Universitat de Lleida

MECANISMES D'ACCIÓ DE DIFERENTS TIPUS D'INTERVENCIONS NUTRICIONALS SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU I LES SEVES IMPLICACIONS EN EL PROCÉS FISIOLÒGIC DE L'ENVELLIMENT

ALBA NAUDÍ I FARRÉ

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

RESULTATS

20.L'ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS AMINOÀCIDS

S'ha analitzat la composició en aminoàcids de les mitocòndries de fetge de rata en l'experiment de restricció proteica al 40% com també en homogenat total de cervell de rata de l'experiment de restricció de metionina (Taula 13 i Taula 14) per tal de determinar si la restricció dietètica pot afectar als nivells dels aminoàcids composicionals tant en mitocòndria de fetge com en cervell.

Taula 13 Anàlisi composicional dels aminoàcids en mitocòndria de fetge de rata en l'experiment de restricció proteica del 40%.

	Grup Control (mol%)	Grup RP 40% (mol%)	P <
Asp	2.41±0.12	2.58±0.09	0.298
Ser	5.70±0.04	5.91±0.04	0.010
Glu	3.07±0.14	3.32±0.10	0.186
Gly	10.28±0.13	10.48±0.13	0.326
His	3.14±0.11	3.21±0.09	0.667
Arg + Thr	12.01±0.19	11.59±0.29	0.256
Ala	5.18±0.19	5.53±0.22	0.270
Pro	2.08±0.04	2.03±0.07	0.609
Tyr	5.92±0.48	5.40±0.39	0.430
Val	8.98±0.13	8.72±0.13	0.212
Met	1.34±0.06	1.28±0.05	0.523
Lys	4.45±0.24	4.78±0.19	0.331
Ile	9.45±0.04	9.28±0.05	0.056
Leu	13.52±0.08	13.37±0.11	0.349
Phe	12.39±0.19	12.43±0.26	0.897
KR	16.47±0.06	16.37±0.19	0.643
ED	5.48±0.26	5.90±0.20	0.233
KR+ED	21.95±0.32	22.28±0.27	0.458
KR-ED	10.99±0.20	10.46±0.28	0.174
LVIFM	45.70±0.22	45.11±0.32	0.175
FIKMNY	35.98±0.21	35.79±0.15	0.483

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. Els index calculats (KR, ED, KR+ED, KR-ED, LVIFM, FIKMNY) estan detallats en l'apartat de material i mètodes corresponent.

En l'experiment de restricció proteica, tot i suportar un profund efecte en el metabolisme del nitrogen, la composició en aminoàcids dels animals del grup de restricció no mostren diferències significatives com tampoc en els índexs que se'n deriven. El mateix succeeix en l'experiment de restricció de metionina en cervell, el qual sembla ser resistent als canvis induïts per la dieta. No hi ha diferències

significatives en composició d'aminoàcids entre el cervell de les rates sotmeses a restricció en comparació amb les rates del grup control, com tampoc en els índexs calculats.

Taula 14 Anàlisi composicional dels aminoàcids en Cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina del 80%.

	Grup Control (mol%)	Grup RMet 80% (mol%)	P <
Asp	3.42±0.32	3.03±0.16	0.285
Ser	7.00±0.13	7.04±0.12	0.843
Glu	4.52±0.35	4.15±0.21	0.381
Gly	8.87±0.35	9.27±0.29	0.398
His	3.25±0.15	3.43±0.12	0.384
Arg + Thr	11.18±0.24	11.57±0.16	0.201
Ala	5.51±0.27	5.35±0.21	0.654
Pro	2.01±0.04	2.13±0.02	0.039
Tyr	4.67±0.48	4.96±0.28	0.605
Val	8.17±0.13	8.14±0.15	0.890
Met	1.45±0.09	1.39±0.09	0.640
Lys	5.25±0.35	5.03±0.21	0.585
Ile	7.82±0.14	8.21±0.10	0.050
Leu	14.55±0.25	13.94±0.10	0.045
Phe	12.27±0.23	12.29±0.21	0.933
KR	16.44±0.13	16.61±0.12	0.385
ED	7.94±0.68	7.18±0.38	0.333
KR+ED	24.39±0.76	23.79±0.44	0.502
KR-ED	8.49±0.62	9.43±0.35	0.204
LVIFM	44.28±0.07	44.00±0.15	0.151
FIKMNY	34.91±0.29	34.94±0.16	0.927

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. Els index calculats (KR, ED, KR+ED, KR-ED, LVIFM, FIKMNY) estan detallats en l'apartat de material i mètodes corresponent.

21.EL DANY OXIDATIU

21.1. El dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial

El dany oxidatiu produït a l'ADN mitocondrial i mesurat a nivell de la quantitat del deoxinucleòsid oxidat, 8-oxo-dG, es veu disminuït significativament en els grups sotmesos a restricció tant en l'experiment de restricció proteica (RP40%) i en l'experiment de restricció de metionina al 40 i 80% (RMet40-80%) en fetge de rata com en l'experiment de restricció de metionina en cervell (RMet80%). No s'han trobat diferències significatives en dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial en l'experiment de

restricció d'aminoàcids (RAAs40%(-Met)) en el grup sotmès a restricció respecte al grup control. No succeeix el mateix en l'experiment de suplementació de metionina (SMet x2,9) , on augmenten significativament els valors de 8-oxo-dG en el grup de suplementació de metionina respecte el grup control, suggerint un augment del dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial produït per l'augment de metionina en la dieta (Figura 20).

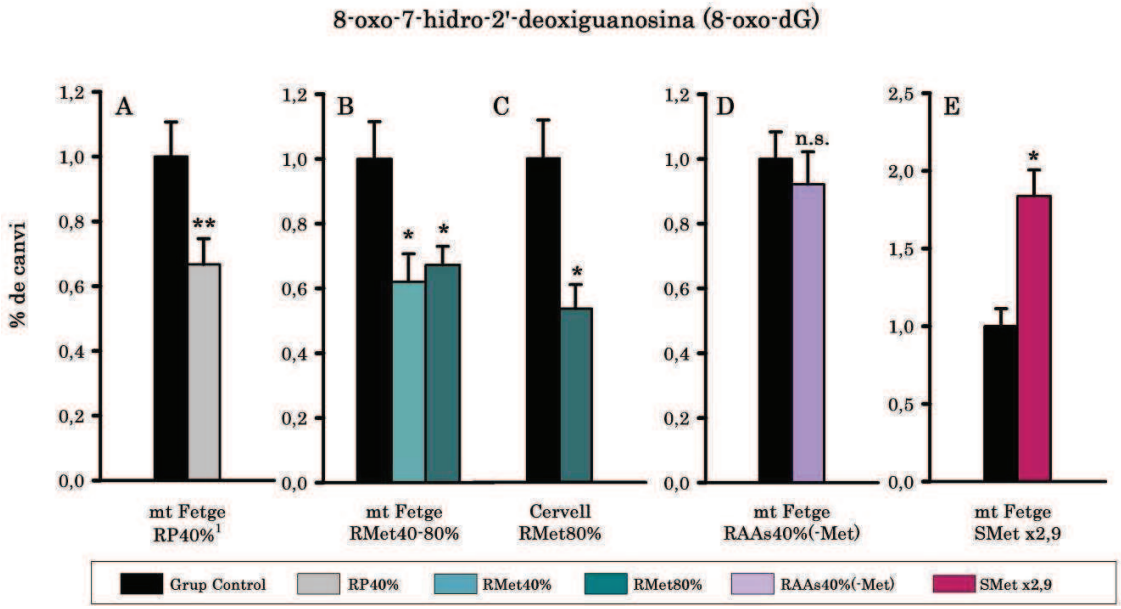

Figura 20 Dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial (8-oxo-dG) en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (8-oxo-dG/10^5 dG): A) 3,75±0,4; 2,5±0,3 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 3,48±0,4; 2,16±0,3; 2,34±0,2 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 6,75±0,8; 3,62±0,5 (GC i RMet80%);D) 5,97±0,5; 5,5±0,6 (GC i RAAs40%(-Met); E) 3,56±0,4; 6,54±0,6 (GC i SMet x2,9). *(p<0,05); **(p<0,01); n.s. (no significatiu).
[1] Dades no realitzades en aquesta tesi. Extretes de (Sanz, Caro & Barja 2004).

21.2. El dany oxidatiu proteic

El dany oxidatiu produït directament a les proteïnes s'ha mesurat en base als marcadors semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA) (Figura 21 i Figura 22), marcadors d'oxidació directa dels aminoàcids prolina, el primer; i arginina i lisina, el segon. S'ha trobat disminució significativa en tots els grups sotmesos a restricció, ja sigui l'experiment de restricció proteica (RP40%) , de restricció de metionina (RMet80% en cervell, RMet40-80% en fetge), com restricció d'aminoàcids excepte la metionina (RAAs40%(-Met) en fetge). Contràriament, en l'experiment de suplementació de metionina no hi ha diferències significatives entre el grup experimental i el grup control en cap dels dos marcadors, ara bé, hi ha una tendència a la disminució del semialdehid glutàmic i una tendència a l'augment del semialdehid

amino-adípic, en el grup sotmès a suplementació de metionina respecte al grup control.

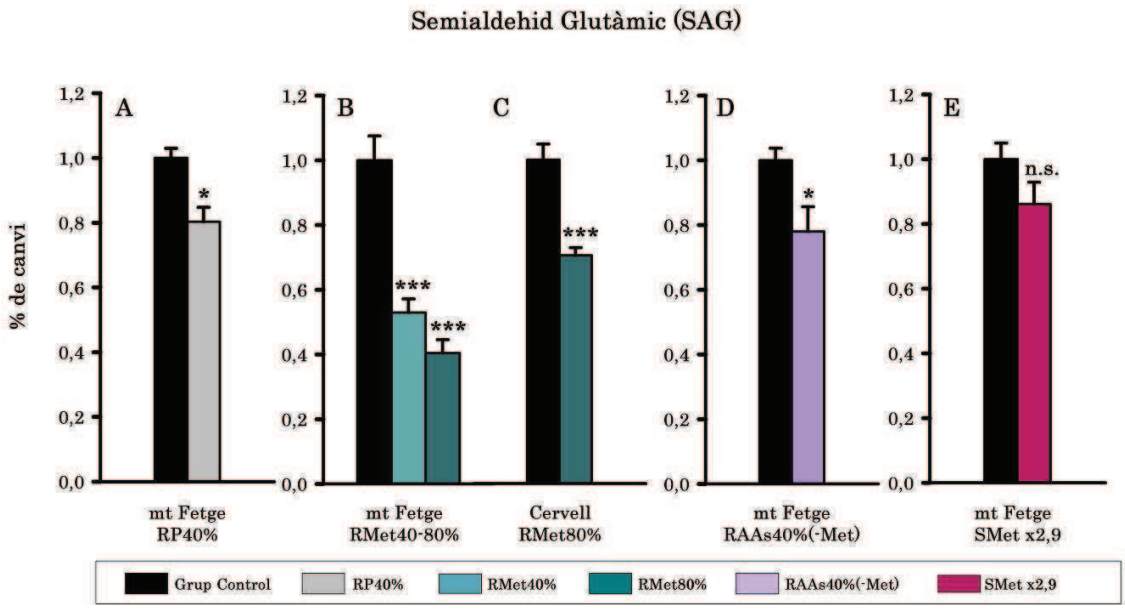

Figura 21 Nivells de semialdehid glutàmic en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol SAG/mol lisina):A) 3236±98; 2598±145 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 4461±334; 2363±186; 1802±186 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 8240±403; 5809±195 (GC i RMet80%); D) 4460±166; 3477±343 (GC i RAAs40%(-Met); E) 3064±152; 2639±207 (GC i SMet x2,9). *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

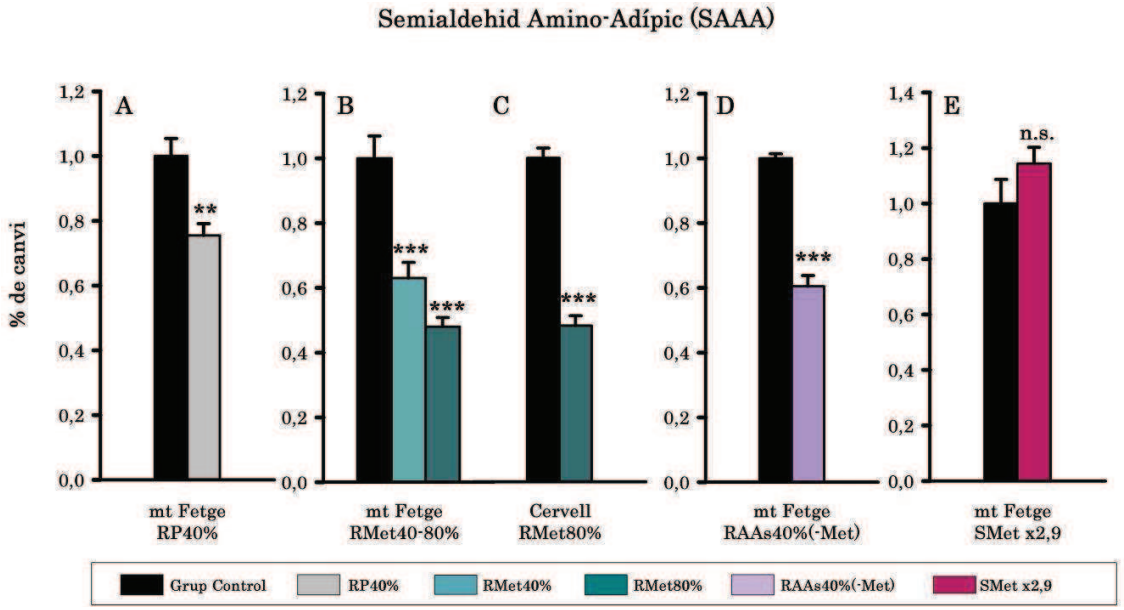

Figura 22 Nivells de semialdehid amino-adípic en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol SAAA/mol lisina): A) 110±6; 83±4 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 246±17; 155±12;118±7 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 197±6; 95±6 (GC i RMet80%); D)150±2; 91±5 (GC i RAAs40%(-Met); E)129±11; 147±7 (GC i SMet x2,9). **(p<0,01);***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

21.3. El dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació

El dany oxidatiu a proteïnes derivat de l'oxidació dels glúcids s'ha quantificat mitjançant el marcador N^{ε}-(Carboxietil)lisina (CEL). Aquest marcador es veu significativament disminuït en els grups sotmesos a restricció en els experiments de restricció proteica (RP40%), de restricció de metionina (RMet80% en cervell i RMet40-80% en fetge) com també de restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina (RAAs80%(-Met) en fetge) (Figura 23).També existeixen diferències significatives entre els dos grups experimentals de l'experiment de restricció de metionina al 40 i 80 %, demostrant una disminució dosi-depenent de lesió proteica derivada de l'oxidació dels carbohidrats per aquest marcador. A diferència d'aquests resultats, no es veuen diferències significatives en l'experiment de suplementació.

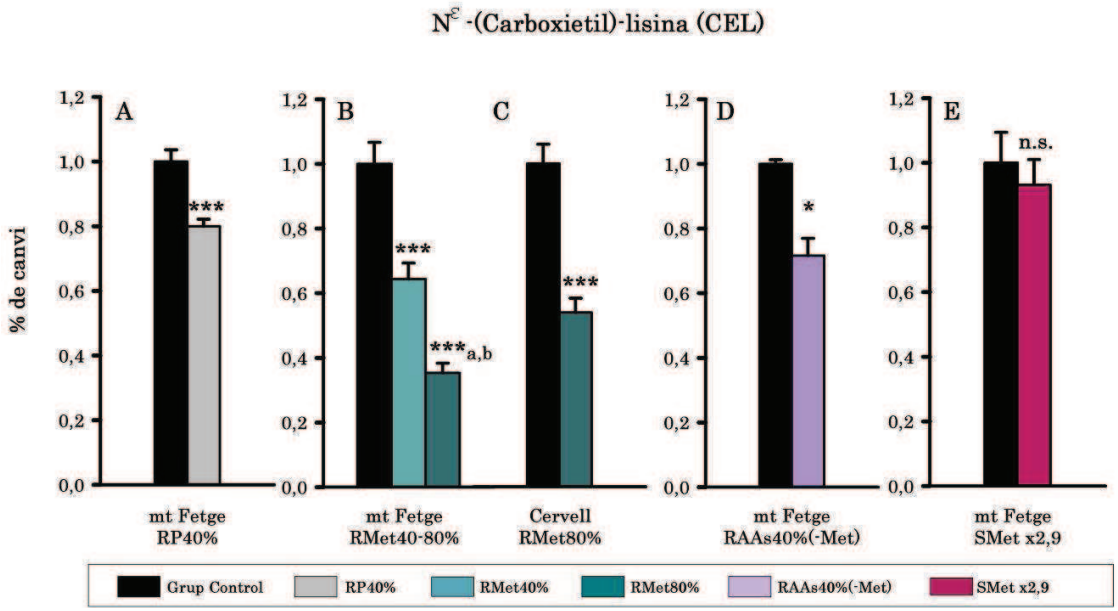

Figura 23 Nivells de N^{ε}-(Carboxietil)-lisina (CEL) en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol CEL/mol lisina): A) 410±15; 328±9 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 300±20; 193±15;106±9 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 319±19; 172±14 (GC i RMet80%); D) 385±5; 276±21 (GC i RAAs40%(-Met); E) 337±32; 314±26 (GC i SMet x2,9). *(p<0,05); ***(p<0,001); [a] (comparant amb grup control) [b](comparant RMet40% amb RMet80%); n.s. (no significatiu).

