



Universitat de Lleida

MECANISMES D'ACCIÓ DE DIFERENTS TIPUS
D'INTERVENCIIONS 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.

OBJECTIUS

La teoria de l'estrès oxidatiu és vàlida per explicar el procés d'envelliment. Aquesta teoria es basa en el fet que endògenament es produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS) les quals danyen a les macromolècules cel·lulars i produeixen els canvis associats a l'envelliment. Es ven conegut que la restricció calòrica (RC) sense malnutrició, augmenta la longevitat disminuint la taxa de producció endògena de ROS i, a més, produeix efectes beneficiosos en l'organisme. La restricció proteica, també augmenta la longevitat, produïnt un 50% de l'efecte de la RC. Sorprenentment, la restricció només de l'aminoàcid metionina, sense una restricció calòrica, també produeix els mateixos efectes en la longevitat que la restricció proteica. Amb tot això, la RP i la RMet presenten una importància rellevant. En aquest sentit, s'ha plantejat estudiar els seus efectes sobre l'estrès oxidatiu endògen (dany molecular específic i les seves dianes) com també els seus mecanismes de regulació, en particular, l'estrès de reticle i la biogènesi mitocondrial. Tanmateix, els efectes de la RMet es valoraran a través de 3 modalitats experimentals: restricció de metionina, restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina i suplementació de metionina. Els òrgans bàsics de l'estudi escollits han estat el fetge i el cervell. El primer, per la seva importància en el metabolisme de l'organisme i pel fet que els estudis previs de RC és l'òrgan on s'observen canvis en períodes de tractament curt (7 setmanes). El cervell s'ha escollit per diferents motius: 1) està format principalment de cèl·lules postmitòtiques, les quals són grans consumidores de glucosa i oxigen, i és de màxima importància per a l'homeòstasi de l'organisme, l'envelliment i la longevitat; 2) té un alt contingut en àcids grassos poliinsaturats, fàcilment peroxidables; 3) té un alt contingut en ferro (un element prooxidant), i 4) té relativament baixos nivells d'antioxidants. El model animal utilitzat ha estat rata Wistar mascle.

A partir de la hipòtesi global s'especifiquen els objectius específics a assolir:

- 1.** Determinar si la restricció proteica i la restricció de metionina al 80% indueixen canvis constitucionals en els aminoàcids de les proteïnes dels dos teixits estudiats, fetge i cervell, analitzant la **composició en aminoàcids** dels dos teixits.

- 2.** Determinar si la restricció proteica, la restricció de metionina, la restricció de tots els aminoàcids excepte metionina i la suplementació de metionina indueixen canvis en el **dany molecular endogen**, avaluant el dany oxidatiu en l'ADN mitocondrial i el dany a proteïnes directe i el derivat de glicoxidació i lipoxidació en tots els experiments d'intervencions nutricionals realitzats.
- 3.** Determinar si existeix variació en la **composició lipídica** induïda per la restricció proteica, la restricció de metionina, la restricció de tots els aminoàcids excepte metionina i la suplementació de metionina, analitzant la composició en àcids grassos de la membrana plasmàtica dels teixits estudiats en els experiments d'intervenció nutricional realitzats.
- 4.** Determinar si existeixen diferències en **l'expressió dels complexos de la cadena de transport** provocades per la restricció proteica, la restricció de metionina, la restricció de tots els aminoàcids excepte metionina i la suplementació de metionina, avaluant el contingut dels complexos mitocondrials i de la proteïna AIF en els teixits estudiats en els experiments d'intervenció nutricional realitzats.
- 5.** Determinar si la restricció en metionina indueix canvis en la **biogènesi mitocondrial i en la defensa antioxidant**, analitzant el contingut de les proteïnes SIRT1, PGC-1 α , NRF1, mTFA, Nrf2, SOD1 en cervell en els experiments de restricció i de suplementació de metionina.
- 6.** Determinar si la restricció en metionina indueix canvis en la **resposta endògena relacionada amb l'estrès de reticle** el qual acaba amb la degradació de les proteïnes danyades, analitzant el contingut de les proteïnes ATF6, XBP1, GRP78, GRP94, KDEL, PDI en el cervell en els experiments de restricció i de suplementació de metionina.
- 7.** Determinar si existeixen **diferències en quantitat de les proteïnes** de mitocondries de fetge induïdes per la restricció de metionina i identificar les que s'expressen diferencialment, analitzat mitjançant tècniques de proteòmica.

- 8.** Determinar si la restricció i suplementació de metionina indueixen **canvis en cicle metabòlic de la metionina**, analitzant el contingut dels seus metabòlits en cervell en els experiments de restricció i de suplementació de metionina.

DISSENY EXPERIMENTAL

8. ANIMALS

Durant el període experimental s'han realitzat 5 experiments d'intervenció nutricional diferents seqüencials en el temps: I) Restricció proteica del 40%; II) Restricció de metionina del 40 i 80%; III) Restricció de metionina del 80%; IV) Restricció de tots els aminoàcids del 40% excepte la metionina; V) Suplementació de metionina del 190%. Per a tots ells s'han utilitzat rates *Wistar* mascle de 250-300 g de pes i 6-7 setmanes d'edat, les quals s'han obtingut de *Iffa-Creddo* (Lyon, França). En tots els experiments les rates s'han encaixat individualment i s'han mantingut a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ amb una humitat relativa de $50\pm 10\%$ i en un cicle de llum:fosc de 12:12 h. En cada experiment, després d'una setmana d'aclimatació, s'han dividit els animals en el grup control i grup o grups d'intervenció dietètica. La composició de la dieta aplicada als grups control dels 5 experiments s'ha basat en la dieta semipurificada de l'Institut Americà de Nutrició (AIN-93G) (Reeves, Nielsen & Fahey 1993). En tots els experiments les dietes s'han obtingut de MP Biochemicals (Irvine, CA, EUA). La intervenció nutricional en tots els casos ha estat de 6-7 setmanes ja que en treballs previs de restricció calòrica es va demostrar que aquest termini d'intervenció nutricional era suficient per a veure canvis fisiològics com la reducció de producció de radicals lliures (Gredilla, Barja & Lopez-Torres 2001). Els animals s'han sacrificat per decapitació, els quals tenien 13-15 setmanes d'edat. Se'ls hi ha extret el fetge i cervell. Una part del fetge s'ha processat immediatament per aïllar les mitocòndries funcionals (apartat 11.1) i la resta s'ha congelat immediatament a -80°C per tots els anàlisis en teixit total.

9. INTERVENCIONS DIETÈTIQUES

I) En el primer experiment d'intervenció nutricional s'ha aplicat una restricció proteica on s'ha reduït un 40% la ingesta de proteïnes. Els animals del grup control s'han alimentat *ad libitum* de la dieta control i els animals del grup de restricció proteica han disposat del 92% de la quantitat ingerida pel grup control (Taula 4). El resultat final ha estat que els animals del grup de restricció proteica han ingerit un 40% menys de proteïnes diàriament en comparació als animals del grup control però s'ha mantingut invariable el contingut total de carbohidrats, greixos i la resta de components de la dieta en el grup d'intervenció respecte al grup control. Amb aquesta

intervenció, els animals del grup de restricció han ingerit un 8,5% menys de calories que els seus respectius del grup control.

