

# **Estudi de la prevalença i l'agressivitat de l'Alzheimer en dones**

Pseudònim: Daniel Johnston

## **Agraïments:**

En primer lloc especial agraïment a la tutor/a d'aquest treball de recerca, per guiar aquest treball, corregir-lo i aconsellar en tot moment quin camí seguir pel correcte desenvolupament d'aquest estudi.

També, agrair al Dr. Josep Garre Olmo coordinador del ReDeGi per deixar-me analitzar la informació del registre i per aconsellar en l'anàlisi epidemiològic. A més, agrair a la Dra. Noemi Vidal Sarró del servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge per fer possible la quantificació del nombre de plaques  $\beta$ -Amiloide. Em va permetre estar una setmana treballant a l'Hospital de Bellvitge observant mostres de pacients d'AD i em va ensenyar el necessari per dur a terme aquest estudi. Addicionalment, tota la informació dels estadis de  $\beta$ -Amiloide i de la proteïna TAU de cada pacient va ser obtinguda per part de la Dra. Noemi Vidal Sarró i cedida per utilitzar-la en aquest treball. Finalment, agrair a l'estudiant de doctorat Alexandra Balaceanu qui, durant la meva estada a l'IRB (Institut de Recerca Biomèdica), em va ensenyar coneixements bàsics de biologia computacional i com utilitzar programes de visualització molecular. La estada a l'IRB va ser possible gràcies el programa Joves i Ciència de Catalunya la Pedrera del qual formo part.

De nou, agrair a tots els professionals que m'han obert les seves portes i m'han permès treballar al seu costat i que han fet possible aquest Treball de Recerca, moltes gràcies.

## **ÍNDEX**

<b>1. Introducció.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Hipòtesi .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Objectius.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Justificació.....</b>	<b>7</b>
<b>5. Metodologia .....</b>	<b>9</b>
<b>6. Anàlisi epidemiològica dades ReDeGi .....</b>	<b>10</b>
<b>6.1. Marc teòric.....</b>	<b>10</b>
<b>6.2. Procediment.....</b>	<b>12</b>
<b>6.3. Resultats.....</b>	<b>13</b>
<b>6.4. Anàlisi estadística.....</b>	<b>15</b>
<b>7. Comparació i anàlisi de mostres de cervell de pacients d'Alzheimer.....</b>	<b>18</b>
<b>7.1. Marc Teòric.....</b>	<b>18</b>
<b>7.2. Procediment.....</b>	<b>21</b>
<b>7.3. Resultats .....</b>	<b>22</b>
<b>7.4. Anàlisi estadística .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Conclusions .....</b>	<b>25</b>
<b>9. Annex .....</b>	<b>28</b>
<b>10. Referències .....</b>	<b>31</b>

## 1. Introducció

L'Alzheimer (AD) és una malaltia crònica neurodegenerativa. Afecta al cervell provocant la pèrdua de teixit cerebral i va empitjorant amb el temps. Comença afectant al llenguatge, sentit de l'orientació, etc. i finalment l'aparell locomotor portant a la mort <sup>i</sup>. La causa es desconeix. La teoria més acceptada proposa que la pèrdua de teixit cerebral està associada amb l'acumulació de plaques  $\beta$ -Amiloide que impedeixen la sinapsi entre neurones <sup>ii</sup>.

AD és la demència més comuna (60-70% de totes les demències) <sup>iii,iv</sup>. A més, els pacients d'AD necessiten ajudes mèdiques i normalment cuidadors. Només a Estats Units, l'AD comporta un cost de 236 bilions US\$ <sup>i</sup>. A causa del seu gran impacte, actualment s'estan realitzant molts estudis relacionats amb l'AD. Tot i així, és una malaltia molt desconeguda.

Els estudis epidemiològics mostren que el 95% dels pacients d'AD tenen més de 65 anys <sup>iii</sup>. També indiquen una major incidència de demències en els països del nord-oest d'Europa (respecte Europa) <sup>v</sup>. Per altra banda, s'ha demostrat que la prevalença a una demència augmenta amb l'edat (fins als 85 anys) <sup>vi</sup>.

S'ha observat que la incidència de demències és major entre les dones, especialment en el cas de l'AD. En general, les dones representen el 64% de tots els pacients d'AD <sup>i</sup>. La diferència entre home i dona augmenta amb l'edat, i la major diferència es troba amb pacients de 80 anys o més <sup>iv</sup>. El dilema es troba en determinar si aquesta diferència és deguda a la major esperança de vida de les dones o a altres factors com diferències cognitives o elements genètics.

## 2. Hipòtesi

Aquest treball es proposa respondre les següents preguntes d'investigació:

- Hi ha més casos de pacients d'AD dones que homes?

- 
- Tenint en compte que l'esperança de vida de les dones és major, tenen les dones més prevalença d'AD?
  - Afecta l'AD amb més agressivitat (major acumulació de plaques de  $\beta$ -Amiloide) a les dones que als homes?

Les hipòtesi principal d'aquest treball és la següent: **l'AD és més prevalent i més agressiu en les dones que en els homes**

### 3. Objectius

El primer objectiu principal d'aquest treball és determinar si les dones tenen major prevalença d'AD que els homes mitjançant l'anàlisi de les dades del Registre de Demències de Girona (ReDeGi). El segon és l'observació i anàlisi quantitatiu de mostres de cervells de pacients d'AD de l'Hospital de Bellvitge.

Un altre propòsit d'aquest treball és llegir i analitzar articles relacionats amb les diferències de sexe a tenir AD. És un tema molt estudiat però tot i així encara no s'ha trobat respostes clares.

Per analitzar les dades d'un registre és important entendre com funciona i aprendre a estudiar estadísticament la informació. Per això un dels objectius importants és saber utilitzar tècniques estadístiques com la t-student per comparar mitjanes i determinar si les diferències observades són significatives o no.

A més, per analitzar mostres de cervells és essencial dominar l'anatomia del cervell i entendre les tècniques de tinció. També observar la proteïna  $\beta$ -Amiloide i la proteïna TAU i a part de saber diferenciar-les, conèixer-les des d'un punt de vista bioquímic. Per tal de conèixer la seva estructura, serà necessari saber utilitzar programari de visualització molecular, en aquest cas VMD (Visual Molecular Dynamics) <sup>vii</sup>.

#### 4. Justificació

La hipòtesi que proposa aquest treball ha estat fruit d'analitzar articles científics que pretenen determinar si les dones tenen major prevalença a tenir AD o que en busquen la causa. S'han revisat estudis epidemiològics, articles basats en les diferències cognitives entre homes i dones, el factor genètic, la importància de les hormones, la influència de l'estil de vida i experiments amb animals.

Per explicar la major prevalença que tenen les dones a tenir AD, s'han investigat les diferències cognitives entre homes i dones. Un estudi del 2016 explica que les dones afectades per AD perden teixit nerviós més ràpidament que els homes <sup>viii</sup>. A més, s'ha demostrat que les dones tenen major flux sanguini cerebral i connectivitat en el còrtex parietal <sup>ix</sup>. Les zones amb gran connectivitat són en les que es deposita la proteïna  $\beta$ -Amiloide <sup>x</sup>.

Altres estudis proposen que la major prevalença de l'AD de les dones és causada per un element genètic. S'ha mostrat que les dones amb l'al·lel APOE  $\epsilon$ 4 tenen quatre vegades més risc d'AD <sup>xi</sup>, indicant que la presència d'aquest gen és un factor de risc importat per tenir AD <sup>xii,xiii</sup>.

La pèrdua d'estrògens (hormones femenines) ha estat demostrat com a possible causa de la major prevalença d'AD en dones. S'ha provat mitjançant estudis animals i cel·lulars que els estrògens milloren la formació de sinapsis neuronal a l'hipocamp <sup>xiv</sup>, milloren el corrent sanguini cerebral i el metabolisme de glucosa cosa que ajuda a reduir els agregats de  $\beta$ -Amiloide <sup>xv</sup>. Després de la menopausa les dones experimenten un pèrdua ràpida de hormones ovàriques <sup>xvi</sup>, augmentant el risc d'AD. Els homes també perden hormones, tot i així, és una pèrdua gradual <sup>xvi</sup>. A més, s'ha observat que l'ús d'hormonoteràpia (Hormone Replacement Therapy (HRT)), utilitzada per complementar la manca d'hormones just a l'inici de la menopausa, redueix el risc d'AD <sup>xvi</sup>. Si la hormonoteràpia es comença cinc anys després de la menopausa, s'ha observat que el risc d'AD es redueix un 30% <sup>xvii</sup>.