21.4. El dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació

El dany oxidatiu a proteïnes derivat de l'oxidació dels lípids s'ha quantificat mesurant el marcador malondialdehid-lisina (MDAL) (Figura 24). Aquest marcador s'ha trobat significativament disminuït en els grups experimentals sotmesos a restricció en els experiments de restricció proteica (RP40%), en els dos de restricció de metionina, tant en cervell (RMet80%) com en fetge (RMet40-80%) i en el de restricció

d'aminoàcids excepte la metionina (RAAs40%(-Met)). No hi ha diferències significatives entre els dos grups experimentals en l'experiment de RMet40-80%, com tampoc en l'experiment de suplementació de metionina.

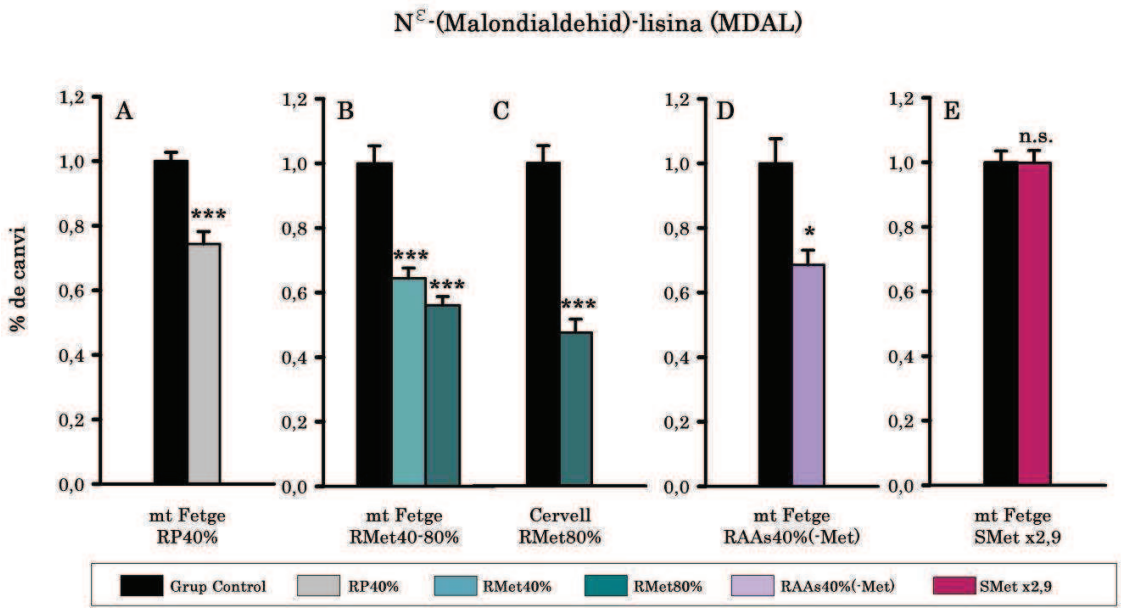

Figura 24 Nivells de Nε-(Malondialdehid)-lisina (MDAL) en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol MDAL/mol lisina): A) 366±10; 272±14 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 478±26; 308±15; 268±13 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 337±18; 160±14 (GC i RMet80%); D) 331±25; 227±15 (GC i RAAs40%(-Met); E) 428±15; 427±17 (GC i SMet x2,9). *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

21.5. El dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació

Els marcadors de dany oxidatiu analitzats fins ara, han estat ja prèviament identificats i detectats en treballs anteriors a aquesta tesi, tant el marcador de dany oxidatiu a l'ADN (8-oxo-dG), com els 4 marcadors de dany oxidatiu proteic (SAG, SAAA, CEL, MDAL). També s'ha detectat i quantificat en treballs previs la modificació de carboximetilació en lisina, el marcador Nε-(carboximetil)lisina (CML). És a dir, s'ha estudiat la carboximetilació en l'aminoàcid lisina, però no en cap altre aminoàcid. Hi ha evidències de modificació per carboximetilació de l'aminoàcid cisteïna (només en múscul esquelètic de rata i en proteines de plasma humà (Naudí et al. 2010)); ja que s'ha de tenir en compte que el grup sulfidril de l'aminoàcid cisteïna li confereix una propietat de nucleòfil que fa que aquest sigui més reactiu a possibles reaccions de modificació amb grups electròfils com el glioxal. Per tant, l'objectiu d'aquest apartat ha estat la detecció, identificació i quantificació de la modificació per carboximetilació de l'aminoàcid cisteïna, la carboximetilcisteïna, CMC.

La S-(carboximetil)-cisteïna (CMC) es postula que pot provenir de les mateixes vies que la mateixa modificació en lisina, la CML (Figura 25). Aquestes es formen per la reacció del glioxal amb els aminoàcids cisteïna o lisina, respectivament. La formació del glioxal deriva de diferents vies. Pot provenir de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats, de l'oxidació dels sucres o d'altres orígens, com l'oxidació de l'ascorbat, de la L-serina o pot provenir d'intermediaris metabòlics. És a dir, tant el marcador CMC com CML els podem considerar marcadors mixtes de glico i lipoxidació, ja que el glioxal format no el podem diferenciar segons el seu origen.

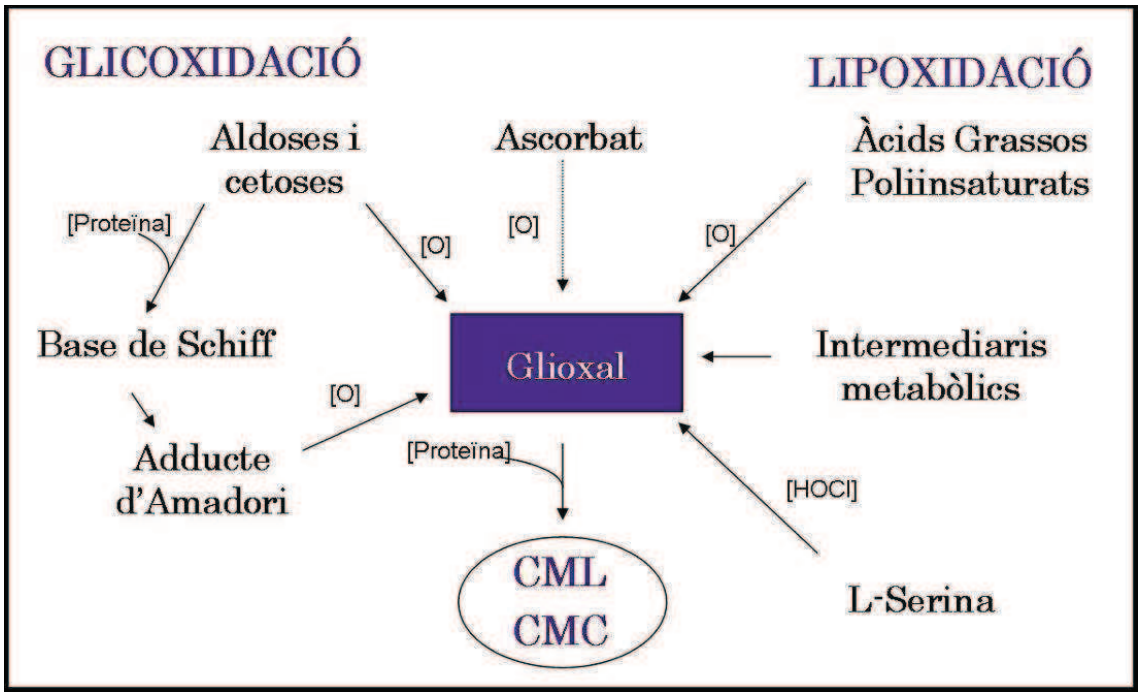

Figura 25 Esquema de formació dels biomarcadors N$^{\varepsilon}$-carboximetil-lisina (CML) i N$^{\varepsilon}$-carboximetil-cisteïna (CMC).
Modificada de (Thorpe, Baynes 2003)

21.5.1. La carboximetilació en l'aminoàcid lisina, CML

El marcador N$^{\varepsilon}$-(carboximetil)lisina, CML, es veu significativament disminuït en els grups sotmesos a restricció en els experiments de restricció proteica (RP40%), de restricció de metionina (RMet80% en cervell i RMet40-80% en fetge) com també de restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina (RestAAs80% en fetge) (Figura 26). No hi ha diferència significativa entre els dos grups de restricció en l'experiment de RMet40-80%, però si entre els dos grups experimentals i el seu grup control. En el cas de l'experiment de suplementació de metionina (SMet x2,9) el marcador CML tampoc varia significativament entre el grup de suplementació i el grup control.

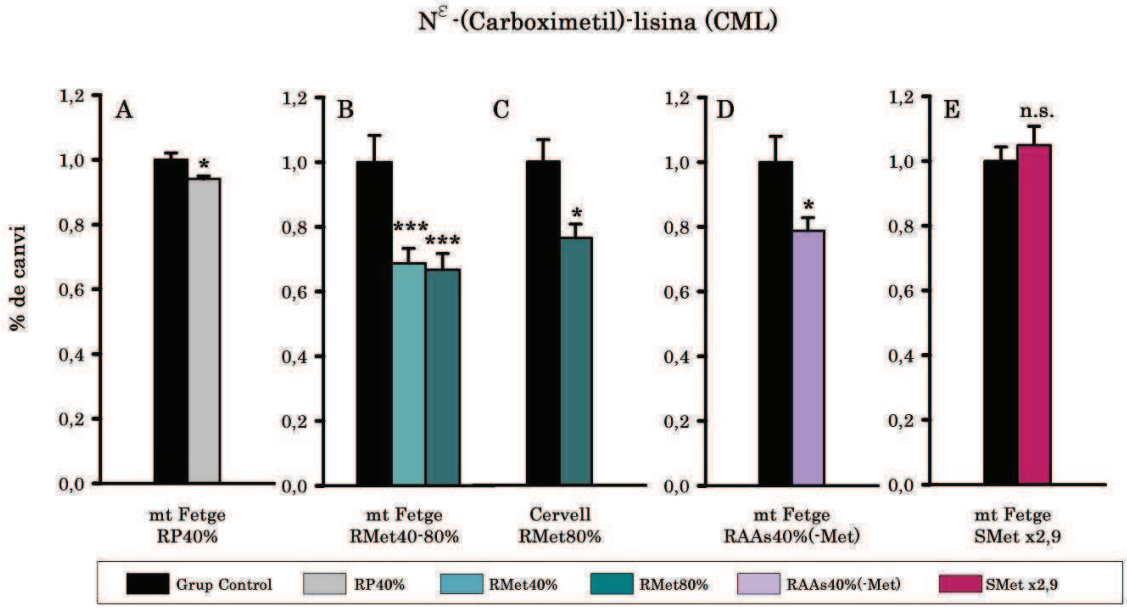

Figura 26 Nivells de Nε-(Carboximetil)-lisina (CML) en fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control, estan expressats com a mitjana±SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol CML/lisina): A) 1148±24; 1080±10 (Grup Control(GC) i RP40%, respectivament); B) 052±169; 1410±95; 1369±103 (GC, RMet40% i RMet80%); C) 1917±130; 1465±82 (GC i RMet80%); D) 1501±119; 1182±61 (GC i RAAs40%(-Met); E) 1081±47; 1134±64 (GC i SMet x2,9). *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

21.5.2. La carboximetilació en l'aminoàcid cisteïna, la CMC

21.5.2.1. Detecció de CMC mitjançant GC/MS

Per a comprovar si es detecta el marcador CMC en les condicions ja establertes per als altres marcadors en el cromatògraf de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses (veure apartat 14.3)s'ha utilitzat un estàndard de CMC comercial. Utilitzem el producte comercial de CMC per preparar la dissolució mare de CMC 0,3M. Dissolem 200 mg de CMC en hidròxid d'amoni 1 M (solució mare). A partir d'aquesta solució mare de CMC es realitzen dilucions en aigua bidestil·lada per a obtenir una recta de 10 a 2000 pmols. Utilitzem dilucions de l'estàndard comercial de CMC i processem 5 aliquotes de diferents quantitats de CMC (50; 280; 560; 1120 pmols) per comprovar si es detecten amb el mateix mètode i condicions que els altres marcadors de lesió analitzats. Per això es processen de la mateixa manera que els altres marcadors (veure apartat 14.1) el processament és el mateix que des del moment de la introducció dels estàndards interns).

S'ha obtingut el cromatograma en abundància-temps de l'alíquota de 1120 pmols de CMC (Figura 27 A) en mode *total ion chromatogram*. En la imatge s'observa que en el mateix temps surten diferents pics, els quals corresponen als ions de diferent massa/càrrega (m/z) corresponents als diferents tipus de fragmentació possibles de la molècula CMC (Figura 28). Si s'observa l'espectre de masses del mateix temps (Figura 27), veiem els diferents pics de m/z corresponents als diferents ions de fragmentació i en la mateixa abundància que la observada en el cromatograma abundància-temps. Per tant, es pot afirmar que l'analit que detectem és el marcador CMC.

Dins dels ions de massa/càrrega (m/z) procedents dels diferents tipus de fragmentació escollim el ió de m/z 271, d'abundància mitjana. S'injecten diferents concentracions de l'estàndard CMC i s'integra l'àrea del pic corresponent al ió de massa/càrrega 271. Es representa la concentració de l'estàndard enfront l'àrea del pic i s'observa que hi ha linealitat en el rang de 50-1150 pmols CMC. Per tant, s'utilitza el ió de m/z 271 per a detectar-lo en les mostres (Figura 29).

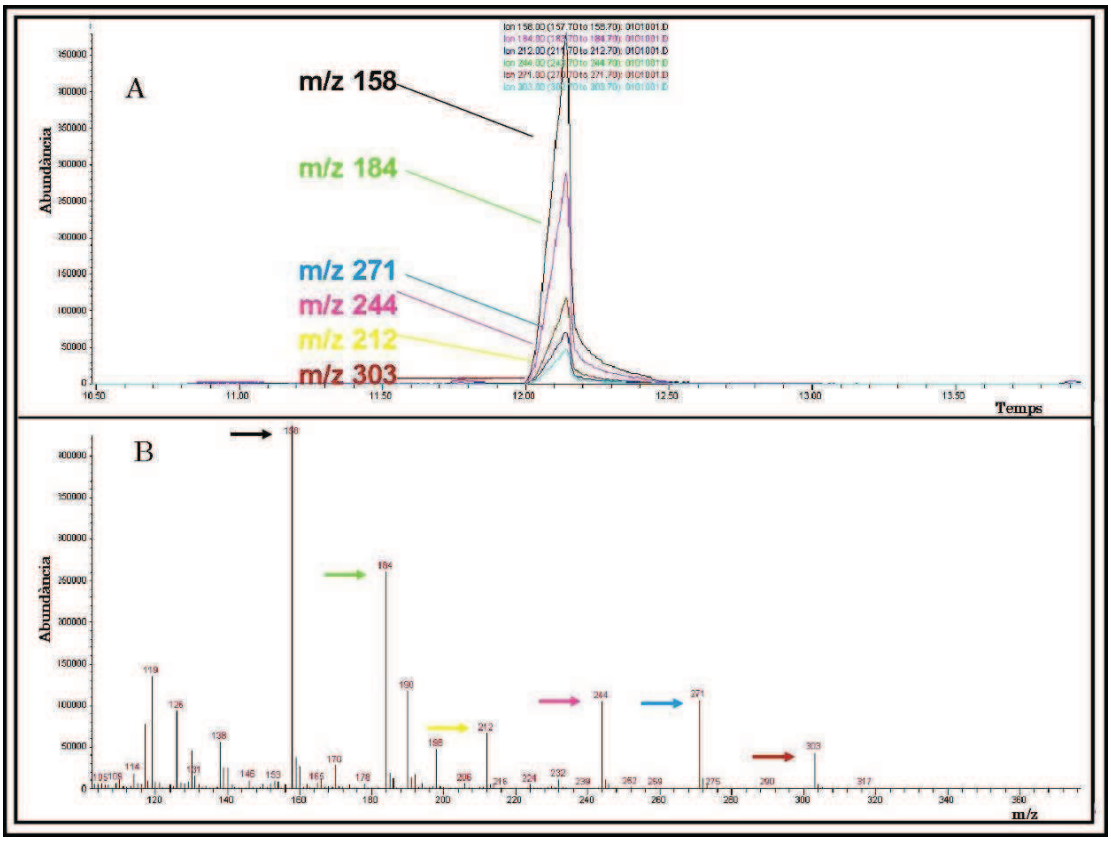

Figura 27 Cromatograma d'abundància-temps d'una mostra de CMC analitzada per GC/MS.
(A) Els pics de diferent abundància que coelueixen en el mateix minut corresponen a ions de massa/càrrega (m/z) de les diferents possibles fragmentacions de l'analit CMC. **(B) Espectre de masses (abundància-m/z) del minut en que coelueixen els pics en A.** Cada pic de l'espectre de masses correspon a una fragmentació de la molécula de CMC. Es detecten tots els fragments i en la mateixa abundància, que els pics detectats en el cromatograma abundancia-temps.