Taula 4 Composicions de les dietes ingerides pels dos grups en l'experiment de restricció proteica del 40%.

Components de la dieta	Quantitat ingerida pel grup control (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup RP* (g/92g de dieta de RP)
Midó	39.7486	36.5687
Caseïna	20.00	12.00
Midó dextrinitzat	13.20	12.144
Sucrosa	10.00	14.234
Oli de soja	7.00	7.00
Cel·lulosa	5.00	5.00
Minerals (AIN)	3.50	3.50
Vitamines (AIN)	1.0	1.00
L-Cisteïna	0.30	0.30
Bitartrat de colina	0.25	0.25
Tert-Butilhidroquinona	0.0014	0.0014
Total	100g	92g

* La quantitat de la dieta ingerida per l'animal per dia es igual al 92% de la mitja del menjar ingerit per dia pels animals del grup control. El resultat final es que els animals del grup de restricció proteica ingereixen diàriament un 40% menys de proteïnes respecte al grup control, mentre que la quantitat total de carbohidrats, greix, i la resta de components de la dieta ha estat el mateix en el grup control i el grup de restricció de proteïnes.

II) En el segon experiment d'intervenció nutricional s'ha realitzat una reducció de la ingesta de l'aminoàcid metionina del 40 i del 80%. En aquest experiment la reducció de metionina s'ha compensat augmentant tots els altres components en proporció a la seva presència en la dieta (Taula 5). Els animals del grup control i del grup de restricció del 40% han rebut diàriament la mateixa quantitat de menjar que la mitja de la quantitat que han menjat els animals del grup de restricció de metionina la setmana anterior.

III) En el tercer experiment d'intervenció nutricional s'ha realitzat una reducció del 80% de la ingesta de l'aminoàcid metionina. En aquest experiment s'ha compensat la reducció de metionina augmentant l'àcid glutàmic i s'han mantingut invariables la resta de components de la dieta (Taula 6). Els animals del grup control han rebut diàriament

la mateixa quantitat de menjar que la mitja de la quantitat que han menjat els animals del grup de restricció de metionina el dia anterior. Aquesta intervenció s'ha basat en la composició de la dieta de restricció de metionina en la qual es va demostrar que una restricció de metionina del 80% augmentava la longevitat en rates (Richie et al. 1994).

Taula 5 Composicions de les dietes ingerides pels tres grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció de metionina del 80%.

Components de la dieta	Quantitat ingerida pel grup control (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup RMet 40% (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup RMet 80% (g/100g)
L-Arginina	1.120	1.124	1.128
L-Lisina	1.440	1.445	1.450
L-Histidina	0.330	0.331	0.332
L-Leucina	1.110	1.114	1.118
L-Isoleucina	0.820	0.823	0.826
L-Valina	0.820	0.823	0.826
L-Treonina	0.820	0.823	0.826
L-Triptòfan	0.180	0.181	0.181
L-Metionina	0.860	0.516	0.172
L-Àcid glutàmic	2.700	2.709	2.719
L-Fenilalanina	1.160	1.164	1.168
L-Glicina	2.330	2.338	2.346
Midó	43.610	43.762	43.911
Midó dextrinitzat	5.000	5.017	5.035
Sucrosa	20.000	20.069	20.139
Oli de soja	8.000	8.028	8.056
Cel·lulosa	5.000	5.017	5.035
Minerals (AIN)	3.500	3.512	3.524
Vitamines (AIN)	1.000	1.003	1.007
Bitartrat de colina	0.200	0.201	0.201
Total	100g	100g	100g

IV) En el quart experiment d'intervenció nutricional s'ha realitzat una reducció del 40% de la ingesta de tots els aminoàcids excepte la metionina que s'ha mantingut invariable en els dos grups. En aquest cas tant la dieta control com la dieta del grup experimental contenen una mescla d'aminoàcids en lloc de proteïnes (Taula 7). La reducció dels aminoàcids en el grup de restricció s'ha compensat augmentant la

quantitat de midó i s'ha mantingut invariable la resta dels components de la dieta. En un treball previ es va demostrar que una reducció del 40% en carbohidrats no modificava els nivells de producció de H₂O₂ mitocondrials com tampoc els nivells de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) en ADN mitocondrial en rates Wistar (Sanz et al. 2006b). Els animals del grup control han rebut diàriament la mateixa quantitat de menjar que la mitja de la quantitat que han menjat els animals del grup de restricció d'aminoàcids la setmana anterior.

Taula 6 Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció de metionina del 80%.

Components de la dieta	Quantitat ingerida pel grup control (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup RMet 80% (g/100g)
L-Arginina	1.12	1.12
L-Lisina	1.44	1.44
L-Histidina	0.33	0.33
L-Leucina	1.11	1.11
L-Isoleucina	0.82	0.82
L-Valina	0.82	0.82
L-Treonina	0.82	0.82
L-Triptòfan	0.18	0.18
L-Metionina	0.86	0.17
L-Àcid glutàmic	2.70	3.39
L-Fenilalanina	1.16	1.16
L-Glicina	2.33	2.33
Midó	31.80	31.80
Midó dextrinitzat	5.00	5.00
Sucrosa	31.80	31.80
Oli de soja	8.00	8.00
Cel lulosa	5.00	5.00
Minerals (AIN)	3.50	3.50
Vitamines (AIN)	1.00	1.00
Bitartrat de colina	0.25	0.25
Total	100g	100g

Taula 7 Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció del 40% de tots els aminoàcids excepte la metionina.

Components de la dieta	Quantitat ingerida pel grup control (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup RAAs 40%(-Met) (g/100g)
L-Arginina		
L-Arginina	1.12	0.672
L-Lisina	1.44	0.864
L-Histidina	0.33	0.198
L-Leucina	1.11	0.666
L-Isoleucina	0.82	0.492
L-Valina	0.82	0.492
L-Treonina	0.82	0.492
L-Triptòfan	0.18	0.108
L-Metionina	0.86	0.86
L-Àcid glutàmic	2.70	1.620
L-Fenilalanina	1.16	0.696
L-Glicina	2.33	1.398
L-Cisteïna	0.340	0.204
L-Prolina	0.340	0.204
L-Tirosina	0.340	0.204
L-Àcid aspàrtic	0.340	0.204
L-Alanina	0.340	0.204
L-Serina	0.340	0.204
L-Asparagina	0.600	0.360
Midó	40.97	47.158
Midó dextrinitzat	5.00	5.00
Sucrosa	20.00	20.00
Oli de soja	8.00	8.00
Cel·lulosa	5.00	5.00
Minerals (AIN)	3.50	3.50
Vitamines (AIN)	1.00	1.00
Bitartrat de colina	0.20	0.20
Total	100g	100g

V) En el cinquè experiment d'intervenció nutricional s'ha realitzat una suplementació de la ingesta de metionina. La composició de la dieta del grup suplementat ha estat similar a la del grup control excepte en el contingut de metionina, on passem del 0,86% en el grup control a 2,5% en el grup de suplementació. Aquest augment representa un increment 2,9 vegades més de

metionina en un grup respecte l'altre, o un augment del 190%. Aquest augment de metionina en la dieta del grup de suplementació s'ha compensat disminuint tots els altres components en proporció a la seva presència en la dieta (Taula 8). Els animals del grup control han rebut diàriament la mateixa quantitat de menjar que la mitja de la quantitat que han menjat els animals del grup de suplementació de metionina la setmana anterior.

