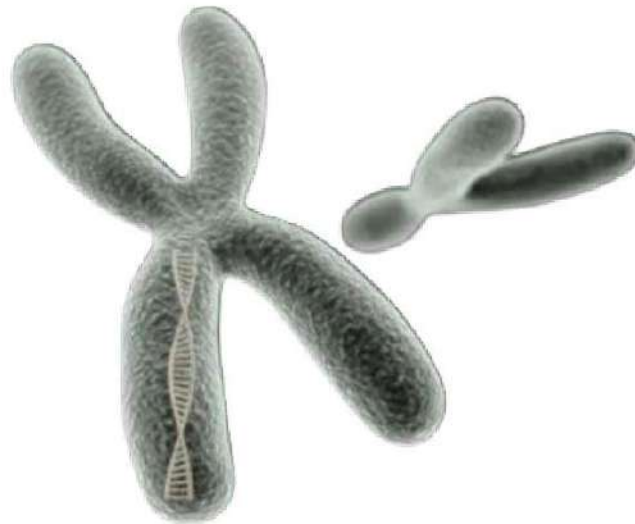


Envelliment cel·lular i grànuls PAS en ratolins: Relacions amb els humans?



ENVELLIMENT CEL·LULAR I GRÀNULS PAS EN
RATOLINS: RELACIONS AMB ELS HUMANS?

Héctor Masero Fernández
2n de Batxillerat, 201
Biologia

Tutora: Carol Saniger
INS Puig Castellar

15/11/2024



INSTITUT

PUIG CASTELLAR

Aquest treball de recerca ha estat elaborat amb l'assessorament del Dr. Jaume del Valle en el marc del projecte FORCES de l'Institut de Desenvolupament Professional (IDP) de la Universitat de Barcelona (UB). Tota la part pràctica, incloent els ratolins, mostres, compostos i estris utilitzats han estat part d'un experiment major.

“Els nostres cossos es descomponen,
a vegades quan tenim 90 anys, a vegades fins
i tot abans de néixer, però sempre succeeix.”

Dr. House, House M.D.

Resum

Aquest treball explora l'envelliment cel·lular i les seves causes i conseqüències, amb un focus especial en els grànuls PAS¹, una estructura associada a l'envelliment cel·lular observada exclusivament en ratolins, especialment en els de la soca SAMP8², caracteritzats per un envelliment accelerat. Un cop definits aquests conceptes i explicat com funciona l'envelliment cel·lular en el cervell humà, s'analitza si existeixen similituds en els mecanismes d'envelliment entre ratolins i humans, centrant-se en el cervell. Amb l'ajuda un estudi vigent de la Universitat de Barcelona que pretén comprovar si existeix una veritable relació entre l'envelliment als humans i ratolins, el treball inclou una investigació experimental orientada a estudiar la presència de grànuls PAS en cervells de ratolins SAMP8, centrant-se en si existeix una diferència entre sexes, i per tant determinar si aquestes diferències són extrapolables als humans, per posteriorment descobrir si el sexe té un paper diferencial en l'envelliment cerebral humà, amb la conclusió final de que, almenys en l'envelliment que genera els grànuls PAS als ratolins, no hi existeix cap diferència que vingui determinada pel sexe.

¹ Definició del terme en l'Annex 8, imatges en l'apartat 3.3.3. Observació i quantificació dels grànuls

² Definició del terme en l'Annex 8.

Resumen

Este trabajo explora el envejecimiento celular y sus causas y consecuencias, con un enfoque especial en los gránulos PAS, una estructura asociada al envejecimiento celular observada exclusivamente en ratones, especialmente en los de la cepa SAMP8, caracterizados por un envejecimiento acelerado. Una vez definidos estos conceptos y explicado cómo funciona el envejecimiento celular en el cerebro humano, se analiza si existen similitudes en los mecanismos de envejecimiento entre ratones y humanos, centrándose en el cerebro. Con la ayuda de un estudio vigente de la Universidad de Barcelona que pretende comprobar si existe una verdadera relación entre el envejecimiento en humanos y ratones, el trabajo incluye una investigación experimental orientada a estudiar la presencia de gránulos PAS en cerebros de ratones SAMP8, centrándose en si existe una diferencia entre sexos, y así determinar si estas diferencias son extrapolables a los humanos, para posteriormente descubrir si el sexo tiene un papel diferencial en el envejecimiento cerebral humano, con la conclusión final de que, al menos en el envejecimiento que genera los gránulos PAS en los ratones, no existe ninguna diferencia determinada por el sexo.

Abstract

This work explores cellular aging and its causes and consequences, with a special focus on PAS granules, a structure associated with cellular aging observed exclusively in mice, especially in the SAMP8 strain, characterized by accelerated aging. Once these concepts are defined and cellular aging in the human brain is explained, an analysis is conducted to determine whether there are similarities in the aging mechanisms between mice and humans, focusing on the brain. With the help of an ongoing study at the University of Barcelona that aims to verify if there is a true relationship between aging in humans and mice, the work includes an experimental investigation oriented towards studying the presence of PAS granules in SAMP8 mouse brains, focusing on whether there is a difference between sexes, and thus determining if these differences are extrapolable to humans, to subsequently discover whether sex plays a differential role in human brain aging, with the final conclusion that, at least in the aging that produces PAS granules in mice, no difference determined by sex exists.

Índex

1. Introducció i motivació	1
1.1. Pregunta i hipòtesi teòrica	2
2. Part teòrica	3
2.1. Teorema del Soma d'un sol ús	3
2.2. Envelliment cel·lular	3
Què és l'envelliment cel·lular? Mecanismes implicats a nivell cel·lular i molecular	3
Interfase	6
Mitosi	7
A què es degut l'envelliment cel·lular?	8
Quines conseqüències comporta l'envelliment cel·lular?	10
Que són els grànuls PAS i quina relació tenen amb l'envelliment cel·lular i amb els ratolins SAMP8?	10
2.3. Els ratolins SAMP8 com a models animals per l'estudi de l'envelliment cel·lular i els grànuls PAS	11
Característiques dels ratolins SAMP8 i diferències en el seu envelliment amb altres soques	11
Com es va aconseguir l'envelliment accelerat en aquests?	13
2.4. Per a que serveix aquesta investigació? Es pot extrapolar als humans?	14
3. Part Pràctica (Informe experimental)	16
3.1. Introducció pràctica	16
3.2. Pregunta i hipòtesi pràctica	16
3.3. Procediment general	17
Materials, reactius i equips	17
Procediment per l'obtenció de mostres	20
Observació i quantificació dels grànuls	22
3.4. Conclusions de la part pràctica	26
4. Conclusions generals	27
5. Agraïments	29
6. Bibliografia	30
7. Annexes	35

1. Introducció i motivació

Des de que vaig donar la unitat de Biologia Cel·lular a l'optativa de Biologia de primer de batxillerat, he tingut especial interès en com funciona l'envel·liment cel·lular ja que em sembla un procés molt interessant que succeeix constantment en el nostre organisme; què fa que aquest s'esdevingui i com afecta a les cèl·lules del nostre cos? En què es diferencia una cèl·lula envellida d'una no envellida? Preguntes com aquestes se'm venen al cap quan penso en aquest tema, però unes de les coses que més m'intriga és quina diferència hi ha en l'envel·liment de les diferents espècies i si els mecanismes implicats en una són paral·lels o es poden extrapolar a d'altres. En aquest treball, començaré definint que és l'envel·liment cel·lular, quines són les causes a nivell cel·lular que el provoquen i quines són les seves conseqüències al nostre organisme, per després poder definir els grànuls PAS, una conseqüència directa de l'envel·liment que s'observa únicament en ratolins, sobretot en ratolins de la soca SAMP8, que presenten envel·liment accelerat.

Amb aquests conceptes definits, intentaré veure si existeix similitud entre l'envel·liment dels ratolins i el dels humans, sobretot en el cervell d'aquests, i amb la col·laboració de la Universitat de Barcelona, on s'està fent una investigació per descobrir què són els grànuls PAS i si aquestes estructures es poden extrapolar al cervell humà, participaré en un procediment experimental on s'analitzarà si existeix diferència entre els grànuls PAS generats en ratolins SAMP8 mascles i femelles, i si aquesta diferència o similitud és extrapolable als humans, per a veure si, almenys en aquest àmbit, hi ha una veritable diferència en l'envel·liment humà que depengui del gènere.

1.1. Pregunta i hipòtesi teòrica

Què és l'envel·liment cel·lular i com afecta als diferents organismes? Com afecta aquest envel·liment a diferents espècies, com per exemple els ratolins? Hi ha cap similitud en com afecta a les diferents espècies, per exemple, es pot comparar les conseqüències generades per l'envel·liment en ratolins i en humans? Quina diferència d'envel·liment hi ha entre la soca de ratolins SAMP8, una soca amb envel·liment accelerat i que presenta grànuls PAS en edats més primerenques i altres soques? Aquesta diferència té cap relació amb els grànuls PAS?

En la meua opinió, i considerant els meus incomplets coneixements sobre biologia cel·lular, crec que l'envel·liment cel·lular és un procés natural que afecta a tots els organismes vius. Aquest procés pot estar influenciat per diversos factors, com per exemple el nombre de divisions de la cèl·lula.

També crec que tant en ratolins com en humans, l'envel·liment cel·lular afectarà d'una forma bastant semblant degut a que el nostre organisme no és gaire diferent. A més considero que hi ha una gran diferència entre els símptomes d'envel·liment presentat en ratolins SAMP8 i els d'altres soques i això desemboca en una major quantitat de grànuls PAS en la soca primerament dita.

A partir d'aquests dubtes i reflexions, desenvoluparé la part teòrica del treball, per poder explicar i donar resposta a la hipòtesi, fent primer una contextualització teòrica i finalment una part pràctica que donarà una conclusió final, corroborant-la o no.

2. Part teòrica

2.1. Teorema del Soma d'un sol ús

La idea de tenir un cos finit és clau per entendre l'envelliment cel·lular. Aquesta idea es coneix com la teoria del soma d'un sol ús, i va ser formulada per Thomas Kirkwood a la fi dels anys 70 i posteriorment desenvolupada per ell mateix i el genetista Robin Holliday, les seves postulacions es troben a l'Annex 1.

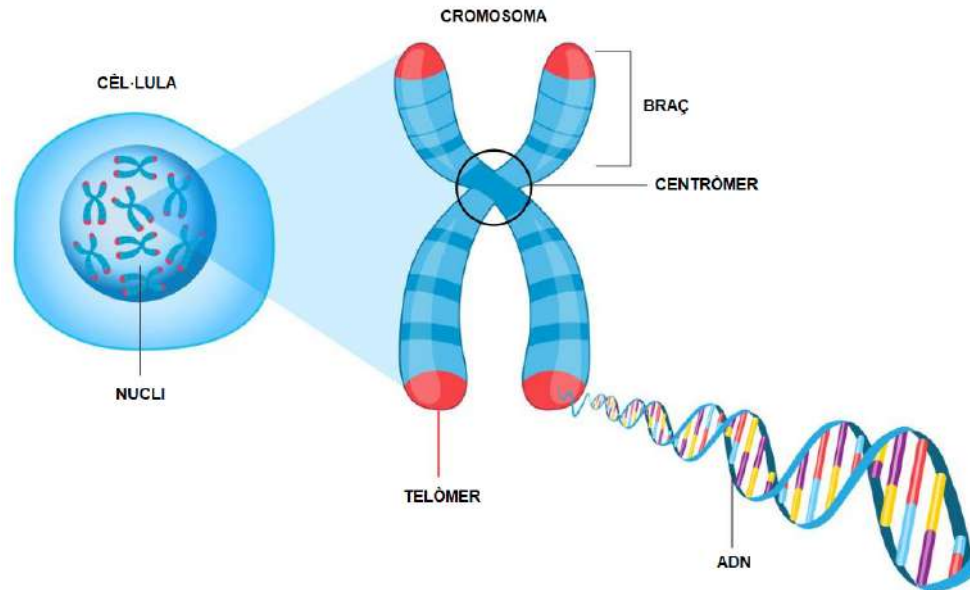
2.2. Envelliment cel·lular

Què és l'envelliment cel·lular? Mecanismes implicats a nivell cel·lular i molecular

Cada segon, les cèl·lules realitzen milers de milions de reaccions bioquímiques que alimenten funcions essencials per a la vida, formant una xarxa metabòlica altament interconnectada. Aquesta xarxa permet que les cèl·lules creixin, prolifereixin i es reparin, i la seva interrupció pot conduir el procés d'envelliment.