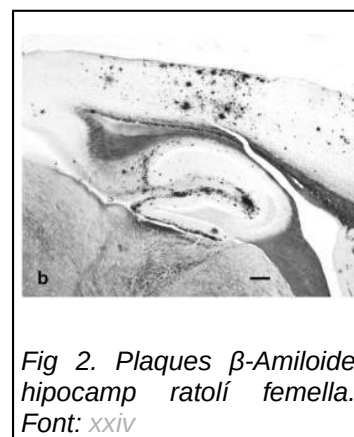
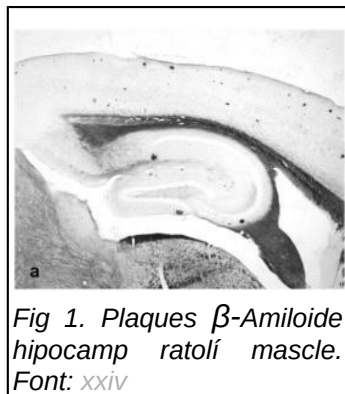
Articles recents mostren la relació de l'estil de vida amb la major incidència d'AD en dones. Estudis de neuropsicologia mostren que les persones amb una major

---

*reserva cognitiva* (major educació, millor dieta i menys estrès) poden tenir millor capacitat d'evitar malalties cerebrals <sup>xviii</sup>. La baixa habilitat mental durant la infància augmenta el risc de demència <sup>xix</sup>. En general els estudis mostren que l'activitat mental pot ajudar evitant malalties cerebrals. Les persones grans d'ara van viure durant un temps en que els homes tenien més oportunitats que les dones. Els homes rebien millor educació i tenien feina, mentre que les dones s'havien de quedar a causa fent feines de la llar. Conseqüentment, el fet que en general les dones tenien un estil de vida menys actiu mentalment, podria ser l'explicació de que al ser grans tinguin major risc d'AD <sup>xx</sup>.

Altres aspectes de l'estil de vida a part de l'activitat mental han estat relacionats amb la incidència d'AD. Estudis recents han analitzat com activitats específiques i experiències poden influir potenciant o evitant l'AD <sup>xxi</sup>. Alguns estudis suggereixen que l'estrès psicològic pot augmentar el risc d'AD <sup>xxii</sup>. Per altra banda, dietes completes que continguin alts nivells de peix, fruita i verdura poden reduir el risc d'AD a causa de la presència de les vitamines E i C <sup>xxiii</sup>.

A part dels estudis epidemiològics, s'han realitzat experiments amb animals fets amb ratolins per determinar com l'AD afecta als mascles i a les femelles <sup>xxiv</sup>. Els ratolins es van modificar genèticament (Tg2576) per ser portadors de la mutació sueca APP695SWE <sup>xxv</sup>, que sobreexpresa la proteïna precursora de  $\beta$ -Amiloide, de tal manera que es formen plaques de  $\beta$ -Amiloide provocant que els ratolins tinguin AD. Es van utilitzar 91 ratolins (32 mascles i 59 femelles) de 15 mesos d'edat. A més, els ratolins van ser analitzats a les edats de 8 mesos (5 mascles i 7 femelles), 12 mesos (9 mascles i 9 femelles) i 19 mesos (6 mascles, 7 femelles)



(Fig. 1). Els resultats van mostrar que les femelles ratolins Tg2576 tenien més agregacions de  $\beta$ -Amiloide. La diferència va ser significativa en els ratolins de 15 i 19 mesos. A aquestes edats, les femelles ratolins Tg2576 tenien gairebé tres vegades més percentatge d'àrees de plaques xxiv.

## 5. Metodologia

Per tal d'assolir el objectius citats anteriorment, aquest treball es dividirà en dues parts. La primera part es tracta d'una anàlisi epidemiològica de les dades del Registre de Demència de Girona (ReDeGi).

En la informació estudiada del ReDeGi hi apareix el nombre de casos d'AD dividits en homes i dones. Les dades epidemiològiques ens donen una visió molt general de com una malaltia incideix sobre una població determinada. És el punt de partida per determinar si hi ha diferències entre homes i dones al patir AD. A part d'analitzar les dades es realitzarà un càlcul de la prevalença, és a dir, la proporció d'individus que pateixen una malaltia respecte la població sobre la qual es fa l'estudi.

En la segona part d'aquest projecte, es pretén observar amb quina agressivitat l'AD afecta a homes i a dones. Una manera de saber-ho és quantificant el nombre de plaques de  $\beta$ -Amiloide mitjançant l'observació de mostres de cervells de pacients d'AD. Calculant amb l'ajuda d'un Microscopi Òptic quantes plaques s'acumulen en pacients homes i en pacients dones, podrem determinar amb quina agressivitat l'AD afecta als dos sexes i si hi ha diferències.

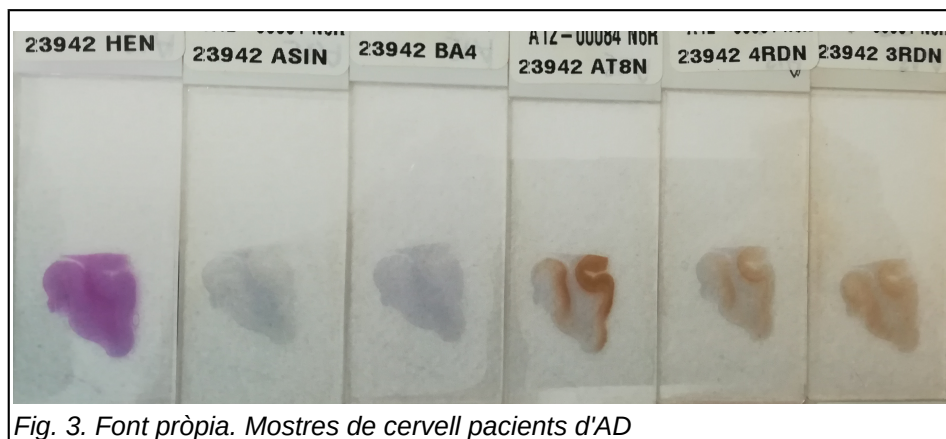


Fig. 3. Font pròpia. Mostres de cervell pacients d'AD



En les dues parts del projecte s'analitzaran estadísticament els resultats amb la prova t-student mitjançant la utilització del programa SigmaPlot versió 11.0. D'aquesta manera podrem saber si la diferència en els casos d'AD, la prevalença i el nombre de plaques entre homes i dones és significativa o no.

## 6. Anàlisi epidemiològica dades del ReDeGi

### 6.1.- MARC TEÒRIC:

Els registres de malalties guarden informació dels pacients d'una regió concreta obtenint informació sobre la malaltia i el seu progrés al llarg del temps. L'anàlisi i la interpretació d'aquestes dades dóna lloc a hipòtesis les quals seran confirmades o falsades en estudis experimentals <sup>xxvi</sup>. A més, els registres estimen els costos de la malaltia i regulen els procediments d'enregistrament <sup>xxvii</sup>. La informació sobre els pacients arriba des dels centres hospitalaris al realitzar-se un diagnòstic.

Per tal de diagnosticar si una persona té AD es realitzen diferents proves. En primer lloc es revisa la història clínica del pacient i es realitza un examen físic. Tot i que no acostuma a ser necessari, un test genètic permet saber si el pacient té el gen APOE-e4. El *Mini-mental state exam* (MMSE) avalua sobre 30 la memòria, l'habilitat de solucionar problemes simples i en general habilitats cognitives. En aquest test es realitzen preguntes al pacient com si coneix la hora i data i a on es troba, i si pot recordar una llista de paraules o si pot realitzar operacions simples. Si el resultat del test és de 20-24 suggereix demència lleu, de 13-20 demència moderada i de 13-20 demència severa <sup>xxviii</sup>. Un altre test molt comú és el *mini-cog* (Fig. 4) en el qual es demana al pacient que recordi tres objectes i els repeteixi al cap d'uns minuts. En la segona part del test el pacient ha de dibuixar un rellotge. Segons el resultat d'aquest test es determina si el pacient pateix AD i el més important, en quin estadi es troba <sup>xxix</sup>.

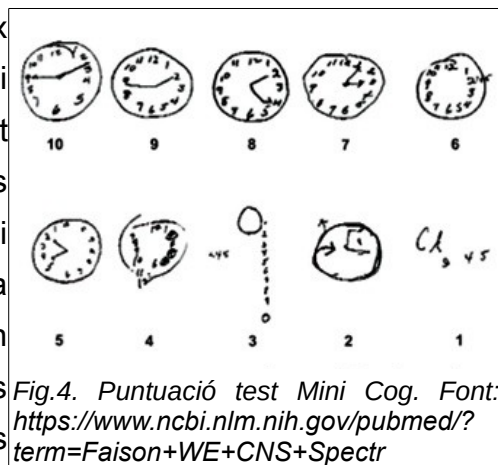


Fig.4. Puntuació test Mini Cog. Font: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Faison+WE+CNS+Spectr>

El Registre de Demències de Girona (ReDeGi) rep i analitza informació de pacients que pateixen demències dins la Regió Sanitària de Girona. Va ser fundat el 2005 i des del 2007 rep dades de l'Hospital de Santa Caterina, l'Hospital Universitari Josep Trueta, la Corporació de Salut del Maresme i la Selva, la Fundació Salut Empordà, l'Hospital Comarcal de la Garrotxa i Olot, L'Hospital de Campdevàrol i dels Serveis Integrats de Salut del Baix Empordà xxx.