Taula 8 Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de suplementació de metionina x 2,9.

Components de la dieta	Quantitat ingerida pel grup control (g/100g)	Quantitat ingerida pel grup de SMet x2,9 (g/100g)
L-Arginina	1.12	1.10
L-Lisina	1.44	1.42
L-Histidina	0.33	0.33
L-Leucina	1.11	1.09
L-Isoleucina	1.82	0.81
L-Valina	1.82	0.81
L-Treonina	1.82	0.81
L-Triptòfan	1.18	0.18
L-Metionina	0.86	2.50
L-Àcid glutàmic	2.70	2.66
L-Fenilalanina	1.16	1.14
L-Glicina	2.33	2.29
Midó	43.61	42.90
Midó dextrinitzat	5.00	4.92
Sucrosa	20.00	19.67
Oli de soja	8.00	7.87
Cel lulosa	5.00	5.00
Minerals (AIN)	3.50	3.44
Vitamines (AIN)	1.00	0.98
Bitartrat de colina	0.20	0.20
Total	100g	100g

MATERIALS I MÈTODES

10. REACTIUS

En la Taula 9 es llisten els reactius utilitzats durant la realització de tots els experiments presentats en aquesta tesi. Cal fer notar que els materials i aparells utilitzats s'han introduït dins el text de l'explicació en l'apartat corresponent.

Taula 9 Reactius utilitzats en tots els experiments realitzats.

Reactius	Número de catàleg	Casa comercial
2-β-mercaptoetanol	M7154	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (2.6 % C)	161-0158	Bio-Rad (Munich, Alemanya)
8-oxodG	H5663	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Acetat de potassi	236497	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Acetat de sodi	57545	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Acetonitril	110008.6	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid 1-Heptasulfònic	221554	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid 5-metilglutàmic	G137	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid bòric	B0127	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid clorhídric	100-317-000	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Àcid fòrmic	33015	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid fosfòric	466123	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid glioxílic	G1134	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid tricloroacètic	T9159	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Àcid trifluoroacètic	T8258	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Agarosa	A5030	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Albúmina sèrica bovina	A2153	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Amfòlits	17-6004-40	Amersham Biosciences (Madrid, Espanya)
ARN polimerasa	10109126001	Roche (Madrid, Espanya)
Blau de bromofenol	B8026	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Borhidrur sòdic	45,288-2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Butilhidroxitoluè	822021	Merck (Darmstadt, Alemanya)
CHAPS	C5070	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Cianoborhidrur sòdic	S8628	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

Cloroform	25685	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Cloroform:clorur d'isoamil	C0549	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Clorur d'acetil	00990	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Clorur d'acetil anhidre	00990	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Clorur de potassi	141494	Panreac (Barcelona, Espanya)
Clorur de sodi	121659	Panreac (Barcelona, Espanya)
Clorur de zinc	450111	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
d₄-4,4,5,5-D,L-lisina	489034	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
d₅-2,3,3,4,4-L-glutàmic	631973	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Desoxiguanosina (dG)	D7145	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Diclorometà	650463	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Dihidrogenfosfat de sodi	30412	Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanya)
Disulfur de carboni	27,066-0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
D-metionina-d₃ (metil-D₃)	589810	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
DTPAC	D6518	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
DTT	D0632	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
EDTA	E4884	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Etanol	414608	Carlo Erba (Milà, Itàlia)
Fluorur de sodi	S7920	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Forimil-lisina	F9376	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Fosfatasa alcalina d'intestí de vedella	P5521	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Glicerol	49770	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Hepes	H3375	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Hexanol	52830	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Hidrogenfosfat de sodi	S9638	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Hidròxid de sodi	480878	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
I-Block	AI300	Applied Biosystem (Madrid, Espanya)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	WBKLS0500	Millipore (Millford, MA, EUA)
Iodoacetamida	RPN6302V	Amersham Biosciences (Madrid, Espanya)
Isopropanol	19076-4	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

Lisina	18-1860	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
L-lisina-3,3,4,4,5,5,6,6-d8	D5555	CDN Isotopes (Quebec, Canadà)
HCl		
L-metionina	64319	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
MagicMark XP Western	LC5602	Invitrogen (Barcelona, Espanya)
Protein Standard		
Manitol	M4125	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Metanol	412722	Carlo Erba (Milà, Itàlia)
MOPS	M5162	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Ne-acetil-lisina	A9885	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Nitrogen gas	Alphagaz	Air Liquid (Barcelona, Espanya)
Nitroprusiat sòdic	71778	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
n-pentà	158941	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Nucleasa P1 de <i>Penicillium</i>	195352	MP Biomedicals (Illkirch, França)
<i>citrinum</i>		
Oli mineral	163-2129	Bio-Rad (Munich, Alemanya)
Ortovanadat de sodi	S6508	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
persulfat amònic	A3678	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Sacarosa	S9378	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
S-adenosil-homocisteïna	A9384	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
S-adenosil-metionina	A2408	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
S-carboximetil-L-cisteïna	C7757	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
(CMC)		
SDS	L5750	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
TRIS	77-86-1	USB Corporation (Madrid, Espanya)
Tween 20	17-1310-01	Amersham Biosciences (Madrid, Espanya)
Urea	U6504	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

11. PROCESSAMENT PRÈVI DE LA MOSTRA

11.1. Aïllament de mitocondries de fetge

S'ha utilitzat la meitat de l'òrgan extret de cada animal per aïllar les seves mitocondries. L'òrgan s'ha dipositat en la solució d'aïllament (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Hepes 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.35) on s'ha netejat bé per intentar treure la grassa que conté al voltant i s'ha trinxat en trossets petits (Lopez-Torres et al. 2002). Tot seguit s'ha homogeneïtzat el teixit net en 60 mL de solució d'aïllament i s'ha repartit en dos tubs per a ser centrifugat a 1200 rpm durant 10 min i així, eliminar els nuclis i les restes cel·lulars conjuntament amb el sediment. A continuació s'han transvasat els sobrenedants a uns altres tubs i s'han centrifugat de nou a 12000 rpm durant 10 min. S'ha descartat el sobrenedant com també la grassa enganxada a les parets dels tubs i el sediment s'ha redissolt en 40 mL de la solució d'aïllament però sense EDTA. S'ha realitzat una altra centrifugació a 1200 rpm durant 10 min, el sobrenedant s'ha passat a un altre tub i s'ha tornat a centrifugar a 12000 rpm durant 10 min. Finalment, obtenim en el sediment les mitocondries aïllades, les quals s'han redissolt en 1 mL de solució d'aïllament sense EDTA. Tots els procediments descrits s'han realitzat en fred (4 °C).

11.2. Homogeneïtzació dels teixits

S'ha utilitzat entre 50-200 mg de teixit (fetge o cervell congelat) per a la homogeneïtzació en una solució tampó i mantenint la mostra sempre en gel. La solució conté 180 mM de clorur de potassi, 5 mM de MOPS, 2 mM de EDTA, 1 mM DTPAC. En la tècnica de la immunotransferència s'ha afegit una mescla d'inhibidors de proteases comercial (#80-6501-23 Amersham Biosciences, Madrid, Espanya) i inhibidors de fosfatases (ortovanadat de sodi 1 mM, fluorur de sodi 1mM). Posteriorment, la mostra s'ha centrifugat a 1000 rpm durant 3 min a 4 °C per tal d'eliminar les partícules cel·lulars. Els sobrenedants són els que s'han utilitzat per als experiments, posteriorment a la quantificació i igualació de proteïnes (veure apartat següent). Aquesta homogeneïtzació s'ha realitzat per les mostres de teixit de fetge i cervell analitzades per immunotransferència, com també per a la homogeneïtzació del cervell en l'experiment de RMet80% en l'anàlisi composicional d'aminoàcids, de lípids i el dany oxidatiu proteic.