L'envelliment cel·lular és el fenomen en què cèl·lules normals diploides diferenciades³ perden la capacitat de dividir-se, normalment després d'unes 50 divisions cel·lulars, fenomen conegut com a Límit de Hayflick. En aquest es postula que una de les raons per la qual l'envelliment cel·lular és causat, és l'escurçament dels telòmers (els extrems dels cromosomes) durant cada divisió cel·lular (diem que cada cop que es divideix i el seus telòmers són més curts està envellint). Quan els telòmers són massa curts, la cèl·lula mor i deixa de dividir-se per impedir la pèrdua d'informació genètica pels extrems dels braços cromosòmics, és a dir, ha arribat al límit de Hayflick. Aquest límit representa el nombre de duplicacions que pot sofrir una cèl·lula eucariota abans d'entrar en senescència (la detenció de creixement cel·lular que té com a conseqüència la suspensió de la divisió cel·lular davant els estímuls mitogènics comuns a causa de l'escurçament telomèric fins al punt de la disfunció telomèrica).

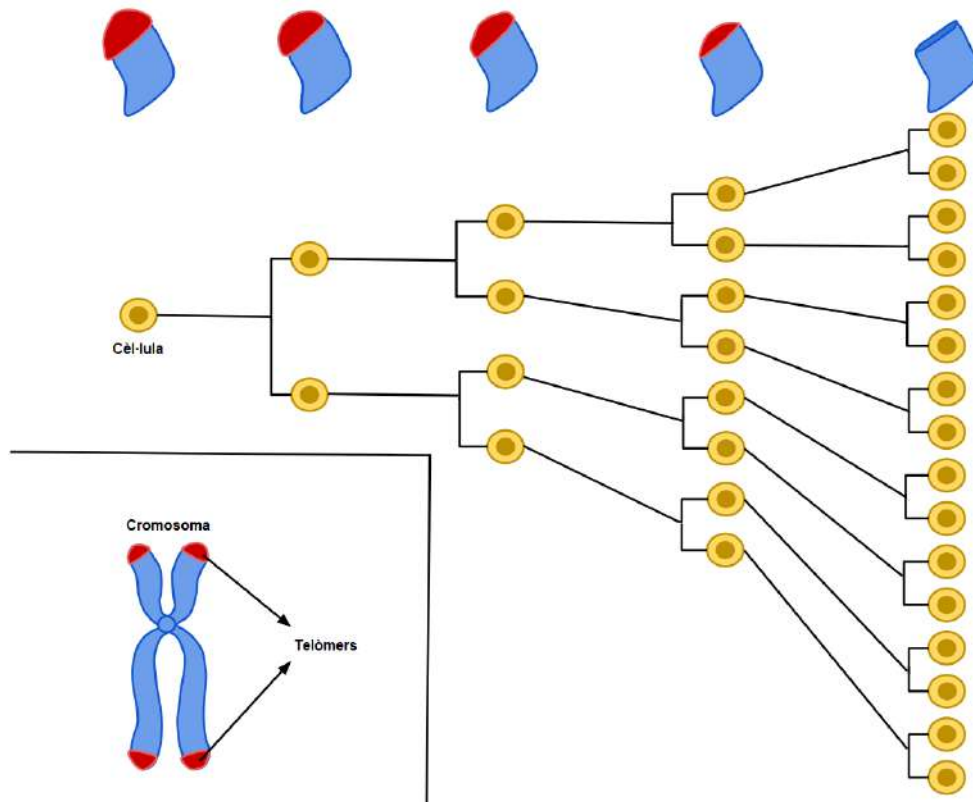
³ Definició del terme en l'Annex 8.



Imatge 1. Parts d'un cromosoma. *Imatge extreta de*
<https://ecologiaverde.com/cromosomas-que-son-tipos-y-partes-3670.html>

En el seu experiment es va descobrir que el teixit provinent dels pulmons semblava morir després que les cèl·lules s'haguessin dividit un cert nombre de vegades (al voltant de 50 vegades). En un segon experiment va deixar a les cèl·lules dividir-se 25 vegades, i les va congelar per un temps. En restablir la temperatura, les cèl·lules continuaven dividint-se fins al límit d'unes 50 divisions, i després morien. A mesura que les cèl·lules s'aproximaven a aquest límit d'edat, presentaven cada vegada més signes d'envel·liment cel·lular. Traient com a conclusió que hi havia un canvi perceptible a les cèl·lules relacionat amb l'edat i que aquestes es podien dividir un nombre finit de cops⁴.

⁴ Hayflick, L., 1965, "The limited in vitro time of human diploid cell strains, Experimental Cell Research", 37: 614-636



Imatge 2. Representació del límit de Hayflick. *Imatge extreta de*
<https://www.ernestoprietogratacos.com/post/longevidad-limite-de-hayflick>

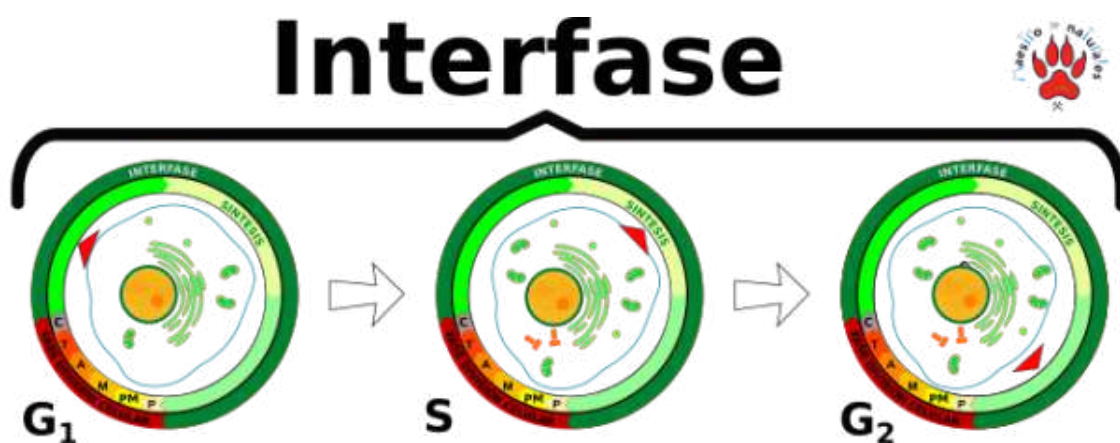
Com ja he explicat abans, l'envelliment de les cel·lules o la seva edat biològica (que a diferència de l'edat cronològica es correspon amb el nostre estat funcional intern i és un concepte fisiològic que informa sobre l'envelliment de les nostres cel·lules, teixits, òrgans i sistemes) és directament proporcional al nombre de divisions cel·lulars que aquesta ha patit, aquestes divisions són el procés pel qual una cel·lula mare es divideix en dues cel·lules filles i solen produir-se com a part d'un cicle cel·lular més gran en el qual la cel·lula creix i replica els seus cromosomes abans de dividir-se.

El cicle cel·lular és el conjunt ordenat d'etapes que caracteritzen la vida d'una cel·lula, des que es forma fins que es divideix per donar lloc a dues noves cel·lules filles. Aquests esdeveniments inclouen el creixement cel·lular, la replicació del material genètic i finalment la divisió. El cicle cel·lular consta principalment de dos períodes: l'interfase, on la cel·lula creix i es prepara per a la divisió, i la divisió mitòtica o mitosi.

Interfase

Durant l'interfase, la cèl·lula es troba en una fase d'alta activitat metabòlica, i, tot i que aparentment sembla en repòs, experimenta els següents processos:

- Fase G₁ (Growth o Gap 1): És el primer període de creixement, on la cèl·lula sintetitza ARN i proteïnes i duplica la seva mida i massa. En aquesta fase, la cèl·lula pot decidir si es prepara per a la divisió o entra en una fase de repòs (fase G₀), on realitzarà funcions especialitzades sense dividir-se.
- Fase S (Synthesis): És la fase en què té lloc la replicació de l'ADN, de manera que cada cromosoma queda format per dues cromàtides idèntiques. Així, la cèl·lula conté el doble de material genètic al final d'aquesta fase.
- Fase G₂ (Growth o Gap 2): En aquest període final de preparació, la cèl·lula sintetitza les últimes proteïnes i components necessaris per a la mitosi. L'ADN es revisa per reparar errors abans d'iniciar la divisió.



Imatge 3. Representació de la interfase. *Imatge extreta de*

<https://blocs.xtec.cat/naturalsom/1r-batx-bio/4-la-vida-de-la-cellula-cicle-cellular/>

Mitosi

La mitosi és el procés de divisió nuclear que permet a la cèl·lula repartir equitativament el material genètic duplicat entre les cèl·lules filles. La mitosi es divideix en les següents quatre fases:

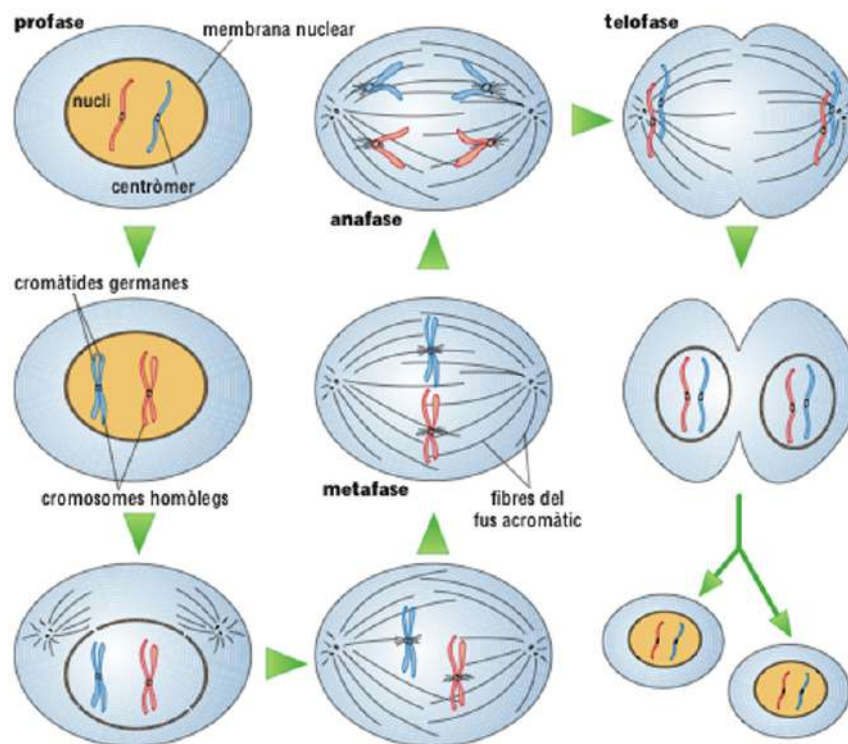
- Profase: En aquesta fase els cromosomes es condensen i es fan visibles, el nuclèol⁵ desapareix, i l'embolcall nuclear⁶ es fragmenta.
- Metafase: Els cromosomes es col·loquen al centre de la cèl·lula, alineats per l'acció del fus mitòtic⁷ formant l'equador de la cèl·lula. Aquesta etapa assegura que les cromàtides⁸ es distribueixin equitativament.
- Anafase: Les cromàtides germanes es separen i cadascuna es dirigeix cap a un pol oposat de la cèl·lula, garantint així una correcta distribució genètica.
- Telofase: Els cromosomes, ara separats, són envoltats per noves membranes nuclears, i comencen a descondensar-se. La cèl·lula disposa ara de dos nuclis idèntics.

⁵ Definició del terme en l'Annex 8.

⁶ Definició del terme en l'Annex 8.

⁷ Definició del terme en l'Annex 8.

⁸ Definició del terme en l'Annex 8.



Imatge 4. Representació de la mitosi. *Imatge extreta de*
<https://www.enciclopedia.cat/gran-enciclopedia-catalana/mitosi>

Finalment, la citocinesi és el procés pel qual es divideix el citoplasma per formar dues cèl·lules completes i independents. Que és diferent depenent del tipus de cèl·lula (animal o vegetal).

A què es degut l'envel·liment cel·lular?

Hi han diverses causes que afecten directament en l'envel·liment cel·lular. A nivell cel·lular, un factor important és el dany oxidatiu, on el metabolisme genera espècies reactives d'oxigen (ROS) que poden danyar membranes, proteïnes i àcids nucleics. També s'ha de tenir en compte el desgast cel·lular i la inestabilitat genètica, segons les quals el cos acumula petites lesions i mutacions que afecten la funció cel·lular amb el temps. També hi ha dany acumulat en l'ADN mitocondrial, que pot produir defectes energètics afectant així la funció cel·lular.