Per la rellevància a nivell Europeu i per la seva col·laboració amb el ReDeGi, el Registre de Demència Suec (Swedish Dementia Registry) (SveDem) representa un registre de referència a nivell d'Europa. Durant el juny de 2017 el registre va realitzar una conferència a Girona en la qual vaig assistir i a partir de la qual em vaig proposar investigar sobre aquest registre. El Sve Dem va ser fundat l'any 2007. El 95% de les clíniques sueques en les que es realitzen diagnòstics de demències envien la informació a SveDem xxxi. A diferència del ReDeGi, a Suècia són el propis doctors el quals enregistren la informació directament a la base de dades. S'enregistra informació detallada dels tests realitzats en el diagnòstic i informació aparentment no tant important com per exemple si el pacient condueix o quantes llengües sap parlar. L'alta fiabilitat i la utilitat de les dades enregistrades a SveDem són degudes a la regularització del protocol del diagnòstic (protocol ICD-10) i l'obligat enregistrament que han de realitzar els propis doctors xxxvi.

L'anàlisi estadística és essencial per interpretar els resultats obtinguts. Tal i com s'ha indicat anteriorment per analitzar els resultats es realitzarà la prova t-student mitjançant el programa SigmaPlot 11.0. El SigmaPlot és un software de creació de gràfics i d'anàlisi estadístic que permet anar més enllà dels simples fulls de càlcul. La prova t-student és un test estadístic que indica si la diferència entre dues mitjanes és significativa o només és causada per l'atzar xxxii. Al realitzar aquesta prova ens formulem la hipòtesi nul·la i la hipòtesi alternativa. La hipòtesi nul·la ens diu que no hi ha diferència entre les dues mitjanes i la hipòtesi alternativa ens diu que hi ha una diferència significativa. En aquest treball no s'entrarà en el procediment matemàtic d'aquest test ja que s'utilitzarà un programa informàtic. Tot i així a continuació s'explicarà com interpretar l'anàlisi que ens fa el programa.

---

En primer lloc, la t-student és una prova que s'utilitza si tens unes dades amb una  $n$  (el nombre de valors) baixa. El propi programa SigmaPlot indica quina prova estadística realitzar amb les dades que tens. Un cop entrem els valors obtenim un informe de la prova. En primer lloc si les dades han passat o no els tests necessaris per realitzar les proves.

- Test de Normalitat: en la t-student les dades han de seguir una distribució similar a la distribució normal o gaussiana xxxiii.
- Test de Homogeneïtat de variàncies: és la igual desviació respecte la mitjana entre dos grups.

Si passen aquests tests, obtenim els resultats de les proves. Aquests ens indiquen la  $n$ , la mitjana de les variables, la desviació estàndard (Std Dev) i l'error estàndard de la mitjana (SEM). La desviació estàndard mostra quanta variació hi ha respecte la mitjana. L'error estàndard de la mitjana calcula les oscil·lacions entre la mitjana de les dades i la mitjana poblacional (el valor real de la mitjana)xxxiv. També ens dóna el valor de la diferència entre dues mitjanes.

Finalment obtenim el valor de la  $t$ , i el nombre de graus de llibertat ( $n-1$ ). Amb aquests dos valors s'obté el valor de la probabilitat ( $p$ ) que la hipòtesi nul·la sigui correcta. Escollim el valor de ( $p=0,05$ ) per sota del qual es considera que la diferència es significativa. El propi programa analitza els resultats i indica quina hipòtesi s'accepta.

## 6.2.-PROCEDIMENT:

Del 2007 al 2014 el ReDeGi ha estat guardant informació dels casos d'AD en la Regió Sanitària de Girona. La informació donada pel ReDeGi mostra el nombre de casos d'AD del 2007 al 2014 dividits per edat (65-69, 70-74, 75-79, 80-84, 85+) i dividits per sexe xxxv. Les dades del ReDeGi contenen 3069 casos d'AD. La pàgina web d'estadística oficial de Catalunya anomenada Idescat xxxvi, conté la informació de la població de la mateixa àrea en la que el ReDeGi registra els casos d'AD durant el mateix període xxxvi. La població de l'àrea de Girona de 2007 a 2014 de 65 a més anys va ser de 934423 habitants.

Per tal de veure si les dones tenen més prevalença a tenir AD, s'ha comparat i analitzat la informació del ReDeGi amb la població de l'àrea de Girona de 2007 a 2014 per majors de 65 anys.

Per obtenir uns resultats que tinguin en compte la població, es calcula la prevalença. La prevalença és el tant per cent de la població que té AD tant per homes com per dones:

*Fórmula 1*

$$\frac{\text{número de pacients (home o dona)}}{\text{població (home o dona)}} \cdot 100$$

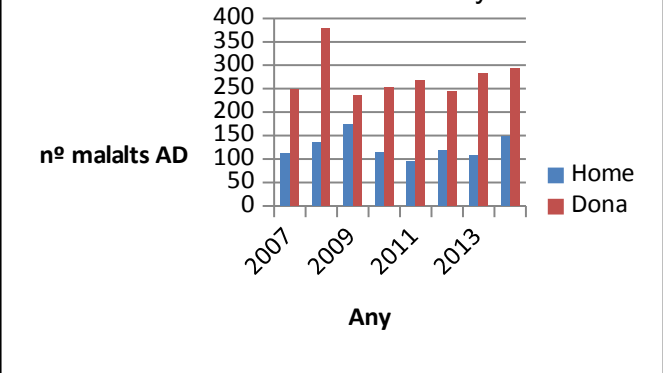
Utilitzem la fórmula anterior per calcular el percentatge d'AD cada any del 2007 al 2014 per cada rang d'edat, per homes i per dones. Amb els resultats obtinguts realitzem la prova t-student explicada anteriorment.

### 6.3.-RESULTATS:

Taula 1: N° de malalts d'AD i prevalença de 2007 a 2014 dividits per sexe						
Any	Home		Dona		Total	
	Nombre de pacients	Prevalença (%)	Nombre de pacients	Prevalença (%)	Nombre de pacients	Prevalença (%)
2007	111	0,22933	249	0,40337	360	0,328185
2008	135	0,27573	243	0,38743	378	0,33846
2009	174	0,34861	236	0,36953	410	0,36035
2010	113	0,22253	252	0,38840	365	0,31558
2011	94	0,18167	267	0,40463	361	0,30664
2012	119	0,22555	244	0,36349	363	0,302783
2013	108	0,20103	282	0,41352	390	0,319887
2014	148	0,26970	294	0,42487	442	0,356239

A la Taula 1 es mostra la informació dels casos d'AD en l'àrea de Girona de 2007 a 2014 dividit per sexe (A l'annex la taula 11 completa amb la divisió segons intervals d'edat). Durant aquest període hi ha hagut un total de 3069 casos d'AD. D'aquests, 1002 pacients són homes i 2067 són dones. Per tant el 67,35% de tots els casos són dones.

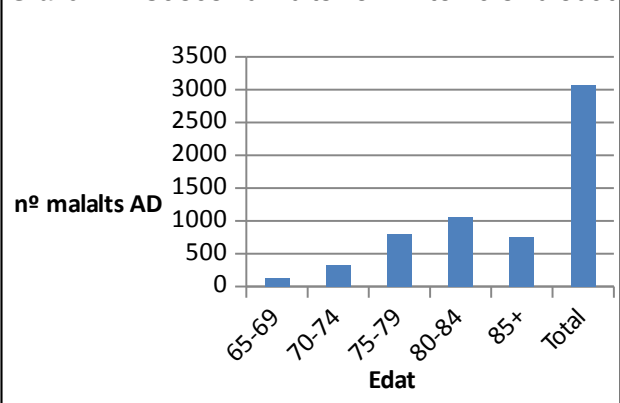
Gràfic 1: Casos AD home/dona anys 2007-2014



El gràfic 1 mostra l'evolució dels casos d'AD en homes i dones del 2007 al 2014. El 2008 observem una major diferència entre homes i dones.

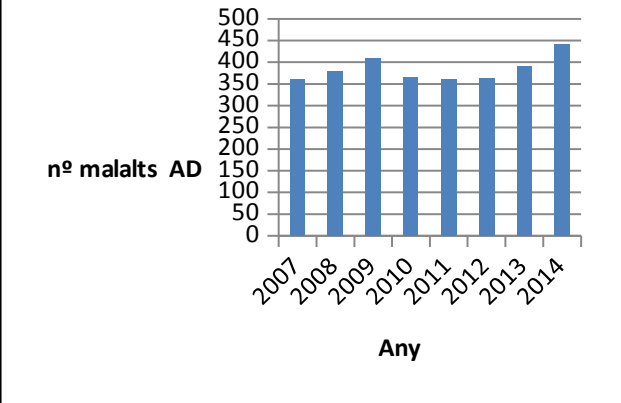
Tal i com observem en el gràfic 2 trobem el major nombre de casos d'Alzheimer entre 75 i 85 anys. L'interval d'edat amb més casos de pacients és de 80 a 84 anys (Gràfic 2). Independentment del sexe el nombre de casos d'AD incrementa de 2011 al 2014. El 2011 es van registrar 361 casos mentre que en 2014 se'n van registrar 442 (Gràfic 3).