11.3. Quantificació de proteïnes

Per tal de determinar la quantitat de proteïna tan de les mitocòndries aïllades com dels teixits homogeneïtzats s'ha utilitzat el mètode Bradford (Bradford 1976) ja que és compatible amb els dos tipus de tampons, utilitzant però una dilució prèvia adequada, utilitzant com a diluent aigua milliQ. En les mostres de mitocòndria s'ha realitzat una dilució prèvia de 1:30, mentre que en els homogeneïtzats de teixit ha estat suficient una dilució de 1:10. En ambdós casos s'ha utilitzat una alíquota de 10 µL de la dilució prèvia, 800 µL d'aigua milliQ i 200 µL del reactiu de Bradford (Protein Assay #500-0006 Bio-Rad, Munich, Alemanya) per a mesurar l'absorbància (UV-160A Shimadzu), i realitzar el càlcul de la concentració de proteïna mitjançant una recta patró de la proteïna albúmina sèrica bovina, BSA (bovine serum albumine). La linealitat de la recta ha estat de 0-20 µg de proteïna BSA.

12. ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS AMINOÀCIDS

12.1. Preparació de la mostra

Per analitzar la composició en aminoàcids de les mostres s'ha utilitzat una mescla d'estàndards d'alta puresa comercial comprada a Pierce (Rockford, IL). La mescla conté 2,5 µmols/mL de 17 aminoàcids en 0,1 N HCl, exceptuant la cisteïna, de la qual s'ha afegit 1.25 mols/mL. L'agent derivatiu comercial que s'ha utilitzat és el carbat de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxi-succinimidil diluït en 10mM d'acetonitril (AQC) comprat dins d'un lot comercial (Millipore, Millford, MA, EUA) conjuntament amb el tampó de borat. S'ha extret la fracció lipídica amb cloroform:metanol (2:1, v/v) (Folch, Lees & Sloane Stanley 1957) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total. S'ha realitzat dos extraccions quan el teixit a analitzar ha estat el fetge i tres quan s'ha tractat del sistema nerviós. S'ha eliminat la fracció lipídica i s'ha precipitat tota la proteïna afegint àcid tricloroacètic al 10% (a concentració final) i centrifugant a 4000 rpm durant 15 min a 4 °C. La proteïna precipitada s'ha hidrolitzat afegint 1 mL d'àcid clorhídric 6 N i esclafant 30 min a 155 °C en un bany sec (Tembloc, Selecta, Barcelona, Espanya) i seguidament s'han evaporat al buit (SPD121P Speed Vac Savant, Madrid, Espanya). Els hidrolitzats de proteïna obtinguts s'han redissolt en 100µL d'àcid clorhídric 4 mM i només 10 µL de l'extracte de la mostra o de la mescla dels aminoàcids estàndards (amb l'estàndard intern inclòs) s'han tamponat amb 70 µL de solució tampó

de borat. Els derivats s'han format afegint 20 µL de AQC i escalfant durant 10 min a 55 °C en un bany sec (Tembloc, Selecta, Barcelona, Espanya).

12.2. Sistema cromatogràfic

Els sistema d'HPLC utilitzat ha estat una bomba de model 510 de Waters, una columna AccQ-Tag C18 específica per analitzar aminoàcids (3,9mm x 150mm), un termòstat de columna i un detector de fluorescència de model 470 en el qual s'han seleccionant les longituds d'ona d'excitació i emissió de 250/395 nm, respectivament (Waters, New Castle, DE).

12.3. Condicions cromatogràfiques

La fase mòbil A està formada per acetat sòdic al 10% (p/v) i la fase mòbil B per un 60% d'acetonitril. La columna s'ha mantingut a 37 °C i ha operat a un flux constant d'1 mL/min. El sistema cromatogràfic s'ha equilibrat amb la fase A i el gradient utilitzat ha consistit en una elució del 93% de fase A en 15 min, seguidament una elució fins arribar al 67% de fase A en 18 min, després passar en 2 min al 100% de fase B mantenint-ho 3 min més i equilibrar-ho en 100% de fase A durant 27 min.

12.4. Quantificació dels analits

El programa que s'ha utilitzat per controlar el sistema d'operació i per recollir i analitzar les dades ha estat *Millennium* (Waters, New Castle, DE). S'ha realitzat la quantificació a partir de les corbes dels estàndards de cada aminoàcid i els resultats s'han recalculat i s'han expressat com a mols en %.

12.5. Índex calculats

A partir de la composició en aminoàcids s'han calculat els següents índexs basats en (Brendel et al. 1992).

- Càrrega positiva: **KR** (Lys+Arg)
- Càrrega negativa: **ED** (Glu+Asp)
- Càrrega total: **KRED**

- Càrrega neta: **KR-ED**
- Grups hidrofòbics majors: **LVIFM** (Leu+Val+Ile+Phe+Met)
- Grups codificats pels codons AAN, AUN, UAN, UUN: **FIKMNY** (Phe+Ile+Lys+Met+Asn+Tyr)

13. QUANTIFICACIÓ DEL DANY OXIDATIU A L'ADN MITOCONDRIAL

El dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial s'ha realitzat mitjançant la valoració dels nivells del deoxinucleòsid oxidat 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) en relació a la seva base no modificada, la deoxiguanosina (dG) (Figura 14). Aquesta determinació s'ha realitzat mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, de l'anglès *high performance liquid chromatography*) amb detecció electroquímica, en el cas de la 8-oxo-dG, i detecció ultravioleta en el cas de la dG. Per a l'aïllament i precipitació de l'ADN mitocondrial s'ha seguit el mètode de (Latorre, Moya & Ayala 1986) adaptat a mamífers (Herrero, Barja 2000, de la Asuncion et al. 1996).

13.1. Preparació de la mostra

13.1.1. Aïllament de l'ADN mitocondrial

Per a realitzar l'aïllament de l'ADN de les mitocòndries s'han utilitzat entre 400 i 500 mg de teixit, el qual s'ha mantingut congelat a -80 °C fins a realitzar l'anàlisi. La mostra s'ha homogeneïtzat a 4 °C a raó de 1,5 mL de tampó TRIS 10 mM amb clorur de sodi 60 mM, sacarosa al 5% i EDTA 10mM per gram de teixit. 300 µL d'aquest homogenat s'han barrejat amb 300 µL de solució tampó TRIS 10mM amb SDS al 1.25%, sacarosa al 5% i EDTA 10mM i 400 µL de cloroform:alcohol d'isoamil (49:1) per a separar els lípids. La mescla obtinguda s'ha centrifugat a 600 rpm durant 10 min a 4 °C. S'ha recollit la fase superior i s'ha incubat a 65 °C durant 30 min, d'aquesta manera s'han trencat les membranes i s'ha alliberat el contingut cel·lular, a la vegada que les proteïnes han quedat desnaturalitzades amb el SDS. Seguidament s'han afegit 0,12 mL d'acetat potàssic 3 M, pH 4.8 a les mostres i s'han incubat 10 min a -20 °C. El descens de pH conjuntament amb l'alta concentració de sals provoca la precipitació de l'ADN d'alt pes molecular, principalment l'ADN nuclear. A més a més el potassi forma

complexes amb el SDS-proteïna, els quals faciliten la seva precipitació. Les mostres s'han centrifugat durant 10 min a 11000 rpm i s'ha recollit el sobrenedant quedant en el sediment les restes cel·lulars, complexes SDS-proteïna i l'ADN nuclear.

