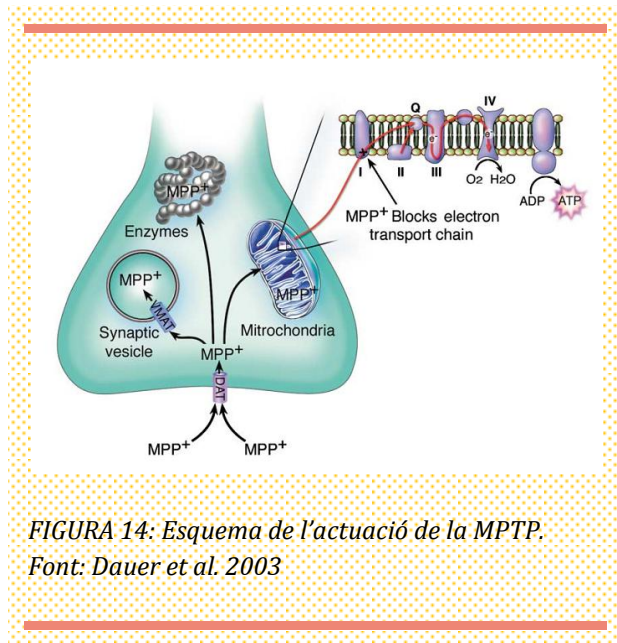


FIGURA 14: Esquema de l'actuació de la MPTP.  
Font: Dauer et al. 2003

### Rotenone

La Rotenona és un pesticida d'origen natural molt utilitzat. Igual que en el cas de la MPTP, la rotenona és capaç de travessar la barrera sanguínia-cerebral i interfereix la respiració cel·lular ja que bloqueja el complex I de la cadena de transport d'electrons en els mitocondris. Això provoca l'estrès oxidatiu i la conseqüent mort neuronal.

### 2.2.3. Proteïnes mitocondrials

Els estudis de famílies que pateixen Parkinson hereditari han permès identificar gens que codifiquen proteïnes mitocondrials. Les seves formes normals o mutades provoquen un mal funcionament dels mitocondris que pot desencadenar la malaltia.

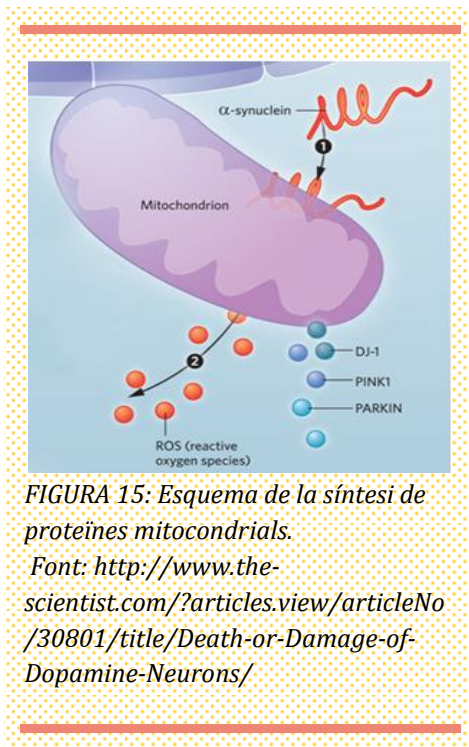


FIGURA 15: Esquema de la síntesi de proteïnes mitocondrials.

Font: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/30801/title/Death-or-Damage-of-Dopamine-Neurons/>

## Alfa-sinucleïna

L'alfa-sinucleïna és un gen que codifica una petita proteïna que es localitza en els terminals nerviosos. El primer vincle entre l'alfa-sinucleïna i la malaltia de Parkinson va venir de la detecció de mutacions en aquest gen en pacients amb la malaltia. De fet, la relació entre l'alfa-sinucleïna i el Parkinson està força contrastada pel fet que els cossos de Lewy (una acumulació de proteïnes molt característica de la malaltia) estan majoritàriament formats per alfa-sinucleïnes.

No està molt clar el mecanisme que relaciona l'alfa-sinucleïna i el mal funcionament dels mitocondris, de fet l'alfa-sinucleïna no és pròpiament una proteïna mitocondrial, però una explicació possible és que aquestes proteïnes s'acumulen en la l'espai intermembrana que és precisament on es produeix la respiració cel·lular. Aquesta acumulació de proteïnes interferiria en el complex I de la cadena del transport d'electrons. Això provocaria la producció excessiva de les espècies reactives d'oxigen (ROS) que podrien acabar amb la mort neuronal.

## Parkina, DJ-1 i PINK1

La Parkina, PINK1 i DJ-1 són gens que codifiquen proteïnes que estan clarament involucrades en la funció i resistència a l'estrès oxidatiu dels mitocondris. Algunes mutacions de la Parkina s'han relacionat amb formes juvenils de Parkinson. També s'ha comprovat que la parkina i provoca la degradació de l'alfa-sinucleïna. El *DJ-1* ajuda a protegir les cèl·lules de l'estrès oxidatiu. El *PINK1* codifica una proteïna activa en els mitocondris; les mutacions d'aquest gen sembla que augmenten la susceptibilitat a l'estrès cel·lular.

## 3. MODELS ANIMALS

---

Els models animals són una part essencial en la investigació biomèdica ja que permeten estudiar hipòtesis que serien molt costoses de verificar directament sobre els malalts.

L'experimentació "in vivo" amb animals de laboratori segueix uns protocols molt estrictes tant experimentals com ètics. Es tracta d'animals estandarditzats que tenen unes característiques físiques i genètiques molt ben definides i que s'han de criar en ambients controlats segons els requeriments específics de cada espècie i que garanteixin el benestar de l'animal. Els principis ètics que s'apliquen en la investigació "in vivo" es poden resumir en tres: (1) utilització del mínim nombre d'animals per tal que els resultats científics siguin vàlids; (2) utilitzar mètodes alternatius "in vitro" sempre que sigui possible, com ara els cultius cel·lulars, els models matemàtics o les simulacions amb ordinadors i (3) utilitzar procediments que minimitzin o eliminin el dolor dels animals.

A continuació descriu dos models animals, el model MPTP i el model PolG knock-out, que són els que he utilitzat en la part experimental del meu treball.

### 3.1. Model de ratolí MPTP

El model de ratolí MPTP de la malaltia de Parkinson s'obté mitjançant la injecció puntual o crònica de la toxina MPTP. L'administració de MPTP en els ratolins provoca la mort d'un nombre elevat de neurones dopaminèrgiques, especialment de la substància negra (SN). Aquesta pèrdua de cèl·lules de dopamina provoca en els ratolins uns símptomes semblants als de la malaltia de Parkinson relacionats amb problemes motors. Els signes es comencen a observar després d'aproximadament una setmana des de la injecció de MPTP.

Els ratolins tractats amb MPTP s'utilitzen com a model "in vivo" del Parkinson per estudiar les causes de la pèrdua de neurones dopaminèrgiques i també per estudiar l'efecte de nous fàrmacs.

### 3.2. Model de ratolí PolG KO

Aquest model animal, model PolG knock-out, també anomenat ratolí mutador de l'ADNmt, està dissenyat per poder estudiar el paper causal de les mutacions mitocondrials en l'envelliment.

L'any 2005 un grup de recerca americà va aconseguir uns ratolins amb mutacions a l'enzima ADN polimerasa gamma (PolG), que és la encarregada de duplicar l'ADN mitocondrial (ADNmt) i corregir els possibles errors que apareixen durant la duplicació. La mutació a l'enzima PolG els impedia corregir els errors de la duplicació i acumulaven diferents mutacions en el seu ADNmt a mesura que es feien grans i que es duplicava el seu ADNmt. Els investigadors van observar que aquests ratolins envellien més ràpid que els ratolins sans. Neixen sense defectes aparents però, al cap de 6 o 7 mesos comencen a mostrar signes d'envelliment prematur com pèrdua de pes, osteoporosi, fertilitat reduïda, pèrdua progressiva de l'oïda o reducció de l'activitat. El seu temps de vida també es redueix considerablement i moren al voltant de les 46 setmanes de vida.

L'any següent, estudiant teixit post-mortem d'humans es va veure que les persones amb l'edat també acumulaven mutacions en l'ADNmt i paral·lelament es van estudiar pacients de Parkinson als quals també es va observar que presentaven nombroses mutacions (Bender et al, Nature Genetics). Aquests estudis van portar a pensar als investigadors que les mutacions en l'ADNmt podien ser la causa de la neurodegeneració en la malaltia de Parkinson.

# PART PRÀCTICA

---



## 4. Hipòtesis i objectius

---

S'ha observat una relació entre la malaltia de Parkinson i l'acumulació de mutacions a l'ADN mitocondrial. El que es desconeix és si aquest gran nombre de mutacions és la causa primària que provoca la neurodegeneració característica del Parkinson o bé si aquest gran nombre de mutacions és la conseqüència del procés de neurodegeneració.

La hipòtesi de partida és:

- Un alt nombre de mutacions a l'ADN mitocondrial causa la neurodegeneració en la malaltia de Parkinson.

Els objectius concrets que em vaig proposar són:

- Determinar si les mutacions en l'ADNmt provoquen la mort de les neurones dopaminèrgiques i els seus terminals.
- Determinar si les mutacions en l'ADNmt augmenten la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a la toxina MPTP.

## 5. Disseny de l'experiment

Per poder estudiar la hipòtesi principal i els objectius concrets plantejats s'ha dissenyat un experiment amb models animals.