Gràfic 2: Casos dividits en intervals d'edat



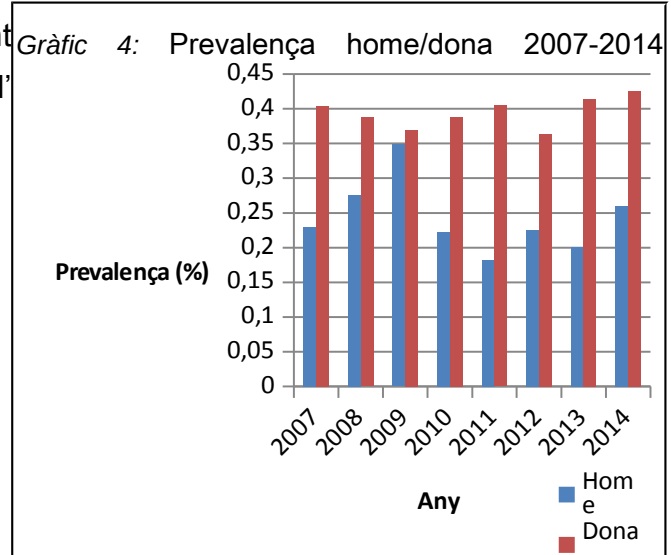
La Taula 1 mostra els percentatges realitzats amb la fórmula 1 que representen la prevalença. La població utilitzada pels percentatges és la població de l'àrea de Girona durant els anys i dividits per les edats

Gràfic 3: Casos totals AD 2007-2014



que mostra la taula. La mitjana de prevalença en homes és de 0,2440% mentre que en dones és del 0,3947%.

En el gràfic 4 observem la diferent prevalença entre homes i dones d'AD de 2007 a 2014.



#### 6.4.- ANÀLISI ESTADÍSTICA: T-student

La prova t-student s'ha utilitzat per determinar si la diferència de casos d'AD entre homes i dones és significativa i si la diferència en la prevalença entre homes i dones és significativa.

En el primer cas la hipòtesi nul·la és que no existeix diferència entre els casos d'homes i de dones i la hipòtesi alternativa que existeix una diferència significativa entre homes i dones.

En primer lloc inserim la taula següent al programa SigmaPlot amb la informació del nombre de casos d'AD:

Any	Nombre de pacients	
	Home	Dona
2007	111	249
2008	135	243
2009	174	236
2010	113	252

2011	94	267
2012	119	244
2013	108	282
2014	148	294

Seleccionem les dues columnes de la dreta. En l'apartat *Statistics* seleccionem *Compare 2 groups* i el propi programa ja suggereix quina és la prova més adequada pels valors que tenim, en aquest cas suggereix la prova t-student. Seleccionem aquesta prova i obtenim l'informe de la prova.

Primerament indica si s'ha passat el test de normalitat, el passa amb una  $p=0,128$ . Després si hem passat el test de Homogeneïtat de variàncies, i també el passa amb una  $p=0,699$ . Per tant si es passen aquests dos tests es pot realitzar la prova t-student. Obtenim la taula següent i el valor de la t-student:

Grup	$n$	Mitjana	Std dev	SEM
Homes	8	125,25	25,789	9,118
Dones	8	258,375	20,612	7,287

Diferència= -133,125

T-student= -11,405, 14 graus de llibertat,  $p<0,001$ .

La  $p$  ens indica que la probabilitat que la hipòtesi nul·la sigui certa és de menys de 0,1%. Per tant la diferència de casos d'AD entre homes i dones és major de la que es podria esperar per atzar. Per tant s'accepta la hipòtesi alternativa.

Realitzem el mateix procediment per calcular la prova t-student de la prevalença d'AD dels homes i de les dones.

La hipòtesi nul·la és que no existeix diferència entre la prevalença del homes i de les dones i la hipòtesi alternativa que existeix una diferència significativa en la prevalença dels homes i de les dones. Inserim la taula següent:

Taula 4: Prevalença AD dividit per sexe de 2007 a 2014		
Any	Home	Dona
	Prevalença (pacients/ població x100) %	Prevalença (pacients/ població x100) %
2007	0,22933	0,40337
2008	0,27573	0,38743
2009	0,34861	0,36953
2010	0,22253	0,38840
2011	0,18167	0,40463
2012	0,22555	0,36349
2013	0,20103	0,41352
2014	0,26970	0,42487

Tal i com s'ha explicat anteriorment obtenim els resultats següents:

Test de Normalitat: passat ( $p=0,225$ ). Test de Homogeneïtat de variàncies: passat ( $p= 0,202$ ).

Taula 5: Informe t-student prevalença AD				
Grup	<i>n</i>	Mitjana	Std dev	SEM
Homes	8	0,244	0,0526	0,0186
Dones	8	0,394	0,0212	0,00749

Diferència= -0,150. T-student=-7,491, 14 graus de llibertat,  $p<0,001$ .

Els resultats mostren que la probabilitat que la hipòtesi nul·la sigui certa és de menys del 0,1%. Per tant la diferència entre les prevalences és major de la que es podria esperar per atzar. Per tant la hipòtesi alternativa és acceptada.



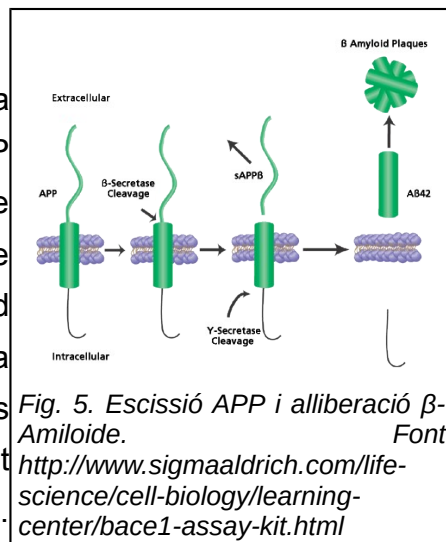
## 7. Comparació i anàlisi de mostres de cervell de pacients d'Alzheimer

### 7.1.-MARC TEÒRIC:

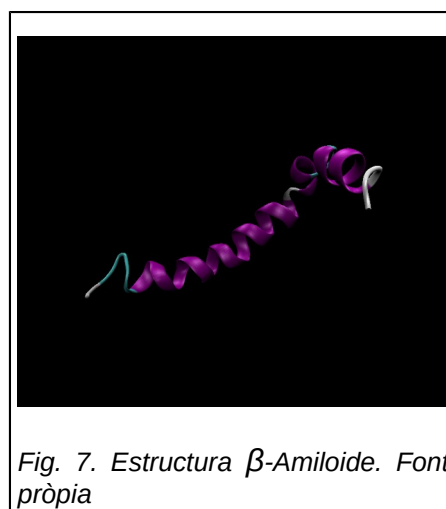
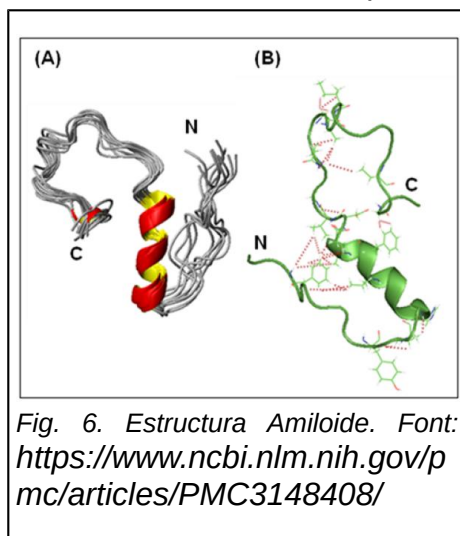
En els serveis d'Anatomia Patològica, al fer autòpsies del cervell s'observen els nivells de la proteïna  $\beta$ -Amiloide que es diposita en forma de plaques. La presència d'aquesta proteïna permet determinar si el pacient va patir AD.

#### Proteïna $\beta$ -Amiloide:

En la membrana de les neurones es troba una proteïna de transmembrana anomenada APP (Amiloid Precursor Protein), la proteïna  $\beta$ -Amiloide es troba dins de APP (Fig. 5). BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme) és una proteasa (àcid aspàrtic) xxxvii que té un paper important en la formació de les beines de Mielina de les neurones . En pacients d'AD, BACE-1 té un comportament anormal provocant l'escissió de la proteïna APP. D'aquesta manera s'allibera la proteïna  $\beta$ -Amiloide acumulant-se formant plaques de  $\beta$ -Amiloide xxxix.



Bioquímicament parlant,  $\beta$ -Amiloide està formada de 36 a 43 aminoàcids que deriven de APP. En certes condicions (15°C; pH 7,3) s'ha pogut observar l'estructura secundària de  $\beta$ -Amiloide. Aquesta es replega formant una hèlix  $3_{10}$  la



qual té una forma semblant a la hèlix alfa i es diferencia d'aquesta per ser més estreta i més allargada (Fig. 6, 7)<sup>xi</sup>. Els aminoàcids de l'hèlix 3<sub>10</sub> estan disposats en sentit horari formant una estructura helicoïdal. Cada aminoàcid representa 120° del gir de l'hèlix, per tant hi ha tres aminoàcids per volta <sup>xli</sup>.

A través del PDB (Protein Data Bank) vaig obtenir el model tridimensional de la proteïna  $\beta$ -Amiloide i utilitzant el programa VMD (Visual Molecular Dynamics) observem l'hèlix 3<sub>10</sub> (Fig. 7). És una proteïna intrínsecament no estructurada, per tant adopta diferents estructures dificultant la seva observació.