13.1.2. Precipitació de l'ADN mitocondrial

S'utilitzen 700 µL de mostra en un tub i s'afegeix el mateix volum d'isopropanol; en aquesta fase ja es pot apreciar l'ADN mitocondrial. A continuació s'han incubat les mostres durant 5 min a temperatura ambient i s'han centrifugat a 11000 rpm durant 10 min. S'elimina el sobrenedant i s'afegeix 0,5 mL d'etanol fred al 70% (v/v) per tal de netejar l'ADN mitocondrial parcialment purificat que queda en el sediment. Les mostres s'han tornat a centrifugar a 11000 rpm durant 10 min. Tot seguit s'ha decantat l'etanol i s'asseca el sediment amb nitrogen gas. Posteriorment s'afegeixen 300 µL de solució tampó TE (TRIS-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8), es redissolen les mostres i s'afegeix 25 µL de proteïna que degrada l'ARN (ARN polimerasa). Després de 6 min d'incubació a temperatura ambient, s'afegeixen 0,3 mL de SDS a 0,1%, pH 12.5. S'incuben a 65 °C 6 min més i s'afegeixen 230 µL d'acetat de sodi 3 M a pH 4 i es torna a incubar a -20 °C durant 20 min. Una vegada les mostres estan descongelades, s'han centrifugat a 11000 rpm durant 5 min, s'ha recollit el sobrenedant i s'ha afegit el mateix volum d'isopropanol i s'han incubat 5 min a temperatura ambient. Seguidament s'ha centrifugat a 11000 rpm durant 10 min, s'ha decantat el sobrenedant i s'ha afegit 0,5 mL d'etanol fred al 70% (v/v), tornant a centrifugar durant 5 min. S'ha decantat l'etanol i les mostres s'han assecat amb nitrogen gas, per redissoldre-les amb 50 µL de solució tampó TE, pH 8. (Cal evitar un assecat excessiu de l'ADN ja que, en aquest cas, podria produir-se una oxidació artificial de la dG i per tant, sobrevalorar la quantitat de 8-oxo-dG de la mostra). Una vegada dissolt l'ADN en la solució tampó TE, pH 8, s'afegeix 40 µL d'acetat de sodi 3 M, pH 4.8 i 800 µL d'etanol fred al 70% (v/v). Es centrifuguen a 11000 rpm durant 10 min i després de decantar el sobrenedant, s'afegeix 1 mL d'etanol fred al 70% (v/v) i es repeteix la centrifugació de nou. S'elimina l'etanol i s'assequen amb nitrogen gas. L'ADN es redissol amb 100 µL d'acetat sòdic 20 mM, pH 4.8, i per últim, s'incuben les mostres a 37 °C durant 1 hora. La concentració i puresa de l'ADN mitocondrial es determina mitjançant el mètode Hoechst i un gel d'agarosa, respectivament (Naudí et al. 2007a).

13.1.3. Digestió de l'ADN mitocondrial

Després de l'hora d'incubació a 37 °C, s'afegeix a les mostres 20 µL de nucleasa P1 (5 U/mostra) dissolta en acetat de sodi 20mM, pH 4.8, el qual conté clorur de zinc 10 mM i 15% de glicerol, i s'incuba a 37°C durant 30min. A continuació s'afegeixen 20 µL de fosfatasa alcalina (1 U/mostra) diluïda (1:3) en solució tampó TRIS 1M, pH 8 i es repeteix la incubació durant 1 hora. Per últim es filtren les mostres amb tubs *Whatman* de 0,22 µm de diàmetre de porus (#UFC3LTK00 Millipore, Millford, MA, EUA) i es centrifuguen a 13000 rpm durant 20 min. De la solució filtrada, s'utilitzen 100 µL per a injectar-los al cromatògraf HPLC per al seu anàlisi.

13.2. Sistema cromatogràfic

Les mostres s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa mitjançant una columna analítica de 5 µm x 4,6 mm x 25 cm (Ultraesphere ODS Beckman) en un sistema d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya). L'aparell utilitzat està compost per una bomba binària G1312A de la sèrie 1200, un desgasificador G1379A de la sèrie 1100, un injector de mostres automàtic G1313A de la sèrie 1100, un termostatitzador per la columna G1316A de la sèrie 1200 i un detector de llum ultravioleta (UV) VWO G1314B de la sèrie 1200 i s'ha utilitzat un detector electroquímic (Coulochem III Esa, Chelmsford, MA).

13.3. Condicions cromatogràfiques

La composició de la fase mòbil utilitzada ha estat àcid fosfòric 50 mM, acetonitril al 3% a pH 5, la qual s'ha filtrat mitjançant filtres de diàmetre de porus de 0.45 µm (#HVLP04700 Millipore, Millford, MA, EUA). El flux de pas de la fase mòbil ha estat de 1 mL/min a una pressió de 1000 PSI. Les condicions del detector electroquímic han estat 400 V/20 nA, i la quantificació de la dG mitjançant el detector ultravioleta s'ha realitzat a 254 nm amb una sensibilitat de 0,64.

13.4. Quantificació dels analits

Per a quantificar els valors obtinguts i poder determinar les concentracions d'ambdós analits, s'han injectat cada dia estàndards de dG i 8-oxo-dG de concentracions conegudes. En el cas de la dG s'ha utilitzat una solució estàndard de dG pura de 100 μM en acetat sòdic 10 mM, pH 8 i Tris 1M, pH 8 (11:1). Per a la 8-oxo-dG, la solució estàndard utilitzada ha estat de 20 nM en el mateix disolvent.

A partir de les àrees obtingudes dels pics dels estàndards s'ha calculat un factor de calibració (F.C.) per a 8-oxo-dG i per dG.

$$- \text{F.C. (8-oxodG)} = \frac{10}{A_{10}}$$

on A_{10} : Àrea del estàndard 10 nM de 8-oxodG.

$$- \text{F.C. (dG)} = \frac{100}{A_{dG100}}$$

on: $A_{dG 100}$: Àrea del estàndard de dG 100 μM .

La concentració de 8-oxo-dG s'ha obtingut mitjançant la següent expressió:

$$- [8\text{-oxodG}] = \text{àrea}_{8\text{oxodG}} \times \text{F.C. (8oxodG)}$$

on: $\text{Àrea}_{8\text{oxodG}}$: Àrea de 8-oxodG de la mostra.

La concentració de dG s'ha obtingut mitjançant la següent expressió:

$$- [dG] = \text{Àrea}_{dG} \times \text{F.C. (dG)}$$

on: Àrea_{dG} : Àrea de dG de la mostra.