Però una de les causes més importants es la ja susdita generada per l'escurçament dels telòmers, on s'afirma que els cromosomes que emmagatzemen tota la informació genètica única estan coberts amb seccions de codi genètic repetides que indiquen el final d'aquests i que aquestes cobertes cromosòmiques es denominen telòmers i ajuden a mantenir la fiabilitat i precisió durant la replicació de l'ADN. Amb cada cicle de replicació, cada vegada que una cèl·lula es divideix (i com ja he explicat abans, a mesura que envelleix) es perd un petit percentatge del codi genètic i els telòmers s'escurcen. A mesura que això succeeix, és més probable que la cèl·lula experimenti danys en el seu ADN o una replicació incorrecta.

Per a preservar la integritat del seu codi genètic, els telòmers que es troben als extrems de cada cromosoma assenyalen quan és el moment en què la cèl·lula ha de deixar de replicar-se. Si no existissin aquests telòmers, la transcripció de gens i la divisió cel·lular continuarien indefinidament, la qual cosa conduiria a una acumulació potencialment perillosa de cèl·lules mal elaborades. En poques paraules les cèl·lules depenen dels telòmers per a saber quan és el moment per a deixar de dividir-se.



Imatge 5. Causes de l'envel·liment cel·lular. *Imatge extreta de*
<https://www.doctorfuster.com/que-es-envejecer/>

Quines conseqüències comporta l'envel·liment cel·lular?

La pertorbació del metabolisme provocada per aquest envel·liment cel·lular està relacionada amb moltes característiques de les cèl·lules envellides ja mencionades a l'apartat anterior, com l'escurçament dels telòmers, la inestabilitat genòmica, i la tendència a formar mutacions genètiques.

La disrupció de l'homeòstasi⁹ desestabilitza l'entorn intern del cos, provocant desequilibris que poden desencadenar una cascada de problemes de salut, incloent trastorns metabòlics, malalties cròniques i deteriorament de les funcions cel·lulars que contribueixen a l'envel·liment i altres malalties greus.

Un metabolisme disfuncional també està relacionat amb un mal funcionament dels mitocondris, la senescència cel·lular, és a dir quan les cèl·lules deixen de dividir-se, pot provocar desequilibris en els microbis intestinals i la capacitat reduïda de les cèl·lules per detectar i respondre als diferents nutrients.

Els trastorns neurològics, com la malaltia d'Alzheimer, són exemples principals de malalties relacionades amb l'edat amb un fort vincle entre el metabolisme desregulat i el deteriorament funcional. Per exemple en ratolins envellits, la capacitat de les cèl·lules de la medul·la òssia per produir, emmagatzemar i utilitzar energia és suprimida a causa de l'augment de l'activitat d'una proteïna que modula la inflamació. Aquest estat deficient energètic condueix a un augment de la inflamació que s'agreuja per la dependència d'aquestes cèl·lules envellides de la glucosa com a font principal de combustible.

⁹ Definició del terme en l'Annex 8.

Que són els grànuls PAS i quina relació tenen amb l'envel·liment cel·lular i amb els ratolins SAMP8?

L'envel·liment cerebral en ratolins comporta canvis morfològics i funcionals que es poden considerar com a resultat de processos anormals o patològics. Un d'ells és l'aparició i expansió progressiva amb l'edat d'estructures granulars degeneratives conegudes com a "grànuls PAS". Aquests grànuls es localitzen principalment a l'hipocamp, tot i que també s'han observat en altres zones del cervell com la escorça piriforme i entorrinal¹⁰. Els grànuls PAS s'han identificat com a dipòsits cerebrals associats a diverses malalties neurodegeneratives, com dipòsits d'amiloide, embolcalls neurofibril·lars, cossos de Lafora, corpora amylacea i cossos poliglucosans¹¹, generant controvèrsia i teories diverses.

Aquestes estructures s'organitzen en clústers i una de les seves característiques principals és que es tenyeixen positivament amb àcid-Schiff periòdic (PAS). Per aquest motiu, han estat nomenats amb freqüència com a grànuls PAS. Es troben en una àmplia gamma de soques de ratolí, però s'ha observat una quantitat notable de grànuls PAS en la soca de ratolí accelerada de senescència 8 (SAMP8), que exhibeix un procés d'envel·liment accelerat. Tot i que els grànuls PAS s'han estudiat principalment en ratolins, també s'han descrit en el cervell d'individus envellits d'altres espècies animals, com altres rosegadors i primats no humans. Els grànuls PAS van ser descrits per primera vegada al 1976 en ratolins vells de la soca C57BL/6 i més tard van ser descrits en ratolins SAMP8¹².

¹⁰ Definició del terme en l'Annex 8.

¹¹ Definicions dels termes en l'Annex 8.

¹² Manich, G., Cabezón, I., Augé, E., Pelegrí, C., & Vilaplana, J. "Periodic acid-Schiff granules in the brain of aged mice: From amyloid aggregates to degenerative structures containing neo-epitopes". (2016), Ageing Research Reviews, 27, 42-55.

2.3. Els ratolins SAMP8 com a models animals per l'estudi de l'envelliment cel·lular i els grànuls PAS

Característiques dels ratolins SAMP8 i diferències en el seu envelliment amb altres soques

El ratolí d'envelliment accelerat (senescence-accelerated mouse [SAM]) és un múrid¹³ que es caracteritza per la seva ràpida progressió cap a l'envelliment una vegada ha aconseguit l'edat de reproducció, una característica del SAM és la presència d'un nucli ben desenvolupat al sistema neurosecretor de l'hipotàlem que no apareix en altres soques de ratolins, el nucli accessori. L'augment dels nivells d'hormones neurosecretores podria tenir un paper important en els processos d'envelliment i deteriorament cognitiu.

L'any 1986, l'equip del Dr. Miyamoto va descriure dèficits en aprenentatge i memòria de la soca d'animals SAMP8, una de les proclius a la senescència accelerada. Des d'aleshores els ratolins SAMP8 han estat usats en nombrosos estudis on s'han descrit nombroses característiques comportamentals, neuropatològiques, neuroquímiques i neurofarmacològiques que han convertit aquesta soca en un excel·lent model de senescència així com per estudiar els mecanismes del declivi cognitiu amb l'edat o per als treballs de recerca biogerontològica¹⁴.

A més, quan es comparen ratolins SAM-P8 joves i vells, s'observa una clara alteració en els processos de respostes apreses a mesura que progressa l'edat. S'ha proposat que aquesta deterioració cognitiva està associat, entre altres raons, al progressiu dipòsit cerebral de beta amiloide (βA) i s'ha vist que l'ús d'anticossos contra el βA millora les capacitats cognitives en aquests ratolins. Els SAM-P8 mostren un elevat estrès oxidatiu, troballa coherent amb els efectes de l'acció dels radicals lliures d'oxigen en diverses biomolècules que produeixen alteracions en les funcions cel·lulars.

¹³ Definició del terme en l'Annex 8.

¹⁴ Definició del terme en l'Annex 8.



Imatge 6. Exemple de ratolí de la soca SAM. *Imatge extreta de*
<https://www.inotiv.com/model/samp8-tahsd>

Com es va aconseguir l'envel·liment accelerat en aquests?

El primer article descrivint el model SAM (senescence accelerated mice) va ser publicat a *Mechanisms of Ageing and Development* l'any 1981. La soca de ratolins SAM deriva originàriament dels ratolins AKR/J. L'any 1968 vàries parelles de ratolins AKR/J van ser donades al departament de patologia del Institut de recerca de malalties toràciques (CDRI) de la universitat de Kyoto, Japó on la soca va ser mantinguda de manera estàndard mitjançant creuaments entre germans. Als anys 1972-1973, va aparèixer descendència amb signes de pèrdua d'activitat, pèrdua de pèl i la seva lluentor i mort prematura, sense existir evidència de retard en el creixement, malformacions, paràlisi de les extremitats o altres signes neurològics tals com tremolors o convulsions. Degut a que aquests fenotips eren heretats per les següents generacions, l'any 1975 es van seleccionar cinc membres amb les citades característiques com a progenitors de les sèries P, propenses a la senescència. De la mateixa manera, es van seleccionar tres animals que presentessin signes normals d'envel·liment com a progenitors de les sèries R, resistent a la senescència.

Amb el transcurs dels anys, algunes soques van esdevenir inviables i van aparèixer-ne també de noves que complien els criteris de consanguinitat per soques. L'any 1991, d'acord amb les normes internacionals de nomenclatura de soques de ratolins consanguinis, es van establir els termes SAMP (senescence-accelerated mice prone) i SAMR (senescence-accelerated mice resistant) per a les soques sensibles i resistents a l'envel·liment accelerat respectivament, quedant establertes diferents colònies de ratolins SAMP i SAMR. És a dir, la reproducció endogàmica d'aquests ratolins va permetre establir la soca d'animals SAM, que té un cicle vital d'uns 12 mesos, prona a l'envel·liment (SAM-P), mentre que un altre grup va servir per a instituir la línia retardada (SAM-R) que té una longevitat d'uns 17 mesos, un cop s'ha assolit l'edat adulta i hi ha un declivi cognitiu concomitant. Cal recalcar que l'esperança de vida mitjana dels animals SAMP era de 9,7 mesos, un 40% més curta que la dels animals SAMR, de 16,3¹⁵.

2.4. Per a que serveix aquesta investigació? Es pot extrapolar als humans?

Si administréssim un colorant vital¹⁶ a la sang d'una rata o un ratolí, passats uns minuts l'animal tindria tots els òrgans del color d'aquest, amb excepció del seu cervell. L'explicació és senzilla: en el cervell existeix una barrera, coneguda com a barrera hematoencefàlica, que limita enormement l'intercanvi de substàncies entre la sang i aquest òrgan. Però aquesta barrera no sols limita l'entrada de substàncies al cervell, també frena la seva sortida, el que ens planteja una qüestió; com fa el cervell per a treure les escombraries com per exemple els grànuls PAS en cas dels ratolins?

¹⁵ Informació proporcionada per la Universitat de Barcelona.

¹⁶ Definició del terme en l'Annex 8.

Doncs bé, estudis recents indiquen que el cervell té un sistema propi de recollida d'escombraries, aquest sistema va ser descobert fa poc més de deu anys, en 2012, i va ser anomenat sistema glinfàtic, la funció d'aquest mecanisme és eliminar o netejar els residus que es van acumulant en el parènquima cerebral¹⁷.

El sistema glinfàtic implica un flux de líquid intersticial i fa en el cervell la mateixa funció (drenatge de deixalles) que el sistema limfàtic fa en la resta d'òrgans del cos. Mitjançant aquest drenatge, es poden eliminar productes de deixalla de distinta naturalesa que es trobin en l'interstici cerebral¹⁸.

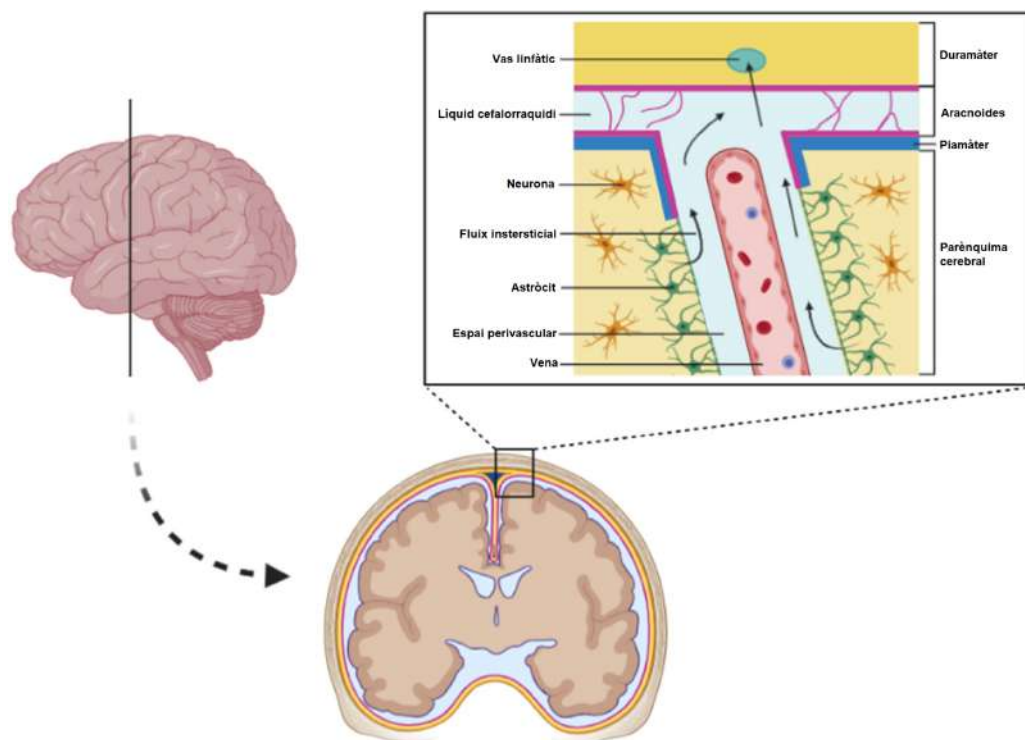
Les cèl·lules responsables de generar els productes de deixalles, denominats científicament cossos amilacis s'anomenen astròcits. Generalment aquests cossos amilacis són estructures esfèriques i relativament grans. Poden aconseguir diàmetres de més de 20 micres, superant les 10 micres dels capil·lars sanguinis, massa grandària per a eliminar-se a través de la sang.