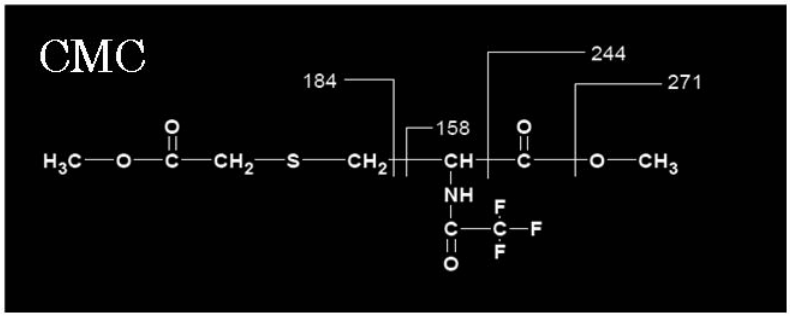

Figura 28 Patró de fragmentació de la molècula S-carboximetil-cisteina (CMC).
Es representen les 4 fragmentacions majoritàries de ions de m/z 158, 184, 271, 244.

21.5.2.2. Estàndard intern de CMC marcat isotòpicament

Per a realitzar el mateix tipus de quantificació de CMC que els altres marcadors (SAG, SAAA, CEL, MDAL i CML) necessitem un estàndard intern deuterat. En aquest cas s'ha disposat d'un estàndard intern de CMC no deuterat, però si marcat isotòpicament en tres carbonis i un nitrogen (U-$^{13}C_3{}^{15}N$-carboximetil-cisteïna, U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC, cedida pel Dr. J.W. Baynes, University of South Carolina, EUA). La seva estructura química i patró de fragmentació està representat en la Figura 30. Utilitzem en les mostres per detectar el ió de fragmentació homòleg a la fragmentació del ió utilitzat per CMC. Utilitzem el ió 271 per CMC i 275 per U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC.

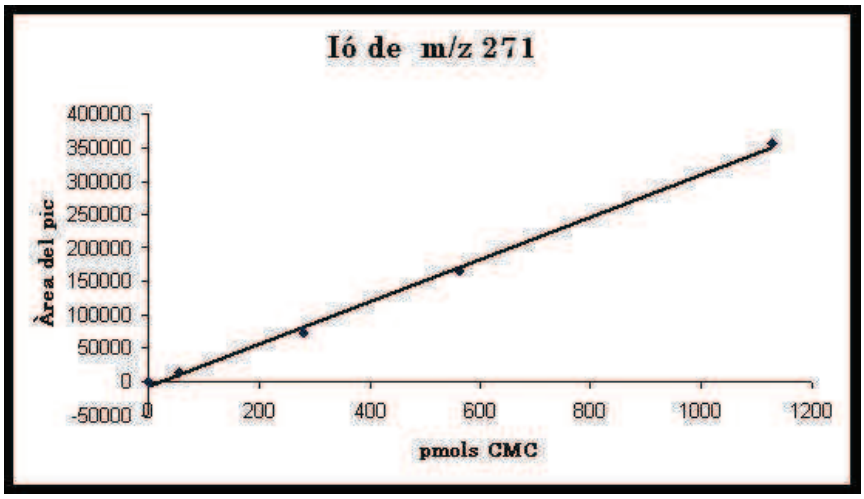

Figura 29 Representació de l'àrea de pic del ió de fragmentació de CMC de m/z 271 enfront a diferents quantitats de CMC (50; 280; 560; 1120 pmols).
Existeix linealitat, complex l'equació de la recta:
Àrea de pic = 316,78 pmols CMC + 6722,4 ; amb R^2=0,9978.

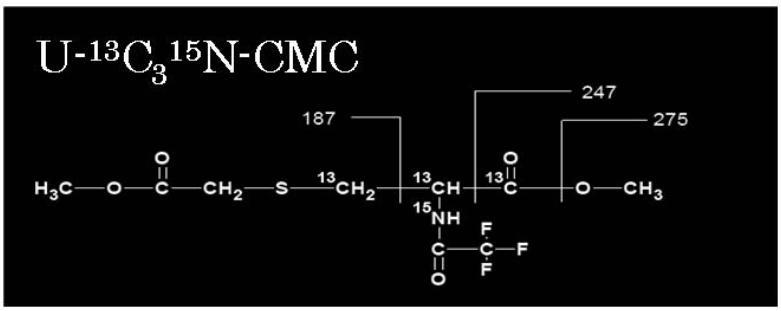

Figura 30 Patró de fragmentació de la molècula U-$^{13}C_3{}^{15}N$-carboximetil-cisteina (U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC).
Es representen les 4 fragmentacions majoritàries de la molècula, de ions de m/z 187, 247, 275.

En el cromatogrames de la Figura 31 s'observa la detecció del ió 271 i 275. En la Figura 31 A es veu el cromatograma abundància-temps per al ió de m/z 271. Sabem que el pic que ens interessa és el tercer per dos motius, i) surt en el mateix temps de retenció que l'estàndard de CMC quan s'injecta sol; ii) el pic surt 0,10 ± 0,03 min abans que el pic del ió m/z 275 (figura 17 B).

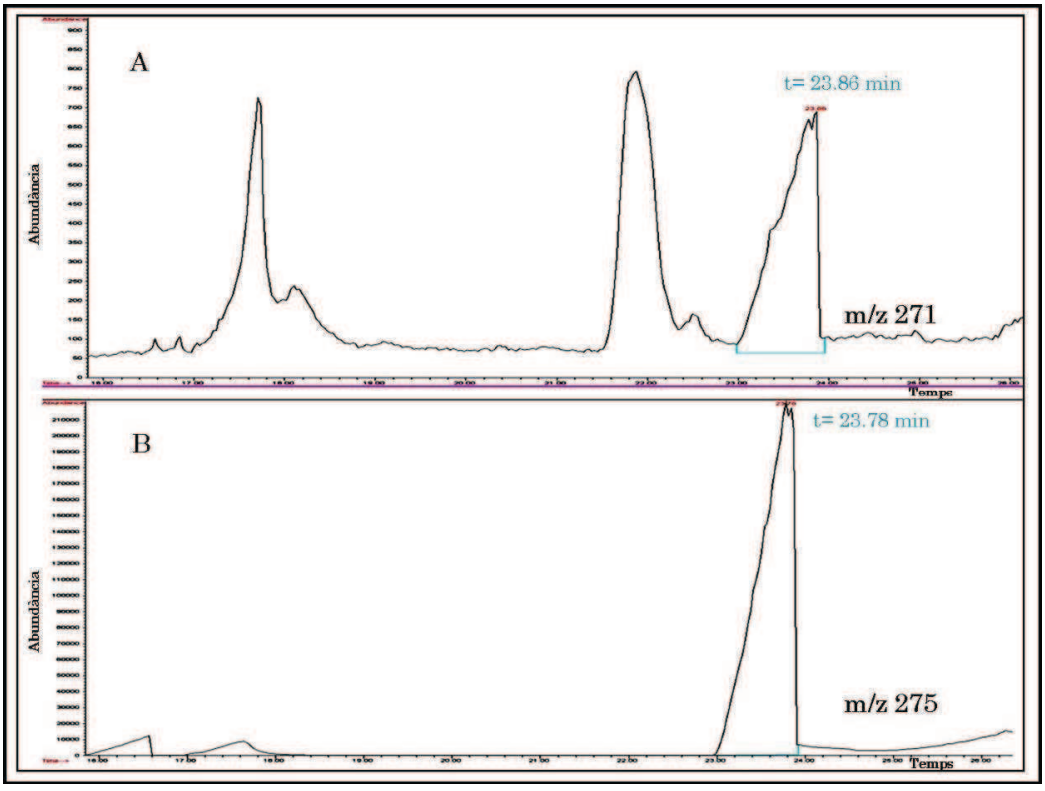

Figura 31 Cromatogrames abundància/temps de mostres de mitocòndria de fetge de rata..
(A) Cromatograma abundància-temps per al ió de massa/càrrega 271 de CMC d'una mostra de mitocòndria de fetge de rata. **(B)** Cromatograma abundància-temps per al ió de massa/càrrega 275 de U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC d'una mostra de mitocòndria de fetge de rata.

Els pics dels estàndards marcats isotòpicament surten sempre uns 0,10 ± 0,03 min abans en referència al pic del estàndard sense marcar, en una cursa cromatogràfica

com la que es realitza en aquest mètode. Per tant, es detecta la CMC i el seu estàndard intern en mitocòndria de fetge de rata i es pot quantificar.

21.5.2.3. Quantificació de CMC en RMet40-80%

Una vegada s'ha determinat la presència de CMC i el seu estàndard intern U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC en mostres biològiques, s'han quantificat en les mostres de mitocòndria de fetge de l'experiment de restricció de metionina al 40 i 80% (RMet40-80%). El procediment de preparació de la mostra, el sistema cromatogràfic i les condicions cromatogràfiques han estat les mateixes que per als altres 5 marcadors d'oxidació proteica (veure apartat 14) en aquest cas la quantitat d'estàndard intern utilitzat ha estat 30 pmols de U-$^{13}C_3{}^{15}N$-CMC. Aquí també s'ha calculat la quantitat de CMC respecte la quantitat de lisina total en la mostra.

Els resultats de la quantificació de CMC estan representats en la Figura 32. S'observa una disminució significativa de la modificació en cisteïna (CMC) en els dos grups sotmesos a restricció de metionina, tant al 40 com al 80%, respecte als animals del grup control. Ara bé, no hi ha diferències significatives entre els dos grups de restricció de metionina.

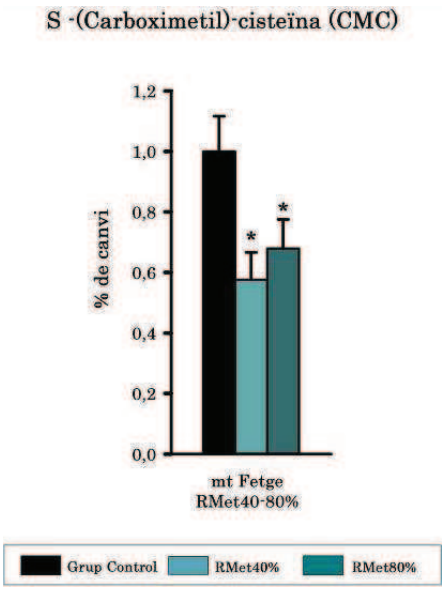

Figura 32 Nivells de S-(Carboximetil)-cisteïna (CMC) en fetge en l'experiment de RMet40-80%.
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grups experimentals respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.
Els valors absoluts (µmol CMC/mol lisina): 201±23; 115±18; 136±19 (Grup Control(GC) i RMet40% i RMet80%, respectivament); *(p<0,05).

21.5.2.4. Mecanismes proposats per a la formació de CMC

En la Figura 33 es representa les dos possibles vies de formació de CMC i CML a partir de glioxal i cisteïna o lisina, respectivament.

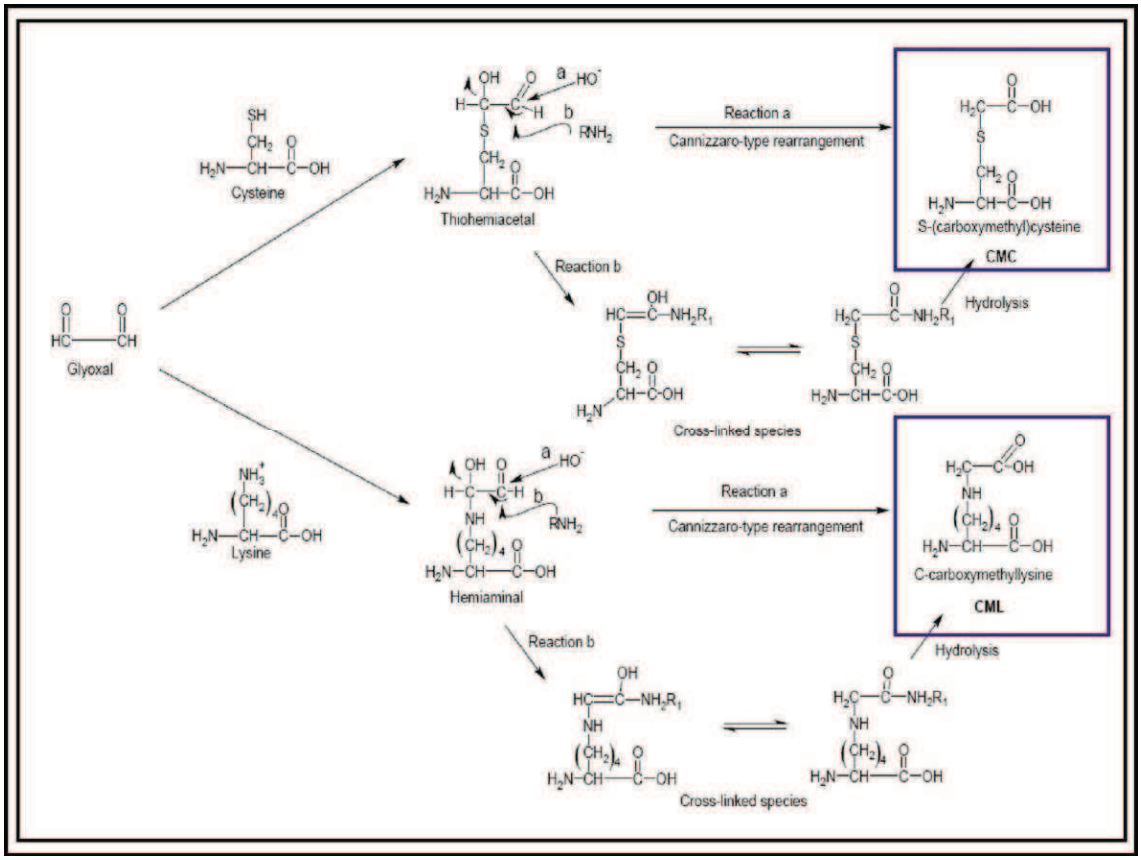

Figura 33 Possibles mecanismes de formació de N$^{\varepsilon}$-carboximetil-cisteïna (CMC) i N$^{\varepsilon}$-carboximetil-lisina (CML) a partir de glioxal i els aminoàcids respectius, cisteïna o lisina.

22.L'ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS ÀCIDS GRASSOS

22.1. Composició percentual dels àcids grassos de la membrana lipídica

Els resultats de la composició en àcids grassos de les membranes lipídiques dels experiments realitzats es mostren en les taules: Taula 15;Taula 16;Taula 17;Taula 18;Taula 19)**.** Cal notar la diferència del perfil lipídic entre òrgans, així doncs, en la Figura 34 A es mostra un cromatograma obtingut d'una mostra corresponent a homogeneïtzat de cervell, el qual es clarament diferent a la Figura 34 B, quèl correspon a un cromatograma d'una mostra de mitocòndria de fetge analitzada.

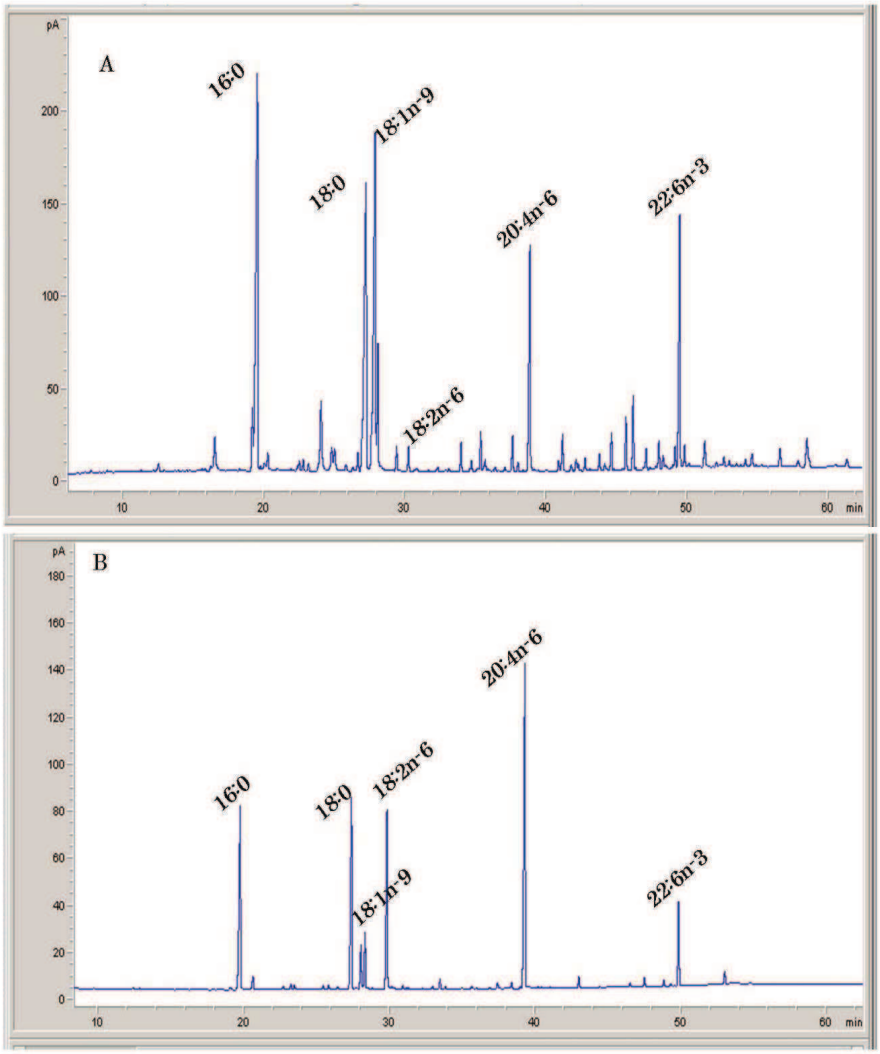

Figura 34 Registres del cromatògraf de gasos per a l'anàlisi composicional en àcids grassos.
(A) Registre del cromatograma intensitat de senyal enfront el temps per a una mostra control de cervell de l'experiment de restricció de metionina al 80% (RMet80%). **(B)** Registre del cromatograma intensitat de senyal enfront el temps per a una mostra control de mitocòndria de fetge de l'experiment de restricció en aminoàcids al 40% excepte la metionina (RAAs40%(-Met).