El laboratori disposa de ratolins transgènics amb una mutació a l'enzim ADN polimerasa gamma (PolG) que impedeix que corregeixin els errors de la duplicació de l'ADNmt i conseqüentment que s'acumulin errors en l'ADNmt.

Els ratolins amb la mutació al PolG s'anomenen knock-out<sup>2</sup> (KO) que vol dir que tenen anul·lada la seva capacitat de correcció d'errors de duplicació de l'ADNmt. Els ratolins sense aquesta mutació s'anomenen wild-type<sup>3</sup> (WT).

D'altra banda, a una part dels ratolins se'ls hi ha subministrat la toxina MPTP que provoca la mort de les neurones dopaminèrgiques, les mateixes neurones que es moren en la malaltia de Parkinson; injectant-los aquesta toxina és com es fan els models animals de la malaltia. Els ratolins amb la malaltia induïda s'anomenen "MPTP" i els que no s'anomenen "salins" perquè enlloc de la toxina se'ls subministra una substància salina innòcua.

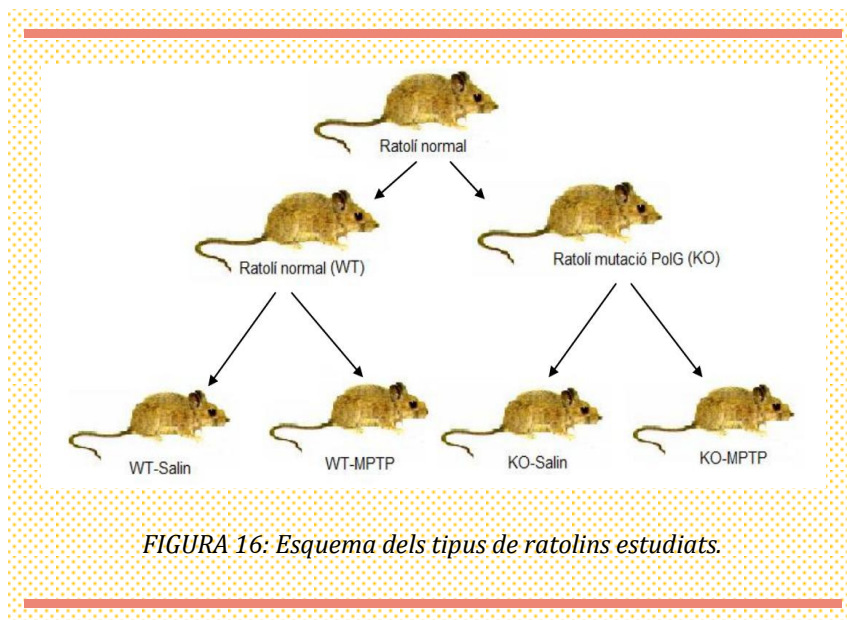


FIGURA 16: Esquema dels tipus de ratolins estudiats.

<sup>2</sup> En català, bloquejat

<sup>3</sup> En català, salvatge

La combinació d'aquests dos tipus de model animal dóna lloc a 4 tipus de ratolins: WT-Salins, WT-MPTP, KO-Salins i KO-MPTP (Veure Figura 16).

El grup de ratolins WT-Salins són els que no tenen modificat el gen PolG i no se'ls ha inoculat la toxina, per tant ens serviran com a grup de referència.

En aquest experiment s'han utilitzat un total de 20 ratolins. Tot i que aquest número pugui semblar gran, aquests 20 ratolins estan dividits en els quatre grups esmentats anteriorment i això fa que quedin pocs ratolins en cada grup. Concretament, el nombre de ratolins de cada grup és 4 WT-Salins, 8 WT-MPTP, 3 KO-Salins i 5 KO-MPTP. La intenció és combinar els resultats d'aquest experiment amb els resultats d'altres experiments previs i posteriors del laboratori.

Les zones del cervell que ens interessa observar en aquest estudi són les mateixes zones que es veuen afectades per la neurodegeneració que provoca el Parkinson: la substància negra pars compacta i l'estriat. La substància negra pars compacta, tal com està explicat a la part teòrica, és una zona petita del cervell on el 90% de les neurones són neurones dopaminèrgiques (neurones DA), les que es veuen afectades pel Parkinson; l'estriat en canvi és una zona molt més gran on arriben els terminals de les neurones DA. Estudiant aquestes dues zones podrem obtenir resultats tant dels cossos neuronals com de les terminacions nervioses dopaminèrgiques i ens podrem fer una idea general de com ha afectat la mort neuronal al cervell dels ratolins que estem estudiant.

He aplicat dos mètodes d'estudi diferents a cada zona del cervell: per a l'estudi dels cossos neuronals en la substància negra pars compacta he utilitzat un mètode de comptatge de neurones assistit per ordinador mentre que per a l'estudi de les terminacions nervioses en l'estriat he utilitzat una mesura de densitat òptica.

## 6. Fases de l'experimentació

1. Obtenció i tractament de mostres de cervells de ratolins transgènics i ratolins normals.
2. Comptatge de la quantitat de neurones dopaminèrgiques (neurones DA) de la substància negra pars compacta en cada cervell; mesura de la densitat òptica les terminals dopaminèrgiques en l'estriat de cada cervell.
3. Comparació de les quantitats de neurones DA i de les densitats òptiques de l'estriat entre ratolins transgènics i normals.

### 6.1. Obtenció i tractament de les mostres

Per poder realitzar l'observació dels cervells i determinar-ne el dany neuronal s'han de seguir uns passos previs d'obtenció i preparació de les mostres en els quals vaig participar: perfusió, talls dels cervells i immunohistoquímica. Aquests passos serveixen per obtenir les mostres en condicions òptimes per observar les neurones dels cervells de manera clara, per poder treure'n resultats i conclusions.

A continuació descriu aquests tres passos:

#### 6.1.1. Perfusió

Primer de tot s'han de *perfondre* els ratolins per poder obtenir el cervell en bones condicions, sense sang i amb les estructures intactes. Jo no vaig perfondre cap ratolí però vaig estar present a l'estabulari en tot el procés.

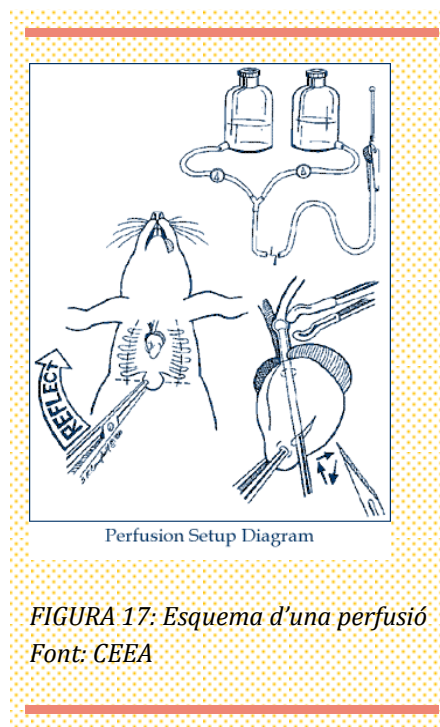


FIGURA 17: Esquema d'una perfusió  
Font: CEEA

Una perfusió consisteix en canviar la sang d'un ratolí per PFA i així fer que les estructures del cervell es mantinguin intactes per poder-les observar en bon estat i sense canvis; si no es fes la perfusió hi podria haver més neurones mortes de les que hi hauria d'haver només amb la influència de la toxina o de les mutacions i això podria distorsionar els resultats.

Procediment de perfusió pel cervell de ratolí:

- Adormir el ratolí amb una injecció intraperitoneal de 0,1ml de pentobarbital.
- Obrir l'estómac, trencar el diafragma i deixar el cor al descobert.
- Clampar la part inferior del ratolí per sobre del fetge per evitar que es perdi líquid cap a la part inferior del cos en perfondre.
- Punxar el cor en la cúspide direcció ventricle dret.
- Tallar la aurícula esquerra per deixar passar el líquid.
- Deixar passar 3 minuts de NaCl 0,9% i canviar el tub col·lector a PFA (paraformaldehid) 4% durant 8 minuts (9ml/min).
- Quan soni el cronòmetre el ratolí ha d'estar perfós, tallar el cap i extreure el cervell.
- Posar el cervell en un pot amb PFA 4% fred i deixar 24 hores a 4°C.
- Després canviar la PFA per Sucrosa 30% i deixar 48 hores a 4°C.
- A continuació congelar els cervells a -40°C.

Aquest procés està molt controlat i disciplinat i els ratolins no pateixen durant el procés ja que els adormen des del principi amb una petita dosi d'anestèsia. A més, l'estabulari és un lloc molt controlat on només hi pot entrar personal acreditat i t'has de vestir amb bata, gorro de plàstic pels cabells, peücs i guants per no portar cap microbi extern als ratolins o als altres animals que estan vivint allà.



*FIGURA 18: L'autora a l'estabulari durant la perfusió de ratolins*

En la perfusió que vaig presenciar es van perfondre deu ratolins que eren una part dels que posteriorment vaig examinar per determinar si havien patit mort neuronal o no.

Vaig tenir l'oportunitat d'anar a l'estabulari una segona vegada durant una operació a rates relacionada amb una altra línia de recerca del grup del Dr Vila. En aquest cas



*FIGURA 19: Foto de cervells de rata congelats.*

l'experiment té per objectiu determinar quin és el millor lloc del crani de les rates on la injecció d'un vector viral adenoassociat (AAV) en la substància negra serà més efectiva. En aquesta operació es va injectar un virus a les rates que inseria un gen que donava fluorescència a les neurones que l'havien adquirit. Això servia per determinar l'eficàcia de la injecció del AAV en funció del lloc on es realitzava la injecció. En aquest cas s'operava a sis rates i vaig ajudar a retornar-les a les gàbies i fins i tot vaig

injectar l'AAV a una de les rates.