Físicament el cervell està molt ben protegit. Es podria dir que aquest “sura” dins del crani, suspès en un medi aquós anomenat líquid cefalorraquidi, doncs bé, algunes substàncies de deixalla cerebrals són abocades directament al líquid cefalorraquidi, i aquest és el cas dels cossos amilacis. D'aquí ve que sigui necessari netejar i renovar el líquid cefalorraquidi, extraient els cossos amilacis acumulats. Una tasca que està a càrrec del sistema limfàtic.

¹⁷ Definició del terme en l'Annex 8.

¹⁸ Definició del terme en l'Annex 8.

En aquest sentit, el que s'està investigant en aquest treball és la naturalesa, la funció i el comportament d'aquests grànuls PAS que apareixen en ratolins envellits i si existeix una veritable diferència en la quantitat de grànuls generats als seus cervells que depengui del sexe de l'exemplar (és a dir si aquesta quantitat de grànuls pot variar depenent de si el ratolí és mascle o femella), i per tant si l'envel·liment cel·lular que presenta aquest té una relació directa amb el seu sexe. Aquesta investigació es podria extrapolar als humans ja que es pot establir un gran paral·lelisme entre els grànuls PAS i els cossos amilacis explicats prèviament generats pel sistema glinfàtic humà, amb la finalitat d'estar més a prop de comprendre el mencionat sistema, de saber com aquest és afectat per l'envel·liment cel·lular i conèixer com afecta aquesta acumulació de residus al nostre organisme, i inclús, si en humans també pot arribar a existir una diferència entre l'envel·liment cel·lular entre mascles i femelles.



Imatge 7. Representació del sistema glinfàtic. *Imatge extreta de*

<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-el-sistema-glinfatico-su-implicacion-S0025775320308551>

3. Part Pràctica (Informe experimental)

3.1. Introducció pràctica

Ja hem vist a la part teòrica que són els grànuls PAS i la seva relació amb l'envel·liment cel·lular i amb els ratolins de la soca SAMP8, uns ratolins amb envel·liment accelerat que presenten aquests grànuls de forma primerenca. En aquesta part pràctica he treballat en col·laboració amb un estudi portat per la Universitat de Barcelona, on s'està investigant la naturalesa, la funció i el comportament d'aquests grànuls PAS amb la finalitat d'estar més a prop de comprendre l'envel·liment cel·lular donat al sistema glimfàtic humà degut a l'ampla semblança entre els grànuls i els cossos amilacis explicada prèviament. En aquest intent per a descobrir nova informació sobre el sistema glimfàtic humà, investigarem a través d'un procediment experimental si existeix cap diferència en l'aparició de grànuls PAS i per tant en la forma d'envel·liment entre els ratolins SAMP8 mascles i femelles, i en conseqüència, si hi podria haver una diferència entre l'envel·liment produït al cervell dels homes i les dones en el cas dels humans, aquesta investigació s'origina del fet que els ratolins femelles no han estat gairebé estudiats al llarg de la història (la gran majoria de les investigacions s'havia fet només amb mascles), no ha estat fins als darrers anys on s'ha començat a comptar també amb aquests per als experiments per identificar grànuls PAS als ratolins i comparar-los amb els cossos amilacis humans, i en els escassos estudis¹⁹ recents que s'han fet amb ratolins femelles no s'ha arribat a identificar certament una diferència entre els grànuls PAS generats en aquests i en els exemplars mascles, el que ens podria servir per teoritzar si, al menys als ratolins, existeix una diferència en l'envel·liment de l'organisme entre els gèneres.

¹⁹ Estudis a l'Annex 4.

3.2. Pregunta i hipòtesi pràctica

Existeixen diferències en l'envel·liment entre ratolins mascles i femelles? Existeix la presència de grànuls PAS en els ratolins femelles sabent que són unes estructures que fins ara només han estat observades al cervell de ratolins mascles envellits?

Crec que l'envel·liment entre ratolins mascles i femelles serà semblant degut a que malgrat en els limitats estudis recients s'han trobat petites diferències, les femelles s'han estudiat en molta menor quantitat en els últims anys i es pot donar l'aparició de grànuls PAS en ratolins femelles envellits (com ja s'ha observat prèviament en els ratolins mascles envellits), sobretot tenint en compte l'investigació tan primerenca que s'ha realitzat fins ara, per tant suposo que la quantitat de grànuls PAS trobats en els diferents gèneres serà més o menys la mateixa.

Per confirmar o refutar la meua hipòtesi, realitzarem una observació al microscopi i comptabilitzarem els grànuls PAS de diferents mostres de l'hipocamp de tretze ratolins de la soca SAMP8, sis mascles i set femelles.

3.3. Procediment general

Aquest procés es basa generalment en dos parts; la primera és l'obtenció de mostres, dividida en una perfusió (on s'extreu el cervell del ratolí SAMP8), un tall (on es talla aquest cervell en làmines extremadament primes per ser investigat al microscopi) i una tinció (on es tenyeixen les parts desitjades del cervell per tal de poder fer un seguiment més precís amb microscopi) i la segona part consta de l'observació i quantificació dels grànuls PAS a les mostres obtingudes.

Per cadascun dels punts anteriorment explicats, es necessiten uns materials que es concreten en l'apartat corresponent. Per veure absolutament totes les imatges de cada pas consultar la carpeta adjunta a l'Annex 3.

Materials, reactius i equips

Materials per a la perfusió

1. Equipament protector (guants, ulleres, màscares, abric de laboratori)
2. Aigua desionitzada
3. Pentobarbital de sodi (Sigma, número de catàleg: P-010)
4. 1,5% pentobarbital de sodi (en salí)
5. NaCl (Sigma-Aldrich, número de catàleg: S7653)
6. Salina (0,9% clorur de sodi)
7. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, número de catàleg: 71645)
8. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, número de catàleg: 71663)
9. Paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, número de catàleg: P6148)
10. NaOH (Sigma-Aldrich, número de catàleg: S8045)
11. Àcid hidroclopòric (HCl) (Sigma, número de catàleg: H1758)
12. Heparina (Sigma, número de catàleg: H3149)
13. Azida de sodi (Sigma, número de catàleg: S2002)
14. 4% paraformaldehid (PFA, en ebullició de fosfat de 0,1 M, pH 7.0-7.4)
15. Fòrceps de dissecció (RWD, número de catàleg: F12018-13)²⁰
16. Fèrcules oftalmològiques (RWD, número de catàleg: F12006-10)²¹
17. Fòrceps hemostàtics (RWD, número de catàleg: F21002-12)²²
18. Tisores de teixit (RWD, número de catàleg: S13052-12)²³
19. Tisores fines (RWD, número de catàleg: S12005-10)²⁴
20. Rampa vascular (RWD, número de catàleg: R33001-48)²⁵
21. Microespàtula (Thermo Fisher, número de catàleg: 21-101-10)²⁶
22. Xeringues de 1ml i 20ml²⁷
23. Agulla d'infusió de 25 o 27 exemplars²⁸
24. Cilindre de mesura
25. Balanç analític (SARTORIUS, número de catàleg: BSA124S)
26. Tub cònic de 50 ml (Thermo Fisher, número de catàleg: 339652)

²⁰ Visualització a la imatge 8.

²¹ Visualització a la imatge 8.

²² Visualització a la imatge 8.

²³ Visualització a la imatge 8.

²⁴ Visualització a la imatge 8.

²⁵ Visualització a la imatge 8.

²⁶ Visualització a la imatge 8.

²⁷ Visualització a la imatge 8.

²⁸ Visualització a la imatge 8.



Imatge 8. Estris utilitzats per a la perfusió. *Imatge extreta de*
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8005872/>

Materials per al tall

1. Criòstat
2. Bisturí
3. Pinzells
4. Pinces
5. Mostra de cervell de ratolí prèviament congelat a -20°C

Materials per a la tinció

1. Les mostres de cervell de ratolí prèviament tallades
2. Campana de gasos
3. Àcid periòdic 0.5% (19324-05 Electron Microscopy Sciences) ó Àcid periòdic 5% (19324-50 Electron Microscopy Sciences)
4. Reactiu de Schiff (26052-06 Electron Microscopy Sciences). Conservació nevera (4° C) i protegit de la llum.
5. Hematoxilina (3870 J.T. Baker)
6. Reactiu de Carnoy (preparat a partir del protocol de Cresyl Violet Staining)
7. Etanol absolut, ACS (ET00051000, Scharlab)
8. Xilè (reutilitzat o XI00502500, Scharlab)

Procediment per l'obtenció de mostres

Les parts del procediment estan explicades *a grosso modo*, per saber el procediment realitzat pas per pas i amb més detall, cal consultar l'Annex 2.

Perfusió

Primerament es realitza la perfusió del cervell, aquest mètode també conegut com a perfusió transcardíaca amb salí seguida d'un 4% de paraformaldehid (PFA) s'utilitza àmpliament per netejar la sang i conservar el cervell per a la immunotinció o la hibridació in situ. El PFA es converteix en formaldehid en solució, que uneix proteïnes i molècules d'ADN per preservar l'estructura dels teixits i les cèl·lules, a l'Annex 2.1. s'explica detallada i il·lustradament el procés complet.

Tall

Seguidament es portarà a cau el tall del cervell, el tall es realitzarà amb cervells prèviament perfosos i congelats a ultracongeladors (-80°C) per un posterior tall al criòstat (-21°C).

El cervell dels ratolins es divideix en 3 parts principals: el bulb olfactori, la part anterior i l'hipocamp, en aquesta pràctica ens interessa la part darrera on es troba l'hipocamp, ja que és on més grànuls PAS apareixen, normalment s'utilitzen en total 70 portaobjectes amb 3 mostres de 20 micres cadascú.

Amb un anterior muntatge del cervell a la platina del criòstat amb OCT orientat verticalment (bulbs a la part anterior), es situarà al portabloc i s'orientarà per equilibrar els hemisferis, després de determinar el gruix del tall (d'uns 20 µm) es comença a tallar pels bulbs, comprovant la textura per si cal desplaçar la ganiveta o ajustar la temperatura, per posteriorment recollir algun tall de prova i acabar tallant el cervell per complet en diversos talls diferents. A l'Annex 2.2. s'explica detallada i il·lustradament el procés complet.

Tinció

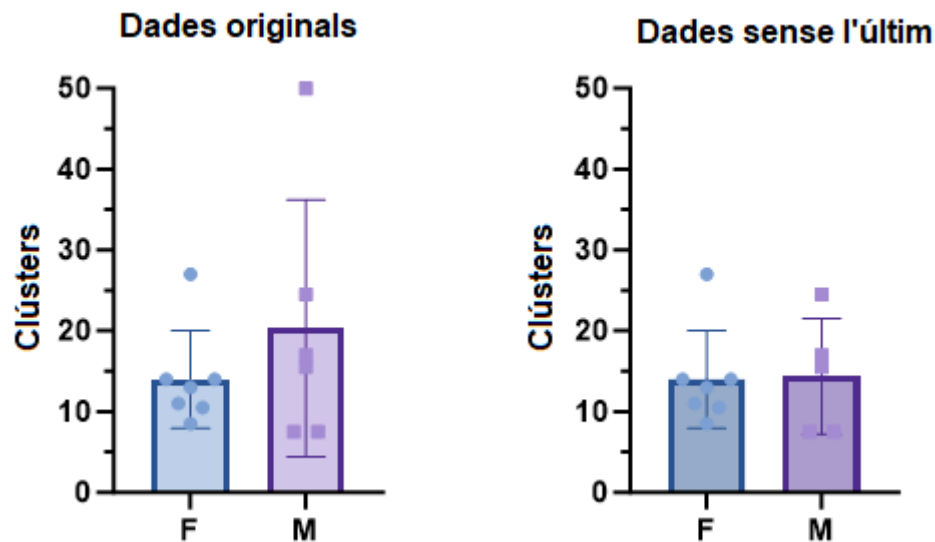
Per últim abans de conseguir les mostres definitives es farà una tinció en les mostres prèviament tallades, aquesta tècnica coneguda com a tinció PAS (Periodic Acid-Schiff) és una de les tincions més comunament utilitzada en histologia i s'utilitza per evidenciar la presència de grups aldehids formats per oxidació prèvia dels hidrats de carboni. El fonament de la reacció consisteix a oxidar els teixits mitjançant l'àcid periòdic per incrementar el nombre de grups carbonil (aldehids o cetones) presents en ells. Posteriorment, es tracta la mostra amb el reactiu de Schiff que reacciona amb dos grups aldehídics contigus donant lloc a una coloració vermell-porpra característica, aquesta reacció és molt útil degut a que els grànuls PAS són sucres de poliglucosa amb gran quantitat de grups carbonils. A l'Annex 2.3. s'explica detallada i il·lustradament el procés complet.