En la Taula 15 es mostren els resultats de la composició de l'experiment de restricció proteica (RP40%) en mitocòndria de fetge de rata. Es veu un augment significatiu en el grup sotmès a restricció respecte el grup control de l'àcid linoleic (18:1n-9), l'àcid eicosadienoic (20:2n-6) i el eicosatrienoid (20:3n-6), per contra, s'observa una disminució significativa de l'àcid eicosapentanoic (20:5n-3) i del docosahexanoic (22:6n-3).

Taula 15 Composició lipídica de les mitocòndries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció proteica del 40%.

	Grup Control	GrupRP 40%	P <
14:0	0.18±0.01	0.15±0.01	0.194
16:0	17.31±0.44	18.20±0.42	0.177
16:1n-7	1.11±0.07	1.70±0.28	0.069
18:0	17.19±0.24	17.21±0.36	0.959
18:1n-9	9.09±0.17	11.81±0.21	0.001
18:2n-6	19.27±0.66	20.22±0.45	0.266
18:3n-3	0.18±0.04	0.29±0.02	0.055
20:2n-6	0.35±0.01	0.72±0.09	0.003
20:3n-6	0.27±0.02	0.72±0.08	0.001
20:4n-6	26.61±0.44	22.12±0.28	0.001
20:5n-3	0.35±0.02	0.21±0.02	0.004
22:4n-6	0.16±0.008	0.13±0.007	0.026
22:5n-6	0.28±0.04	0.28±0.02	0.959
22:5n-3	0.79±0.04	0.67±0.03	0.070
22:6n-3	6.79±0.44	5.50±0.22	0.028

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.

En la Taula 16 es mostren els resultats de la composició en àcids grassos de l'experiment de restricció de metionina al 40 i 80% en mitocòndria de fetge de rata. El grup restringit en metionina al 40% mostra un augment significatiu, respecte al grup control, dels àcids grassos linoleic (18:2n-6) i el docosapentanoic (22:5n-3) i una disminució significativa del linolènic (18:3n-3) i del araquidònic (20:4n-6). El grup restringit en metionina al 80% mostra un augment significatiu dels àcids esteàric (18:0), linoleic (18:2n-6) i l'adrènic (22:4n-6) i una disminució significativa de l'àcid

palmític (16:0), el palmitoleic (16:1n-7), l'oleic (18:1n-9), el linolènic (18:3n-3), el eicosatrienoic (20:3n-6) i l'araquidònic (20:4n-6) respecte al grup control. Comparant el grup de restricció de metionina al 40% amb el de restricció al 80% veiem que a més restricció de metionina disminueixen significativament els àcids palmític (16:0), el palmitoleic (16:1n-7), el eicosatrienoic (20:3n-6) i l'araquidònic (20:4n-6) i augmenten significativament els àcids esteàric (18:0) i linoleic (18:2n-6).

Taula 16 Composició lipídica de les mitocòndries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció de Metionina del 40 i 80%.

	Grup Control	Grup RMet 40%	$P^a <$	Grup RMet 80%	$P^b <$	$P^c <$
14:0	0.41±0.03	0.34±0.04	0.189	0.39±0.03	0.724	0.330
16:0	16.36±0.24	16.22±0.26	0.691	15.43±0.23	0.012	0.030
16:1n-7	0.70±0.04	0.69±0.06	0.940	0.43±0.03	0.001	0.001
18:0	20.20±0.41	20.06±0.46	0.818	22.07±0.43	0.005	0.003
18:1n-9	7.78±0.30	7.61±0.31	0.711	6.78±0.35	0.037	0.081
18:2n-6	15.85±0.23	17.82±0.45	0.002	19.84±0.48	0.001	0.002
18:3n-3	0.25±0.02	0.17±0.01	0.002	0.20±0.01	0.040	0.233
20:3n-6	0.18±0.01	0.19±0.01	0.569	0.14±0.007	0.061	0.017
20:4n-6	32.07±0.17	30.38±0.15	0.001	27.73±0.46	0.001	0.001
22:4n-6	1.55±0.10	1.71±0.14	0.400	1.99±0.13	0.022	0.127
22:5n-6	0.45±0.02	0.50±0.02	0.179	0.50±0.03	0.237	0.868
22:5n-3	0.32±0.02	0.44±0.02	0.002	0.37±0.02	0.142	0.055
22:6n-3	3.82±0.10	3.82±0.14	0.990	4.09±0.08	0.105	0.102

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.[a] (comparant grup RMet40% amb grup control);[b] (comparant grup RMet80% amb grup control) [c] (comparant grup RMet40% amb grup RMet80%)

En la Taula 17 es mostren els resultats de la composició en àcids grassos de l'experiment de restricció de metionina (RMet80%) en cervell de rata. En aquest experiment es veu un augment significatiu en el grup sotmès a restricció de metionina respecte al grup control en els àcids oleic (18:1n-9) i linoleic (18:2n-6), per contra, es veuen disminuïts els àcids araquidònic (20:4n-6), adrènic (22:4n-6) i el docosahexanoic (22:6n-3).

Taula 17 **Composició lipídica del cervell de rata Wistar en l'experiment de restricció de metionina del 80%.**

	Grup Control	Grup RMet 80%	P <
14:0	0.32±0.05	0.26±0.02	0.378
16:0	22.99±0.29	22.78±0.30	0.636
16:1n-7	0.27±0.01	0.30±0.008	0.080
18:0	22.28±0.19	21.82±0.56	0.499
18:1n-9	19.10±0.25	22.08±0.73	0.006
18:2n-6	0.82±0.03	1.00±0.04	0.011
20:0	1.19±0.10	1.43±0.14	0.231
20:3n-6	0.15±0.004	0.14±0.004	0.965
20:4n-6	13.03±0.12	10.70±0.49	0.002
22:4n-6	3.52±0.04	2.86±0.09	0.001
22:5n-6	0.46±0.01	0.56±0.03	0.023
22:5n-3	1.10±0.07	1.54±0.05	0.001
22:6n-3	14.25±0.08	13.70±0.11	0.005
24:0	0.14±0.004	0.41±0.20	0.265
24:1n-9	0.28±0.01	0.32±0.008	0.017

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.

En la Taula 18 es mostren els resultats de la composició en àcids grassos de l'experiment de restricció d'aminoàcids al 40% excepte la metionina. Entre tots els àcids grassos analitzats en aquest experiment, només s'observen canvis en dos àcids grassos, el linoleic (18:2n-6) i l' araquidònic (20:4n-6); el primer augmenta en el grup sotmès a restricció respecte el grup control i el segon a l'inversa.

Taula 18 Composició lipídica de les mitocòndries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció del 40% de tots els aminoàcids excepte la metionina.

	Grup Control	Grup RestAAs 40%	P <
14:0	0.27±0.04	0.31±0.05	0.634
16:0	16.63±0.27	16.84±0.39	0.657
16:1n-7	1.29±0.13	1.34±0.12	0.784
18:0	18.68±0.48	18.19±0.24	0.378
18:1n-9	7.97±0.30	8.50±0.19	0.171
18:2n-6	15.11±0.13	16.38±0.41	0.015
18:4n-6	0.89±0.07	1.04±0.08	0.227
20:0	0.20±0.05	0.15±0.02	0.358
20:1	0.26±0.03	0.22±0.006	0.240
20:2n-6	0.61±0.07	0.59±0.02	0.775
20:3n-6	0.26±0.04	0.35±0.02	0.084
20:4n-6	30.31±0.22	28.98±0.31	0.006
22:0	1.08±0.05	1.28±0.08	0.076
24:0	0.42±0.07	0.49±0.03	0.431
22:6n-3	5.93±0.26	5.27±0.18	0.070

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.

En la Taula 19 es mostren els resultats de la composició en àcids grassos de l'experiment de suplementació de metionina. La suplementació de metionina disminueix significativament els àcids palmitoleic (16:1n-7), linolènic (18:3n-3), eicosatrienoic (20:3n-6), araquidònic (20:4n-6), eicosapentanoic (20:5n-3) i l'adrènic (22:4n-6) i augmenta significativament l'àcid oleic (18:1n-9) i el linoleic (18:2n-6), respecte el grup control.

Taula 19 Composició lipídica de les mitocòndries de fetge de rata Wistar en l'experiment de suplementació de metionina x 2,9.

	Grup Control	Grup SMet x2,9	P <
14:0	0.50 ± 0.06	0.40 ± 0.03	0.034
16:0	24.65 ± 0.53	23.46 ± 0.91	0.289
16:1n-7	1.17 ± 0.09	0.70 ± 0.04	0.001
18:0	14.96 ± 0.36	16.57 ± 0.63	0.054
18:1n-9	9.99 ± 0.32	11.78 ± 0.53	0.017
18:2n-6	15.66 ± 0.50	19.01 ± 0.69	0.003
18:3n-3	0.69 ± 0.06	0.27 ± 0.01	0.001
20:3n-6	0.47 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.001
20:4n-6	25.44 ± 0.29	22.40 ± 0.66	0.002
20:5n-3	0.58 ± 0.06	0.28 ± 0.04	0.003
22:4n-6	0.68 ± 0.05	0.38 ± 0.02	0.001
22:5n-6	0.79 ± 0.11	0.64 ± 0.01	0.219
22:5n-3	1.43 ± 0.17	1.26 ± 0.12	0.446
22:6n-3	2.82 ± 0.09	2.53 ± 0.15	0.131

Els valors estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals.

22.2. Índexs derivats de la composició en àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global. En la Figura 35 es mostra els valors de la longitud mitjana de la cadena dels àcids grassos analitzats en cada experiment. En tots els experiments aquest paràmetre es manté en un valor mitjà de 18.4 àtoms de carboni. S'observen diferències significatives en l'experiment de

restricció proteica (RP40%) i en l'experiment de restricció d'aminoàcids excepte la metionina (RAAs40%(-Met)) en els quals disminueixen lleugerament el valor de longitud mitjana de la cadena dels àcids grassos en els grups sotmesos a restricció. En els altres experiments realitzats no existeixen diferències significatives en aquest paràmetre.

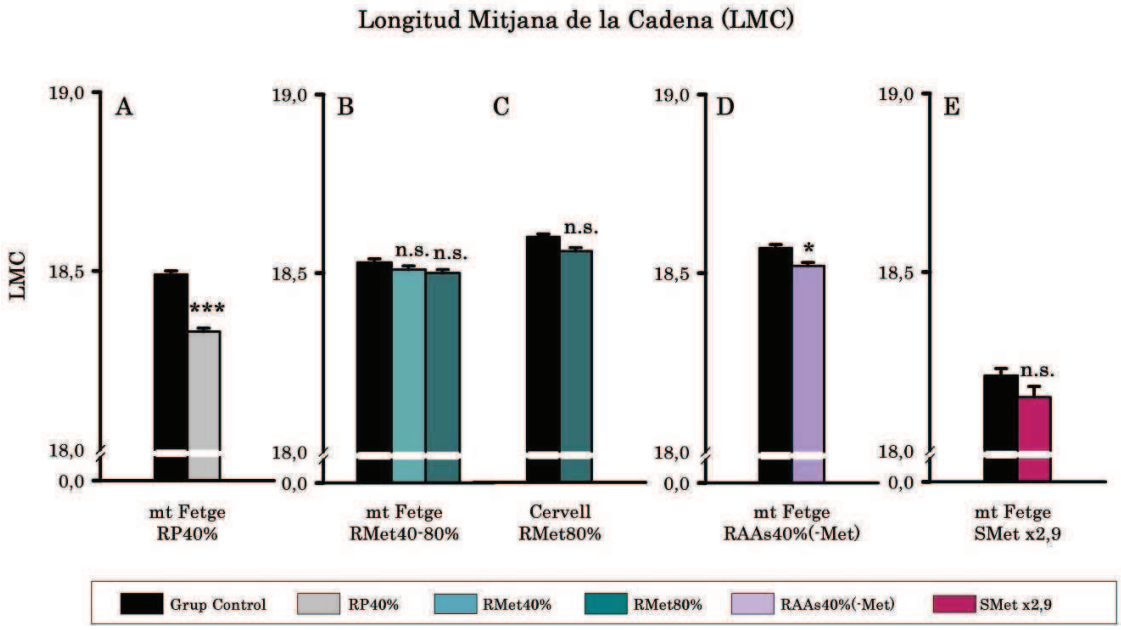

Figura 35 La longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos analitzats. En mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

En la Figura 36 i Figura 37 es mostren els valors dels índex d'àcids grassos saturats (AGS) i insaturats (AGI), respectivament. No s'observa cap diferència significativa en cap dels 5 experiments realitzats en cap dels dos índexs. És a dir, el total d'àcids grassos saturats i insaturats no varia en cap de les intervencions nutricionals realitzades ni en mitocòndria de fetge ni en cervell. Ara bé, cal notar la diferència en valor absolut que existeix entre els índex AGS i AGI en cervell en respecte als altres experiments en mitocòndria de fetge. El AGS es major respecte la mitjana total en els experiments en mitocòndria de fetge i pel AGI passa al inrevés, el AGI es menor que la mitjana dels experiments en mitocòndria de fetge. Això té sentit ja que la composició lipídica varia segons el teixit.

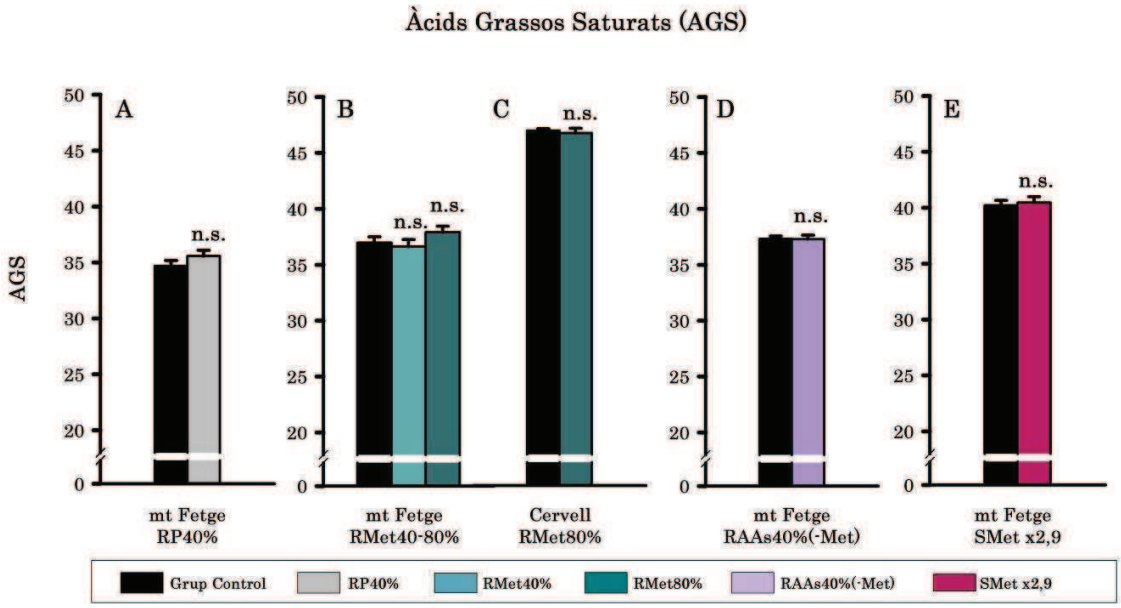

Figura 36 Índex d'Àcids grassos saturats (AGS).
Ens indica el nombre total d'àcids grassos saturats analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). n.s. (no significatiu).

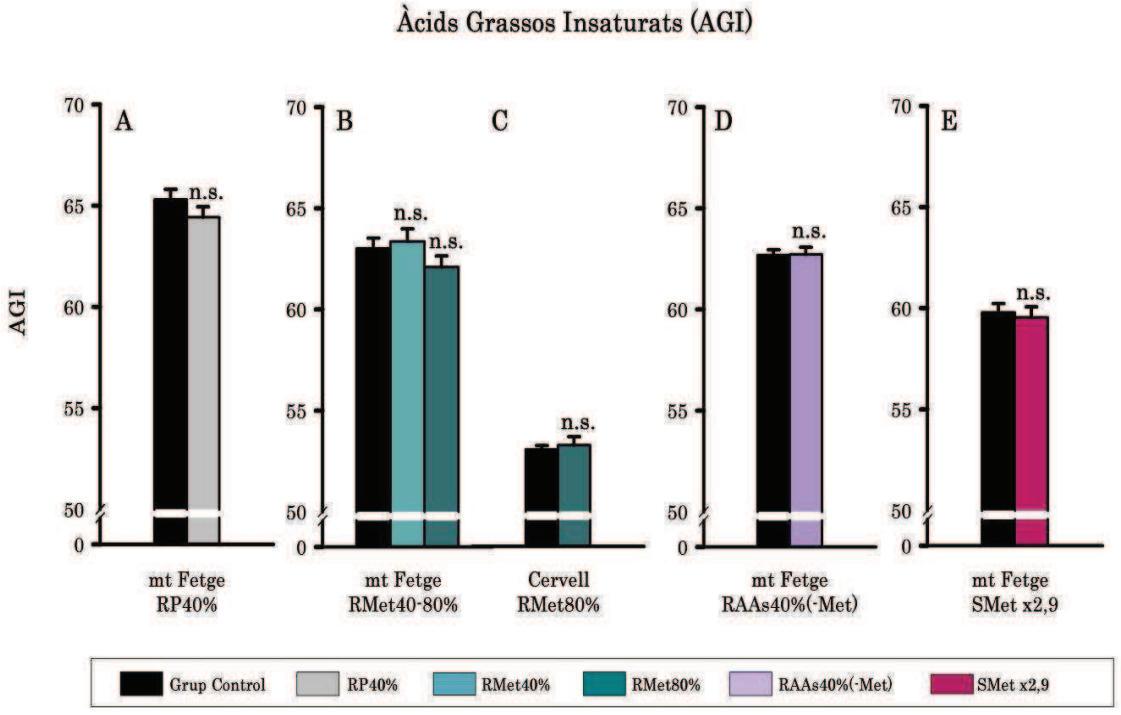

Figura 37 Índex d'Àcids grassos insaturats (AGI).
Ens indica el nombre total d'àcids grassos insaturats analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). n.s. (no significatiu).