Al realitzar autòpsies per observar les plaques de  $\beta$ -Amiloide es realitza una tinció immunohistoquímica que permet observar les plaques d'un color marronós (Fig. 8 )<sup>xlii</sup>. La tinció immunohistoquímica es basa en la reacció d'anticossos específics amb un antigen, és a dir, amb la molècula que es vol observar. En el nostre cas s'utilitzen els anticossos comercials 82E1, 6E10, 6F3D, 4G8, A $\beta$  40, A $\beta$ 42 i 12F4 els quals tenyeixen les plaques mitjançant la reacció amb els aminoàcids de la proteïna  $\beta$ -Amiloide <sup>xliii</sup>.

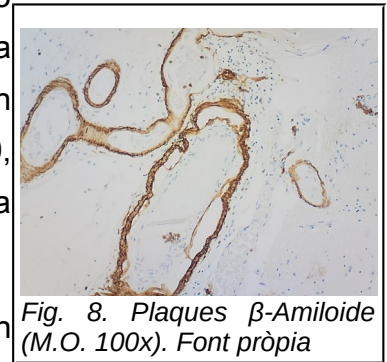


Fig. 8. Plaques  $\beta$ -Amiloide (M.O. 100x). Font pròpia

Per quantificar els nivells d'aquesta proteïna s'assignen els valors 0,A,B,C <sup>xliv</sup>.

- 0: absència de  $\beta$ -Amiloide
- A: baixa densitat de  $\beta$ -Amiloide en el neocortex i en els lòbuls frontal temporal i occipital.
- B: presència de plaques en el neocortex, moderada quantitat en la regió de l'hippocamp.
- C: gran presència de plaques en totes les zones. Gran acumulació a l'hippocamp.

### **Proteïna TAU.**

A part de la proteïna  $\beta$ -Amiloide, la proteïna TAU també està relacionada amb l'aparició de l'Alzheimer. Dins dels axons de les neurones es troben microtúbuls els quals estan estabilitzats per la

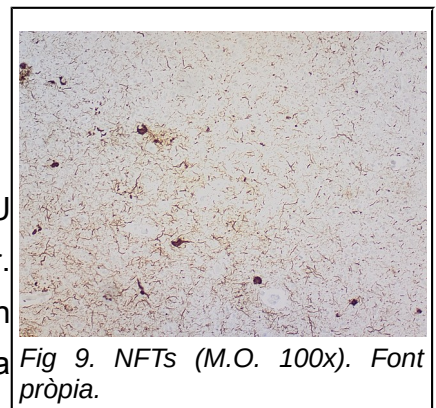


Fig 9. NFTs (M.O. 100x). Font pròpia.

proteïna TAU. En els pacients d'AD, la proteïna TAU es desprèn dels microtúbuls això provoca una dissociació del citoesquelet de la neurona. Les neurones degeneren impedit la sinapsi neuronal. A nivell microscòpic s'observen uns punts foscos en forma de gota (Fig. 9) <sup>xlv</sup>. Aquestes acumulacions són anomenades NFTs (Neuro Fibrillary Tangles).

La proteïna TAU és una fosfoproteïna de 2,1Å <sup>xlvi</sup>. La seva estructura molecular és poc coneguda ja que TAU és un conjunt de diferents proteïnes amb una funció comú <sup>xlvii</sup>.

Mitjançant el programa VMD vaig observar l'estructura següent (Fig.10):

Per tal de quantificar els nivells de NFTs, segons la quantitat de proteïna TAU s'assigna un valor de I a VI mitjançant el mètode Braak que representa en quin estadi es troba el pacient <sup>xliv</sup>, <sup>xlviii</sup>:

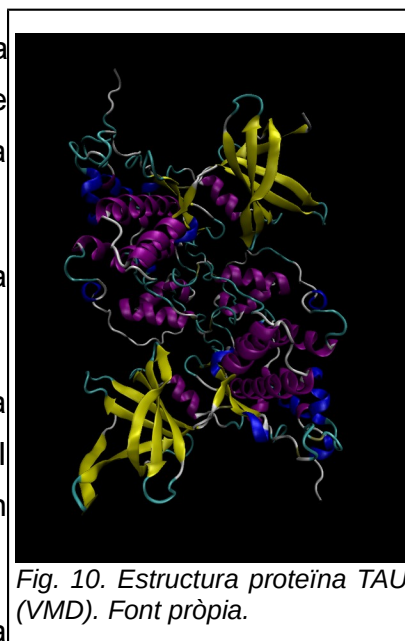


Fig. 10. Estructura proteïna TAU (VMD). Font pròpia.

- **I:** NFTs en la regió transentorrinal (zona relacionada amb la memòria).
- **II:** aparició en la zona CA1 (*cornus ammonis 1*) de l'hippocamp i al cortex entorrinal.
- **III:** acumulació en les estructures límbiques
- **IV:** formació en l'amígdala, el tàlem i el *claustrum*.
- **V:** NFTs en totes les zones isocorticals.
- **VI:** abundància de NFTs en totes les zones anteriors.

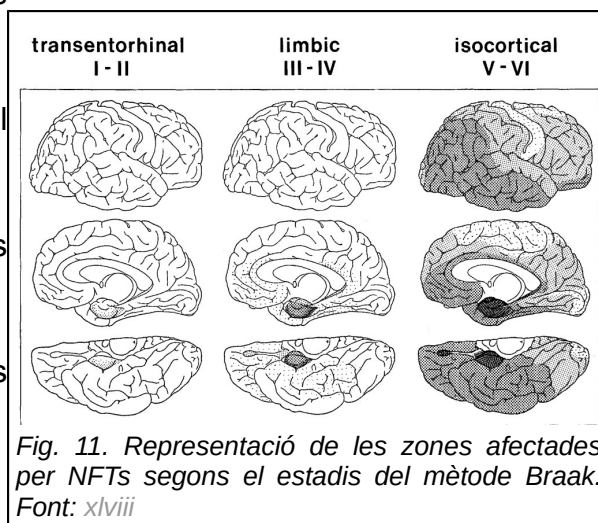


Fig. 11. Representació de les zones afectades per NFTs segons el estadis del mètode Braak. Font: <sup>xlviii</sup>

## 7.2.-PROCEDIMENT:

Per tal de comparar els nivells de  $\beta$ -Amiloide entre homes i dones, s'han analitzat 20 casos de pacients d'AD (11 homes i 9 dones) i un cas control. De cada cas s'han analitzat mostres de certes regions del cervell prèviament preparades durant l'autòpsia del pacient.

Tots els casos són de pacients que van morir a l'Hospital Universitari de Bellvitge de L'Hospitalet (Barcelona). Totes les mostres analitzades han estat preparades pel servei d'Anatomia patològica de Bellvitge i en concret a càrrec de la Dra. Noemi Vidal Sarró.

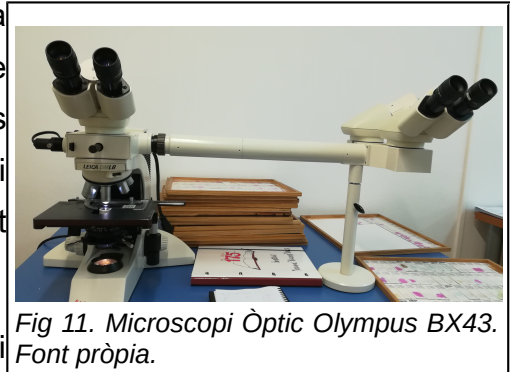
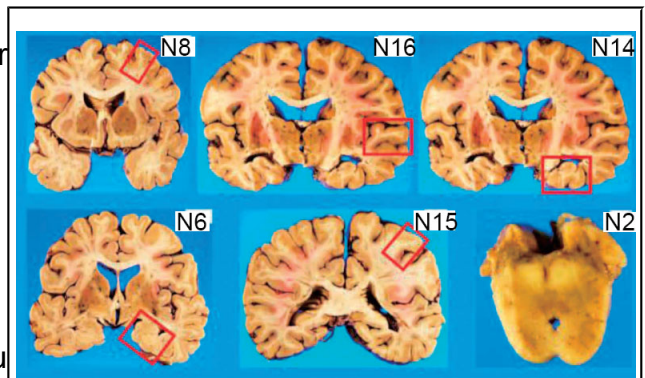


Fig 11. Microscopi Òptic Olympus BX43. Font pròpia.

Els casos analitzats són de pacients d'entre 50 i 88 anys. Les autòpsies es van realitzar entre 2010 i 2016. Les observacions les vaig realitzar amb un Microscopi Òptic Olympus BX43.

De cada cas he analitzat les següents regions segons la seva implicació en l'AD xlix:

1. Gir frontal medial (*gyrus frontalis medius*): N8
2. Gir temporal mitjà (*Gyrus temporalis medius*): N16
3. Hipocamp (*Hippocampus*): N14
4. Gir parahipocampal (*Gyrus parahippocampalis*): N6
5. Lòbul parietal inferior (*Lobulus parietalis inferior*): N15
6. Mesencèfal (*mesencephalon*): N2



Per tal de realitzar un anàlisi quantitatiu dels nivells de  $\beta$ -Amiloide, de cada una

Fig. 12. Regions cervell analitzades. Font: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591545>

de les 6 regions, amb el microscopi òptic a 100x vaig comptar el número de plaques de cada 5 camps visuals diferents. Les plaques es dipositen en especial a l'escorça de les mostres. Per això els 5 camps corresponen a 5 zones de l'escorça representatives de cada mostra.