Observació i quantificació dels grànuls

Un cop obtingudes les mostres, hem procedit a observar el número de clústers (agrupació de grànuls PAS) que observabem en cada part de l'hipocamp de cada cervell de ratolí, per a aquest procediment hem fet servir tres mostres de cada banda d'hipocamp per ratolí, és a dir sis mostres de làmines de cervell per cada ratolí, en total hem observat els cervells de tretze ratolins, set femelles i sis mascles, com es pot observar a la taula a continuació (el seu significat s'explica posteriorment amb exemplificacions).

Animal	Sexe	Punts hipocamp dret	Punts hipocamp esquerre	Clústers hipocamp dret	Clústers hipocamp esquerre	Clústers totals
910	F	14	14	7	7	14
911	F	12	5	6	2,5	8,5
912	F	13	8	6,5	4	10,5
913	F	6	20	3	10	13
928	F	10	12	5	6	11
929	F	28	26	14	13	27
930	F	16	12	8	6	14
942	M	20	11	10	5,5	15,5
943	M	8	7	4	3,5	7,5
944	M	14	20	7	10	17
945	M	10	5	5	2,5	7,5
946	M	25	24	12,5	12	24,5
947	M	54	46	27	23	50

Imatge 9. Taula amb la quantificació dels grànuls PAS a l'hipocamp. *Font pròpia.*



Imatge 10. Gràfic estadístic representant la mitjana la quantificació dels grànuls PAS. *Font pròpia.*

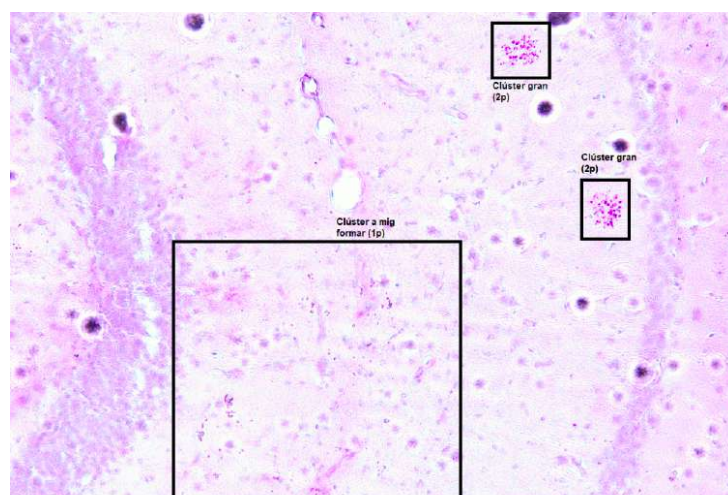
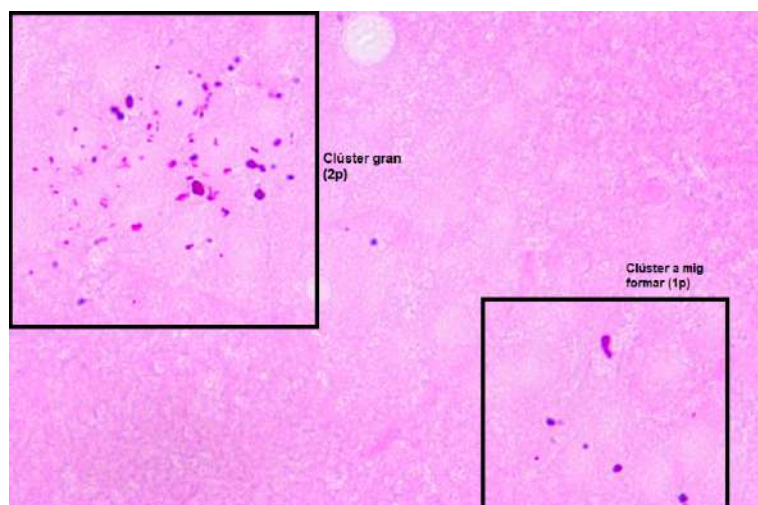
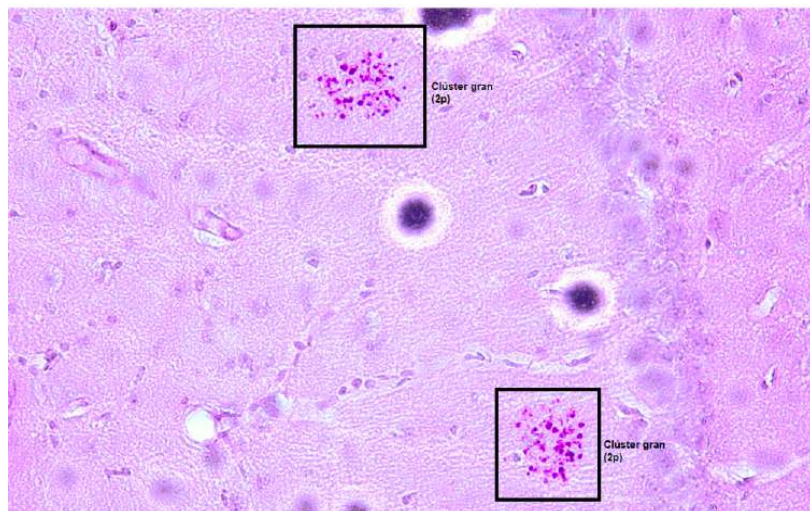
Els resultats van ser analitzats estadísticament pel programari GraphPad PRISM²⁹. Les dades es presenten com a mitjana. L'error estàndard de la mitjana (SEM), i els mitjans es van comparar amb el test estadístic "student's t-test" de dues cues sense emparellar, en el qual s'estudia si el fet de que un ratolí sigui mascle o femella té un impacte en la seva quantitat de grànuls PAS. Si el valor p, que representa la significància estadística (és a dir com d'estranya o comuna és una observació) és més gran de 0.05³⁰ (per exemple 0.25, o 0.32 o 0.75 o 0.9999), es podria dir que el gènere del ratolí no té a veure amb la quantitat de grànuls PAS en aquest. En canvi, si el valor de p fos menor de 0.05 com per exemple, 0.03 (o potser 0.00008, o 0.000000001, etc.) es podria dir amb certa seguretat que hi ha una diferència entre la quantitat de grànuls PAS al cervell depenent del gènere del ratolí.

²⁹ GraphPad Software, Inc.

³⁰ El valor 0.05 va ser proposat per l'estadístic Ronald Fisher en la dècada de 1920 com un llindar pràctic per a determinar si un resultat era prou "insòlit" com per a rebutjar la hipòtesi nul·la, encara que no és una regla estricta i depèn del context de l'estudi.

És a dir, per a poder afirmar que hi ha una verdadera diferencia significativa entre la quantitat de grànuls PAS de ratolins mascles i femelles i per tant que les dues barres estadístiques siguin diferents, la p ha de ser menor de 0.05. Les dades obtingudes indiquen que el valor de p és de 0.34 (lluny de donar diferències quan tenim en compte tots els valors. I si tenim en compte tots els valors menys el que s'allunya, és a dir el ratolí mascle 947, la P és de 0.91, encara més lluny de les diferències) és a dir en cap dels dos casos s'assoleix la significació estadística perquè en cap dels dos el valor de p és menor a 0.05, el que ens fa concloure que almenys en el nostre experiment realitzat no existeix una diferència entre el nombre de grànuls PAS generats en els cervells dels ratolins mascles i femelles, i pel que això comporta, tampoc hi ha cap diferència entre el seu envelliment en aquest àmbit.

Per a quantificar aquests grànuls PAS, dos observadors van analitzar una secció cerebral de ratolí amb un microscopi làser. Com que els grànuls observats en l'hipocamp estan agrupats, cada observador va quantificar el nombre de cúmuls en cada regió hipocampal de la secció cerebral. El nombre mitjà obtingut pels observadors es va utilitzar per a l'anàlisi estadística. Per calcular els resultats ens hem basat en aquests investigadors utilitzant un mètode on cada grup de grànuls d'una mida mitjana o gran val dos punts, i un grup petit de grànuls val un punt, per a sumar després els punts obtinguts de les tres mostres de cada part de l'hipocamp per tal d'aconseguir el valor total de punts de cada part i després dividir els punts a la meitat per obtenir el nombre mitjà de clústers obtinguts. A continuació mostraré tres exemples de quantificació, on en total s'obtindrien 12 punts en la part adient de l'hipocamp, el que es traduiria en 6 clústers:



Imatges 11, 12 i 13. Observació i quantificació dels grànuls PAS a l'hipocamp. *Font pròpia.*

3.4. Conclusions de la part pràctica

En els resultats es pot concloure que la diferencia en l'aparició de clústers de grànuls PAS entre ratolins mascles i femelles no és significativa, és més, si no es té en compte l'últim ratolí mascle investigat la diferència és gairebé inexistent, per tant en conclusió i responent a la pregunta inicial de la part pràctica, es pot afirmar que els grànuls PAS, malgrat haver estat unes estructures trobades únicament en ratolins mascles envellits fins ara, els hem pogut observar també en ratolins femelles envellits, i no només això, sinó que també podem dir que segons l'experiment realitzat no existeix una diferència entre el nombre de grànuls PAS generats en els cervells dels ratolins mascles i femelles, i pel que això comporta, tampoc hi ha cap diferència entre el seu envel·liment en aquest àmbit.

En conclusió la meua hipòtesi era correcta, tal com havia predit, malgrat la manca d'estudis sobre els grànuls PAS en ratolins femelles es pot concloure que els grànuls també estan presents en aquests, i que la quantitat de grànuls originats en els ratolins de la soca SAMP8 tant en mascles com en femelles és molt semblant, i no hi ha una diferència significativa entre aquests, per tant en aquest àmbit tant als ratolins com als humans l'envel·liment cel·lular és independent del sexe de l'exemplar.

4. Conclusions generals

Recordem que l'envel·liment cel·lular és un procés en què les cèl·lules diploides, després d'un cert nombre de divisions (normalment al voltant de 50), perden la capacitat de dividir-se. Aquest fenomen, conegut com a Límit de Hayflick, s'explica en part per la reducció progressiva dels telòmers, les regions situades als extrems dels cromosomes, que es van escurçant a cada divisió cel·lular, fet que marca l'envel·liment de la cèl·lula. Quan els telòmers es fan massa curts, la cèl·lula deixa de dividir-se per evitar la pèrdua d'informació genètica en els extrems dels cromosomes i, en última instància, mor i entra en senescència, un estat en què la cèl·lula cessa de respondre als estímuls que afavoririen la divisió. Després d'aquest treball, i en resposta a les preguntes plantejades inicialment i amb el coneixement adquirit al llarg de la recerca d'informació i del procediment experimental realitzat, puc concloure que aquest procés d'envel·liment cel·lular, està estrictament relacionat amb l'aparició de grànuls PAS, que són efecte directe de l'envel·liment i la presència dels quals augmenta a mesura que aquest avança.

També puc concloure que, malgrat encara s'està investigant la naturalesa, la funció i el comportament d'aquests grànuls PAS en ratolins SAMP8 (que són ratolins que presenten envel·liment a edats més primerenques i per tant una major quantitat de grànuls PAS, aquests han estat usats en nombrosos estudis, fet que han convertit aquesta soca en un excel·lent model de senescència per estudiar els mecanismes de l'envel·liment accelerat), aquests estudis es fan amb la finalitat d'estar més a prop de comprendre l'envel·liment cel·lular donat al sistema glimfàtic humà, això és degut a l'ampla semblança entre els grànuls i els cossos amilacis, per tant es podria determinar que sí que hi ha certa similitud entre l'envel·liment de les diferents espècies, al menys entre els ratolins i els humans. En aquest intent per a descobrir nova informació sobre el sistema glimfàtic humà, he col·laborat amb una investigació en la qual a través d'un procediment experimental s'ha intentat determinar si existeix cap diferència en l'aparició de grànuls PAS i per tant en la forma d'envel·liment entre els ratolins SAMP8 mascles i femelles, i en conseqüència, si hi podria haver una diferència entre l'envel·liment produït al cervell dels homes i les dones en el cas dels humans, donant com a conclusió que en aquest àmbit l'envel·liment cel·lular és independent del sexe.