Finalment, s'ha obtingut la relació 8-oxodG / $10^5 dG$ com a indicador del dany oxidatiu a l'ADN:

$$- \frac{8\text{oxodG}}{10^5 dG} = \frac{100 \times 8\text{oxodG}}{dG}$$

14. QUANTIFICACIÓ DEL DANY OXIDATIU PROTEIC

14.1. Preparació de la mostra

S'ha extret la fracció lipídica amb cloroform:metanol (2:1, v/v) (Folch, Lees & Sloane Stanley 1957) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total. S'ha realitzat dos extraccions quan el teixit a analitzar ha estat el fetge i tres quan s'ha tractat del sistema nerviós. S'ha reservat la fracció lipídica (veure apartat 12.1) i s'ha precipitat tota la proteïna afegint àcid tricloroacètic al 10% (a concentració final) i centrifugant a 4000 rpm durant 15 min a 4 °C. Seguidament s'han reduït les mostres incubant-les tota la nit amb una solució reductora [1 mL de borhidrur sòdic 500 mM dissolt en un tampó d'àcid bòric 0,2 M a pH 9.2]. A aquesta solució se li ha afegit una gota d'hexanol com a agent antiescumant. Les proteïnes s'han reduït amb borhidrur sòdic per a estabilitzar els adductes en la posterior hidròlisi àcida). Al dia següent les proteïnes s'han reprecipitat afegint 1 mL d'àcid tricloroacètic al 10% (concentració final) i s'ha centrifugat de nou. Aquest pas s'ha repetit dues vegades. A les mostres reduïdes se les hi afegeix els estàndards interns deuterats marcats isotòpicament [²H₈]lisina (120 nmols), [²H₄]CML (474 pmols), [²H₄]CEL (432 pmols), [²H₈]MDA-Lisina (216 pmols), [²H₅]AHAV (648 pmols) i [²H₄]HACA (140 pmols) i s'han sotmès a hidròlisi afegint 1 mL d'àcid clorhídric 6 N i incubant a 155 °C durant 30 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). Els hidrolitzats que s'han obtingut s'evaporen al buit (SPD121P Speed Vac Savant, Barcelona, Espanya). Els derivats N,O-trifluoroacetil dels èsters metílics de l'hidrolitzat de proteïnes s'obtenen de la següent manera: 1) incubació dels èsters metílics de l'hidrolitzat amb 1 mL de metanol-àcid clorhídric al 5% durant 30 min a 65 °C seguit d'evaporació sota flux de nitrogen (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) per a obtenir els èsters metílics. (La solució de metanol-àcid clorhídric s'ha preparat mitjançant l'addició de clorur d'acetil sobre el metanol, amb l'objectiu de produir àcid clorhídric anhidre, s'ha de treballar amb molta cura ja que és una reacció molt exotèrmica); 2) incubació dels èsters metílics de l'hidrolitzat amb 1 mL d'àcid trifluoroacètic anhidre durant 1 h i seguit també d'evaporació sota flux de nitrogen (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Per últim, les mostres es redissolen amb 80 µL de diclorometà com a vehicle per al seu posterior anàlisi mitjançant cromatografia de gasos acoblat a espectrometria de masses.

14.2. Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS, de l'anglès, *gas chromatography-mass spectrometry*). El cromatògraf de gasos utilitzat ha estat el model 6890 de Hewlett-Packard (Barcelona, Espanya) equipat amb una columna capil·lar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) i acoblat a un espectròmetre de masses model 5973A en el mode d'impacte iònic, també de Hewlett-Packard (Barcelona, Espanya).

14.3. Condicions cromatogràfiques

El port d'injecció s'ha mantingut a 275 °C i el programa de temperatura ha consistit en el següent: 5 min a 110 °C, després augmenta 2 °C/min fins a 150 °C, 5 °C/min fins a 240 °C, 25 °C/min fins a 300 °C i un manteniment final a 300 °C durant 5 min. S'injecten 2 µL de mostra en cada cursa cromatogràfica.

14.4. Quantificació dels analits

La quantificació s'ha realitzat mitjançant una estandardització externa usant corbes patró construïdes a partir de la mescla d'estàndards interns deuterats i no deuterats: [²H₈]lisina; CML; [²H₄]CML; CEL; [²H₄]CEL; AHAV; [²H₅]AHAV; AHAC; [²H₄]AHAC; MDAL i [²H₈]MDA-Lisina. Aquests estàndards interns utilitzats havien estat prèviament sintetitzats en el nostre grup (veure apartat següent). Els anàlisis s'han realitzat mitjançant la monitorització de ions específics seleccionats prèviament (SIM, de l'anglès, *selected ion monitoring*). Els analits es detecten per SIM-GC/MS. Els ions que s'han utilitzat i la seva descripció química es presenten en la Taula 10. Les concentracions finals s'han expressat com µmols de CML, CEL, MDAL, SAG o SAAA/mols de lisina.

Taula 10 Relació dels ions de m/z d'analits mesurats mitjançant GC/MS.

Estàndard	Nomenclatura química del compost	Ió (m/z)
lisina	Lisina	180
[² H ₈]lisina	d ₈ -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	187
CML	N ^ε -carboximetil-D,L-lisina	392
[² H ₄]CML	N ^ε -carboximetil-d ₄ -4,4,5,5-D,L-lisina	396
CEL	N ^ε -carboxietil-D,L-lisina	379
[² H ₄]CEL	N ^ε -carboxietil-d ₄ -4,4,5,5-D,L-lisina	383
AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric	280
[² H ₅]AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-amino-d ₅ -2,3,3,4,4-valèric	285
AHAC*	Àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic	294
[² H ₄]AHAC*	Àcid 6-hidroxi-2-amino-d ₄ -4,4,5,5-caproic	298
MDAL	Malondialdehid-lisina	474
[² H ₈]MDA-Lisina	Malondialdehid-lisina-d ₈ -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	482

*els productes de l'oxidació són les molècules semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA), però els analits que es detecten en el cromatògraf són els seus derivats després de la reducció. AHAV i AHAC, respectivament.

14.5. Síntesi d'estàndards interns

Per la síntesi dels diferents estàndards interns (deuterats i no deuterats) s'han utilitzat procediments descrits prèviament. Breument es descriuen els procediments realitzats:

La CML i la [²H₄]CML s'han sintetitzat a partir de la reacció de l'àcid glixílic amb N^ε-acetil-lisina i N^ε-acetil[²H₄]lisina respectivament, en presència de cianoborohidruir sòdic. La CML s'ha aïllat mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic i la seva estructura i homogeneïtat s'han confirmat mitjançant GC/MS i per anàlisi d'aminoàcids (Knecht et al. 1991).

La CEL i la [²H₄]CEL s'han sintetitzat mitjançant la reacció de piruvat amb formil-lisina i [²H₄]lisina respectivament, en presència de cianoborohidruir sòdic (relació molar 1:1:3) en solució tampó fosfat 0,2 M pH 7.4 a 37 °C durant 3 dies (Ahmed et al. 1997).