Dins del àcids grassos insaturats diferenciem entre els que contenen un sol doble enllaç o els que en tenen més d'un. Per tant, tenim l'índex d'àcids grassos

monoinsaturats (AGMI) (Figura 38), i l'índex d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) (Figura 39).

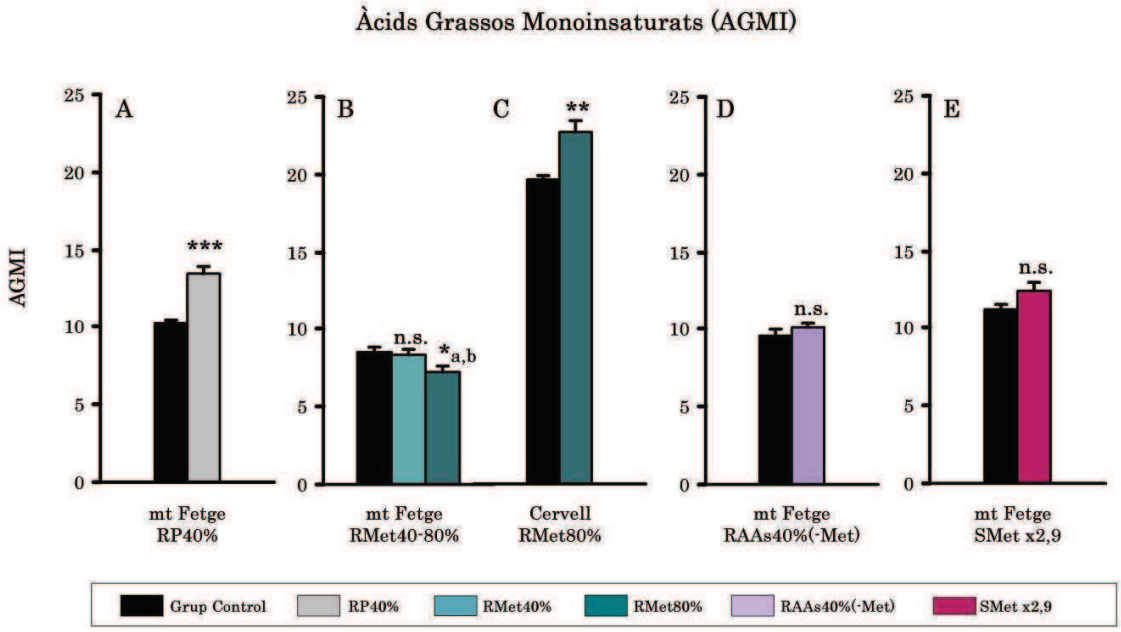

Figura 38 Índex d'Àcids grassos monoinsaturats (AGMI).
Ens indica el nombre total d'àcids grassos monoinsaturats analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); [a] (comparant amb grup control); [b](comparant RMet40% amb RMet80%); n.s. (no significatiu).

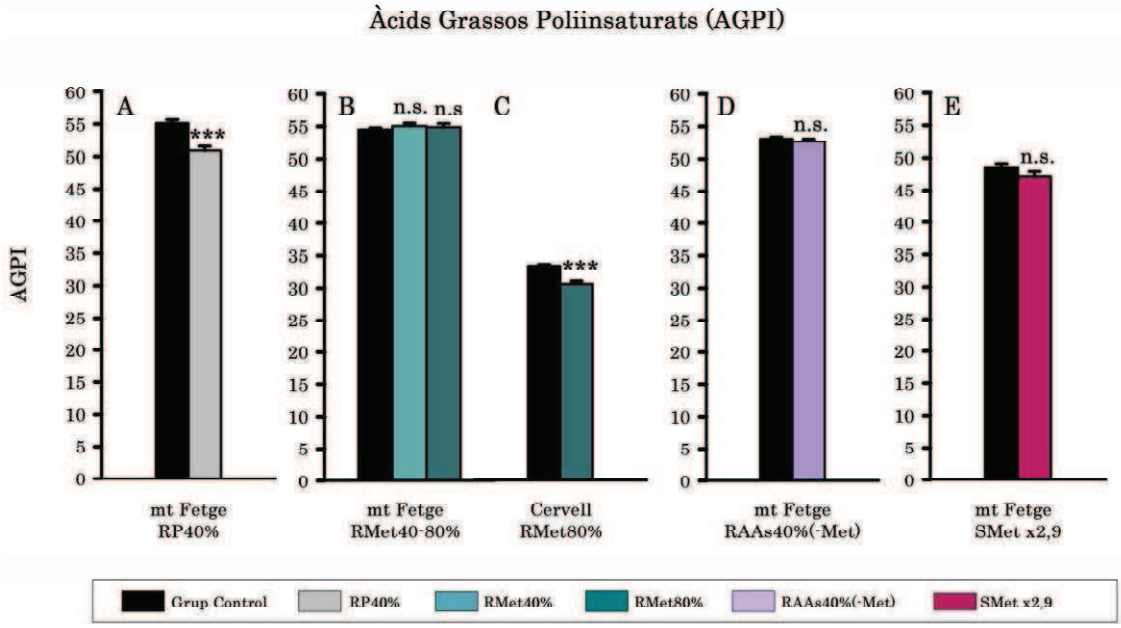

Figura 39 Índex d'Àcids grassos poliinsaturats (AGPI)
Ens indica el nombre total d'àcids grassos poliinsaturats analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

S'observa un augment significatiu d'àcids grassos monoinsaturats en els grups sotmesos a restricció dels experiments de restricció proteica (RP40%) en mitocòndria

de fetge i de restricció de metionina (RMet80%) en cervell. Per contra, s'observa una disminució significativa en l'experiment de restricció de metionina al 40-80% per part del grup sotmès a restricció del 80% en relació tant amb el grup control com amb el grup de restricció al 40%. No s'observen canvis en AGMI ni en l'experiment de restricció d'aminoàcids (RAAs40%) com tampoc en l'experiment de suplementació de metionina (SMet x2,9). L'índex que ens indica el nombre total d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI), succeeix a l'inrevés que en l'índex d'àcids grassos monoinsaturats per als experiments de restricció proteica (RP40%) i de metionina (RMet80%). És a dir, disminueixen significativament els àcids grassos poliinsaturats dels grups sotmesos a restricció respecte als grups controls en ambdós experiments; fet que fa compensar l'augment d'àcids grassos monoinsaturats i mantenir així constant el nombre total d'àcids grassos saturats.

Dins dels àcids grassos poliinsaturats diferenciem dos tipus de poliinsaturació, els de la sèrie n-6 i els de la sèrie n-3. L'índex d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPIn-6) (Figura 40) i els de la sèrie n-3 (AGPIn-3) (Figura 41).

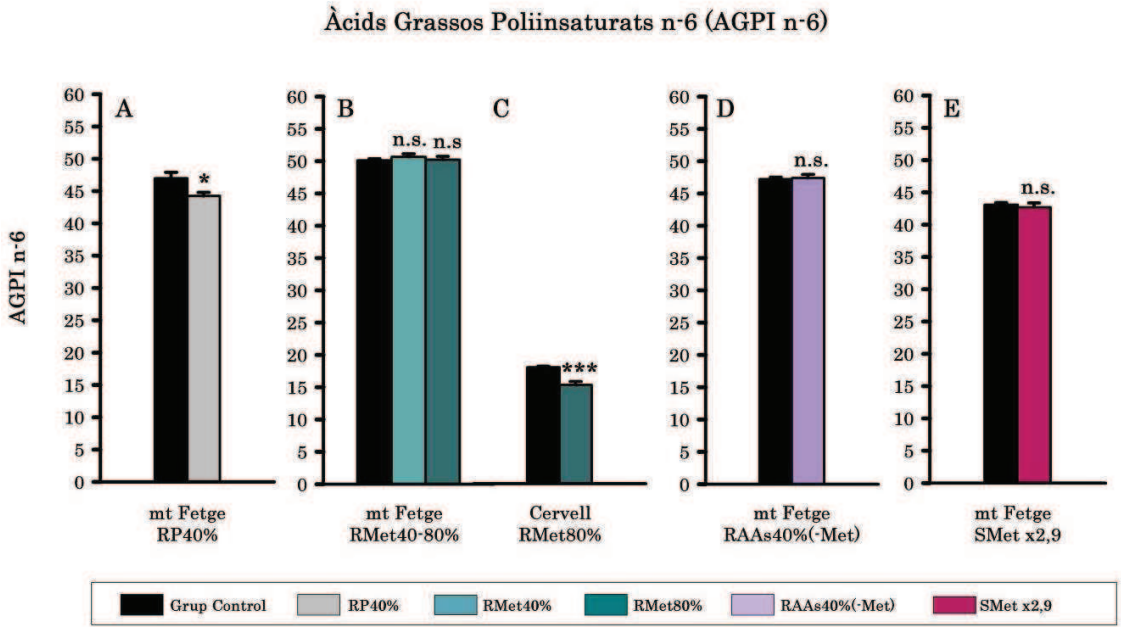

Figura 40 Índex d'Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6).
Ens indica el nombre total d'àcids grassos poliinsaturats n-6 analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).*(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

Observem una disminució significativa del àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 i de la sèrie n-3 en l'experiment de restricció proteica (RP40%), una disminució dels de la sèrie n-6 en l'experiment de restricció de metionina (Rmet80%) en cervell i una

disminució dels n-3 en l'experiment de suplementació de metionina (SMet x2,9). No s'observen canvis significatius en cap altra condició experimental.

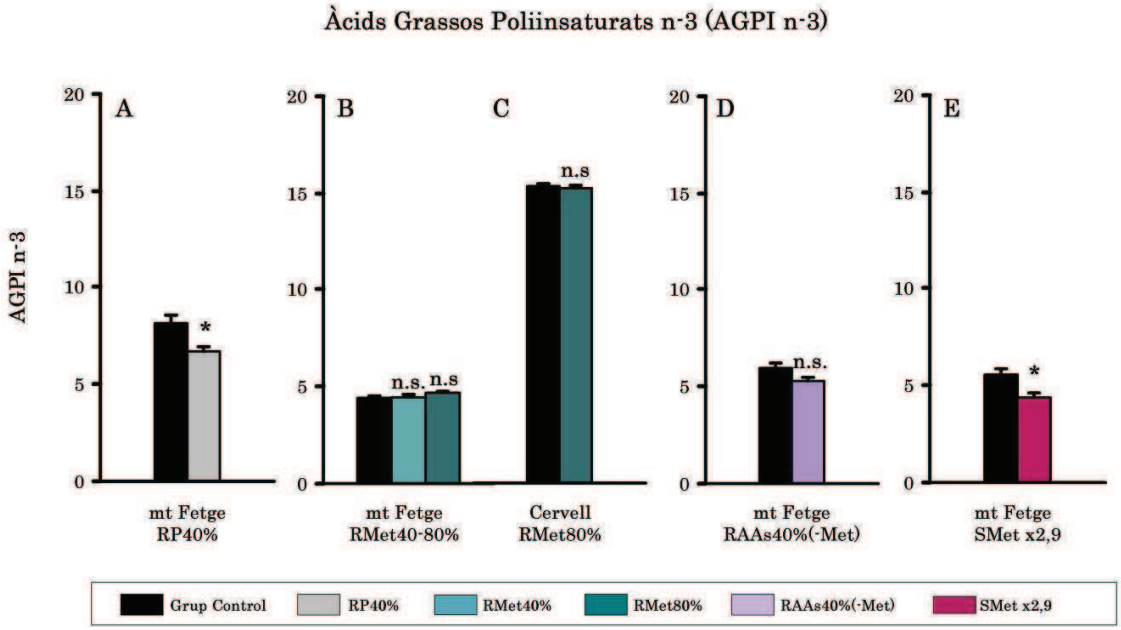

Figura 41 Índex d'Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3).
Ens indica el nombre total d'àcids grassos poliinsaturats n-3 analitzats en mitocòndria de fetge en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C). *(p<0,05); n.s. (no significatiu).

22.3. Grau d'insaturació de la membrana

Els dos paràmetres calculats que ens indiquen el grau d'insaturació de la membrana i la susceptibilitat d'aquesta a ser oxidada són el índex de dobles enllaços (IDE) (Figura 42) i l'índex de peroxidizabilitat (IP) (Figura 43), respectivament. L'índex de dobles enllaços ens indica el nombre d'insaturacions que hi ha per cada 100 molècules d'àcid gras i l'índex de peroxidizabilitat ens indica la susceptibilitat dels àcids grassos a ser oxidats.

S'observa una disminució significativa de l'índex de dobles enllaços i de l'índex de peroxidizabilitat en tots els experiments en els grups sotmesos a la intervenció nutricional. On no hi ha diferència és en l'experiment de restricció de metionina al 40-80% entre el grup de restricció de metionina al 40% i el grup control.

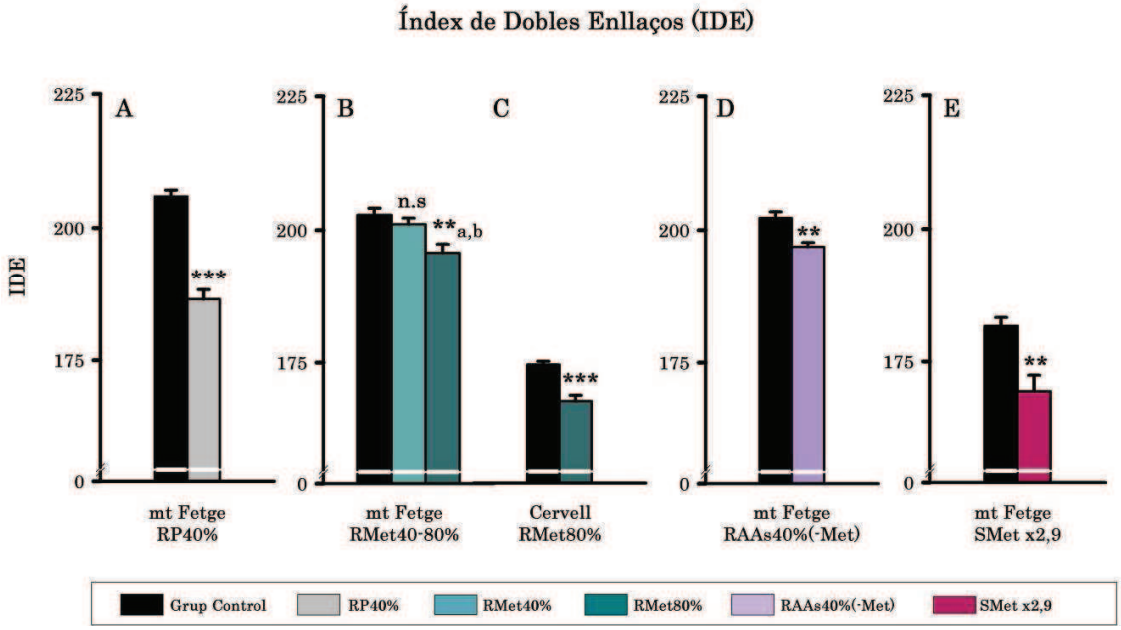

Figura 42 Índex de dobles enllaços.
S'ha calculat pels experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E) en mitocòndria de fetge; i en l'experiment de RMet80% (C) en cervell. **(p<0,01); ***(p<0,001); [a] (comparant amb grup control); [b](comparant RMet40% amb RMet80%); n.s. (no significatiu).