D'aquest treball, es podrien extreure preguntes per a futures investigacions o treballs de recerca, com per exemple, aprofundir en si hi ha un veritable paral·lelisme entre els grànuls PAS generats en ratolins envellits i els cossos amilacis generats pel sistema glinfàtic humà, o com afecta l'envelliment cel·lular a aquest sistema limfàtic i com repercuteix l'acumulació de cossos amilacis en el deteriorament del nostre organisme o si hi ha alguna forma amb els coneixements actuals d'envelliment cel·lular i del sistema glinfàtic de poder endarrerir o atenuar els efectes d'aquest envelliment al cervell i si no és així, si en un futur es pot descobrir alguna forma de fer-ho.

5. Agraïments

Vull agrair sobretot a la meva tutora en aquest treball, Carol Saniger, qui m'ha ajudat i guiat per a fer aquest document que tant he disfrutat de realitzar des del seu inici, en el qual ha col·laborat no només en la seva estructuració, sinó també ajudant-me a prendre moltes decisions que m'han fet arribar fins al punt on em trobo ara mateix, amb un treball del qual em sento plenament orgullós i del qual puc dir sense cap dubte que he fet meu.

També agrair al Dr. Jaume del Valle i el projecte FORCES de l'Institut de Desenvolupament Professional (IDP) de la Universitat de Barcelona (UB). També m'agradaria mentar a Clara Romera, Marina Sartorio, Raquel Alsina i la dra. Marta Riba que em van ensenyar a com es perfora un animal, a extreure un cervell de ratolí, a tallar un cervell de ratolí amb un criòstat i obtenir-lo, a fer la tinció de PAS, a mirar pel microscopi i observar grànuls PAS i a quantificar-los. I també voldria agrair a la dra. Carme Pelegrí i el dr. Jordi Vilaplana per acollir-me al seu grup de recerca per a que hi pogués dur a terme la recerca pertinent al meu TR.

Agrair a més a la meva família per suportar-me durant aquest procés i proporcionar-me els recursos necessaris per tal que sigui possible l'elaboració d'aquest treball, i per ajudar-me en la lectura i en la identificació d'errors o conceptes complexos en el treball.

A part vull donar les gràcies als meus amics, que sempre han estat per solventar dubtes puntuals i aconsellar-me quan ho he demanat en àmbits tant tècnics com formals.

Per últim, agrair als ratolins emprats per sacrificar la seva vida per a l'experiment.

6. Bibliografia

- S. Fuster, Joan. ¿Qué es envejecer? [en línia]. Dr. Joan S. Fuster, 16 d'octubre de 2018. [Consultat: 29 d'octubre de 2024]. Disponible a: <<https://www.doctorfuster.com/que-es-envejecer/>>
- 4. La vida de la cèl·lula (cicle cel·lular) [en línia]. Naturalsom. [Consultat: 24 de setembre de 2024]. Disponible a: <<https://blocs.xtec.cat/naturalsom/1r-batx-bio/4-la-vida-de-la-cellula-cicle-cellular/>>
- Gilbert, S. F. "Aging: The Biology of Senescence. Developmental Biology". NCBI Bookshelf, 2000. També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10041/>>
- Aging: What to expect [en línia]. Mayo Clinic. [Consultat: 1 de juliol de 2024]. Disponible a: <<https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/healthy-aging/in-depth/aging/art-20046070>>
- Pan, W., Li, W., Wu, H., Xie, X., Xie, M., Nie, Q., Liu, Z., & Cai, S. "Aging-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) Mice Experiment and Network Pharmacological Analysis of Aged Liupao Tea Aqueous Extract in Delaying the Decline Changes of the Body". (2023), Antioxidants, 12(3), 685. També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://doi.org/10.3390/antiox12030685>>
- Riba, M., Romera, C., Alsina, R., Alsina-Scheer, G., Pelegrí, C., Vilaplana, J., & Del Valle, J. "Analyzing the Virchow pioneering report on brain corpora amylacea: shedding light on recurrent controversies". (2023), Brain Structure And Function, 228(6), 1371-1378. També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://doi.org/10.1007/s00429-023-02664-5>>

- Pelegri, C., Augé, E., Vilaplana, J., & Riba, M. Así saca la basura el cerebro [en línia]. The Conversation. [Consultat: 13 de juliol de 2024]. Disponible a: <<https://theconversation.com/asi-saca-la-basura-el-cerebro-129808>>
- Colorantes vitales [en línia]. EcuRed. [Consultat: 13 de juliol de 2024]. Disponible a: <https://www.ecured.cu/Anexo:Colorantes_vitales>
- Cos de poliglucosà [en línia]. Viquipèdia, L'enciclopèdia Lliure. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cos_de_poliglucos%C3%A0>
- Crecimiento celular [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 14 de maig de 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Crecimiento_celular>
- Álvarez Bernard, Daniela. Cromosomas: qué son, tipos y partes [en línia]. Ecología verde, 22 de febrer de 2022. [Consultat: 19 de juliol de 2024]. Disponible a: <<https://ecologiaverde.com/cromosomas-que-son-tipos-y-partes-3670.html>>
- Divisió cel·lular [en línia]. Viquipèdia, L'enciclopèdia Lliure. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Divisi%C3%B3_cel%C2%B7lular>
- Edad biológica [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 14 de maig de 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Edad_biol%C3%B3gica>
- El «boom» en la investigación del cerebro: sistema glinfático [en línia]. Psiquiatria.com, 5 de juliol de 2023. [Consultat: 15 d'octubre de 2024]. Disponible a: <<https://psiquiatria.com/neuropsiquiatria/el-boom-en-la-investigacion-del-cerebro-sistema-glinfatico>>

- Toriello, M., González-Quintanilla, V., & Pascual, J. "El sistema glinfático y su implicación en las enfermedades del sistema nervioso". (2021), Medicina Clínica, 156(7), 339-343. També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-el-sistema-glinfatico-su-implicacion-S0025775320308551>>
- Crespo, D., Fernández-Viadero, C., Verduga, R., Alonso, L., & Megías, M. "El sistema neurosecretor del ratón de envejecimiento acelerado: un modelo de deterioro cognitivo". (2006), Revista Española de Geriatria y Gerontología, 41(3), 171-177. També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-geriatria-gerontologia-124-articulo-el-sistema-neurosecretor-del-raton-13088488>>
- Ruiz Torres, A. "Envejecimiento: causa, mecanismos y regulación". (1 de desembre del 2001), Revista Española de Geriatria y Gerontología (Páginas 13-19). També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-geriatria-gerontologia-124-articulo-envejecimiento-causa-mecanismos-regulacion-13023383>>
- Envelliment cel·lular [en línia]. Viquipèdia, L'enciclopèdia Lliure. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Envelliment_cel%C2%B7lular>
- Explicación sobre el envejecimiento de las células: qué causa el envejecimiento celular [en línia]. Ask The Scientists. [Consultat: 13 de juliol de 2024]. Disponible a: <<https://askthescientists.com/es/cellularaging/>>
- Hugo von Mohl [en línia]. Viquipèdia, L'enciclopèdia Lliure. [Consultat: 14 de maig de 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Hugo_von_Mohl>
- Inmortalidad hayflick [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Inmortalidad_Hayflick>

- Valentina, O. M. D., & Felipe, R. M. D. "Implementación del ensayo de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos in vitro de cáncer colorrectal y seno". (2022). També es pot trobar disponible de forma digital a:
<<https://repositorio.unbosque.edu.co/items/e5196cd9-2e51-4143-b433-bac31fd64187>>
- Gratacós, E. P. LA VIDA TRAS EL LÍMITE DE HAYFLICK [en línia]. Ernesto Prieto Gratacós, 8 de desembre de 2022. [Consultat: 19 de juliol de 2024]. Disponible a:
<<https://www.ernestoprietogratacos.com/post/longevidad-limite-de-hayflick>>
- Límite de Hayflick [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a:
<https://es.wikipedia.org/wiki/L%C3%ADmite_de_Hayflick>
- Mitosi [en línia]. Enciclopedia.cat. [Consultat: 24 de setembre de 2024]. Disponible a:
<<https://www.enciclopedia.cat/gran-enciclopedia-catalana/mitosi>>
- Manich, G., Cabezón, I., Augé, E., Pelegrí, C., & Vilaplana, J. "Periodic acid-Schiff granules in the brain of aged mice: From amyloid aggregates to degenerative structures containing neo-epitopes". (2016), Ageing Research Reviews, 27, 42-55. També es pot trobar disponible de forma digital a:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26970374/>>
- SAM (senescence accelerated mice) inbred mice: SAMP8/TaHsd [en línia]. Inotiv. [Consultat: 15 d'octubre de 2024]. Disponible a:
<<https://www.inotiv.com/model/samp8-tahsd>>
- Senescencia [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 14 de maig de 2024]. Disponible a: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Senescencia>>

- Fernández, A., Quintana, E., Velasco, P., Moreno-Jimenez, B., De Andrés, B., Gaspar, M. L., Liste, I., Vilar, M., Mira, H., & Cano, E. "Senescent accelerated prone 8 (SAMP8) mice as a model of age dependent neuroinflammation". (2021), Journal Of Neuroinflammation, 18(1). També es pot trobar disponible de forma digital a: <<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02104-3>>
- Telómero [en línia]. Wikipedia, la Enciclopedia Libre. [Consultat: 7 de maig de 2024]. Disponible a: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Tel%C3%B3mero>>
- Tinció de PAS [en línia]. ITW Reagents. [Consultat: 15 de juny de 2024]. Disponible a: <https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD15/es/CEIVD15_es.pdf>
- Wu, J., Cai, Y., Wu, X., Ying, Y., Tai, Y., & He, M. Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation [en línia]. BIO-PROTOCOL, 2021. [Consultat: 22 d'octubre de 2024]. Disponible a: <<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3988>>
- McReynolds, M. R. What links aging and disease? A growing body of research says it's a faulty metabolism [en línia]. The Conversation. [Consultat: 1 de juliol de 2024]. Disponible a: <<https://theconversation.com/what-links-aging-and-disease-a-growing-body-of-research-says-its-a-faulty-metabolism-236047>>

7. Annexes

Annex 1. Postulacions del Teorema del Soma d'un sol ús

1. L'envel·liment es deu a limitacions que han sorgit en el manteniment somàtic i la reparació, pel fet que competeix amb elles de manera prioritària la reproducció.
2. L'envel·liment, per tant, és resultat de l'acumulació durant la vida de mal en les cèl·lules i teixits.
3. Contribueixen a l'envel·liment múltiples mecanismes (ja que són formes múltiples de manteniment somàtic, totes les quals estan subjectes al mateix procés d'optimització).
4. Els principals gens que determinen la longevitat i la taxa de senescència són gens que especifiquen els nivells de funcions de manteniment (gens de reparació d'ADN, enzims antioxidants, proteïnes d'estrès, etc.).
5. El procés d'envel·liment és intrínsecament estocàstic, però la longevitat està programada, en general, a través dels gens que acabem d'esmentar.
6. La longevitat màxima no està controlada per cap mena de rellotge, però si modulable, per exemple, modificant l'exposició al mal o millorant les funcions del manteniment corporal³¹.

³¹ Kirkwood, Thomas. Holliday, Robin. (Finals dels 70).

Annex 2. Procés experimental explicat detalladament

2.1. Perfusió:

1. Anestesiari profundament al ratolí amb pentobarbital a 200 mg/Kg.
2. Tornar a col·locar el ratolí a la seva gàbia. Transcorreguts aproximadament 5 min avaluar si el ratolí ha arribat a un pla quirúrgic d'anestèsia profunda.
3. Col·locar el ratolí en decúbit supí sobre una superfície dura i enganxar fermament les quatre potes.
4. Agafar la pell del pit amb pinces oftàlmiques i fer una incisió amb unes tisores de teixit, fer incisions amb cura al diafragma al llarg de tota la caixa toràctica amb unes tisores fines.
5. Fer dos talls pels dos costats de la caixa toràctica fins a la clavícula amb tisores de teixit.
6. Amb l'ajuda d'un pinces tipus Kocher pinçar per tal d'exposar completament el cor i els pulmons.
7. Assegurar el cor amb pinces de dissecció en una posició estable.
8. Inserir una agulla roma des de la punta del ventricle esquerre en un angle aproximadament paral·lel a la línia mitjana del cor amb cura de no avançar cap a l'aurícula esquerra o el ventricle dret.
9. Avançar l'agulla de manera constant fins que entri a l'aorta ascendent i quedi visible a través de la paret de l'aorta.
10. Fer una petita incisió a l'aurícula dreta amb unes tisores fines de tal manera que la sang venosa surti immediatament.

11. Iniciar la perfusió per gravetat amb la solució netejadora (50 ml) col·locada 80 cm per sobre de l'animal.



Imatge 14. Preparació de la solució netejadora i la fixadora. *Font pròpia.*

14. Acabats els 50 mL de solució netejadora i buidada tota la sang del cos del ratolí, canviar el líquid de perfondre a una solució fixadora i deixar passar 50 mL més.