### 6.1.2. Talls del cervell

Els cervells es posen en una solució de sucrosa perquè no es trenquin quan es congelen i es tallen després. Es fan 48 talls de la substància negra i 48 talls de l'estriat. El talls de la substància negra en recullen en 48 pouets i els de l'estriat en 48 més i es mantenen en fred (4°C) fins que es necessitin.

Per tallar-los s'utilitza un criostat, una màquina que fa talls histològics de gruix regulable que, en el cas dels cervells, es talla a 30µm de gruix. Durant el transcurs del tall, es selecciona la part de la substància negra i la de l'estriat de cada cervell, que són les parts que es recullen en els pouets, i les altres parts es descarten. Per diferenciar la part dreta de la part esquerra del cervell (ja que durant el següent pas estan submergits i es poden girar contínuament) es fa un petit



*FIGURA 20: Foto del criostat del laboratori*

forat a la part de dalt dreta del cervell ja que la substància negra, que és la que es vol estudiar, està a la part més baixa del cervell. Per la zona de l'estriat no importa quina banda és ja que es determina el color dels dos costats. En canvi en la substància negra només es fa un recompte de les neurones d'una de les bandes del cervell i després s'extrapola per obtenir resultats de les dues bandes, ja que es considera que als dos costats hi ha el mateix número de neurones.

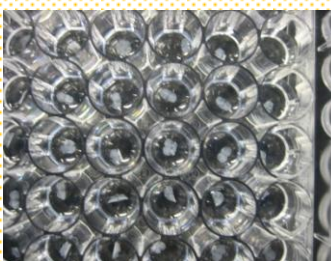
### 6.1.3. Immunohistoquímica

Els talls de cervell són de color blanc i al ser tan prims són transparents al microscopi. Per això, per poder observar bé les neurones cal que els talls de cervell passin per un procés de tinció. En aquest cas s'utilitza la tècnica immunohistoquímica ABC per tenyir les neurones DA.

Aquesta tècnica consisteix en submergir els talls de cervell en un anticòs primari que reacciona amb una proteïna que només està en les neurones DA i així es converteix en un tint específic. Després es submergeixen en un anticòs secundari que reacciona amb el primer anticòs i també amb una substància que reacciona amb el segon anticòs i és la que dóna color al tall.



*FIGURA 20: Treball durant la immunohistoquímica, omplint els pouets amb TBS.*

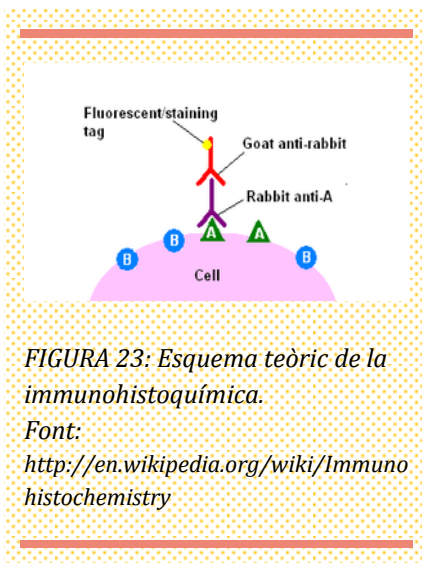


*FIGURA 21: Pouets amb talls de cervell de ratolí per la part de la substància negra.*

La tècnica de tinció i el posterior anàlisi del dany neuronal no s'aplica a tots els talls del cervell. Per a la substància negra s'agafen de manera sistemàtica un de cada quatre talls del cervell per tenyir-lo i analitzar-lo, és a dir, es consideren 12 talls que són representatius de tota la substància negra ja que s'agafen de manera que cobreix sistemàticament tota aquesta estructura. A partir de l'anàlisi d'aquests 12 talls s'extrapola el que seria la superfície real de la

substància negra. En l'estriat no s'hi han de comptar neurones, només es mira la densitat òptica de les fibres neuronals ja que en aquesta estructura no hi ha els cossos neuronals sinó que hi ha els axons que arriben de les neurones de la substància negra. En aquest cas s'agafen quatre talls representatius de cada zona de l'estriat per fer una representació de l'evolució de l'estriat en el cervell. Per tant, seguint aquest mètode al final es tenyeixen 12 talls de la substància negra i quatre de l'estriat de cada cervell.

Protocol per fer la immunohistoquímica en submersió per Tirosina Hidroxilasa (TH):



Primer dia:

- Per a la substància negra (tallada a 30µm de gruix) seleccionar una de les primeres quatre seccions a l'atzar i després agafar una secció cada quatre (un total de 12 seccions).
- Netejar els talls tres vegades en Tris Buffered Saline (TBS) 0,1M (500ml per pouet) durant 5 minuts cada bany.
- Banyar els talls durant 5 minuts en TBS + 10% metanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, per permeabilitzar-los.

- Netejar els talls en TBS tres vegades durant 5 minuts cada bany.
- Banyar els talls durant 60 minuts en TBS + 5% de normal goat serum (NGS), un bloquejador per impedir unions inespecífiques.
- Banyar els talls durant 48 hores a 4°C en agitació amb l'anticòs TH (Rabbit anti-TH, color lila a la figura 23) en TBS + 2% NGS.

Segon dia: Deixar els talls en repòs.

Tercer dia:

- Netejar els talls tres vegades en TBS durant 5 minuts cada bany.
- Banyar els talls en TBS + 2% NGS durant 60 minuts en Anti-rabbit (color vermell a la figura 23)
- Netejar els talls tres vegades en TBS durant 5 minuts cada bany.



- Banyar els talls durant 60 minuts en solució de ABC (preparar 30 minuts abans d'aplicar)
- Netejar els talls tres vegades en TBS durant 5 minuts cada bany.
- Banyar els talls en solució DAB (staining tag a la figura 23) durant 10-15 minuts amb poca llum perquè agafi color.
- Netejar els talls tres vegades en TBS durant 5 minuts cada bany.
- Muntar els talls en portaobjectes i deixar assecar durant la nit.

En acabar aquest procediment les zones dels talls on hi ha neurones DA o les seves terminals, com és el cas de la substància negra i l'estriat, estan tintades de color marró i que es poden diferenciar a simple vista gràcies a aquest tint específic.

En el cas dels talls de la substància negra, aquests es passen per un altre tintatge abans de muntar-los en el portaobjectes, el Violeta de Cresil, que tenyeix els nuclis i les vesícules, de manera que tot el tall queda de color blavós (es pot observar a la figura 25). Així es pot saber quan s'observa amb el microscopi si el que s'ha tenyit amb la immunohistoquímica són realment neurones o només fibres ja que les neurones tindran el nucli de color blau a diferència de les fibres que només seran marrons.

L'autora del treball i una de les tècniques de laboratori van fer la immunohistoquímica dels talls de cervell que després es van emprar per contrastar la hipòtesi de l'estudi. Seguint el procés descrit anteriorment, es van fer dos tintatges: un pels talls a la substància negra i un altre pels de l'estriat. Durant el procés s'han de passar els talls d'un pouet a un altre per anar-los submergint a les diferents substàncies.



*FIGURA 24: Durant la immunohistoquímica, passant un tall d'un pouet a un altre.*



*FIGURA 25: Foto dels talls de cervell en la zona de la substància negra després de ser tenyits.*

Aquest traspàs dels talls d'un pouet a l'altra s'ha de fer amb un pinzell ja que són talls molt prims i no es poden agafar amb pinces. Un cop submergits en la substància corresponent es deixen sobre una placa en moviment que fa que la substància es mescli i augmenti la superfície de contacte amb el tall. També es pot fer el procés d'immunohistoquímica sense submergir completament els talls, però aquest procés no s'utilitza al laboratori del doctor Miquel Vila ja que podria ser que no quedessin les dues cares dels talls tenyides amb la mateixa intensitat.

Tot el procés dura tres dies, encara que el segon no s'ha de fer res ja que s'han de deixar els talls banyats en l'anticòs primari sobre una placa motoritzada que va remouent els pouets. Amb això s'intenta que hi hagi el màxim nombre d'anticòs primari que entri en contacte amb la proteïna TH de les neurones DA perquè s'hi quedi adherit. D'aquesta manera, quan els talls es banyin en l'anticòs secundari, el marcador que ha de donar color al tall, la majoria de proteïnes TH estaran unides al primer anticòs i quedaran de color marró.

Aquest procés no és infal·lible i també es fan marcacions inespecífiques que tenyeixen parcialment altres neurones diferents de les DA. Això es corregeix en el cas dels talls de la substància negra passant els talls per un segon tintatge que tenyeix els nuclis i així es poden diferenciar les neurones de les fibres. En el cas dels talls de l'estriat no cal corregir el tintatge inespecífic amb una segona tinció ja que aquesta coloració inespecífica, concretament del còrtex del cervell, serveix com a mesura de densitat òptica de referència contra la qual compararem els valors de densitat òptica de l'estriat.