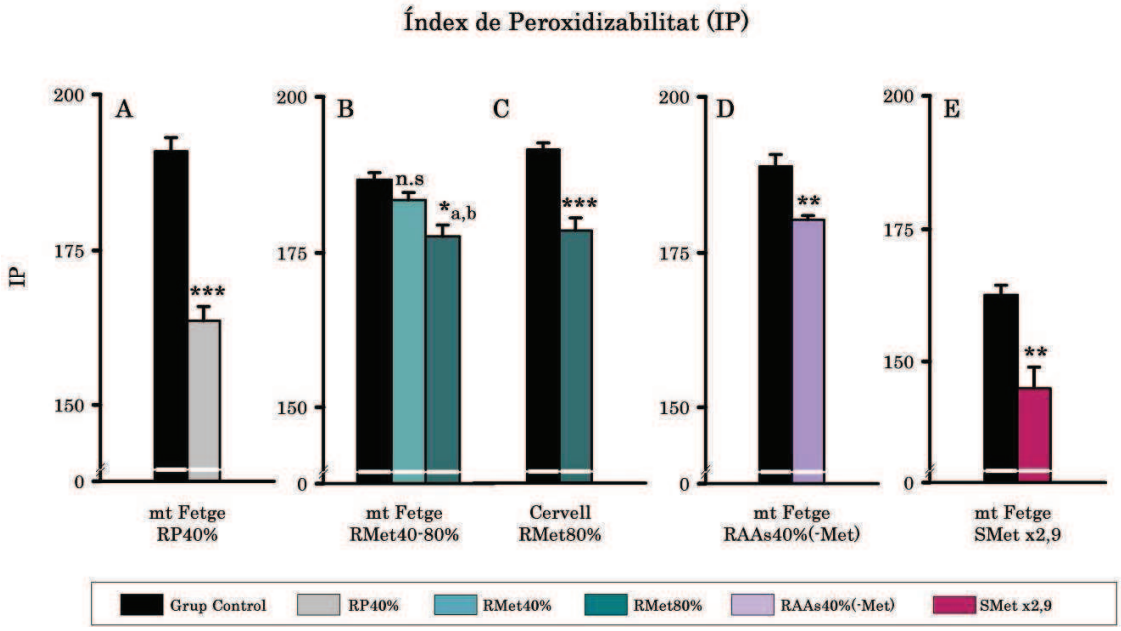

Figura 43 Índex de peroxidizabilitat.
S'ha calculat pels experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E) en mitocòndria de fetge; i en l'experiment de RMet80% (C) en cervell. **(p<0,01); ***(p<0,001); [a] (comparant amb grup control) [b](comparant RMet40% amb RMet80%); n.s. (no significatiu).

23.LA IMMUNOTRANSFERÈNCIA

23.1. Proteïnes dels complexes mitocondrials i AIF

Mitjançant la tècnica d'immunotransferència s'ha realitzat l'estimació de la quantitat d'algunes subunitats del complexes de la cadena de transport electrònic mitocondrial, relativitzant els càlculs sempre a la càrrega a porina *–proteïna mitocondrial molt abundant-*. S'ha realitzat per a els 5 tipus d'experiments d'intervencions nutricionals realitzats en aquesta tesi.

COMPLEX I

S'ha analitzat la subunitat NDUFA9 (CI^a) i la subunitat NDUFS3 (CI^b) del complex I de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Figura 44). S'observa una disminució de les subunitats del complex I en els grups sotmesos a restricció respecte els seus grups controls en els experiments de restricció proteica (RP40%) en fetge, de restricció de metionina al 80% (RMet80%) en cervell i de restricció de metionina al 40 i 80% (RMet40-80%) en fetge. No s'observen diferències significatives en cap de les dues subunitats del complex I en els experiments de restricció en aminoàcids (RAAs40%) i en el de suplementació de metionina (SMet x2,9).

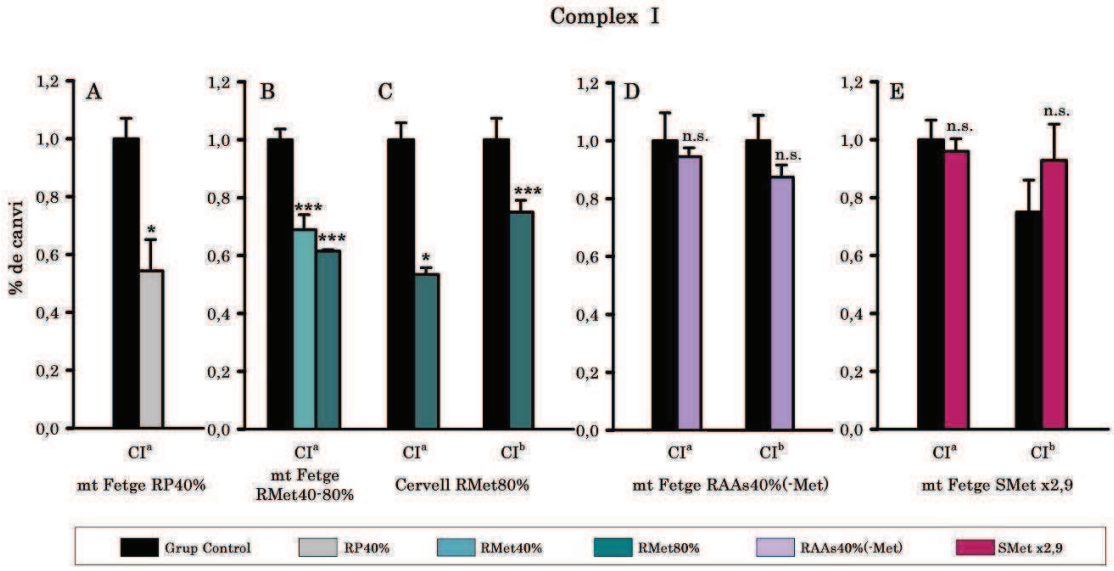

Figura 44 Quantitat de les subunitats CI^a (NDUFA9)i CI^b (NDUFS3) del complex I.
Quantitat de les subunitats CI^a (NDUFA9) del complex I en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C); i de la subunitat CI^b (NDUFS3) en l'experiment de RMet80% (C) en cervell i en els experiments de RAAs40%(-Met) (D) i SMet x2,9 (E) en fetge.
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de CI/densiometria de porina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S1, S2, S3, S4, S5; Annex I)

COMPLEX II

S'ha analitzat la subunitat *Flavoproteïna* del complex II de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Figura 45). S'observen canvis significatius en l'experiment de restricció de metionina al 40-80% on disminueixen significativament els grups de restricció de metionina respecte al grup control. En els altres experiments analitzats no hi ha canvis significatius en el nivell de complex II entre els grups experimentals i els grups controls.

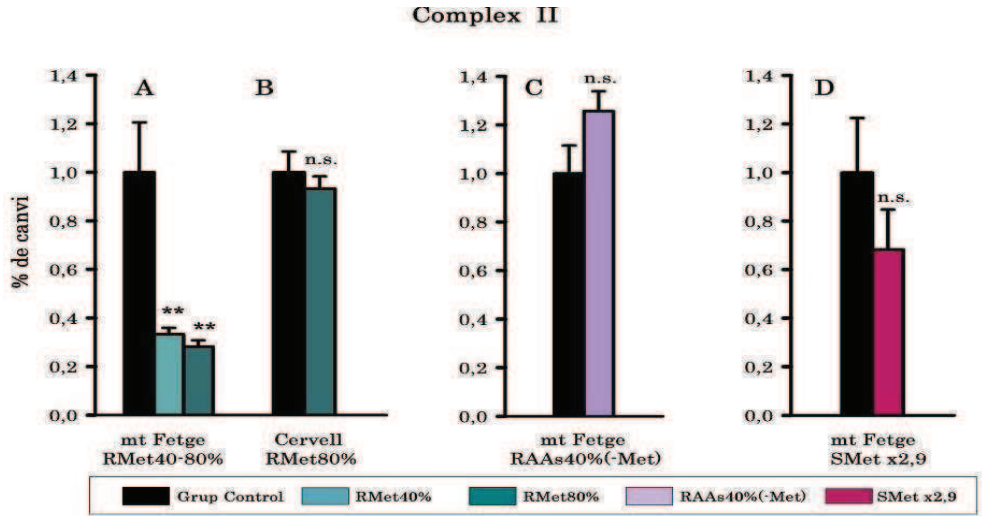

Figura 45 Quantitat de la subunitat *Flavoprotein* del complex II.
En l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de CII/densiometria de porina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. **(p<0,01); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S2, S3, S4, S5; Annex I)

COMPLEX III

S'ha analitzat la subunitat *CORE 2* (CIII[a]) i la subunitat *RIESKE Iron-sulfur* (CIII[b]) del complex III de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Figura 46). S'observa disminució significativa en els grups sotmesos a restricció de metionina en comparació amb els seus grups controls , tant en l'experiment de restricció de metionina al 80% en cervell com en l'experiment de restricció de metionina al 40 i 80% en fetge. No s'observen diferències significatives en l'experiment de restricció d'aminoàcids com tampoc en el de suplementació de metionina.

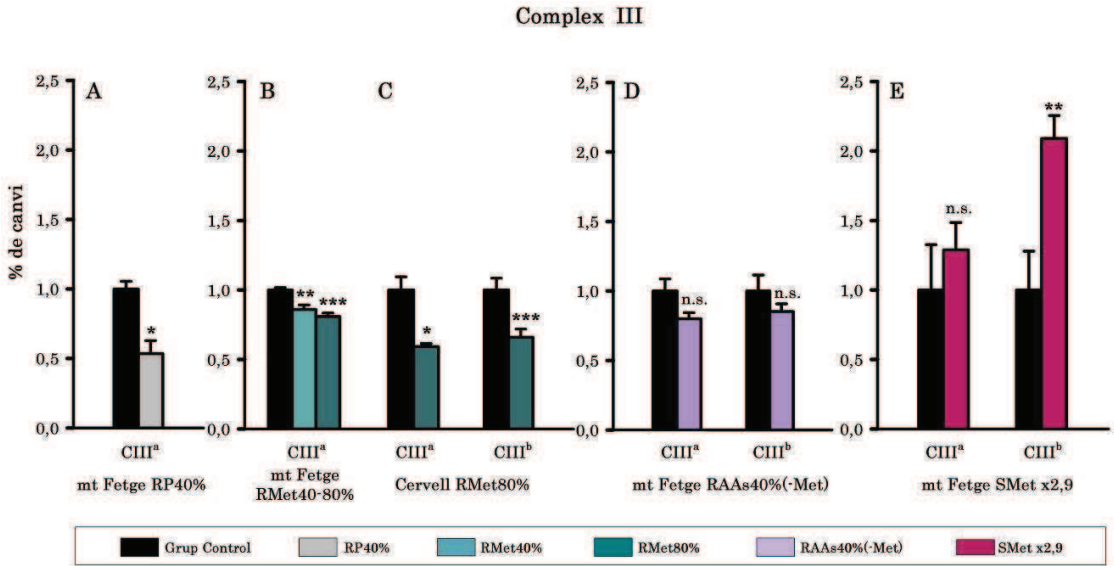

Figura 46 Quantitat de les subunitats CIII^a (*CORE 2*) i CIII^b (*Rieske Iron-Sulfur*) del complex III.
Quantitat de les subunitats CIII^a (*CORE 2*) del complex III en l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C); i de la subunitat CIII^b (*Rieske Iron-Sulfur*) en l'experiment de RMet80% (C) en cervell i en els experiments de RAAs40%(-Met) (D) i SMet x2,9 (E) en fetge.
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de CIII/densiometria de porina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); ***(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S1, S2, S3, S4, S5; Annex I)

COMPLEX IV

S'ha analitzat la subunitat *COXI* del complex IV de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Figura 47). S'observa disminució significativa en els grups sotmesos a restricció dels experiments de restricció proteica (RP40%) i restricció de metionina al 40 i 80% (RMet80%) en relació als seus grups controls. També s'observa disminució significativa del contingut de la subunitat del complex IV en el grup de suplementació de metionina en relació al seu grup control. No s'observen diferències significatives en l'experiment de restricció de metionina (RMet80%) ni en el de restricció d'aminoàcids (RestAAs).

AIF

S'ha analitzat la flavoproteïna mitocondrial anomenada factor d'inducció d'apoptosis (AIF, de l'anglès, *apoptosis-inducing factor*) com a proteïna mitocondrial que sembla estar involucrada en l'assamblatge i manteniment intramitocondrial dels complexes de la cadena respiratòria, especialment del complex I. S'observa disminució significativa en els grups sotmesos a restricció en els experiments de restricció de metionina al 40-

80% i restricció d'aminoàcids respecte els seus grups controls. No s'observen canvis significatius en els experiments de restricció de metionina al 80% (MetR80%) com tampoc en el de suplementació de metionina (SMet) (Figura 48).

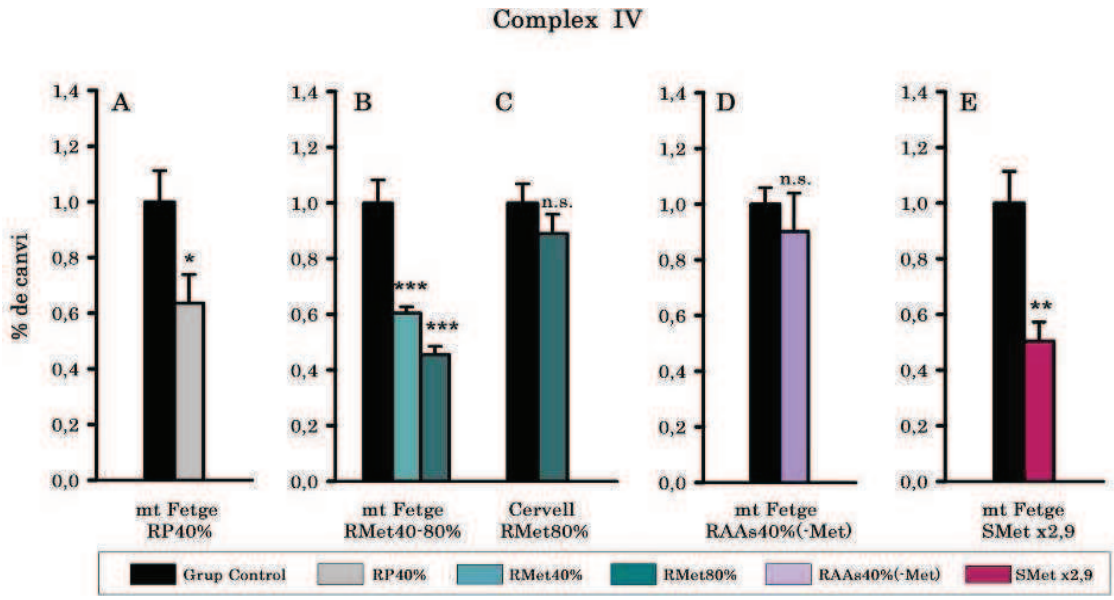

Figura 47 Quantitat de la subunitat *COXI* del complex IV.
En l'experiment de RP40% (A), RMet40-80% (B), RAAs40%(-Met)(D) i SMet x2,9 (E); i en cervell en l'experiment de RMet80% (C).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de CIV/densiometria de porina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S1, S2, S3, S4, S5; Annex I)

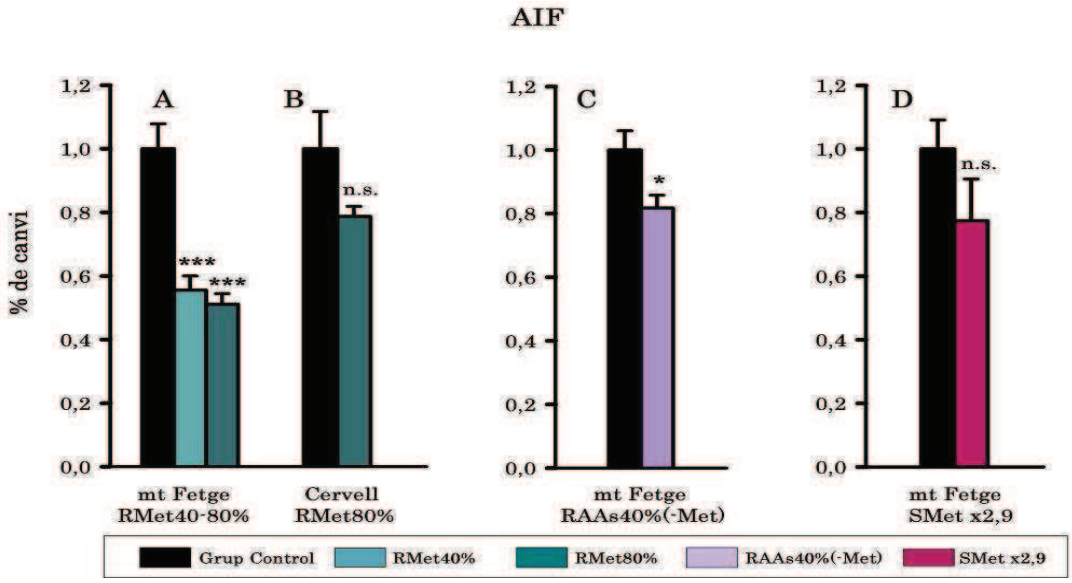

Figura 48 Quantitat de la flavoproteïna mitocondrial anomenada factor d'inducció d'apoptosis (*Apoptosis-Inducing Factor*, AIF).
En l'experiment de RMet40-80% (A), RAAs40%(-Met)(C) i SMet x2,9 (D); i en cervell en l'experiment de RMet80% (B).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup/s experimental/s respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de AIF/densiometria de porina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S2, S3, S4, S5; Annex I)

23.2. Proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial

En l'experiment de restricció de metionina al 80% en cervell s'ha estimat la concentració de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1α (de l'anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α*) i la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (de l'anglès, *uncoupling protein 4*) com a proteïna mediadora de la resistència de les neurones a l'estrès metabòlic i oxidatiu (Figura 49). S'observa un augment significatiu en els cervells de les rates restringides en metionina en les dos proteïnes analitzades.

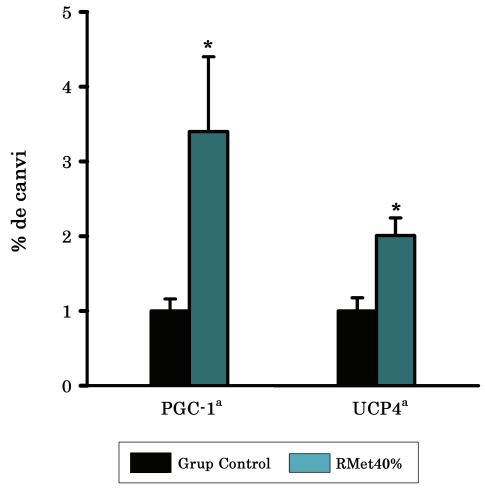

Figura 49 Quantitat de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1 α) i la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (Uncoupling Protein 4).
En cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina al 40% (RMet40%).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de PGC-1 o UCP4/densiometria de l'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *($p<0,05$). (PGC-1ª i UCP4ª: veure detall Taula 11). (Veure figura suplementària S6; Annex I).