Inicialment es pretenia comparar totes les zones citades anteriorment. Però, al realitzar l'anàlisi no teníem les mostres de totes les zones de cada pacient. Per això al comparar els nivells de  $\beta$ -Amiloide entre homes i dones només s'ha comparat les regions N14 i N6 (hipocamp, gir parahipocampal) ja que eren les úniques regions comunes en tots els casos. A més, la regió de l'hipocamp és una zona a on es formen grans dipòsits de  $\beta$ -Amiloide i està íntimament relacionada amb l'AD  $\gamma$ . L'estudi s'ha realitzat a cegues de tal manera que de cada cas es desconeixia si era home o dona fins a acabar l'anàlisi.

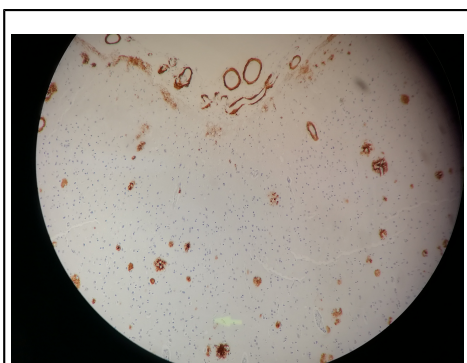


Fig. 13. Plaques  $\beta$ -Amiloide a 100x. Font pròpia.

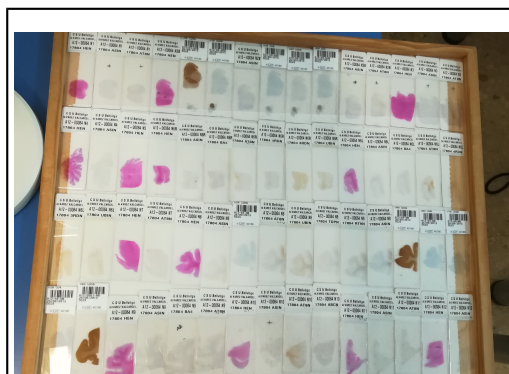


Fig. 14. Safata amb totes les mostres necrològiques d'un pacient. Font Pròpia.

### 7.3.-RESULTATS:

Taula 6: Resultats de la quantificació de plaques $\beta$ -Amiloide de cada cas					
Cas (any i número d'autòpsia)	Sexe (Home/Dona)	Edat (anys)	nº de plaques en 100x	Estadi de Beta-Amiloide (0,A,B,C)	Estadi de proteïna Tau (I-VI)
A10-14	Home	82	47,5	C	V

A10-51	Home	77	18,9	C	V
A10-79	Dona	86	24	C	VI
A10-92	Dona	67	21,5	C	IV
A11-38	Dona	56	66,7	C	IV
A11-64	Dona	69	23,6	C	V
A11-72	Home	80	16,1	C	V
A11-90	Home	81	18,7	C	V
A11-94	Dona	84	20,8	B	V
A12-64	Home	78	1,1	0	V
A12-74	Home	86	13,8	B	V
A12-84	Home	82	22,6	C	V
A12-97	Dona	74	12,1	A	V
A13-13	Home	73	1,8	A	V
A13-28	Dona	87	14,3	B	V
A14-40	Home	88	23,4	C	V
A14-49	Home	50	0	0	V
A15-01	Dona	85	0	0	V
A15-18	Home	75	13	B	V
A16-25 (AD hereditari)	Dona	51	22,2	C	VI
Control: A17-15	Home	48	0	0	-

Taula 7: Mitjana del nombre de plaques de  $\beta$ -Amiloide dividit per sexe.

Sexe	Nº de plaques en 100x (mitjana)
------	---------------------------------

Home	16,1
Dona	22,8

En la taula 6 hi apareix el número de cas (*A(any de la mort)- (número de cas)*). Hi ha casos des del 2010 fins al 2017. Hi ha 11 homes, 9 dones i un cas control. En la columna de «nº de plaques en 100x» hi apareix el número de plaques de  $\beta$ -Amiloide quantificat de la forma explicada en l'apartat anterior. En les columnes « $\beta$ -Amiloide» i «Estadi de proteïna Tau» i apareix la informació de cada cas cedida per el servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge.

En primer lloc crida l'atenció que els casos A14-49 i A15-01 el número de plaques i l'estadi de  $\beta$ -Amiloide siguin 0 i tot i així aquests pacients van ser diagnosticats d'Alzheimer. Això es deu a que l'estadi de proteïna TAU és alt, V.

En la taula 7 s'ha realitzat la mitjana del número de plaques en homes i dones. En dones aquest valor (22,8) és més elevat que en homes (16,1).

#### 7.4.-ANÀLISI ESTADÍSTIC: T-student

La hipòtesi nul·la és que no existeix diferència entre el nombre de plaques  $\beta$ -Amiloide entre homes i dones i la hipòtesi alternativa que existeix una diferència significativa. Inserim la taula següent al programa SigmaPlot:

Taula 8: nº de plaques $\beta$ -Amiloide en homes i dones	
Nº de plaques en dones	Nº de plaques en homes
23	47,5
21,5	18,9
66,7	16,1
23,6	18,7
20,8	1,1
12,1	13,8
14,3	22,6
0	1,8

22,2	23,4
	0
	13

Els valors de la taula 8 no passen el test de normalitat. Per normalitzar les dades realitzem el logaritme  $\log(x+1)$  (sent  $x$  cada valor) i eliminem els 0. De tal manera que obtenim la taula 9. Aquests valors passen el test de normalitat i n'obtenim l'informe.

Taula 9: logaritme del nº de plaques $\beta$ -Amiloide en homes i dones	
Log del nº de plaques en dones	Log del nº de plaques en homes
1,39794001	1,68574174
1,35218252	1,29885308
1,83058867	1,23299611
1,39093511	1,29446623
1,33845649	0,32221929
1,11727130	1,17026172
1,18469143	1,17026172
1,36548798	0,44715803
	1,38738983
	1,14612804

Test de Normalitat: passat ( $p=0,053$ ). Test de Homogeneïtat de variàncies: passat ( $p= 0,278$ ).

Taula 10: Informe t-student plaques $\beta$ -Amiloide				
Grup	$n$	Mitjana	Std dev	SEM
Homes	9	1,372	0,211	0,0747
Dones	11	1,136	0,424	0,134

Diferència= 0,236. T-student=1,434, 16 graus de llibertat,  $p=<0,171$ .

Els resultats mostren que la probabilitat que la hipòtesi nul·la sigui certa és de menys del 17,1%. Tot i que el resultat suggerix una diferència estadísticament significativa, el valor de la  $p$  és major del que s'ha establert inicialment ( $p=0,05$ ).



---

Per tant, a causa de tenir una  $n$  tant baixa, no podem acceptar la hipòtesi alternativa.

## **8. Conclusions**

L'anàlisi de les dades del ReDeGi mostra que el 67,4% dels casos totals d'AD de 2007 a 2014 dins la regió sanitària de Girona de 65 a 85 anys són dones. Dels 3069 casos totals 1002 pacients eren homes i 2067 dones. La prevalença és major en les dones (0,3947%) que en els homes (0,2440%). En altres paraules gairebé 4 (3,947) de cada 1000 dones pateixen AD. Mentre que en el cas dels homes, l'AD afecta a 2 (2,440) de cada 1000 homes. La prova t-student mostra que, segons les dades obtingudes, tenir AD és dependent del sexe. A més, el test t-student mostra que la diferència en el grau de prevalença entre homes i dones és significativa. L'anàlisi del nombre de plaques  $\beta$ -Amiloide en mostres de pacients d'AD de 2010 a 2017 mostra que en el cas de dones en 100x tenen una mitjana de 22,8 plaques mentre que en el cas dels homes la mitjana és de 16,1. Tot i haver-hi una clara diferència, tot i que no significativa, és important tenir en compte que l'estudi s'ha realitzat amb 11 homes 9 dones i un cas control.

L'esperança de vida de les dones és més elevada que la dels homes. Per tant en la franja d'edat en la que apareix l'AD hi ha més dones que homes. Per això certs estudis associen el major nombre de casos d'AD de dones amb el fet que hi hagin més dones. Però al calcular la prevalença ja es té en compte la població. I tot i així, les dones tenen més prevalença a patir AD que els homes.