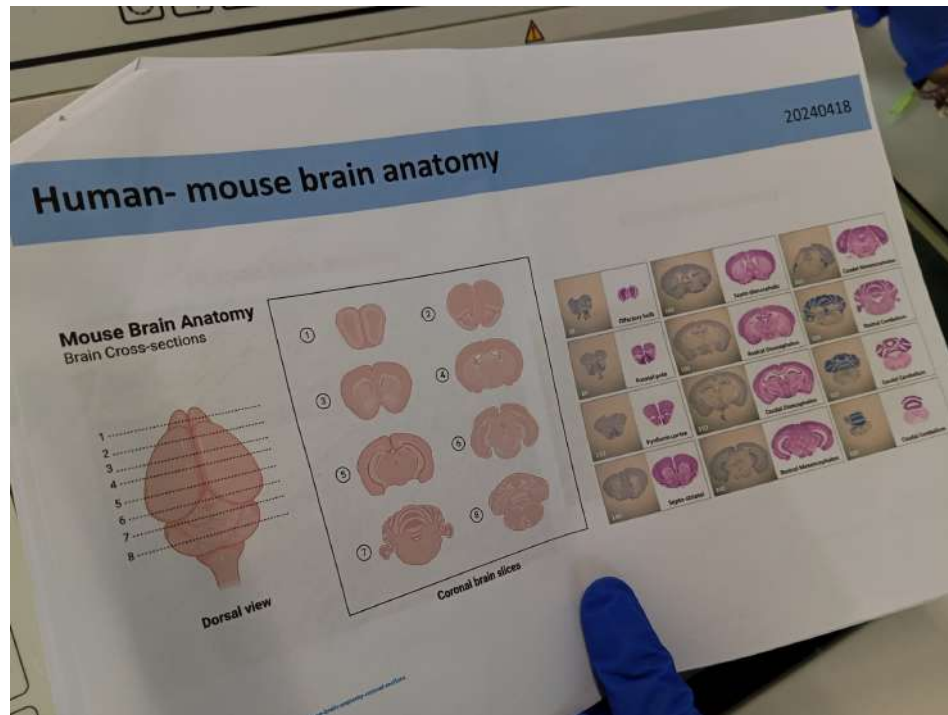
Imatge 15. Els líquids pertinents a les dues solucions. *Font pròpia.*

15. Un cop acabada la perfusió, extreure l'agulla del cor, en aquest moment tota la sang del cos habrà estat substituïda per la solució fixadora, per tant els músculs del ratolí es contrauran i el seu cos romandrà immòbil i fix, el què facilitarà procedir a extreure el seu cervell apartant prèviament els ossos i músculs que el bloquegen.



Imatge 16. El cervell de ratolí un cop perfós. *Font pròpia.*

2.2. Tall:



Imatge 17. Comparació entre l'anatomia d'un cervell humà i de ratolí. *Font pròpia.*

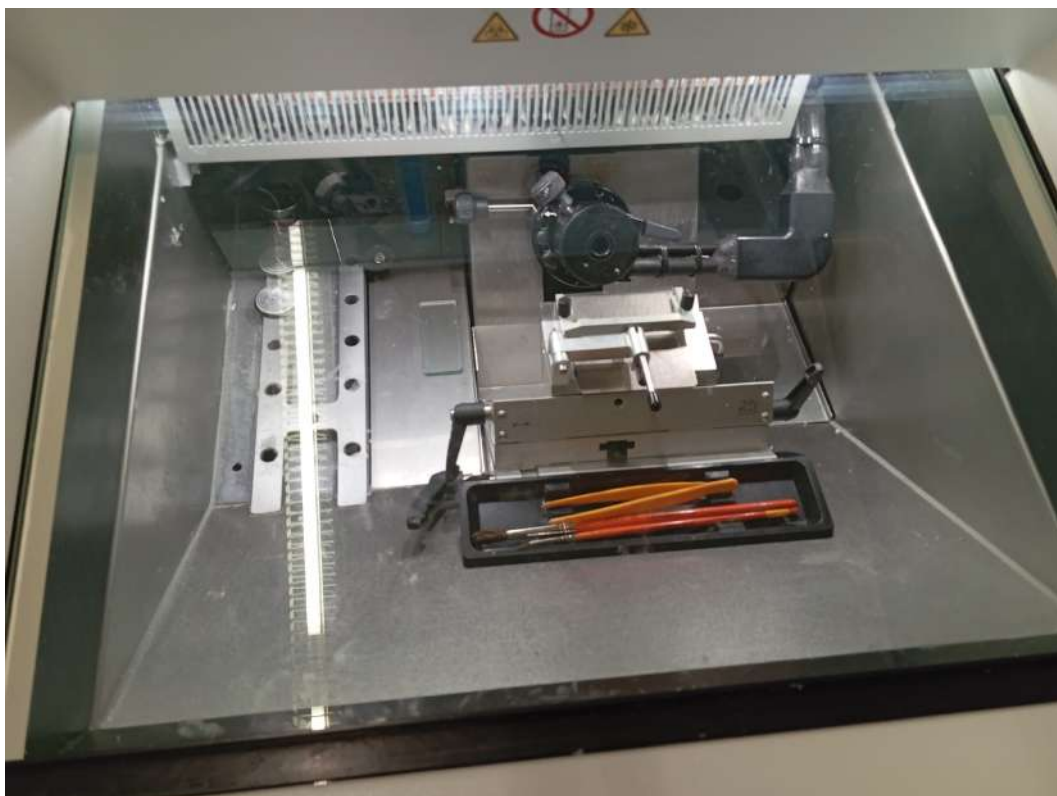
1. Preparar el criostal a -21°C (sol estar a -11°C) i posar el cervell prèviament congelat a un ultracongelador i tots els estris necessaris a dins per que agafin la mateixa temperatura per poder treballar amb ells.



Imatge 18. Fotografia d'un ultracongelador a -80°C amb neu carbònica a -60°C . *Font pròpia.*

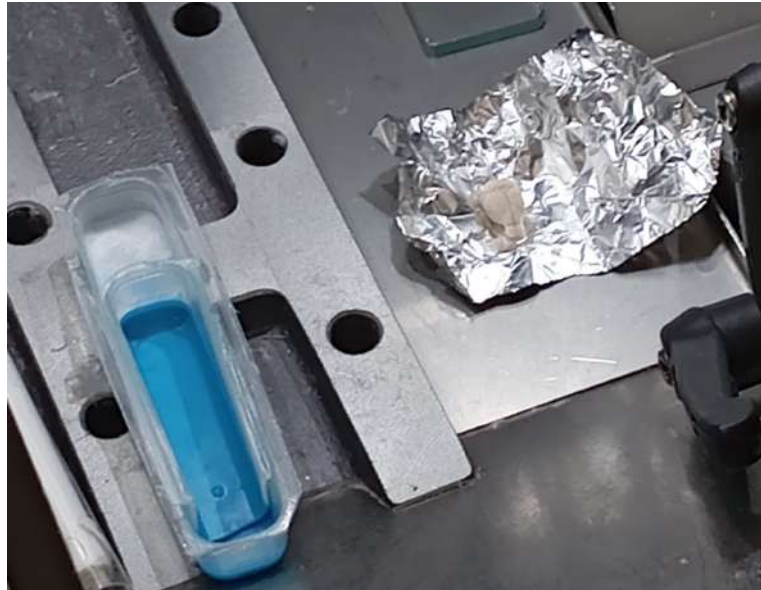


Imatge 19. Fotografia del criòstat utilitzat. *Font pròpia.*



Imatge 20. Interior del criòstat amb els estris preparats. *Font pròpia.*

2. Preparar una primera capa de líquid fixador OCT (transparent) i deixar-lo dins del criostat perquè es congeli i canvi a color blanc.



Imatge 21. Interior del criostat amb el cervell i la primera capa d'OCT. *Font pròpia.*

3. Quan el criostat estigui a la temperatura adequada (-21°C) es col·loca el cervell a sobre del OCT blanc amb la disposició adient i es recobreix amb una altra capa de OCT. El cervell triga aproximadament 20 minuts en estar preparat (és a dir a que es congelin les dues capes de OCT). Per això la primera capa es posa el més aviat possible (quan s'encén el criostat) perquè baixi de temperatura i mentre es congela es van preparant els portaobjectes per a les mostres que es tallaran.

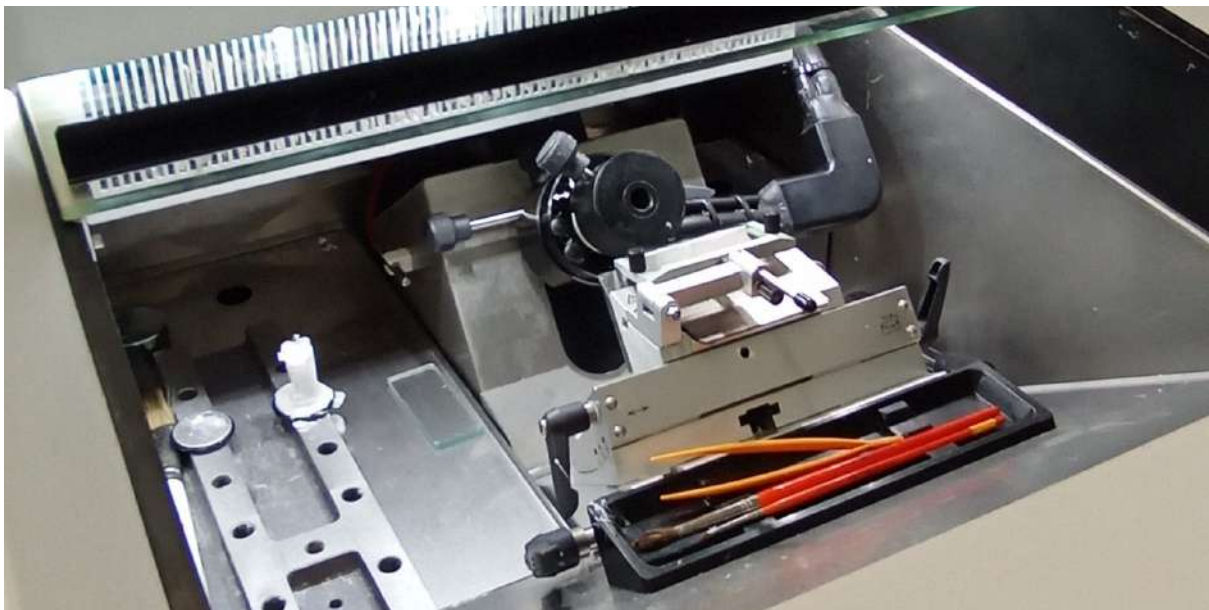


Imatge 22. Cervell en muntatge, a sobre d'OCT blanc i amb una segona capa d'aquest. *Font pròpia.*



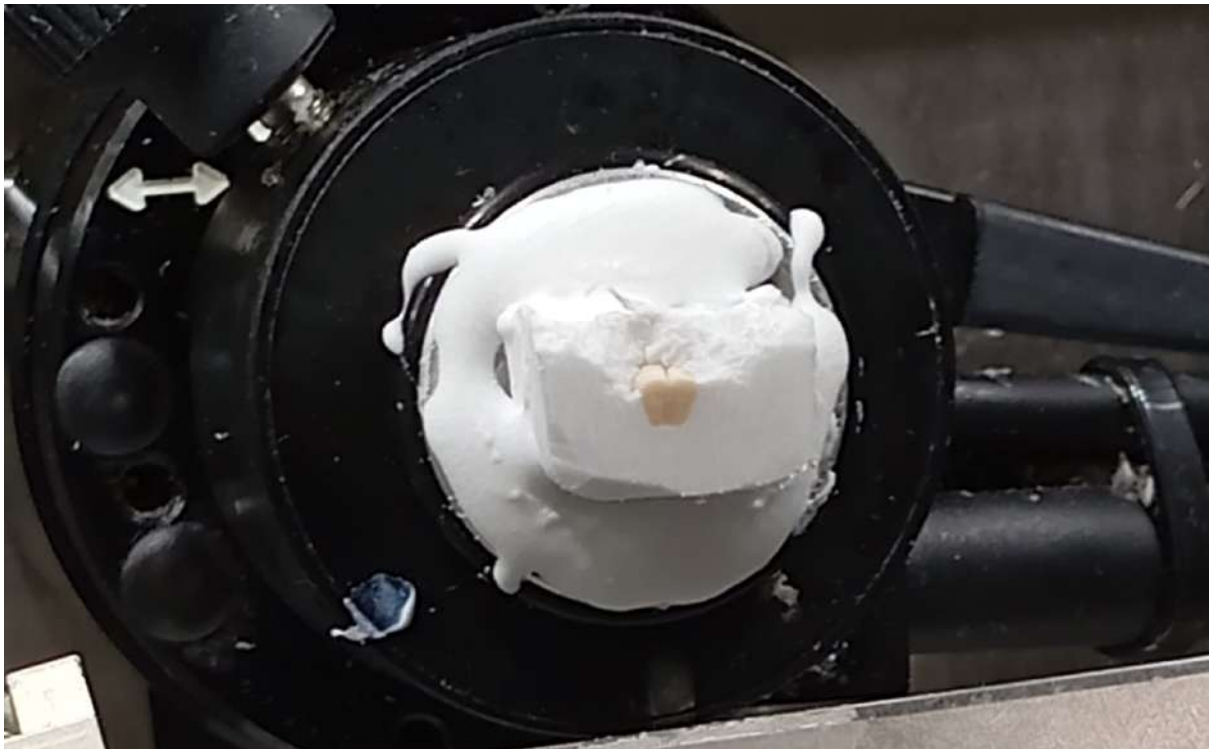
Imatge 23. Portaobjectes preparats per a quan es tallin les mostres. *Font pròpia.*

4. Quan es congela la segona capa de OCT, s'agafa la massa congelada i es posiciona al lloc de muntatge i s'afegeix més OCT per la part lateral i inferior per evitar el moviment del cervell (tenint cura de no excedir-se).