En l'experiment de restricció de tots els aminoàcids al 40% excepte la metionina (RAAs40%(-Met)) s'ha estimat en fetge de rata la concentració del factor coordinador de la biogènesi mitocondrial PGC-1α (de l'anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α*), de la sirtuïna SIRT1 (de l'anglès, *sirtuin 1*) i del factor nuclear Nrf2 (de l'anglès, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Figura 50). No s'observen canvis significatius entre els dos grups experimentals amb el factor coordinador de la biogènesi mitocondrial PGC-1α, com tampoc amb el factor nuclear, Nrf2. En canvi, s'observa un augment significatiu del grup restringit en aminoàcids respecte el grup control en la sirtuïna 1, SIRT1.

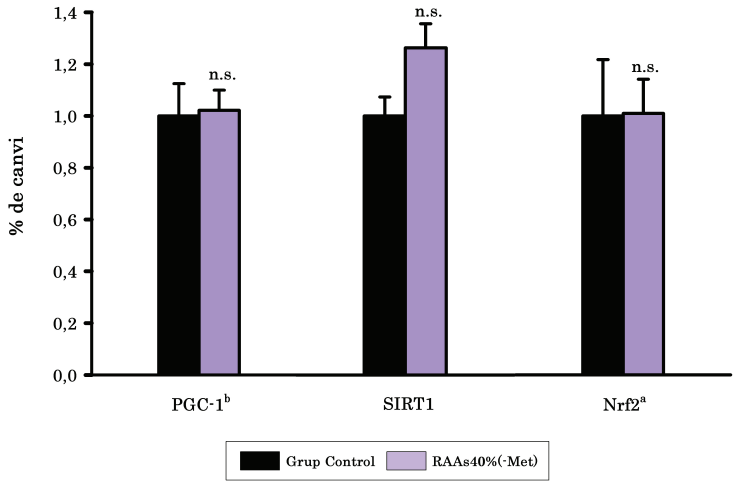

Figura 50 Quantitat de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1 α*), de la sirtuïna SIRT1 (*sirtuin 1*) i del factor nuclear de respiració Nrf2 *(NF-E2 related factor 2*)
En fetge de rata en l'experiment de restricció de tots els aminoàcids al 40% excepte la metionina (RAAs40%(-Met)).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densiometria de PGC-1 o SIRT o NRF2/densiometria de l'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. n.s. (no significatiu). (PGC-1[b] i Nrf2[a]: veure detall Taula 11). (Veure figura suplementària S7; Annex I)

En base a aquests resultats, el fet que el màxim coordinador de la biogènesi mitocondrial, el PGC-1α, es veu significativament augmentat en cervell de rata amb una restricció de metionina i contràriament, no es vegin canvis en fetge de rata de l'experiment de RAAs40%(-Met) ens fa pensar en el sistema nerviós com a diana més vulnerable als canvis en biogènesi, tal com passa, en sentit invers, en les malalties associades a l'envelliment, especialment les neurodegeneratives. Per tot això s'han explorat més a fons els canvis que l'aminoàcid metionina, tant la seva reducció com suplementació en la dieta, pot produir en la biogènesi mitocondrial en el teixit nerviós, el cervell. S'ha analitzat en dos condicions experimentals, en restricció de metionina del 40% (RMet40%) i en suplementació de metionina x 2,9 (SMet x2,9) (Figura 51).

La sirtuïna SIRT1 no mostra canvis significatius en cap de les dues intervencions nutricionals. El coordinador de la biogènesi mitocondrial, en canvi, es veu lleugerament augmentat en la intervenció de restricció de metionina al 40%, tot i que l'augment no és significatiu com en la restricció de metionina del 80% (Figura 51). Contràriament, en suplementació de metionina el PGC-1α es troba significativament disminuït, aquesta disminució pot fer pensar en una disminució de la biogènesi mitocondrial induïda per l'excés de metionina. El factor nuclear de respiració, NRF1, disminueix significativament en l'experiment de restricció de metionina i mostra una tendència a disminuir en

l'experiment de suplementació de metionina, sense ser significativa. El factor de transcripció mitocondrial mTFA es troba significativament augmentat en l'experiment de RMet40%, en canvi, no hi ha diferències significatives en l'experiment de SMet.

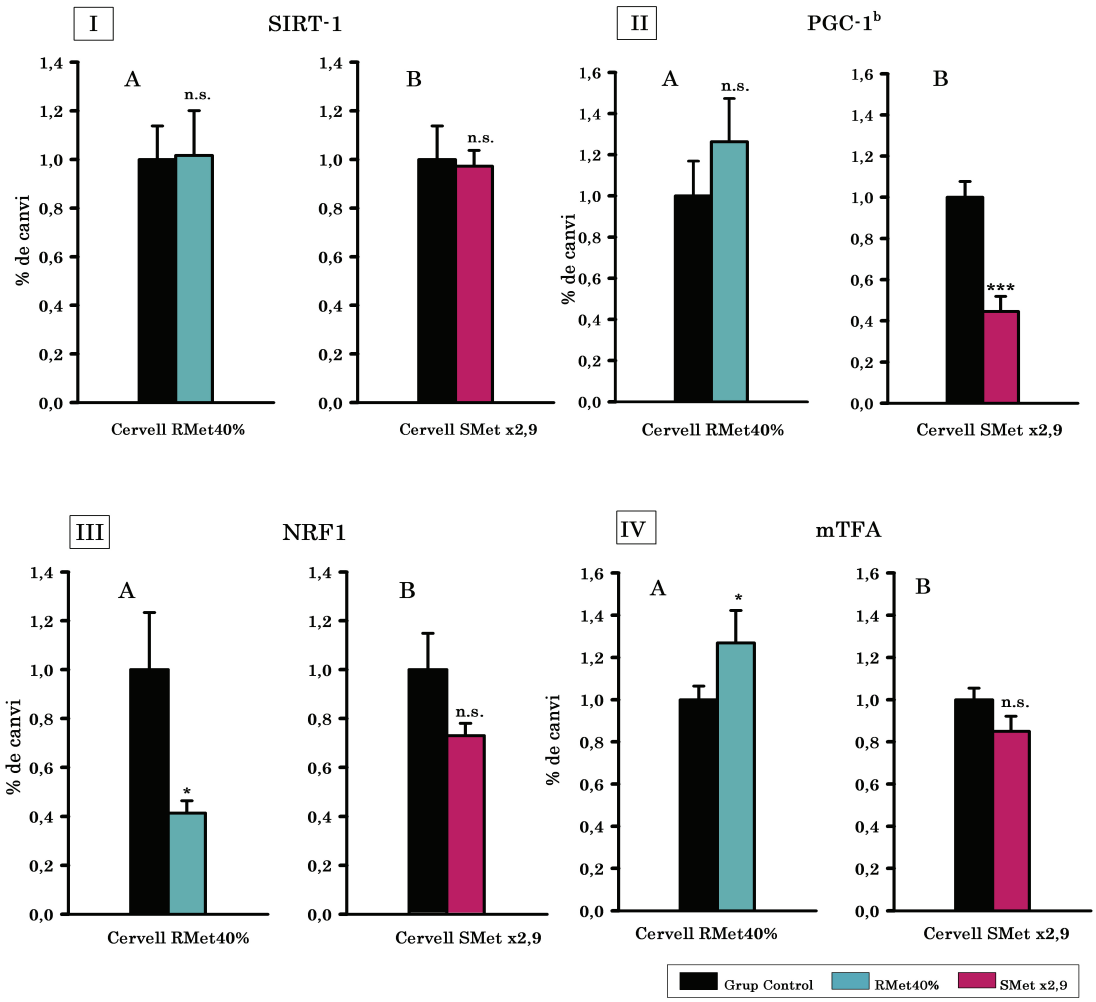

Figura 51. Quantitat de la proteïna sirtuïna SIRT1 (*sirtuin 1*) (I); de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1 α*) (II); del factor nuclear de respiració NRF1 (*nuclear respiratory factor1*) (III), del factor de transccripció mitocondrial A (*mitochondrial transcription factor A*).
Totes elles en cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina del 40% (MetR40%) (A) i en l'experiment de suplementació de metionina x 2,9 (MetS x2,9) (B).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densitometria de SIRT; PGC-1; NRF1; mTFA/densitometria d'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (PGC-1^b, veure detall Taula 11). (Veure figures suplementàries S8,S10; Annex I)

El factor nuclear Nrf2 no mostra diferències significatives en la restricció ni en la suplementació de metionina, tot i que s'intueix una tendència a la disminució en els dos casos. L'enzim antioxidant, superòxid dismutasa 1, també anomenada CuZnSOD; la qual es induïda pel factor nuclear Nrf2, es mostra significativament disminuïda en la restricció de metionina i per altra banda, no mostra diferències significatives en l'experiment de suplementació de metionina (Figura 52).

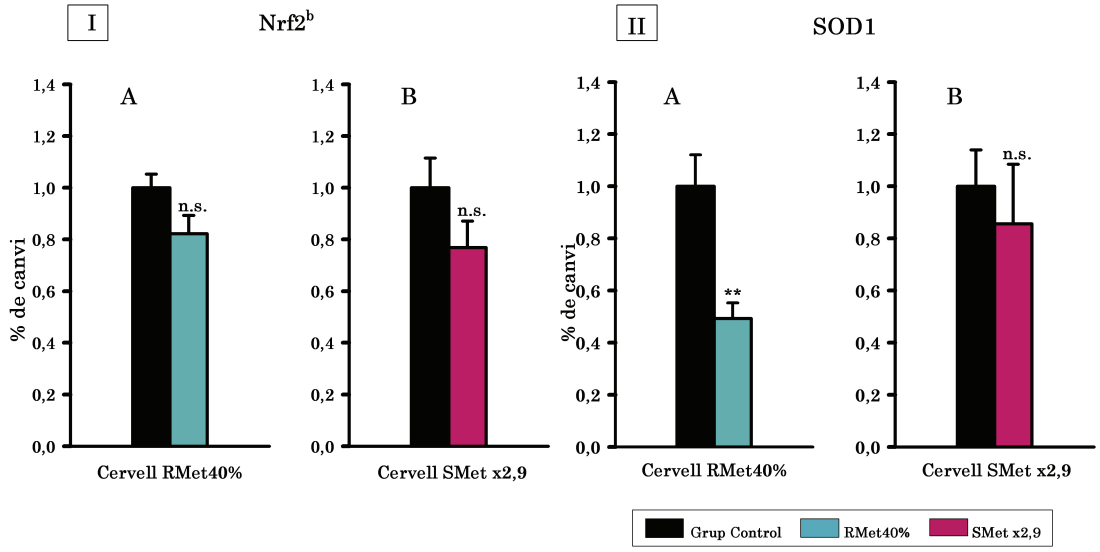

Figura 52 Quantitat del factor nuclear Nrf2 *(NF-E2 related factor 2*) (I) i de la superòxid dismutasa Cu/Zn (SOD1) (II).
Totes elles en cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina del 40% (MetR40%) (A) i en l'experiment de suplementació de metionina x 2,9 (MetS x2,9) (B).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densitometria de Nrf2; mTFA/densitometria d'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Nrf2^{b} , veure detall Taula 11). (Veure figures suplementàries S8,S10; Annex I)

La proteïna desacobladora específica de cervell, UCP4, la qual s'ha descrit com a proteïna mediadora de la resistència de les neurones a l'estrès metabòlic i oxidatiu, no mostra canvis significatius en l'experiment de restricció de metionina. Per contra, es mostra significativament disminuïda quan la intervenció nutricional és de suplementació de metionina (Figura 53).

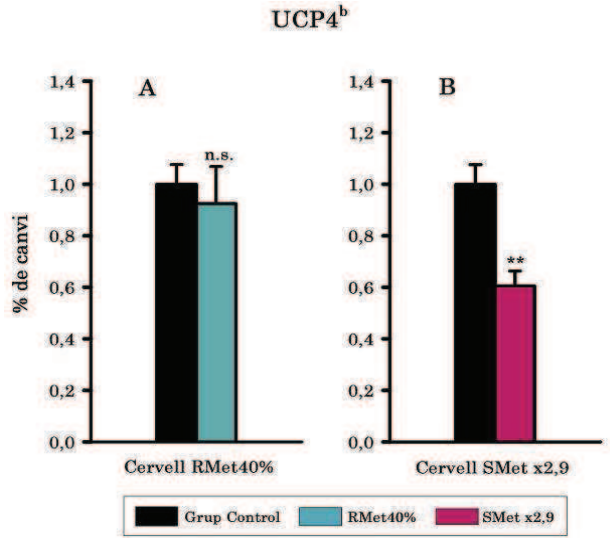

Figura 53 Quantitat de la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (*Uncoupling Protein 4*).
En cervell en els experiments de restricció de metionina al 80% (MetR80%) i en suplementació de metionina x2,9 (MetS x2,9).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densitometria de UCP4 /densitometria d'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (UCP4^{b}: veure detall Taula 11). (Veure figures suplementàries S8,S10; Annex I).

23.3. Proteïnes relacionades amb l'estrès de reticle

Donat el fet que en les malalties associades a l'envelliment també es troba implicat l'estrès de reticle endoplasmàtic (RE) alhora que existeix l'estrès oxidatiu, s'ha plantejat estimar les quantitats d'algunes proteïnes relacionades amb el control de qualitat del

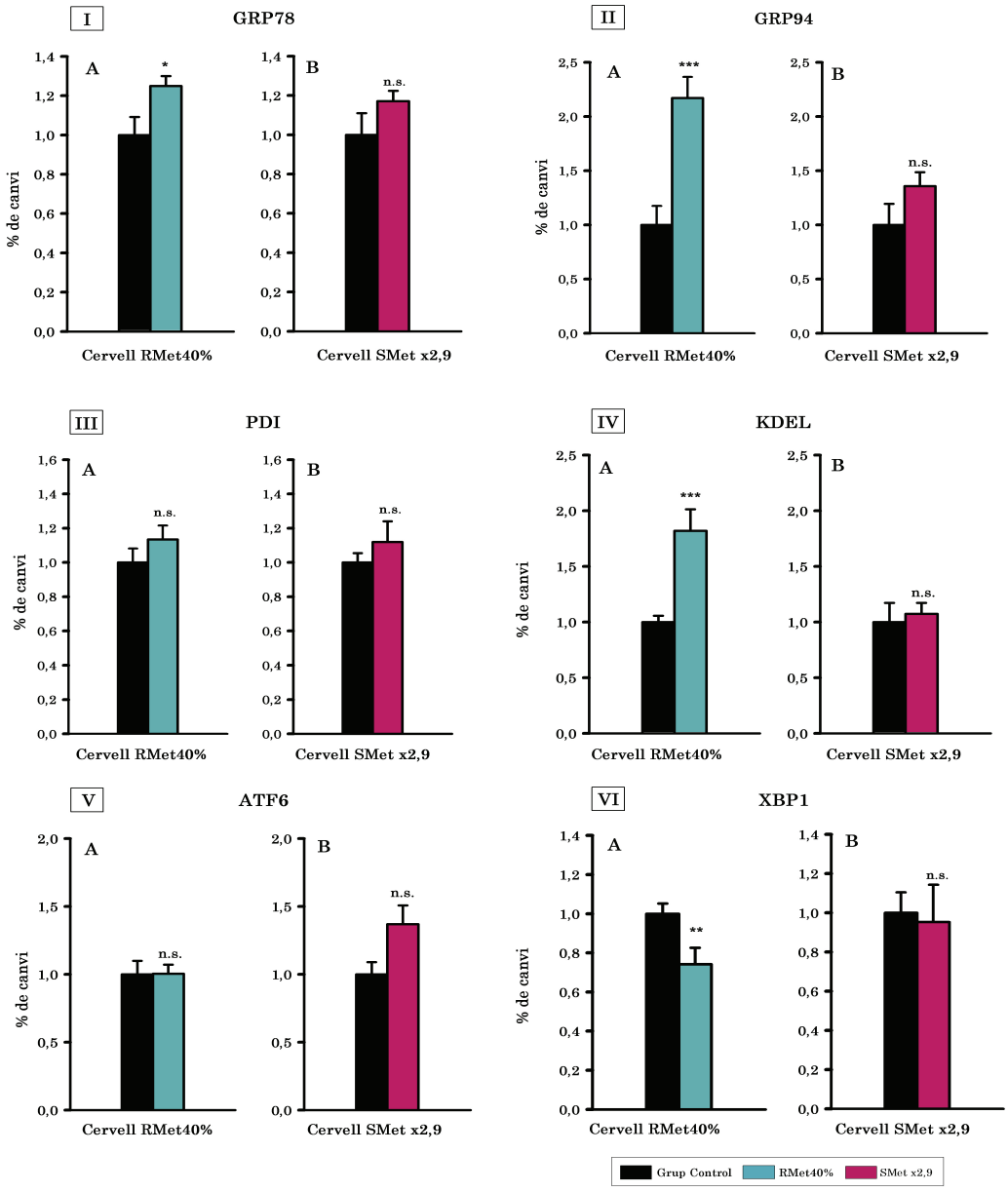

Figura 54 Quantitat de les proteïnes xaperones i relacionades amb el reticde endoplasmàtic.
La proteïna transmembrana del reticle endoplasmàtic ATF6 (*activating transcription factor 6*) (I) ; el factor de transcripció XBP1 (*X box binding protein 1*) (II); les proteïnes del reticle endoplasmàtic GRP 78 (*glucose regulated protein 78kDa*) (III) i GRP 94 (*glucose regulated protein 94kDa*) (IV) ; la proteïna KDEL (V) i la proteïna disulfur isomerasa (*protein disulphide isomerase*) PDI (VI). Totes elles en cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina del 40% (MetR40%) (A) i en l'experiment de suplementació de metionina x2,9 (MetS x2,9) (B).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control calculant la relació de la densitometria de ATF6; XBP1; GRP78; GRP94; KDEL; PDI/densitometria d'actina, i estan expressats com a mitjana ± SEM de 5-6 animals. *(p<0,05); **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu). (Veure figures suplementàries S9,S11; Annex I)

plegament proteic, el qual es troba alterat per l'estrès oxidatiu i de RE (veure Figura 17) en cervell en les dues mateixes condicions experimentals, en restricció de metionina del 40% (RMet40%) i en suplementació de metionina (SMet x2,9), en les que s'han analitzat algunes de les proteïnes relacionades amb biogènesi mitocondrial.