Determinar l'existència d'aquesta diferència és important, però més important és descobrir la causa d'aquesta diferència. Es coneix una relació entre la pèrdua sobtada d'hormones i l'AD. La pèrdua d'estrògens en la menopausa podria ser la causant de la major prevalença d'AD en dones. Sabent l'edat en la que a les pacients els hi arriba la menopausa i quan se'ls hi diagnostica l'AD, futurs estudis epidemiològics podrien determinar si existeix una relació. La baixa activitat mental durant la infància augmenta el risc a tenir AD. La població que actualment està en risc de patir AD (persones entre 65 i 85 anys) durant la infància i la maduresa

existia desigualtat d'oportunitats entre homes i dones. En general, els homes rebien major educació i treballaven, mentre que les dones realitzaven feines domèstiques. La menor reserva cognitiva de les dones podria ser un factor més que expliqui la major prevalença. Tot i així, si realment és un factor determinant durant les pròximes generacions hi hauria d'haver igual prevalença ja que cada cop l'educació i les oportunitats laborals són més equitatives entre homes i dones.

Per obtenir dades més fiables i més representatives es necessiten més i millors registres. El registre de demències de Suècia SveDem cobreix la immensa majoria de casos de demències i conté informació molt detallada de cada cas. La regularització d'un sistema d'enregistrament comú en la UE i la implantació de més registres pot ser una eina clau per donar lloc a futures investigacions. Els estudis epidemiològics de dades poblacionals i de registres potser no ens diuen la causa d'una malaltia o el fàrmac per tractar-la. Però és el primer pas essencial per poder donar lloc a assajos clínics que ho facin.

El nombre de plaques de  $\beta$ -Amiloide té relació amb l'estadi de  $\beta$ -Amiloide i amb amb l'Estadi de proteïna TAU. De tal manera que les mostres en els quals s'ha observat major nombre de plaques també es trobaven en un estadi de  $\beta$ -Amiloide i de TAU més elevat. Tot i així hi han tres casos excepcionals (casos A12-64, A14-49 i A15-01). En aquests tres casos el nombre de plaques ha estat 1,1; 0 i 0 respectivament. Com és d'esperar l'estadi de  $\beta$ -Amiloide també és 0. Tot i així aquests pacients al realitzar-se l'autòpsia es va determinar que eren pacients d'AD i que havien mort a causa d'aquesta malaltia. Això és degut que l'estadi de proteïna TAU en tots tres casos és molt elevat (V, V i V) i per tant una elevada acumulació de NFTs. Tal i com s'ha mencionat anteriorment la teoria principal de la causa de l'AD és la teoria de la proteïna  $\beta$ -Amiloide. Tot i així en aquests casos observem una absència de  $\beta$ -Amiloide i com la proteïna TAU és la possible causa d'AD.

El fet que trobem més plaques  $\beta$ -Amiloide en les dones que als homes suggereix que l'AD és més agressiu en dones. La zona observada, l'hipocamp és la regió del cervell relacionada amb la memòria. Per tant observar més plaques en aquesta regió suposa que el pacient ha tingut una major pèrdua de memòria. El recompte de plaques ens proporciona més informació a part de l'estadi de  $\beta$ -Amiloide que es

---

valora segons 0,A,B,C. Quantificar el nombre de plaques de diferents regions ens pot permetre detallar no només si el pacient ha mort d'AD o no, sinó quines regions han estat més afectades. El problema d'aquest sistema és que és lent i comporta la imprecisió de l'ull humà. La creació de programes informàtics que distingeixin les plaques de  $\beta$ -Amiloide i les quantifiquin proporcionaria informació molt valuosa per futures investigacions.

L'estudi epidemiològic ha estat realitzat amb les dades d'una regió concreta. Per tal d'obtenir uns resultats més representatius serien necessàries les dades d'una zona més extensa i per tant més pacients. De la mateixa manera, l'anàlisi de mostres de cervells de pacients d'AD només s'ha realitzat amb 20 casos. Per obtenir resultats més fiables serien necessaris més casos. A més, seria convenient utilitzar un sistema de quantificació més precís mitjançant l'ús de quadrícules.

Estudiar aquestes diferències, si realment existeixen, és essencial per entendre més la malaltia i donar lloc a futures vies d'investigació. Articles relacionats amb aquest tema deuen aquesta diferència a elements genètics, diferències cognitives o a causa de la pèrdua d'hormones. Determinar a què es deu aquesta diferència podria permetre l'elaboració de fàrmacs per eliminar aquesta diferència i reduir la probabilitat a patir AD per part de les dones.

D'acord a la hipòtesi inicial, tant l'estudi de la dades del ReDeGi com l'anàlisi de mostres de cervell de pacients d'AD suggereixen que les dones tenen major prevalença a tenir AD i que les acumulacions de  $\beta$ -Amiloide podrien ser majors.

**9. Annex**

Taula 11: Casos d'AD dividits per sexe i intervals d'edat de 2007 a 2014

Any	Edat	Home		Dona		Total	
		Nombre de pacients	Prevalença (pacients/població x100) (%)	Nombre de pacients	Prevalença (pacients/població x100) (%)	Nombre de pacients	Prevalença (pacients/població x100) (%)
2007	65-69	5	0,039939	8	0,06100	13	0,05072
	70-74	20	0,14980	37	0,24642	57	0,20094
	75-79	34	0,32103	62	0,46193	96	0,39978
	80-84	34	0,4801	81	0,75496	115	0,64567
	85+	18	0,4071	61	0,6455	79	0,56953
	Total	111	0,22933	249	0,40337	360	0,328185
2008	65-69	4	0,031583	7	0,053366	11	0,042665
	70-74	17	0,12802	21	0,14138	38	0,13507
	75-79	44	0,40117	60	0,43375	104	0,41934
	80-84	40	0,5454	90	0,82637	130	0,71331
	85+	30	0,6363	65	0,64831	95	0,64446
	Total	135	0,27573	243	0,38743	378	0,33846
2009	65-69	13	0,095434	9	0,064226	22	0,079609
	70-74	14	0,11130	27	0,19019	41	0,15313
	75-79	50	0,44743	67	0,47491	117	0,46276
	80-84	63	0,8418	81	0,71878	144	0,77361
	85+	34	0,6730	52	0,49914	86	0,55591
	Total	174	0,34861	236	0,36953	410	0,36035
2010	65-69	8	0,053727	4	0,025796	12	0,039479

	70-74	12	0,10408	25	0,19298	37	0,15111
	75-79	33	0,29292	67	0,47018	100	0,39191
	80-84	35	0,4566	91	0,80190	126	0,66270
	85+	25	0,4605	65	0,60063	90	0,55381
	Total	113	0,22253	252	0,38840	365	0,31558
2011	65-69	4	0,026598	6	0,038430	10	0,032624
	70-74	11	0,092764	32	0,24242	43	0,17160
	75-79	28	0,24735	66	0,46842	94	0,36993
	80-84	31	0,3935	95	0,81259	126	0,64387
	85+	20	0,3542	68	0,59686	88	0,51643
	Total	94	0,18167	267	0,40463	361	0,30664
2012	65-69	11	0,069731	12	0,073724	23	0,071758
	70-74	14	0,12137	18	0,12036	32	0,13137
	75-79	37	0,32388	65	0,45885	102	0,39859
	80-84	27	0,3344	84	0,71162	111	0,55843
	85+	30	0,5039	65	0,53911	95	0,52748
	Total	119	0,22555	244	0,36349	363	0,302783
2013	65-69	8	0,048677	7	0,040881	15	0,044699
	70-74	9	0,078459	39	0,30752	48	0,19873
	75-79	31	0,27426	59	0,42428	90	0,35702
	80-84	36	0,4344	107	0,88437	143	0,70146
	85+	24	0,3854	70	0,56520	94	0,50505
	Total	108	0,20103	282	0,41352	390	0,319887
2014	65-69	11	0,064271	13	0,073239	24	0,068837
	70-74	21	0,17191	17	0,12786	38	0,12896
	75-79	36	0,34068	65	0,49660	101	0,42695
	80-84	50	0,5882	110	0,89891	160	0,77153
	85+	30	0,46318	89	0,69384	119	0,61645
	Total	148	0,26970	294	0,42487	442	0,356239

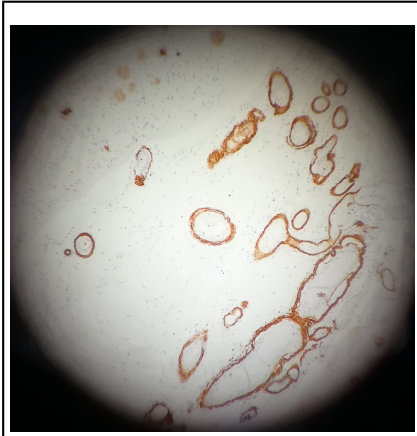


Fig. 16. Proteïna  $\beta$ -Amiloide, M.O. 100x. Font pròpia.

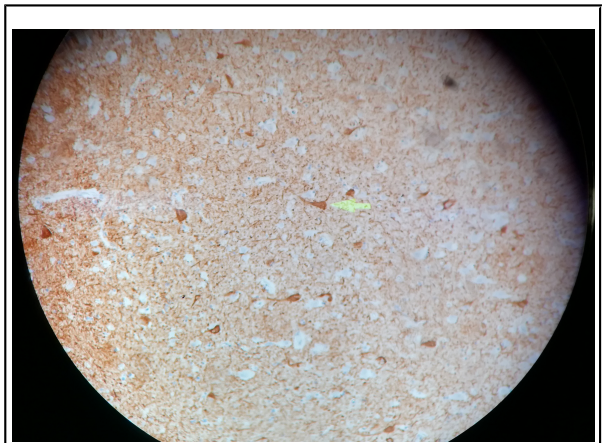


Fig. 17. Proteïna TAU, M.O. 100x. Font pròpia.