Imatge 24. Interior del portaobjectes amb el cervell envoltat de OCT congelat. *Font pròpia.*

5. S'elimina l'excés de OCT en el cervell i es selecciona el gruix dels talls desitjats, en aquest cas volem el mateix gruix per a tots els talls de les diferents parts del cervell (20 micres), cal tenir en compte que l'altura del motllo ha de ser igual o inferior a la de l'espai de tall per tal de que no es trenqui el cervell a l'hora de tallar (trencament que pot ser degut a la separació dels hemisferis).
6. Es fan els talls i s'enganxen les mostres als portaobjectes (amb molta facilitat degut a la diferencia de temperatura), s'ha de saber que quan s'enganxa la mostra al portaobjectes i s'aclimata a la temperatura el OCT es torna transparent de nou, per tant no influeix en la mostra.

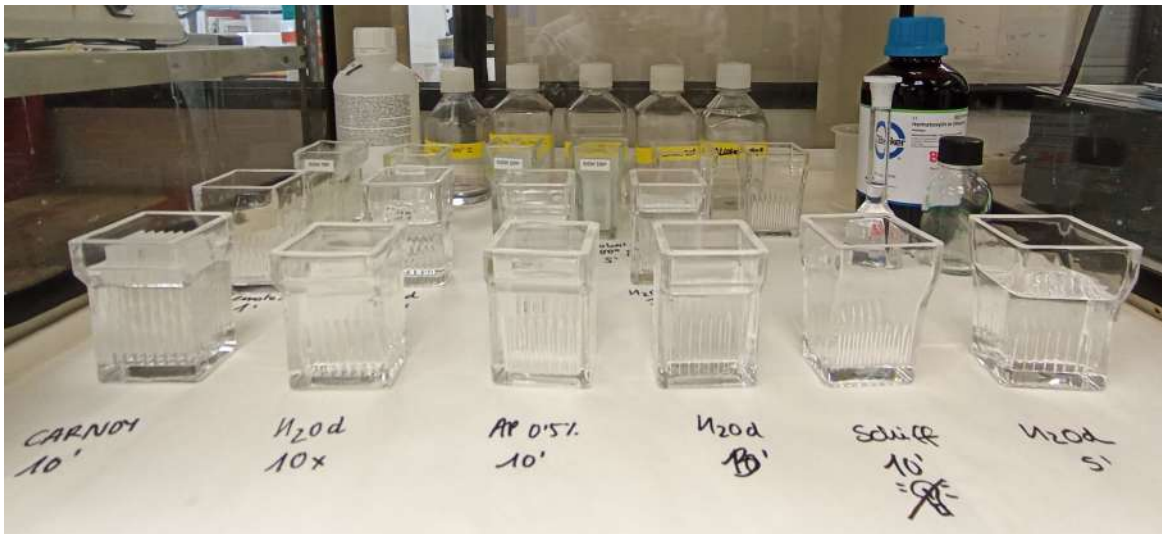


Imatge 25. Cervell muntat i començat a tallar. *Font pròpia.*



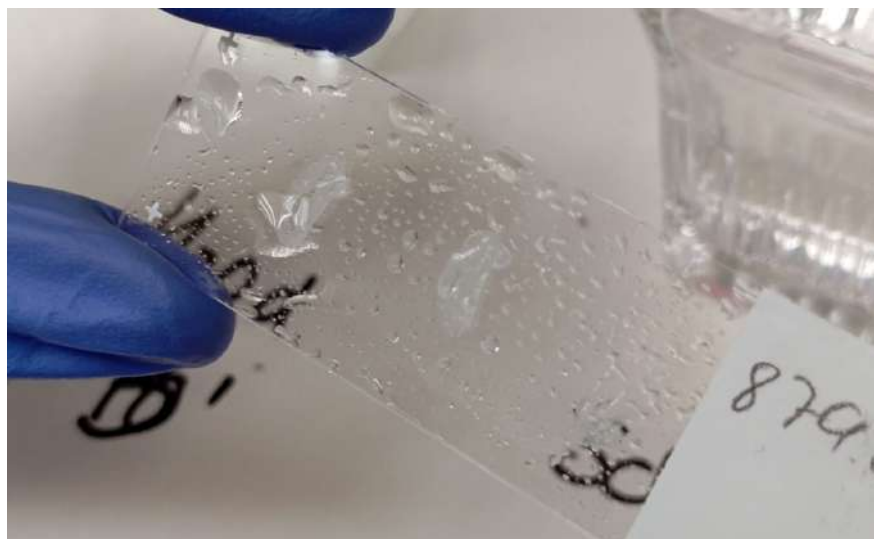
Imatge 26. Les mostres obtingudes. *Font pròpia.*

2.3. Tinció



Imatge 27. Els compostos preparats dins de la campana de gasos. *Font pròpia.*

1. Fixar el teixit tallat amb la solució de Carnoy durant 10 minuts per tal de conservar la seva estructura per evitar la seva degradació.
2. Rentar 10 cops el teixit per immersió en aigua destil·lada.



Imatge 28. Les mostres després de la immersió en aigua destil·lada. *Font pròpia.*

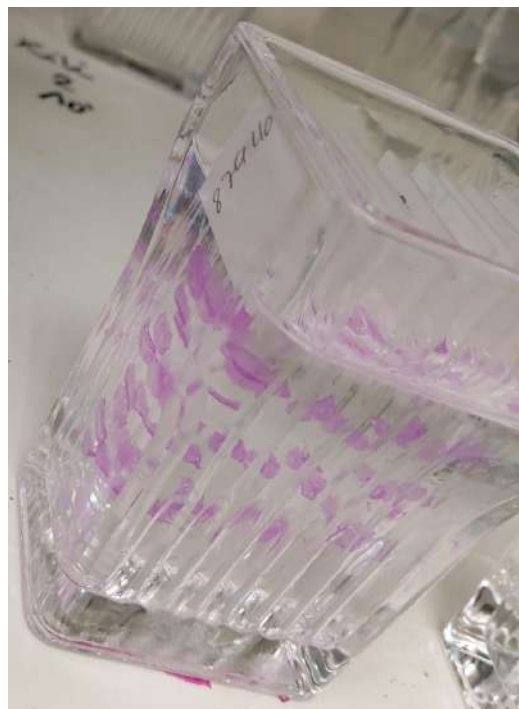
3. Submergir 10 minuts en 4mL d'àcid periòdic preparat previamente al 0.25% (4mL HP 0.5% + 40mL H₂O d = 4mL 0.25% HP) per oxidar els teixits per tal d'incrementar el nombre de grups carbonils en aquests.

4. Rentar 3 minuts en aigua destil·lada.
5. Introduir 10 minuts en reactiu de Schiff (ben tancat i protegit de la llum) ja que reacciona amb els grups funcionals aldehids per convertir-los en alcohols.



Imatge 29. Les mostres dins del reactiu de Schiff protegides de la llum. *Font pròpia.*

6. Rentar 5 minuts amb aigua destil·lada fins que els talls quedin roses.



Imatge 30. Les mostres de color rosa. *Font pròpia.*

7. Ficar 1 minut en Hematoxilina ja que aquesta marca el nucli de la cèl·lula.
8. Rentar 3 cops els teixits per immersió en aigua destil·lada.



Imatge 31. Les mostres amb el nucli de la cèl·lula marcat. *Font pròpia.*

9. Fer deshidratació progressiva per treure l'aigua de tots els teixits rentats i que quedi només el teixit, aquesta es fa amb:
 - Alcohol 70°
 - Alcohol 90°
 - Alcohol 100° (5min) (dos cops).
 - Xilè (10min) (dos cops).



Imatge 32. Les mostres durant la deshidratació progressiva. *Font pròpia.*

A 06.33



49

Annex 3. Imatges del procediment experimental complet:

Imatges Procediment Experimental TR



Imatge 35. Codi QR “Imatges Procediment Experimental TR”. *Font pròpia.*

Annex 4. Estudis previs sobre diferències entre l'envelliment dels ratolins mascles i femelles perteneixents a la soca SAMP8.

 Manich et al. - 2016 subratllat.pdf



Imatge 36. Codi QR “Estudis previs sobre diferències entre l'envelliment dels ratolins mascles i femelles perteneixents a la soca SAMP8”. *Font pròpia.*

Annex 5. Bibliografia total de totes les persones que han col·laborat en les diferents investigacions al llarg de la història que ha fet possible aquest treball:

 [Biblio total 100629.docx.pdf](#)



Imatge 37. Codi QR “Bibliografia total de totes les persones que han col·laborat en les diferents investigacions al llarg de la història que ha fet possible aquest treball”. *Font pròpia.*

Annex 8. Glossari de termes:

Grànuls PAS: Estructures cel·lulars que deuen el seu nom degut a que es tenyeixen amb el colorant àcid periòdic-Schiff (PAS), es generen al cervell dels ratolins com a causa de l'envel·liment cel·lular.

Ratolins SAMP8: Línia de ratolins genèticament modificats per tal d'accelerar el seu l'envel·liment, especialment utilitzada en estudis de neurodegeneració i envel·liment cerebral.

Cèl·lules normals diploides diferenciades: Cèl·lules amb el nombre complet de cromosomes (46 cromosomes als humans) que han adquirit característiques especialitzades per complir funcions específiques en el teixit al qual pertanyen.

Nuclèol: Estructura dins del nucli de les cèl·lules on es produeix i es processa l'ARN ribosòmic, essencial per la síntesi de ribosomes.

Embolcall nuclear: Membrana doble que envolta el nucli cel·lular, separant-lo de la resta de la cèl·lula i regulant el transport de substàncies cap a l'interior i l'exterior del nucli.

Fus mitòtic: Estructura formada per microtúbuls que facilita la separació dels cromosomes durant la mitosi, permetent una divisió cel·lular precisa.

Cromàtides: Cadascuna de les dues còpies idèntiques d'un cromosoma duplicat, unides pel centròmer i separades durant la divisió cel·lular.

Homeòstasi: Mecanisme de regulació que manté l'equilibri intern de les cèl·lules i organismes, permetent la seva funció estable davant de canvis externs.

Escorça piriforme i entorrinal: Zones del cervell que participen en processos d'aprenentatge, memòria i integració de senyals olfactives, sovint afectades en malalties neurodegeneratives.

Malalties neurodegeneratives (dipòsits d'amiloide, embolcalls neurofibril·lars, cossos de Lafora, corpora amylacea i cossos poliglucosans): Trastorns progressius del sistema nerviós en què s'acumulen estructures anormals com plaques d'amiloide, proteïnes, i altres inclusions cel·lulars que interfereixen en la funció neuronal.

Múrid: Membre de la família dels múrids, que inclou ratolins i rates, i és sovint utilitzat com a model animal en recerca científica.

Recerca biogerontològica: Camp de la investigació científica que estudia els processos biològics de l'envel·liment, amb l'objectiu de comprendre com es poden prevenir o retardar les malalties associades a l'edat.

Colorant vital: Aquells colorants que exerceixen la seva acció en les parts vives de les cèl·lules sense alterar el seu metabolisme, i posant en relleu les seves estructures.

Parènquima cerebral: Teixit funcional del cervell compost principalment per neurones, responsable de les funcions cognitives i neurològiques.

Interstici cerebral: Espai entre les cèl·lules del cervell, que inclou líquid extracel·lular i elements del sistema immunitari, i ajuda en la distribució de nutrients i en l'eliminació de deixalles cel·lulars.