## 6.2. Comptatge i obtenció de dades

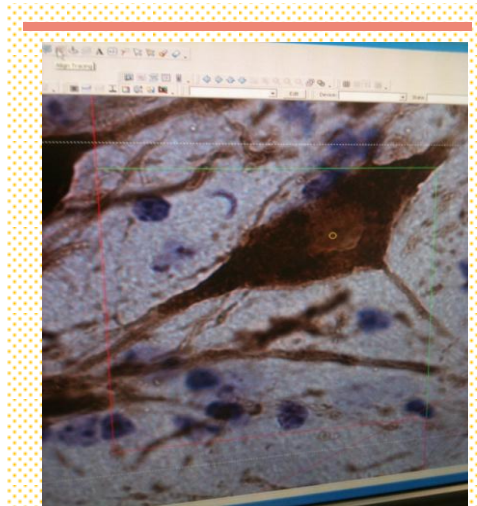
Quan ja es tenen les mostres preparades, cal observar els talls dels cervells per poder determinar si hi ha hagut mort neuronal o no. Per poder-ho fer es segueixen dos passos diferents, un per a cada una de les dues zones diferents del cervell que volem analitzar, la substància negra i l'estriat. Això és perquè, com ja he dit anteriorment, un mètode serveix per analitzar la quantitat de cossos neuronals i l'altra per determinar la

quantitat de terminals dopaminèrgics. Seguidament explico els dos mètodes detalladament.

### 6.2.1. Comptatge de neurones DA

El comptatge de les neurones es realitza amb un programa informàtic anomenat "Stereo Investigator" que permet fer un càlcul del nombre aproximat de neurones que hi ha en una determinada zona marcada.

El recompte de neurones consisteix en obtenir un resultat del nombre de neurones que té la substància negra pars compacta d'un cervell de ratolí. Cada portaobjectes té dotze talls del cervell d'un ratolí on es veu la substància negra. Com he dit anteriorment en l'explicació de l'immunohistoquímica, s'agafa un de cada quatre talls del cervell i així, analitzant cadascun dels talls es pot veure com evolucina el dany neuronal en la substància negra des de la part anterior del cervell a mesura que ens movem cap a la part posterior del cervell. Per fer el comptatge de les neurones s'estudia una sola banda del cervell, la mateixa en tots els talls i després l'ordinador ho extrapola a tot el cervell ja que es considera que les dues bandes del cervell tenen el mateix nombre de neurones. Si algun dels talls tingués danyat un costat de la substància negra, s'haurien de comptar les neurones de l'altra costat en tots els talls.

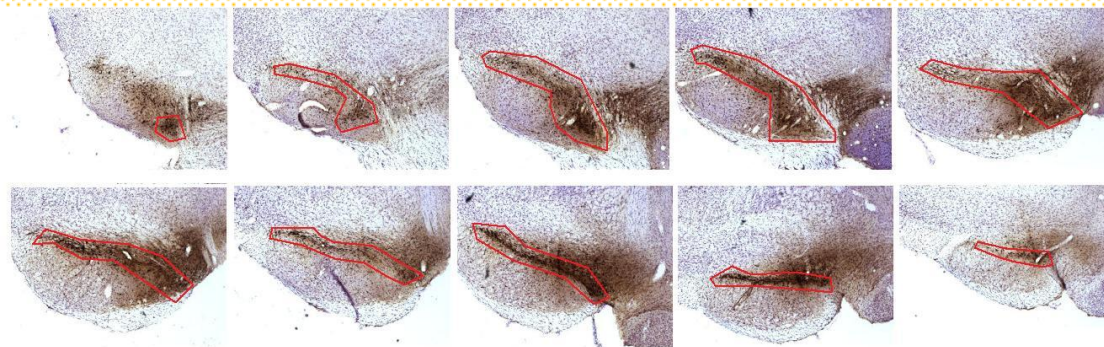


*FIGURA 26: Imatge d'una neurona DA a la pantalla de l'ordinador observada amb el microscopi.*



*FIGURA 27: Portaobjectes amb els talls de la substància negra d'un cervell de ratolí.*

Per poder aconseguir el número de neurones DA del cervell, es connecta un microscopi amb una càmera a l'ordinador. Aquest microscopi és un microscopi òptic de bona qualitat que permet obtenir una imatge clara dels cossos neuronals i dels talls en general. A més, el microscopi té una platina motoritzada que fa que la mostra es pugui moure de manera automàtica segons el programa de l'ordinador que s'utilitza i també manualment amb un comandament.



*FIGURA 28: Evolució de la substància nigra pars compacta en un animal control. En vermell s'indica la selecció de la SNpc.*

En primer lloc es col·loca el portaobjectes amb els talls de cervell que es volen observar a la platina i s'utilitza l'objectiu de quatre augments. Amb aquest objectiu es veuen els talls sencers i es comprova que tots els talls estiguin bé. En aquest moment es decideix quina de les dues bandes del cervell es comptarà, ja que pot ser que algun dels talls estigui trencat per la zona de la substància nigra d'una banda. Quan s'ha decidit quina de les dues bandes s'utilitza pel recompte, s'ha d'observar el primer tall i localitzar la substància nigra per marcar el seu relleu. Amb aquest relleu, l'ordinador sap que aquella és la zona que vols observar i analitzar.

El pas següent és canviar l'objectiu pel de 100 augments. Aquest és un objectiu amb oli d'immersió que permet veure una imatge nítida dels components del tall de cervell. Amb aquest objectiu es poden observar clarament les neurones i els seus terminals i filaments. A més, també es veuen els nuclis d'altres neurones de la substància nigra que no són dopaminèrgiques però no es veuen els seus cossos (amb la immunohistoquímica només queden de color marró les neurones DA, però el segon tint que tenyeix els nuclis no és específic i sí que tenyeix els nuclis de les altres

neurones). Això es pot observar a la figura 26 on es pot veure al centre una neurona de color marró, que és una neurona DA i pel voltant unes taques blaves que són els nuclis d'altres neurones.

Amb l'objectiu de 100 augments, l'ordinador divideix l'interior de l'espai marcat anteriorment, o sigui el relleu de la substància negra, en una graella. Aquesta graella està formada per rectangles de  $125 \times 100 \mu\text{m}$  i dintre d'aquests rectangles només es fa el recompte de neurones en un quadrat de  $50 \times 50 \mu\text{m}$  que representa una cinquena part de tot el rectangle. Amb una platina motoritzada, l'ordinador recorre tots els rectangles de la substància negra i, per a cada rectangle selecciona i mostra el quadrat on s'han de marcar els cossos neuronals que siguin visibles. Aquest quadre té les línies esquerra i inferior de color vermell i la superior i la de la dreta de color verd. Aquests colors serveixen de criteri pel recompte: si a una neurona l'atravessa una de les línies verdes la comptarem però si l'atravessa una vermella farem com si estigués fora del requadre i no la comptarem.

Com he dit abans, cada quadre on es realitza el recompte representa 1/5 part de la superfície total de cada rectangle de la graella i a partir d'això l'ordinador fa una extrapolació per obtenir el nombre total de neurones en la substància negra:

Si, per exemple, en el total dels 12 talls del cervell d'un dels ratolins hem comptat 200 neurones dopaminèrgiques, l'extrapolació del nombre total de neurones en la SNpc és:

$$200 \text{ neurones} \times 5 \times 4 = 4000 \text{ neurones en tota la SNpc}$$

Es multiplica per 5 perquè cada quadre que hem comptat és 1/5 part dels rectangles de la graella i es multiplica per 4 perquè hem agafat un tall de cervell de cada quatre.

Es va efectuar el recompte de les neurones de tots els ratolins estudiats. Després d'un aprenentatge previ per identificar la SNpc amb un

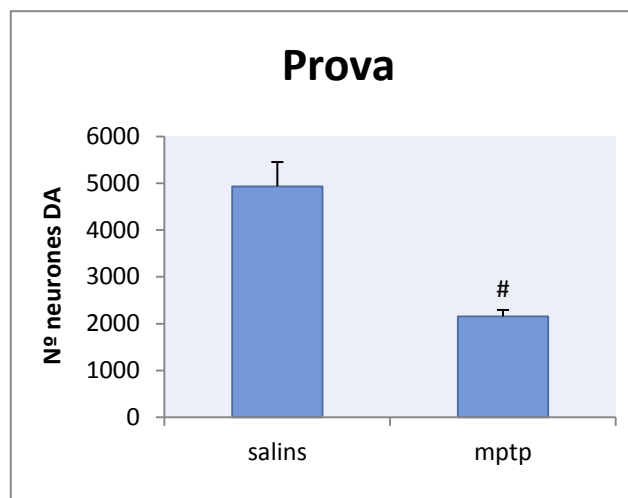


FIGURA 29: Esquema de com actua l'ordinador.

atles del cervell del ratolí i imatges com les de la figura 28, es van realitzar els recomptes. L'aprenentatge previ va incloure la realització del comptatge de talls d'experiments que ja s'havien comptat amb anterioritat. D'aquesta manera vam poden comparar els resultats dels meus comptatges amb els que havien obtingut ells. En aquesta prova vaig fer el recompte de tres cervells de salins, o sigui animals control als quals no se'ls hi ha administrat cap toxina, i tres cervells d'animals injectats amb MPTP, una toxina que provoca la mort de les neurones DA. Com que els resultats van ser molt semblants als que havien obtingut, ja vaig poder començar amb els cervells que he utilitzat per obtenir els resultats del meu treball.