Per la síntesi de malondialdehid-lisina (MDAL) i [²H₈]MDAL ha estat necessari obtenir prèviament malondialdehid (MDA). Aquest s'ha produït immediatament abans

del seu ús mitjançant la hidròlisi de la seva forma dimetilacetal afegint àcid clorhídric 1M durant 30 min a 37 °C. A continuació s'ha quantificat mesurant la seva absorbància a 245 nm, utilitzant el seu coeficient d'extinció molar ($137.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Per a obtenir MDAL o $[\text{}^2\text{H}_8]\text{MDAL}$ s'ha incubat lisina o $[\text{}^2\text{H}_8]\text{lisina}$ amb una quantitat equimolar de MDA en presència de cianoborohidrur sòdic en excès (500 mg per mmol de lisina, que equival a 8 vegades la quantitat de lisina i MDA, els quals són equimolars) en solució tampó fosfat 0,2 M i pH 7.4 a 37 °C durant tota la nit (Requena et al. 1997).

Els productes de la reducció dels carbonils proteics específics semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA), l'àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric (AHAV) i l'àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic (AHAC) es van obtenir mitjançant el mètode descrit per (Requena et al. 2001). L'àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric (AHAV), producte de la reducció del SAG, es va sintetitzar segons el mètode de (Swallow, Abraham 1959), amb l'excepció d'utilitzar l'èster de l'àcid 5-metilglutàmic en lloc de l'èster etílic, com a material de partida. El producte es va purificar amb una columna d'intercanvi iònic Dowex-50W en forma àcida seguit d'una precipitació amb metanol. Per a la obtenció de $[\text{}^2\text{H}_5]\text{AHAV}$ es va partir de l'àcid $\text{d}_5\text{-2,3,3,4,4-L-glutàmic}$ el qual va ser convertit al corresponent èster metílic i es va tractar tal i com s'ha descrit per a la preparació del AHAV, amb una reacció a escala reduïda. L'àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic (AHAC), producte de la reducció del SAAA, es va preparar d'acord a (Gaudry 1948) i es va precipitar amb metanol. Aquest mètode no es va poder adaptar per a la síntesi de $[\text{}^2\text{H}_4]\text{AHAC}$, per tant es va adaptar al procediment descrit per (Baldwin et al. 1988). Es va utilitzar $\text{d}_4\text{-4,4,5,5-D,L-lisina}$ per a convertir-la en N- α -formil- d_4 -lisina. El producte es va evaporar i es va obtenir un oli, el qual es va dissoldre en 20 mL d'aigua milliQ. Després d'ajustar el pH a 9.5 amb hidròxid de sodi s'afegeixen 320 mg de nítroprusiat sòdic durant 20 min, mantenint-ho a 60 °C i ajustant el pH quan ha estat necessari. La solució marronosa resultant s'ha escalfat a 60 °C durant 4 h més, ajustant novament el pH. El producte de la reacció s'ha filtrat i hidrolitzat amb àcid clorhídric 6 M durant 1 h a 100 °C. Després de l'evaporació, el producte s'ha dissolt en àcid fòrmic, pH 2, i s'ha filtrat mitjançant una columna d'intercanvi iònic Dowex-50W. El producte final s'ha precipitat amb un volum petit de metanol calent. Les preparacions de AHAV; $[\text{}^2\text{H}_5]\text{AHAV}$; AHAC; $[\text{}^2\text{H}_4]\text{AHAC}$ s'han dissolt en aigua milliQ i s'han calibrat amb una mescla d'aminoàcids. Les mostres i els estàndards s'han analitzat mitjançant HPLC en un sistema Hewlett-Packard (Barcelona, Espanya) Serie 1100 després de la seva derivació automàtica amb orto-phthalaldehid. L'àrea mitjana de Ser, His, Gly, Arg, Ala,

Tyr, Met i Val s'ha utilitzat per a calcular la concentració de AHAV; [²H₅]AHAV; AHAC; [²H₄]AHAC en cada preparació. Els anàlisis s'han realitzat per triplicat per a cada solució i s'han congelat alíquotes a -80 °C per a la seva posterior utilització (Requena et al. 2001).

15. ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS ÀCIDS GRASSOS

15.1. Preparació de la mostra

El primer pas ha consistit en extreure els lípids dels extractes de mitocondria. S'han utilitzat extractes igualats a la concentració de 500 µg de proteïna i s'ha afegit una mescla de cloroform/metanol (2:1, v/v) (Folch, Lees & Sloane Stanley 1957) en presència de butilhidroxitoluè al 0,01 % per evitar l'oxidació artefactual dels lípids durant el processament de la mostra. S'ha realitzat dos extraccions quan l'extracte a analitzar ha estat mitocondria de fetge i tres quan s'ha tractat del sistema nerviós. La fase de cloroform s'ha separat i s'ha evaporat sota flux de nitrogen en un evaporador (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Els grups acil dels àcids grassos s'han transesterificat incubant-los en 2,5 mL de metanol-àcid clorhídric al 5% (v/v) a 75 °C durant 90 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). La solució de metanol-àcid clorhídric s'ha preparat mitjançant l'addició de clorur d'acetil sobre el metanol, amb l'objectiu de produir àcid clorhídric anhidre (s'ha de treballar amb molta cura ja que és una reacció molt exotèrmica). Els èsters metílics dels àcids grassos resultants s'han extret afegint, i per aquest ordre: primerament 1 mL de solució saturada de clorur de sodi i posteriorment 2,5 mL de n-pentà, tot seguit s'ha agitat durant 15-30 min en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya) i s'ha centrifugat a 4400 rpm durant 15 min a 4 °C. La fase de n-pentà s'ha separat i s'ha evaporat sota flux de nitrogen. Per últim, el residu s'ha dissolt en 80 µL de disulfur de carboni com a vehicle per al seu posterior anàlisi mitjançant cromatografia de gasos acoblat a espectrometria de masses. Es punxen 2µL de mostra.

15.2. Sistema cromatogràfic

La separació dels èsters metàlics s'ha portat a terme en una columna capil·lar (30m x 0,25mm x 0,20 µm) amb un cromatògraf de gas model 7890A amb detector d'ionització amb flama (FID) (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya).

15.3. Condicions cromatogràfiques

El mètode utilitzat per la separació dels diferents èsters metàlics dels àcids grassos ha estat per gradient de temperatures. El port d'injecció s'ha mantingut a 220 °C i el detector a 250 °C; el programa de temperatura ha consistit en 100 °C durant 2 min, després ha pujat 10 °C/min fins als 200 °C, després 5 °C/min fins als 240 °C, i finalment s'ha mantingut 10 min a 240 °C. S'injecten 2 µL de mostra en cada cursa cromatogràfica.

15.4. Quantificació dels analits

La identificació dels èsters metàlics dels àcids grassos s'ha realitzat per comparació amb els temps de retenció i patrons de fragmentació dels corresponents estàndards. S'han identificat els àcids grassos de les mostres, s'han integrat els pics, s'ha fet un càlcul de les àrees de cada pic i s'han expressat d'una manera semiquantitativa; és a dir, s'ha calculat el % que suposa cada àcid gras en relació al total de la mostra. Els resultats s'han expressat com a mols en %.

15.5. Índex calculats

Holman va determinar empíricament les susceptibilitats relatives dels diferents àcids grassos mitjançant la mesura del consum d'oxigen (Holman 1954). L'àcid docosahexaenoic (22:6n-3), l'àcid gras omega-3 altament poliinsaturat amb sis dobles enllaços, és extremadament susceptible a la peroxidació i és vuit vegades més propens a patir la peroxidació que l'àcid linoleic (18:2n-6), el qual només té dos dobles enllaços. El 22:6n-3 és 320 vegades més susceptible a la peroxidació que l'àcid gras monoinsaturat, l'àcid oleic (18:1n-9).