La proteïna xaperona principal, la GRP78 es troba significativament augmentada en l'experiment de RMet40%, contràriament, però, en l'experiment de SMet no hi ha diferències significatives, tot i que la tendència sembla ser a l'augment. L'altra proteïna xaperona quantificada per immunotransferència és la GRP94, la qual, augmenta també significativament en l'experiment de RMet40%, en el mateix sentit que la GRP78. I no mostra diferència significativa en l'experiment de SMet. La proteïna principal del RE responsable del plegament proteic, la PDI, no mostra canvis significatius ni en RMet40% ni en SMet, tot i que sembla que hi ha una tendència a l'augment, en els dos experiments. La proteïna receptora de membrana KDEL, principalment de les xaperones GRP78 i GRP94 i la proteïna PDI, es troba significativament augmentada en l'experiment de restricció de metionina i no hi ha canvis significatius en l'experiment de SMet. El factor ATF6, sensor de l'estrès de RE, no mostra canvis significatius en cap de les dues intervencions nutricionals, ara bé, hi ha una tendència a augmentar degut a l'excés de metionina. Per últim, la proteïna XBP1, la qual indueix la transcripció de xaperones, es mostra significativament disminuïda en l'experiment de restricció de metionina, en canvi, en l'experiment de suplementació de metionina no mostra cap canvi significatiu (Figura 54).

24.LA PROTEÒMICA EN RESTRICCIÓ DE METIONINA

Per tal d'intentar elucidar si existeixen diferències en el proteoma[i] quan s'efectua la intervenció nutricional de restricció de metionina, s'han utilitzat mitocòndries de fetge de rata de l'experiment de restricció de metionina al 40-80% per realitzar una electroforesi bidimensional i una posterior identificació de les proteïnes expressades diferencialment mitjançant MALDI-TOF. La comparació s'ha realitzat només entre el grup control i el grup de restricció de metionina al 80%.

A partir de l'anàlisi de les imatges dels gels (veure apartat 17.5) i segons el criteri descrit en el mateix apartat , s'ha identificat 6 proteïnes. D'aquestes, quatre han estat identificades mitjançant MALDI-TOF i les altres dos han donat senyals en aquesta tècnica, però que no han estat suficients per a detectar-les; per tant s'han seqüenciat mitjançant LC-MS/MS (Taula 20). Les proteïnes identificades estan anomenades per les lletres de la "A" a la "F". En la Figura 55 es mostren dos gels representatius de l'experiment, on estan senyalades les proteïnes identificades.

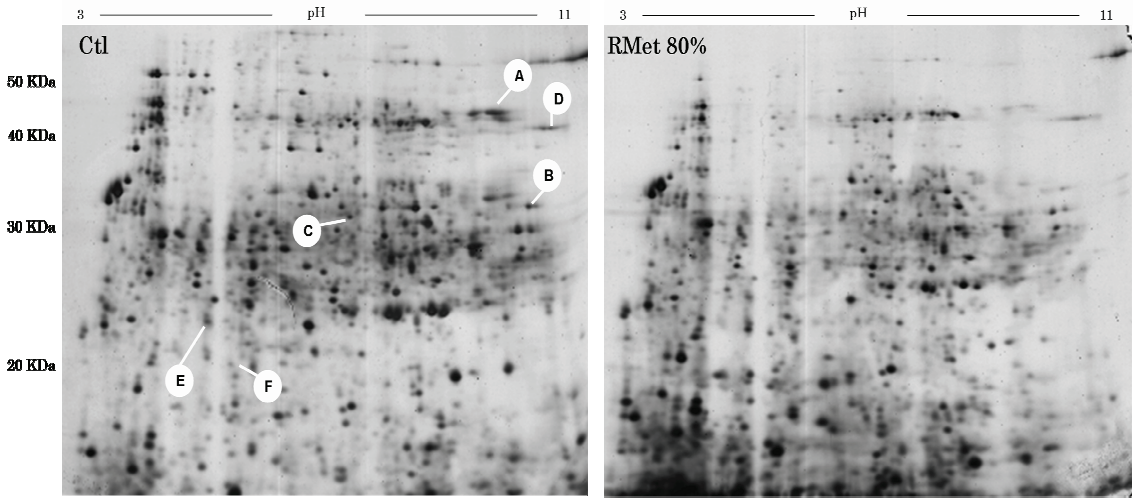

Figura 55 Imatges dels gels tenyits amb plata, de la mostra del grup control i grup de RMet, esquerra dreta, respectivament.
Les lletres (A-F) assenyalen les taques de les proteïnes identificades, veure detall a la Taula 20 Proteïnes identificades mitjançant MALDI-TOF.Taula 20.

Una vegada les proteïnes han estat identificades s'ha realitzat un càlcul densitomètric (dades de *View density- Density in box - Average Quantity*) per a cada proteïna identificada. S'ha realitzat el càlcul estadístic i s'ha expressat el càlcul de la

[i] La definició original d'analisi proteòmic va ser descrita per Wasinger i col·laboradors (Wasinger et al. 1995) i es refereix a l'anàlisi de totes les proteïnes expressades per un genoma, cèl·lula o teixit.

relació: mitjana valors densitometria de la taca de la proteïna en el grup de MetR80% enfront mitjana valors densitometria de la taca de la proteïna en el grup control. Tots ells amb una p< 0.05.

En la Taula 20, a més del nom de la proteïna, de la seva abreviació, del seu número d'accés a les bases de dades, del punt isoelèctric i pes molecular teòric, i l'observat (en els nostres experiments), com també el nombre de pèptids identificats i la cobertura de la seqüència; es mostra també el procés biològic en el qual participa dins de la mitocòndria.

Taula 20 Proteïnes identificades mitjançant MALDI-TOF.
Estan ordenades segons la seva expressió en MetR respecte al grup control, de menys a més. (* proteïnes identificades mitjançant LC-MS/MS).

PROTEÏNES IDENTIFICADES								
	Nom/ Abreviació/ Num. d'accés	pI/P.M Teòric	pI/P.M Obs.	N.P.I	C.S. (%)	Procés biològic implicat	MetR /Ctl	P<
A	3-cetoacil-CoA tiolasa / THIM_RAT / P13437	8,09 / 41870,92	8 / 45000	21	66	ß-oxiodació dels àcids grassos	0,31	0,016
B*	Proteïna de canal aniònic depenent de voltatge o Porina / VDAC1_RAT / Q9Z2L0	8,62 / 30755,51	7,5 / 35000	1	0,57**	Transport aniònic	2,02	0,046
C	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomerasa / ECH1_RAT / Q62651	8,14 / 36171,67	7,5 / 32000	10	47	ß-oxiodació dels àcids grassos	3,30	0,002
D	Aspartat aminotransferasa / AATM_RAT / P00507	9,13 / 47314,28	9 / 47000	12	29	Cicle de la urea	3,77	0,001
E	Catalasa/ CATA_RAT / P04762	7,07 / 59757,20	7 / 28000	5	10	Resposta a l'estrès oxidatiu	5,21	0,038
F*	Subunitat d de l'ATP sintasa / ATP5H_RAT / P31399	6,16 / 18763,44	6 / 20000	1	7,50**	Cadena de transport electrònic i fosforilació oxidativa	6,24	0,050

pI punt isoelèctric; P.M. pes molecular expressat en Daltons; N.P.I. nombre de pèptids identificats;C.S. cobertura de la seqüència, en %. **puntuació Delta Cn (Bioworks) (veure apartat 17)

25.LA MESURA DELS METABÒLITS DE LA METIONINA

25.1. Metabòlits de la metionina en fetge de rata

El tractament de restricció del 40% de tots els aminoàcids excepte la metionina (RAAs40%(-Met)) no causa canvis significatius en els valors dels metabòlits del cicle de la metionina, la S-adenosil-metionina i la S-adenosil-homocisteïna en el fetge de la rata. Com tampoc en la seva relació (SAM/SAH) (Figura 56).

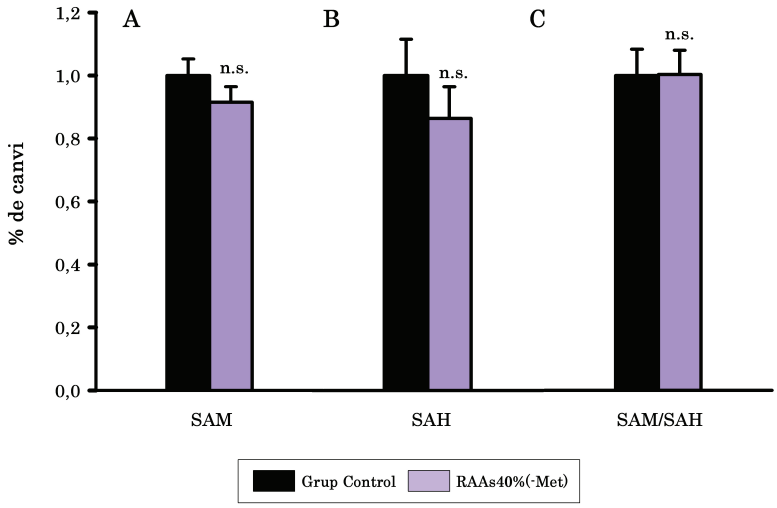

Figura 56 Nivells de S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteïna (SAH) i la relació SAM/SAH. En fetge de rata de l'experiment de restricció de tots els aminoàcids al 40% excepte la metionina (RAAs40%(-Met)).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. Els valors absoluts (nmol SAM o SAH/g teixit): A) 201,8±10,6; 184,8±9,8; B) 39,8±4,6; 34,4±4,1; C) 5,63±0,47; 5,65±0,43 (grup control; grup experimental, respectivament). n.s. (no significatiu).

25.2. Metabòlits de la metionina en cervell de rata

Posteriorment a l'anàlisi de SAM i SAH en fetge de rata mitjançant HPLC, s'ha pogut disposar d'un cromatògraf de líquids acoblat a un quadrupol amb temps de vol. Es va posar a punt un altre mètode cromatogràfic basat en (Burren et al. 2006). Amb aquest mètode s'ha determinat mitjançant LC QTOF-MS la concentració de metionina, S-adenosil-metionina i S-adenosil-homocisteïna en cervell de rata dels experiments de restricció de metionina al 40% i de suplementació de metionina al 2,5% (Figura 57).

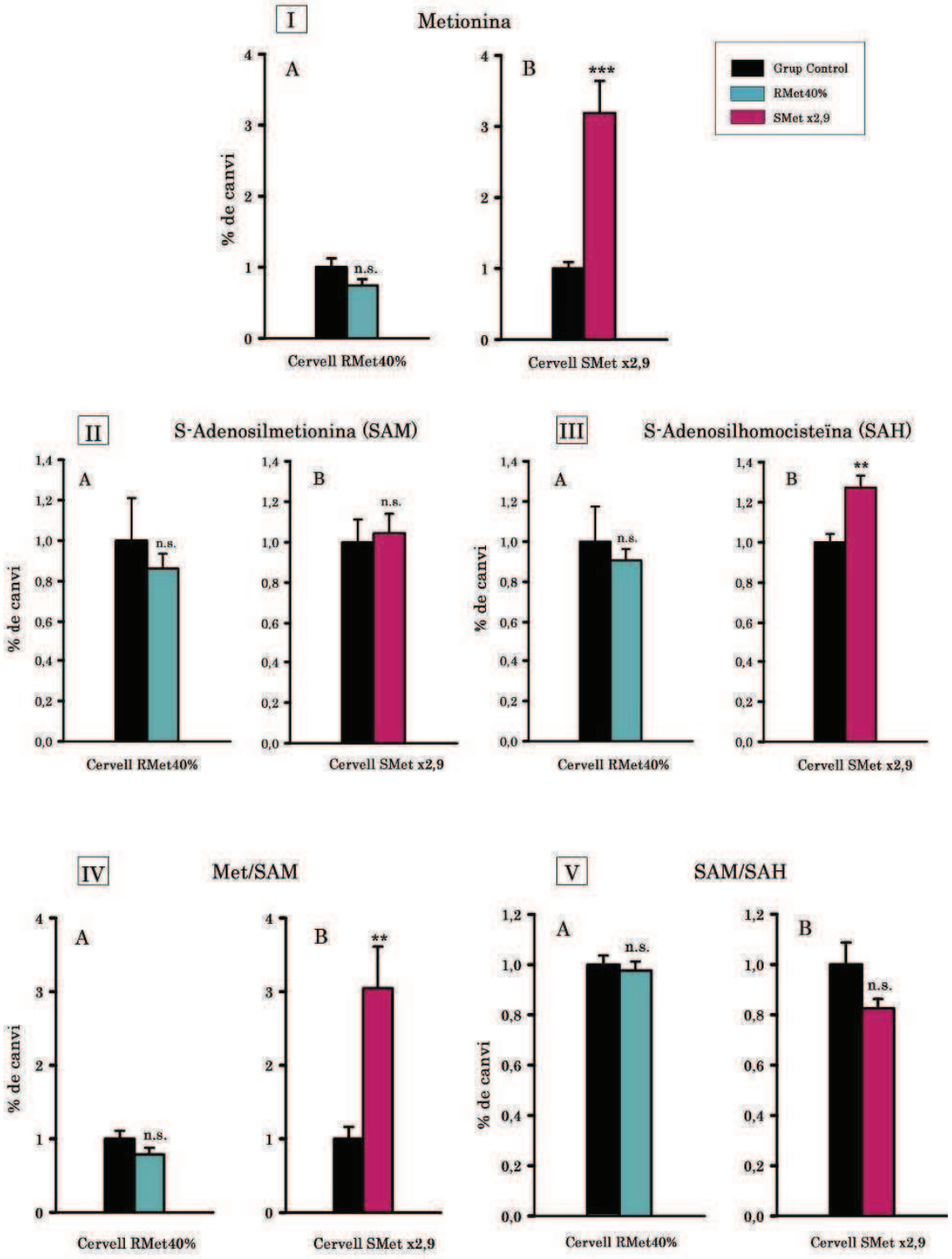

Figura 57 Nivells de metionina (I), S-adenosilmetionina (SAM) (II), S-adenosilhomocisteïna (SAH) (III), la relació Met/SAM (IV) i la relació SAM/SAH (V).
En cervell de rata de l'experiment de restricció de metionina al 40% (RMet40%) (A) i en suplementació de metionina (SMet x2,9) (B).
Els valors representats en les gràfiques ens indiquen el % de canvi del grup experimental respecte el grup control, estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. Els valors absoluts (nmol Met, SAM o SAH/g teixit): (I-A) 109,19±13,46; 81,02±9,8; (I-B) 112,76±9,93; 359,27±51,43; (II-A) 6,81±1,43; 5,87±0,5; (II-B) 6,66±0,75; 6,96±0,63; (III-A) 8,06±1,41; 7,31±0,46; (III-B) 8,24±0,35; 10,49±0,49; (IV-A) 17,71±1,94; 13,91±1,63; (IV-B) 18,57±2,99; 56,56±10,52; (V-A) 0,82±0,03; 0,8±0,03; (V-B) 0,8±0,07; 0,66±0,03. **(p<0,01); ***(p<0,001); n.s. (no significatiu).

LA METIONINA

En l'experiment de restricció de metionina al 40% no es veuen diferències significatives entre els valors de metionina en els cervells de les rates. S'observa un increment significatiu del 200% del valor de metionina en el grup suplementat en metionina respecte al grup control.

LA SAM I LA SAH

Els valors del metabòlit S-adenosil-metionina (SAM) no varien en cap de les dos intervencions nutricionals realitzades, ni la restricció ni la suplementació. En canvi, el valor de S-adenosil-homocisteïna es veu augmentat significativament en el grup sotmès a suplementació de metionina. No es veuen diferències d'aquest metabòlit en l'experiment de restricció de metionina (RMet40%).

LA RELACIÓ MET/SAM

No s'observen diferències significatives del valor de la relació Met/SAM en l'experiment de restricció de metionina (RMet40%). Per contra, s'observa un augment significatiu de la relació Met/SAM en el grup sotmès a suplementació en metionina en relació al seu grup control.

LA RELACIÓ SAM/SAH

La reducció de metionina del 40% o la suplementació de metionina del 2,5% no afecten als valors de la relació SAM/SAH en cap de les condicions estudiades.