Aquests primers comptatges es van fer a uns ratolins amb la dosi de MPTP que es sol utilitzar que és de 30mg/kg/dia de MPTP durant cinc dies consecutius i llavors es sacrifiquen els animals al cap de 21 dies després de la última injecció de MPTP. Serveixen de mostra per veure com afecte la toxina a les neurones DA.

	mitjana	SEM
salins	4933,333	516,5699
mptp	2153,333	136,7886



Aquests són els resultats de la prova realitzada. Es pot veure clarament que hi ha una diferència molt gran entre la mitjana del nombre de neurones DA dels ratolins salins i dels que tenen injectada la neurotoxina MPTP. En el gràfic es maraca amb un # la segona columna ja que, després de fer les proves estadístiques corresponents, es veu que la diferència entre un grup i l'altre és significativa ( $p < 0,05$  respecte els salins).

En aquest treball, com que un dels objectius és determinar si l'alt nombre de mutacions en l'ADNmt fa augmentar la sensibilitat de les neurones DA a la toxina



MPTP, els ratolins estudiats van rebre una dosi de la toxina inferior a la que es dona usualment. En aquest cas, es va donar una dosi que normalment no mata a les neurones (10mg/kg/dia durant cinc dies consecutius, sacrificant els animals també al dia 21 després de la última injecció de MPTP) perquè amb una dosi que matés moltes neurones en un ratolí normal no podríem veure si en els ratolins amb la mutació en la PolG se'n moren més (si fossin més sensibles a la MPTP).

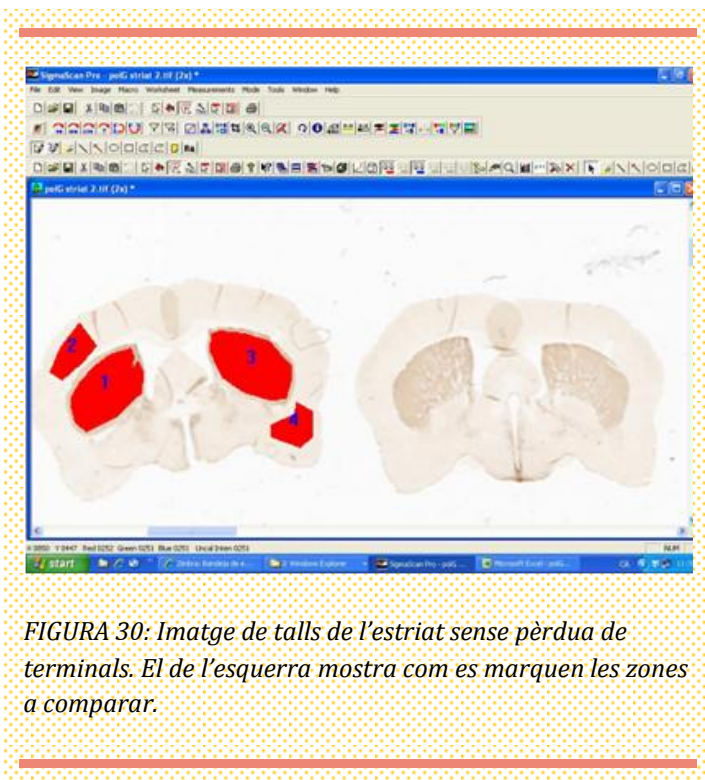
En el meu treball es va estudiar el cervell de 20 ratolins diferents però només es va poder comptar el número de neurones DA en 19 ratolins ja que un dels ratolins no va quedar ben tallat i la SNpc quedava trencada en tots els talls. Els resultats del recompte es mostren a l'apartat de resultats.

### 6.2.2. Densitat òptica de les terminals DA

En els talls de l'estriat s'ha de seguir un procediment diferent al que es segueix en la SNpc ja que en l'estriat no hi ha cossos neuronals DA, sinó que és on arriben els seus terminals. És important estudiar l'estriat ja que en el Parkinson el primer que es perd en la neurodegeneració són els terminals de les neurones. A més, això ens permetrà estudiar si la toxina MPTP i l'acumulació de mutacions en l'ADNmt tenen un efecte en la pèrdua de terminals en l'estriat diferent a la neurodegeneració observada en la SNpc.

La comprovació de si hi ha hagut pèrdua d'axons de les neurones DA no es pot fer amb un recompte ja que el número de terminals és molt gran i impossible de determinar quantitativament. L'alternativa que s'utilitza és comparar el color de l'estriat amb el color del còrtex, una altra part del cervell sense aquests terminals.

Com que els talls de cervell han passat prèviament pel procés de tintatge de la immunohistoquímica, els axons dopaminèrgics queden tenyits de color marró ja que a les membranes dels terminals també es troba la proteïna TH que reacciona amb l'anticòs que es posa per tenyir. Tot i això el còrtex, que no presenta ni neurones ni terminals DA, es tenyeix una mica de marró perquè també es fan marques inespecífiques. El procés per mesurar la pèrdua d'axons DA consisteix en compara el



*FIGURA 30: Imatge de talls de l'estriat sense pèrdua de terminals. El de l'esquerra mostra com es marquen les zones a comparar.*

color de l'estriat amb el color del còrtex. Si el color de l'estriat és molt semblant al del còrtex significa que hi ha hagut molta pèrdua de terminals DA.

El primer pas del procediment és escanejar per transparència els portaobjectes amb els talls de l'estriat i així obtenim una imatge dels talls a l'ordinador.

Després s'utilitza un programa d'ordinador que mesura la densitat òptica de la zona que marquis. Primer es selecciona una zona de l'estriat esquerra, mirant que no tingui cap arruga o brutícia ja que podria fer variar la densitat òptica de la zona. Seguidament es selecciona la zona del còrtex esquerra també evitant qualsevol arruga o brutícia que hi pugui haver. Es fa el mateix en la banda dreta. La figura 30 il·lustra aquestes seleccions. Aquest procediment es repeteix amb cadascun dels talls de l'estriat.

En el cas del l'estriat només s'utilitzen quatre talls de cada cervell on cadascun representa els canvis que fa l'estriat a mesura que s'avança cap a la zona posterior del cervell. Amb quatre talls ja és suficient perquè la zona de l'estriat és molt més gran i la mida i composició d'aquesta zona no varia tant com la de la SNpc.

Vaig buscar la densitat òptica dels 20 cervells dels ratolins que vaig utilitzar. A partir de les imatges escanejades i un ordinador amb el programa necessari vaig obtenir la densitat òptica dels diferents talls i zones. Després vaig passar els resultats a un Excel per poder-los analitzar i comparar. Els resultats queden reflectits en l'apartat de resultats.



### 6.3. Comparació de les quantitats de neurones dopaminèrgiques i de les densitats òptiques de l'estriat

Un cop obtingudes les dades sobre el comptatge de neurones DA a la substància negra i les densitats òptiques de l'estriat s'han de comparar els resultats dels diferents grups per poder determinar l'efecte de la toxina i de l'acumulació de mutacions a l'ADNmt.

En primer lloc he analitzat les dades a nivell descriptiu amb uns gràfics apropiats i resums numèrics (mitjana i error estàndard de la mitjana). Aquests resultats ja ens donen una primera idea de les diferències entre els grups.

Però per poder saber si les diferències que s'observen són realment significatives o no es necessari aplicar tècniques estadístiques més avançades, concretament he utilitzat la prova t de Student (t-test) i la prova d'anàlisi de la variància (ANOVA).

- El t-test serveix per comparar les mitjanes de dos grups diferents. Les hipòtesis que es contrasten són:

H0: No hi ha diferències en les mitjanes dels dos grups

H1: Les mitjanes dels dos grups són significativament diferents

Donat un nivell de significació  $\alpha=0.05$  (que representa el marge d'error de la prova), a partir de les dades observades es fan una sèrie de càlculs i es determina l'anomenat p-valor. Si el p-valor és menor que  $\alpha$  s'accepta H1, és a dir, les diferències són significatives.

- La prova ANOVA serveix per comparar les mitjanes de més de dos grups, en el nostre cas, dels quatre grups de ratolins.

H0: No hi ha diferències en les mitjanes dels quatre grups

H1: La mitjana d'algun dels grups és significativament diferent a les dels altres grups

Com abans, donat un nivell de significació  $\alpha=0.05$ , es calcula el p-valor amb els càlculs concrets de la prova ANOVA a partir de les dades observades i si el p-valor és menor que  $\alpha$  s'accepta H1, és a dir, les diferències són significatives.

## 7. RESULTATS

---

Resultats obtinguts durant l'experimentació en el laboratori.

En l'apartat 7.1 es mostren els resultats relacionats amb el recompte de les neurones dopaminèrgiques que vaig realitzar mitjançant un microscopi òptic i un programa informàtic que aproximava el número total de neurones en la substància negra pars compacta tenint en compte les meves observacions.

En l'apartat 7.2 es mostren els resultats de l'estudi de la densitat òptica de l'estriat del cervell que és on arriben els terminals de les neurones DA. Per obtenir els resultats vaig utilitzar un programa informàtic que mesurava la densitat òptica de diverses parts d'uns talls de cervell escanejats prèviament.

### 7.1. Resultats recompte neurones dopaminèrgiques

Les dades individuals del recompte de neurones dopaminèrgiques es troben a la taula A1 a l'annex. A continuació presento els resultats de l'anàlisi estadística d'aquestes dades:

La taula 1 conté el resum numèric dels resultats (mitjana i error estàndard de la mitjana) agrupats segons el tipus de ratolí. La figura 31 és un gràfic on es poden veure les diferències entre els 4 grups i la figura 32 conté 4 gràfics per comparar els diferents grups dos a dos.