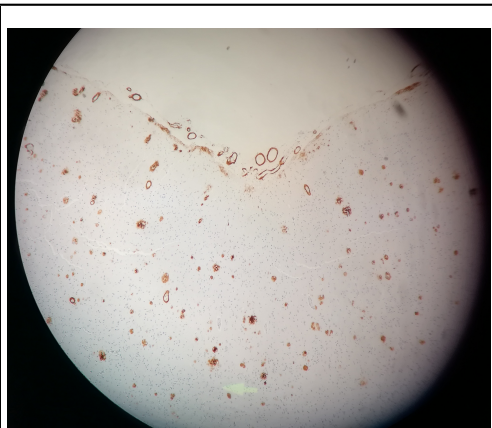


Fig. 18. Proteïna  $\beta$ -Amiloide, M.O. 100x. Font pròpia.

## 10. Referències

- i Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. 2010;6(2):158-94.
- ii Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):353-6.
- iii Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(3):137-52.
- iv Religa D, Fereshtehnejad SM, Cermakova P, Edlund AK, Garcia-Ptacek S, Granqvist N, Hallbäck A, Kåwe K, Farahmand B, Kilander L, Mattsson UB, Nägga K, Nordström P, Wijk H, Wimo A, Winblad B, Eriksdotter M. SveDem, the Swedish Dementia Registry - a tool for improving the quality of diagnostics, treatment and care of dementia patients in clinical practice. *PLoS One*. 2015;10(2)
- v Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*. 2000;54:S10-5.
- vi Roberts RO, Knopman DS, Mielke MM, Cha RH, Pankratz VS, Christianson TJ, Geda YE, Boeve BF, Ivnik RJ, Tangalos EG, Rocca WA, Petersen RC. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal. *Neurology*. 2014; 28;82(4):317-25.
- vii Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38.
- viii Filon JR, Intorcchia AJ, Sue LI, Vazquez Arreola E, Wilson J, Davis KJ, Sabbagh MN, Belden CM, Caselli RJ, Adler CH, Woodruff BK, Rapsack SZ, Ahern GL, Burke AD, Jacobson S, Shill HA, Driver-Dunckley E, Chen K, Reiman EM, Beach TG, Serrano GE. Gender Differences in Alzheimer Disease: Brain Atrophy, Histopathology Burden, and Cognition. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016.
- ix Hsieh TC, Lin WY, Ding HJ. Sex- and age-related differences in brain FDG metabolism of healthy adults: an SPM analysis. *J Neuroimaging*. 2012;22(1):21-27.
- x Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, et al. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*. 2005;25(34):7709-7717.
- xi Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. *APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA*. 1997;278(16):1349-1356.
- xii Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(5):1977-1981.
- xiii Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-923.
- xiv Murphy DD, Segal M. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci*. 1996;16(13):4059-4068.
- xv Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci*. 2006;7:74.
- xvi Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, Gore AC. Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *J Neurosci*. 2006;26(41):10332-10348.
- xvii Shao H, Breitner JC, Whitmer RA, Wang J, Hayden K, Wengreen H, Corcoran C, Tschanz J, Norton M, Munger R, Welsh-Bohmer K, Zandi PP. Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology*. 2012;79(18):1846-1852.
- xviii Stern Y. Cognitive reserve. *Neuropsychologia*. 2009;47(10):2015-2028.
- xix Whalley LJ, Starr JM, Athawes R, Hunter D, Pattie A, Deary IJ. Childhood mental ability and dementia. *Neurology*. 2000;55(10):1455-1459.
- xx Borderías C. La condició de la dona. In: *Història, política, societat i cultura dels països catalans*. Ed. Enciclopèdia Catalana. 1997, vol.10, pp135-137.

- xxi Vemuri P, Lesnick TG, Przybelski SA, et al. Effect of lifestyle activities on Alzheimer disease biomarkers and cognition. *Ann Neurol*. 2012;72(5):730–738.
- xxii Aleisa AM, Alzoubi KH, Gerges NZ, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: possible role of BDNF. *Neurobiol Dis*. 2006; 22(3):453-62.
- xxiii Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS, Scherr PA. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*. 2002; 287(24):3230-7.
- xxiv Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol*. 2001;158:1173–7.
- xxv Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992;1(5):345-7.
- xxvi Gliklich R, Dreyer D. Registries for Evaluating Patient Outcomes: A User's Guide. AHRQ . 2010;10:49.
- xxvii Religa D, Fereshtehnejad SM, Cermakova P, Edlund AK, Garcia-Ptacek S, Granqvist N, Hallbäck A, Kåwe K, Farahmand B, Kilander L, Mattsson UB, Nägga K, Nordström P, Wijk H, Wimo A, Winblad B, Eriksdotter M. SveDem, the Swedish Dementia Registry - a tool for improving the quality of diagnostics, treatment and care of dementia patients in clinical practice. 2015;10.
- xxviii [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_steps\\_to\\_diagnosis.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_steps_to_diagnosis.asp) (29/8/17)
- xxix Smedslund G, Siqveland J, Leiknes K. Psychometric Assessment of the Clock Drawing Test. *NIPH*. 2015 Jun;16.
- xxx <http://www.ias.cat/ca/contingut/iasgirona/591> (11/8/17)
- xxxi Religa D, Fereshtehnejad SM, Cermakova P, Edlund AK, Garcia-Ptacek S, Granqvist N, Hallbäck A, Kåwe K, Farahmand B, Kilander L, Mattsson UB, Nägga K, Nordström P, Wijk H, Wimo A, Winblad B, Eriksdotter M. SveDem, the Swedish Dementia Registry - a tool for improving the quality of diagnostics, treatment and care of dementia patients in clinical practice. *PLoS One*. 2015; 10, e0116538.
- xxxii Walpole, Roland; Myers, Raymond y Ye, Keying. *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*. Ed. Pearson Education. 2002.
- xxxiii Ralph B. Tests for the Normal Distribution. Ed. In D'Agostino, R.B. 1986
- xxxiv Abaira, V. Desviación estándar y error estándar. *Semerfen*. 2002;28:621-3.
- xxxv Garre-Olmo J, Garcia-Ptacek S, Calvó-Perxas L, Turró-Garriga O, López-Pousa S, Eriksdotter M. Diagnosis of Dementia in the Specialist Setting: A Comparison Between the Swedish Dementia Registry (SveDem) and the Registry of Dementias of Girona (ReDeGi). 2016 Jul 1;53(4):1341-51.
- xxxvi <http://www.idescat.cat/pub/?id=pmh&n=498&geo=at%3AAT02&t=201000> (7/2/17)
- xxxvii Vassar R1, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999 Oct 22;286(5440):735-41.
- xxxviii Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (Oct 2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1". *Science*. 314 (5799): 664–6.
- xxxix Sarah L. Cole and Robert Vassar. The Role of Amyloid Precursor Protein Processing by BACE1, the  $\beta$ -Secretase, in Alzheimer Disease Pathophysiology. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31; 283(44): 29621–29625.
- xl Subramanian Vivekanandan, Jeffrey R. Brender, Shirley Y. Lee, and Ayyalusamy Ramamoorthy. A Partially Folded Structure of Amyloid-Beta(1-40) in an Aqueous Environment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul29; 411(2):312-116.
- xli Pauling L, Corey H. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1951; 205-211.



- xlii Ellises D, Love S, Chimelli L, Harding B, Lowe J, Visters H. *Neuropathology, a reference text of CNS pathology*. Ed. Morby. 2004. pp 562,564.
- xliii Aho L, Pikkarainen M, Hiltunen M, Leinonen V, Alafuzoff I. Immunohistochemical visualization of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta in extra- and intracellular compartments in the human brain. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1015-28.
- xliv Serrano-Pozo A, Frosch P, Nasliah E, Hyman B. *Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011 Sep; 1(1).
- xlv Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):289-309. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.003.
- xlvi Aoki M, Yokota T, Sugiura I, Sasaki C, Hasegawa T, Okumura C, Ishiguro K, Kohno T, Sugio S and Matsuzaki T. Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta. *Acta Crystallogr*, 2004;60:439-446.
- xlvii Hirokawa N, Shiomura Y and Okabe S. Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules. *J Cell Biol*. 1988 Oct 1; 107(4): 1449–1459.
- xlvi Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmanr H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol*. 2006;112: 389–404
- xlix Takayama M, Kashiwagi M, Matsusue A, Waters B, Hara K, Ikematsu N, Kubo S. Quantification of immunohistochemical findings of neurofibrillary tangles and senile plaques for a diagnosis of dementia in forensic autopsy cases. *Leg Med*. 2016 Sep;22:82-9.
- I Esmaeilzade B, Nobakht M, Joghataei M, Rahbar Roshandel N, Rasouli H, Samadi Kuchaksaraei A, Hosseini SM, Najafzade N, Asalgoo S, Hejazian LB, Moghani Ghoroghi F. Delivery of epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) to hippocamp in Alzheimer's disease rat model. *Iran Biomed J*. 2012;16(1):1-9.