*TAULA 1: Resum numèric del nombre de neurones DA en cadascun dels 4 grups (mitjana i error estàndard de la mitjana (SEM))*

	PolG wt		PolG ko	
	mitjana	SEM	mitjana	SEM
salins	6547,5	586,26	5980	407,06
mptp	6198,75	364,52	6585	533,50

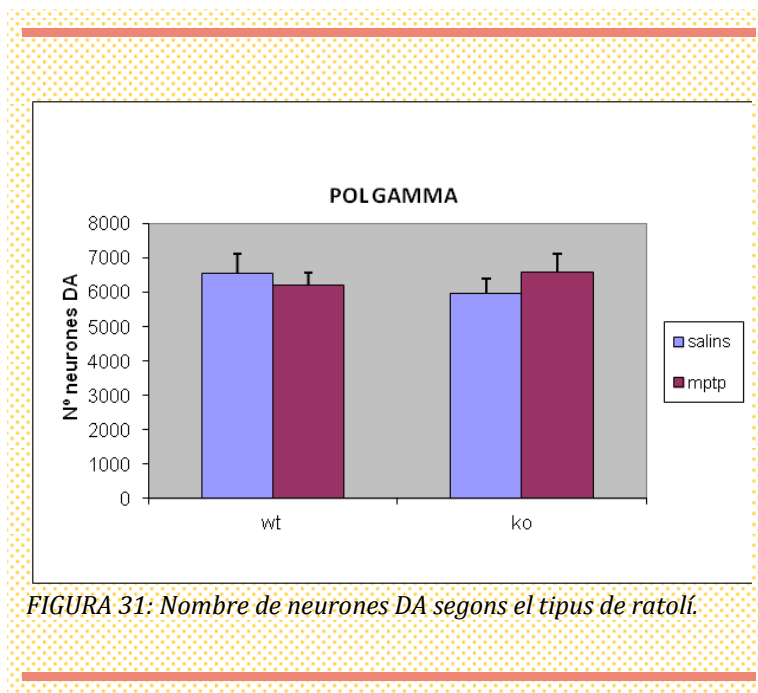


FIGURA 31: Nombre de neurones DA segons el tipus de ratolí.

Per interpretar els resultats d'aquestes dades prenc com a grup de referència el grup de ratolins "salins i PolG wt", que no han estat afectats ni per la neurotoxina MPTP ni per l'acumulació de mutacions a l'ADNmt deguda a un mal funcionament de PolG. Aquest grup de ratolins té un nombre mitjà de neurones DA igual a 6547,5.

A partir de la taula i també a partir dels gràfics podem veure diferències en el nombre mitjà de neurones dels diferents grups respecte al grup de referència:

1) Efecte de la toxina MPTP:

Si comparem els ratolins MPTP + PolG wt amb el grup de referència (figura 32, a) podem veure una disminució de neurones ( $6547,5 - 6198,75 = 348,75$ ) que és deguda a l'efecte de la toxina MPTP.

2) Efecte de l'acumulació de mutacions en ratolins PolG ko:

Si comparem els ratolins salins + PolG ko respecte als de referència (figura 32, c) trobem una disminució de neurones ( $6547,5 - 5980 = 567,5$ ).

En el primer cas les diferències que trobem són unes diferències esperades degut a l'efecte tòxic del MPTP.

En el segon cas, les diferències ens indiquen una pèrdua neuronal deguda a l'acumulació de mutacions en l'ADN mitocondrial dels ratolins PolG KO.

En canvi, quan es barregen aquests dos factors (l'efecte tòxic de l'MPTP i el mal funcionament de PolG) obtenim uns resultats inesperats:

### 3) Efecte conjunt de la toxina MPTP i l'acumulació de mutacions:

Si comparem els ratolins MPTP + PolG ko amb els de referència veiem que pràcticament no hi ha diferències (6547,5- 6585 = - 37.5).

Aquest resultat sembla indicar que els dos efectes es contraposen i es cancel·len.

De totes maneres, cal prendre aquests resultats amb cautela ja que a nivell estadístic aquestes diferències no són significatives. Per comprovar-ho he realitzat una sèrie de proves estadístiques: l'ANOVA de dos factors per comparar les mitjanes dels 4 grups i també he fet quatre proves T (en anglès, t-test) per comparar els grups 2 a 2. En tots els casos els resultats han sortit no significatius. El detall dels resultats d'aquestes proves es troba a l'apèndix.

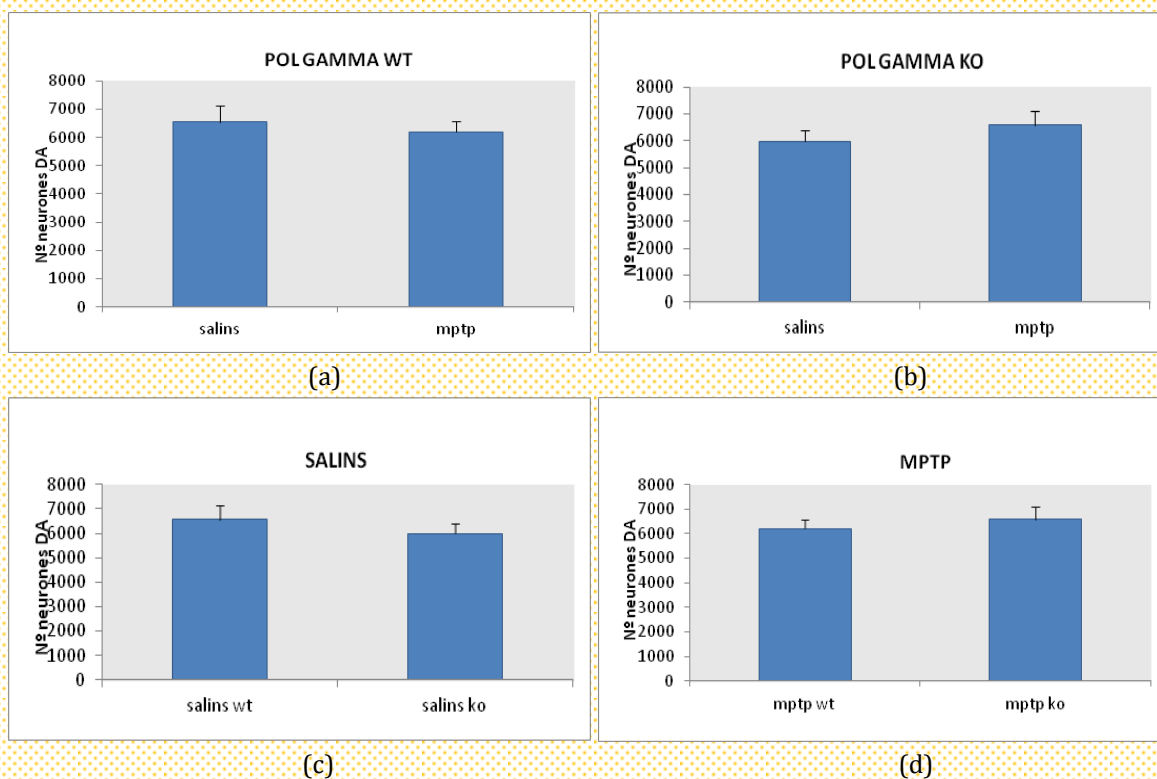


FIGURA 32: Nombre de neurones DA comparant els grups dos a dos.

Per a cadascun dels grups he calculat el percentatge de pèrdua neuronal respecte al grup de referència (salins + PolG wt) fent el càlcul  $100 \cdot (6547,5 - \text{mitjana}) / 6547,5$ . Els resultats estan a la taula 2.

*TAULA 2: Percentatge de pèrdua neuronal respecte al grup "salins + PolG wt"*

	PolG wt		PolG ko	
	% pèrdua	% pèrdua	% pèrdua	% pèrdua
salins	Ref		8,66	
mptp	5,32		-0,005	

## 7.2. Resultats densitat òptica de l'estriat del cervell

En aquest apartat presento l'anàlisi de les dades sobre la densitat òptica de l'estriat del cervell. Els valors individuals d'aquestes dades a la taula A2 a l'annex.

La taula 3 conté el resum numèric dels resultats (mitjana i error estàndard de la mitjana) agrupats segons el tipus de ratolí. La figura 33 és un gràfic on es poden veure les diferències entre els 4 grups i la figura 34 conté 4 gràfics per comparar els diferents grups dos a dos.

*TAULA 3: Resum numèric de la densitat òptica en cadascun dels 4 grups (mitjana i error estàndard de la mitjana (SEM))*

	PolG wt		PolG ko	
	mitjana	SEM	mitjana	SEM
salins	0,0699	0,0077	0,0539	0,0031
mptp	0,0529	0,0035	0,0521	0,0063

Tant a nivell gràfic com a partir de la taula 3 es pot veure que el grup de ratolins de referència "salins i PolG wt", que no han estat afectats ni per la neurotoxina MPTP ni per l'acumulació de mutacions a l'ADNmt, té una densitat òptica mitjana superior a la dels altres. Concretament, aquest grup té un densitat òptica mitjana de gairebé 0,07

mentre que els altres tres grups tenen densitats òptiques mitjanes molt semblants i molt més baixes, al voltant de 0,052.

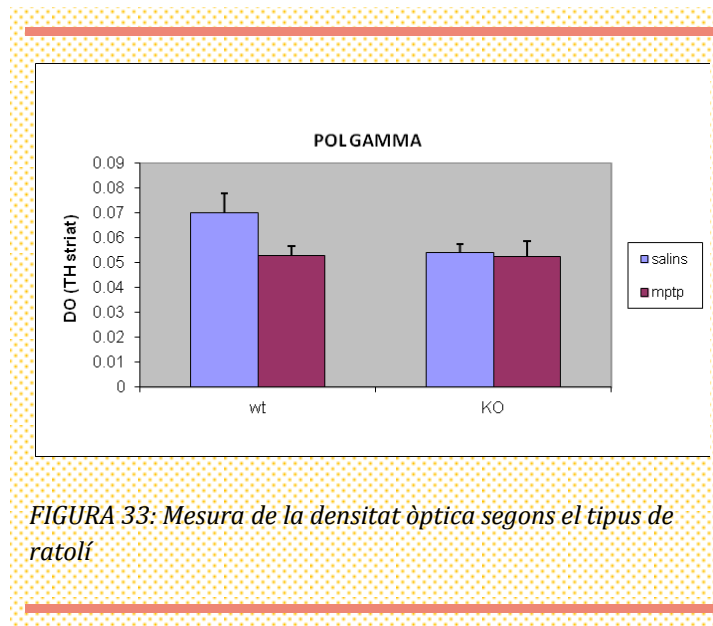


FIGURA 33: Mesura de la densitat òptica segons el tipus de ratolí

Igual que en el cas del nombre de neurones, he realitzat una sèrie de proves estadístiques per veure si aquestes diferències són significatives. Els resultats de les proves estan a l'apèndix. La prova T de comparació de les mitjanes de densitat òptica entre salins i MPTP en ratolins PolG wt ha sortit significativa. Això apareix expressat en la figura 34 (a) amb un símbol #.

Per a cadascun dels grups he calculat el percentatge de densitat òptica perdut respecte al grup de referència (salins + PolG wt) fent el càlcul  $100 \cdot (0,0699 - \text{mitjana}) / 0,0699$ . Els resultats estan a la taula 4.

TAULA 4: Percentatge de pèrdua en la densitat òptica respecte al grup "salins + PolG wt"

	PolG wt	PolG ko
	% pèrdua	% pèrdua
salins	Ref	22,89
mptp	24,32	25,46

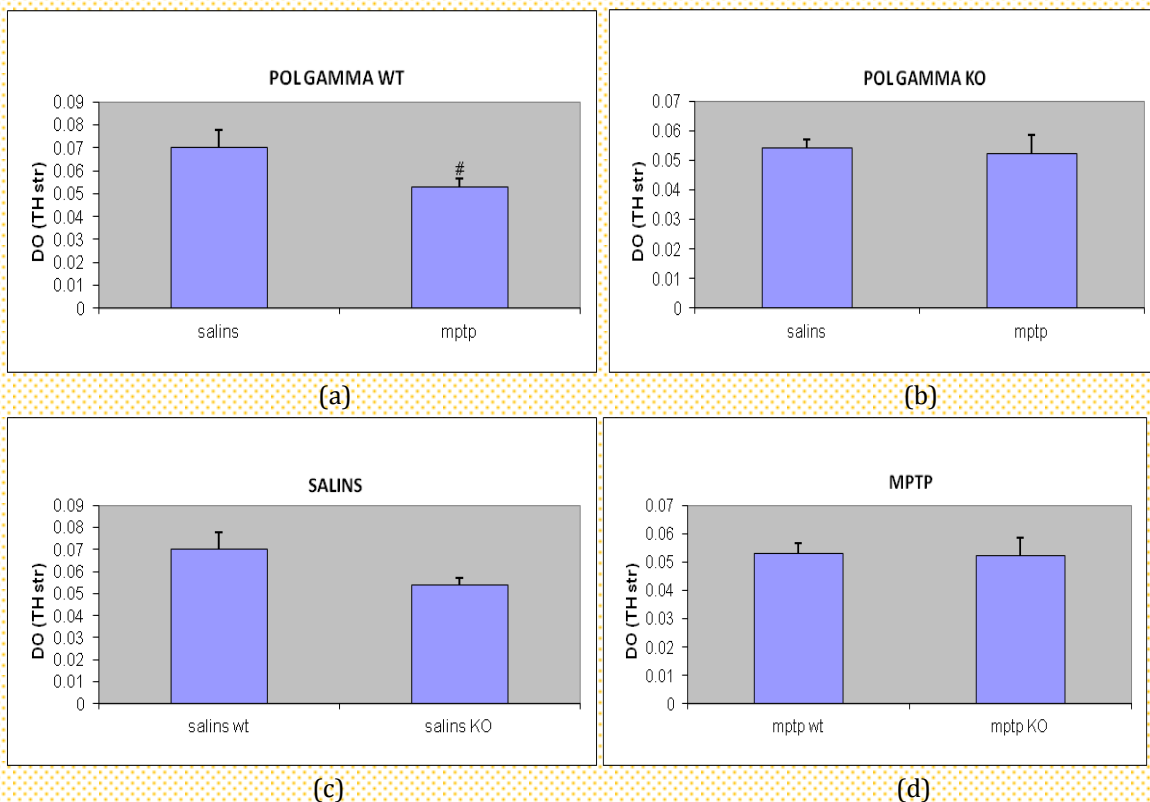


FIGURA 34: Mesura de la densitat òptica comparant els grups dos a dos.

El que ens indiquen aquests resultats és que la pèrdua de densitat òptica respecte al grup de referència (salins + PolG wt) per l'efecte de la toxina MPTP (24,32%) és molt similar a la pèrdua de densitat òptica deguda a l'efecte de l'acumulació de mutacions (22,98%), tot i que aquesta segona no és una diferència significativa. A més, quan s'ajunten aquests dos factors (MPTP + PolG ko) la pèrdua no s'acumula si no que es manté també molt similar (25,46%).

### 7.3. Resultats en relació als objectius plantejats

#### Objectiu 1:

Determinar si l'acumulació de mutacions en l'ADNmt provoca la mort de les neurones dopaminèrgiques i els seus terminals.

Hem observat:

- una certa pèrdua neuronal (8,66%) deguda a l'acumulació de mutacions en l'ADN mitocondrial dels ratolins PolG KO, similar a la provocada per la toxina MPTP (5,32%)
- una pèrdua de densitat òptica (22,98%) deguda també a l'efecte de l'acumulació de mutacions en l'ADN mitocondrial, similar a la provocada per la toxina MPTP (24,32%)

Podem concloure que:

1. Les mutacions en l'ADNmt provoquen per si soles una mort a nivell dels terminals molt semblant al de la neurotoxina MPTP però, com que la dosi de MPTP donada als ratolins és una que no es considera que mati les neurones, podem dir que no provoca mort neuronal.
2. Als cossos neuronals l'efecte de les mutacions en l'ADNmt no és tant notable com als terminals de les neurones.

## Objectiu 2:

Determinar si l'acumulació de mutacions en l'ADNmt augmenta la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a la toxina MPTP:

Hem observat que quan s'ajunten els efectes de la toxina MPTP i l'acumulació de mutacions:

- no s'observa mort dels cossos neuronals (-0,005%).
- la pèrdua de terminals en l'estriat és molt similar (25,46%) a la provocada per cadascun dels dos factors per separat (MPTP 24,32% i mutacions ADNmt 22,98%).

Podem concloure que:

3. Les mutacions en l'ADNmt no afecten a la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a la toxina MPTP.



## 8. Conclusions

---

Determinar els mecanismes que provoquen una malaltia complexa com una malaltia neurodegenerativa és un repte molt ambiciós. Cada malaltia és un món i descobrir quina n'és la causa és molt més difícil del que sembla. La malaltia de Parkinson no és una excepció ja que, tot i que fa molt temps que és coneguda, encara no se sap quin és el mecanisme concret que la causa. Per això el treball dels equips de recerca és tant important ja que el descobriment de la causa inicial de la neurodegeneració és el primer pas per trobar una cura per a la malaltia.

Hi ha diverses hipòtesis sobre la possible causa del Parkinson i una d'elles és la disfunció mitocondrial, en concret la provocada per l'acumulació de mutacions en l'ADN mitocondrial, que és precisament en la que he estat treballant. Els resultats dels experiments que he dut a terme ens ajuden a entendre millor la posició que ocupa la disfunció mitocondrial en la cadena d'esdeveniments que acaben en la mort neuronal. Concretament, dels resultats experimentals obtinguts podem arribar a les següents conclusions:

- Les mutacions en l'ADNmt no provoquen per si soles una mort de les neurones DA com la de dosis normals de la neurotoxina MPTP (que provoquen mort neuronal alta, semblant a la que provoca la malaltia).
- Als cossos neuronals l'efecte de les mutacions en l'ADNmt no és tant notable com als terminals de les neurones.
- Les mutacions en l'ADNmt no afecten a la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a la toxina MPTP.

Cal tenir en compte que aquests resultats estan basats en una mostra petita d'animals i per tant s'hauran de complementar amb altres experimentacions prèvies i posteriors per aconseguir augmentar l'espai mostral de l'experiment i la significació dels resultats.

Amb aquest treball espero haver aportat el meu granet de sorra en la investigació sobre el Parkinson i que els resultats d'aquest estudi serveixin per avançar en direcció al coneixement de la causa del Parkinson.

A nivell personal la realització d'aquest treball m'ha aportat molt. Gràcies a l'oportunitat que em va donar el Dr Miquel Vila, que em va permetre entrar en el seu laboratori i participar en la seva recerca, he pogut viure en primera persona com treballa un equip de recerca científic professional, acompanyant-los durant tot el mes de juliol i participant en aquesta branca de la seva investigació. M'he sentit tractada com una més de l'equip i he pogut fer una recerca independent dins el laboratori, que ha donat lloc al meu treball experimental. Aquesta experiència m'ha aportat un augment de la meua maduresa en l'àmbit científic i de recerca: he pogut treballar amb models animals, aplicar tècniques professionals com la immunohistoquímica a mostres i aconseguir resultats seguint els mètodes científics que utilitzen els professionals.

## 9. Bibliografia

---

DAUER, William i PRZEDBORSKI, Serge. "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models". *Cell Press*. Vol. 39, 11 de Setembre de 2003, pàgines 898-909.

VILA, Miquel i PERIER, Celine. "Mitochondrial Biology and Parkinson's Disease". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012;2:a009332, publicat originalment online el 8 de Novembre de 2011.

BOVÉ, Jordi , MARTÍNEZ-VICENTE, Marta i VILA, Miquel. "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights". *Nature Reviews*. Vol. 12, Agost de 2011, pàgines 437-450.

KRAYTSBERG, Yevgenya. "Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons". *Nature genetics*. Publicat online el 9 d'Abril de 2006.

EDGAR, Daniel. "The mtDNA mutator mouse: Dissecting mitochondrial involvement in aging". *Aging*. Vol. 1, nº 12, Desembre 2009.

KEANE, P.C. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease". *SAGE-Hindawi Access to Research*. Vol. 2011, 16 de Gener de 2011, 18 pàgines.

BENDER, Andreas. "High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease". *Nature genetics*. Publicat online el 9 d'Abril de 2006.

KUJOTH, G. C. "Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging". *Science*. Vol. 309, 15 de Juliol de 2005, pàgines 481-484.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE (NINDS). Transtornos neurológicos. Enfermedad de Parkinson: Esperanza en la Investigación. [http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson\\_disease\\_spanish.htm](http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm). [Consulta: Juny 2012]

KULISEVSKY, Jaume. "Enfermedad de Parkinson". *Guia terapèutica de la Societat Catalana de Neurologia*. [www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/.../enfermedad\\_de\\_parkinson.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/.../enfermedad_de_parkinson.pdf) [Consulta: Juny 2012]

FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE PARKINSON. Nº 16. Abril de 2008 <http://www.fedesparkinson.org/upload/20101103111017.pdf> [Consulta: Setembre 2012]

ROCHE ESPAÑA. Anatomía Patológica. Inmunohistoquímica.  
<http://www.roche.es/portal/roche-spain/inmunohistoquimica>. [Consulta: Octubre 2012]

VIQUIPÈDIA. Malaltia de Parkinson.  
[http://ca.wikipedia.org/wiki/Malaltia\\_de\\_Parkinson](http://ca.wikipedia.org/wiki/Malaltia_de_Parkinson) [Consulta: Setembre 2012]

LUQUIN, M<sup>a</sup> Rosario. UNIDAD DE NEUROLOGÍA EXPERIMENTAL, CLÍNICA UNIVERSITARIA DE NAVARRA. Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson.  
<http://www.uninet.edu/neurocon/congreso-1/conferencias/t-movimiento-2.html>  
[Consulta: Setembre 2012]

ENCICLOPÈDIA.CAT. <http://www.enciclopedia.cat/> [Consulta: Juliol 2012]

## 10. Glossari

---

**Axó:** Prolongació del citoplasma d'una neurona, generalment única i de longitud variable (d'uns microns fins a un metre), que condueix l'impuls nerviós.

**Cadena de transport d'electrons:** Sèrie de complexos proteics transportadors d'electrons que es troben a la membrana interna dels mitocondris que mitjançant reaccions bioquímiques produeixen ATP. És la fase final de la respiració cel·lular.

**Codó:** Triplet d'unitats de nucleòtids de l'ARN missatger que codifiquen un aminoàcid o final de missatge. La seqüència de codons té com a resultat una proteïna.

**Cos estriat:** Part a l'interior de l'encèfal. És la principal via d'entrada d'informació cap als ganglis basals. Al seu torn, el cos estriat rep informació de l'escorça cerebral.

**Espècies reactives de l'oxigen (ERO o ROS per *reactive oxygen species*):** S'inclouen ions de l'oxigen, radicals lliures i peròxids tant orgànics com inorgànics. Són generalment molècules molt petites altament reactives degut a que a la seva capa de valència hi ha electrons desaparellats. Aquestes espècies es formen de manera natural com a subproducte del metabolisme normal de l'oxigen i tenen un paper important en la senyalització cel·lular. Tot i això, en èpoques d'estrès ambiental els seus nivells poden augmentar molt, el qual pot provocar danys significatius a les estructures cel·lulars que porta a la situació d'estrès oxidatiu.

**Estrès oxidatiu:** Conseqüència d'un desequilibri entre la producció de les espècies reactives de l'oxigen i la capacitat del sistema biològic per destoxicar els reactius intermedis o reparar el dany que han causat.

**Ganglis basals:** Acumulacions de cossos de cèl·lules nervioses que es troben a prop de la base del cervell, dins del telencèfal. En els mamífers estan associats, fonamentalment, amb els moviments: les seves fibres s'enllacen amb el centre motor supraespinal del troc cerebral, conjunt de neurones que envien les seves fibres nervioses a la medul·la espinal. Els ganglis basals s'associen a moviments voluntaris realitzats de manera principalment inconscient, o sigui aquells que involucren el cos sencer en feines rutinàries o quotidianes. El dany dels ganglis basals implica la fallada

de la coordinació que suposa la aparició dels símptomes característics d'un trastorn motor global, especialment els característics de malalties com el parkinson, el bal·lisme i la corea de Huntington.

*Gens:* Seqüència d'ADN que conté la informació necessària per fabricar una proteïna.

*Malaltia neurodegenerativa:* Malaltia que causa la pèrdua de neurones de manera continuada, en general sense cura.

*Neurones dopaminèrgiques:* Neurones que el seu neurotransmissor principal és la dopamina i tenen una funció complexa relacionada amb l'aprenentatge.

*Neurotransmissor:* Molècula que utilitzen els animals per transmetre, amplificar i modular senyals elèctrics entre una neurona i una altra cèl·lula.

*Respiració cel·lular:* Conjunt de reaccions bioquímiques per les quals es degraden completament, per oxidació, determinats compostos orgànics fins a convertir-se en substàncies inorgàniques amb l'objectiu d'obtenir energia (en forma d'ATP) aprofitable per la cèl·lula.

*Sinapsis:* Unió intercel·lular especialitzada entre neurones o entre una neurona i una cèl·lula efectora (gairebé sempre glandular o muscular). En aquests contactes es porta a terme la transmissió de l'impuls nerviós. Aquest s'inicia com una descarrega química que origina un corrent elèctric en la membrana de la cèl·lula emissora i quan arriba a l'axó, la pròpia neurona segrega un tipus de compostos químics (els neurotransmissors) que es dipositen a l'espai sinàptic (espai intermedi entre la neurona transmissora i la neurona receptora). Aquests neurotransmissors són els encarregats d'excitar o inhibir l'acció de l'altra cèl·lula, anomenada cèl·lula postsinàptica.

*Substància negra:* Porció de l'encèfal on es localitzen les neurones dopaminèrgiques. Està dividida en dues parts generals, la part compacta i la difusa. En els humans la part compacta es tenyeix de color negre per l'efecte de la neuromelamina i per això s'anomena "negra".

# 11. Annex

## Dades del recompte de neurones dopaminèrgiques

TAULA A1: Resultats del recompte de neurones dopaminèrgiques

nom	tractament	tipus	neurones DA
s1	salins	wt	6330
s2	salins	wt	5610
s3	salins	wt	6000
s4	salins	ko	5970
s5	salins	ko	5280
s6	salins	ko	6690
s7	salins	wt	8250
m1	mptp	wt	4800
m2	mptp	wt	5340
m3	mptp	wt	7170
m4	mptp	wt	6840
m5	mptp	wt	5370
m6	mptp	wt	7620
m7	mptp	wt	6810
m8	mptp	wt	5640
m11	mptp	ko	5640
m12	mptp	ko	8100
m15	mptp	ko	6480
m16	mptp	ko	6120
m17	mptp	ko	-

## Dades de densitat òptica de l'estriat del cervell

TAULA A2: Resultats de la densitat òptica de l'estriat.

Nom	tractament	tipus	DO esq	DO dret	DO mitj
s1	salins	wt	0,0535	0,0558	0,0546
s2	salins	wt	0,0665	0,0526	0,0596
s3	salins	wt	0,0774	0,0785	0,0780
s4	salins	ko	0,0507	0,0505	0,0506
s5	salins	ko	0,0526	0,0495	0,0510
s6	salins	ko	0,0576	0,0631	0,0604
s7	salins	wt	0,0834	0,0915	0,0874
m1	mptp	wt	0,0723	0,074	0,0731
m2	mptp	wt	0,042	0,0398	0,0409
m3	mptp	wt	0,0669	0,0548	0,0608
m4	mptp	wt	0,051	0,0548	0,0529
m5	mptp	wt	0,0528	0,0557	0,0543
m6	mptp	wt	0,0474	0,0508	0,0491
m7	mptp	wt	0,0406	0,0497	0,0451
m8	mptp	wt	0,0485	0,046	0,0473
m11	mptp	ko	0,0687	0,0685	0,0686
m12	mptp	ko	0,0411	0,0392	0,0401
m15	mptp	ko	0,0345	0,0362	0,0354
m16	mptp	ko	0,05	0,059	0,0545
m17	mptp	ko	0,0594	0,0654	0,0624