Amb la combinació de les diferents susceptibilitats dels diferents àcids grassos i la composició dels mateixos en les membranes lipídiques, és possible calcular l'índex de peroxidabilitat (IP), com a mesura de la susceptibilitat a la peroxidació per a qualsevol tipus de membrana lipídica. L'IP no s'ha de confondre amb l'índex de dobles enllaços (IDE), el qual es la mesura del nombre de dobles enllaços per cada 100 molècules d'àcid gras, és a dir, la mesura de la densitat dels dobles enllaços. Així, per exemple, una bicapa lipídica formada solament per AGMI (p.e. 18:1) tindria un IDE calculat de 100 i un IP de 2,5; mentre que si la bicapa està formada per un 95% de AGS i un 5% de 22:6n-3 tindria un IDE de 30 i un IP de 40. Això significa que tot i que la membrana només conté un 5% de l'àcid gras altament insaturat, el docosahexaenoic, produeix una densitat de dobles enllaços de només el 30%, però en canvi, la susceptibilitat a oxidadar-se és 16 vegades superior a la bicapa monoinsaturada (Hulbert et al. 2007).

Per tant, a partir de la composició en àcids grassos s'ha calculat els següents índexs:

- Longitud mitja de la cadena (**LMC**)

$$\mathbf{LMC} = [(\sum \% \text{mol total } C_{14} \times 14) + (\sum \% \text{mol total } C_{16} \times 16) + (\sum \% \text{mol total } C_{18} \times 18) + (\sum \% \text{mol total } C_{20} \times 20) + (\sum \% \text{mol total } C_{22} \times 22) + (\sum \% \text{mol total } C_{24} \times 24)]/100$$

- Àcids grassos saturats (**AGS**)

$$\mathbf{AGS} = \sum \% \text{mol àcids grassos saturats}$$

- Àcids grassos insaturats (**AGI**)

$$\mathbf{AGI} = \sum \% \text{mol àcids insaturats}$$

- Àcids grassos monoinsaturats (**AGMI**)

$$\mathbf{AGMI} = \sum \% \text{mol àcids monoinsaturats}$$

- Àcids grassos poliinsaturats (**AGPI**)

$$\mathbf{AGPI} = \sum \% \text{mol àcids poliinsaturats}$$

- Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (**AGPI_{n-6}**)

$$\mathbf{AGPI}_{n-6} = \sum \% \text{mol àcids poliinsaturats de la sèrie n-6}$$

- Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (**AGPI_{n-3}**)

$$\mathbf{AGPI}_{n-3} = \sum \% \text{mol àcids poliinsaturats de la sèrie n-3}$$

- Índex de dobles enllaços (**IDE**):

$$\mathbf{IDE} = [(\sum \% \text{mol àcids monoenoics} \times 1) + (\sum \% \text{mol àcids dienoics} \times 2) + (\sum \% \text{mol àcids trienoics} \times 3) + (\sum \% \text{mol àcids tetraenoics} \times 4) + (\sum \% \text{mol àcids pentaenoics} \times 5) + (\sum \% \text{mol àcids hexaenoics} \times 6)]$$

- Índex de peroxidabilitat lipídica (**IP**):

$$\mathbf{IP} = [(\sum \% \text{mol àcids monoenoics} \times 0.025) + (\sum \% \text{mol àcids dienoics} \times 1) + (\sum \% \text{mol àcids trienoics} \times 2) + (\sum \% \text{mol àcids tetraenoics} \times 4) + (\sum \% \text{mol àcids pentaenoics} \times 6) + (\sum \% \text{mol àcids hexaenoics} \times 8)]$$

16. IMMUNOTRANSFERÈNCIA

16.1. Preparació de la mostra

Per a tots els anàlisis realitzats mitjançant la tècnica del immunotransferència s'ha utilitzat teixit total, tan en el cas de fetge com cervell dels animals. Una vegada obtingut els homogenats i la seva quantificació (apartat 11.2 i 11.3) ja s'han realitzat diferents alíquotes de les mostres a diferents concentracions, i s'han congelat fins a la seva utilització. Cada alíquota s'ha congelat ja dissolta en la solució TRIS-HCl 62,5 mM pH 6.8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2-β-mercaptoetanol al 20% (v/v) i Blau de Bromofenol 0,02% (p/v). En el moment de la utilització s'han descongelat, barrejat i escalfat a 95 °C en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya) durant 3 min, per a desnaturalitzar del tot les proteïnes abans de carregar-les al gel.

16.2. Electroforesi

Per a la separació de les proteïnes presents en les mostres s'han utilitzat gels d'acrilamida en presència del detergent dodecil-sulfat de sodi (SDS, de l'anglès, *sodium dodecyl sulfate*). El detergent aniònic SDS actua solubilitzant i desnaturalitzant la major part de les proteïnes de la mostra. A més, confereix una càrrega catiònica determinada a cada proteïna, fet que permet que la separació de les proteïnes es realitzi segons el seu pes molecular. Quan es sotmet el gel amb la mostra a un camp elèctric, les proteïnes migren cap a l'ànode amb més o menys velocitat depenent del seu tamany. S'han utilitzat com a suport físic gels separadors de diferents percentatges d'acrilamida [entre 9-15%, segons el pes molecular de la proteïna a detectar, i diferents gruixos (0,75; 1,0 o 1,5 mm) segons la quantitat necessària de proteïna per a poder detecta-la en cada cas (veure Taula 11), i gel apilador del 5%, partint d'una solució comercial

d'acrilamida-bisacrilamida [30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (2.6% C)] que s'ha forçat a polimeritzar amb l'aplicació dels catalitzadors persulfat amònic al 10% (p/v) i de TEMED al 0,03% (v/v). S'ha utilitzat 2,5 µL de marcador de pesos moleculars per gel [MagicMark XP Western Protein Standard]. La separació electroforètica es realitza amb una solució tampó [TRIS 25 mM, glicerol 192 mM, SDS 0.1% (p/v), pH 8.3] amb l'amperatge a 15 mA/gel la part de l'apilador i a 20 mA/gel la part del separador.

Taula 11 Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.

ANTICOSSOS PRIMARIS (I)								
Anticòs	Descripció	Referència	P.M. (kDa) 1	% 2	µg 3	Dil·lució 4	Incubació 5	Anticòs Secundari 6
CI ^a	Subunitat NDUFA9 del complex I	A21344- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	39	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
CI ^b	Subunitat NDUFS3 del complex I	A21343- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	30	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
CII	Subunitat Flavoprotein del complex II	A11142- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	70	10	10	1:500	1h T ^a ambient	Anti-mouse
CIII ^a	Subunitat CORE 2 del complex III	A11143- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	48	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
CIII ^b	Subunitat Rieske iron-sulfur del complex III	A21346- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	29	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
CIV	Subunitat COXI del complex IV	A6403- Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	57*	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
AIF	Apoptosis Inducing Factor	A7549- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA	57	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-rabbit
PGC-1 ^a	PPAR Coactivator 1α (PGC-1 H-300)	SC13067- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	100	9	80	1:200	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
PGC-1 ^b	PGC-1 Polyclonal antibody	101707 Cayman Chemical, Michigan, EUA	100	9	80	1:100	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
UCP4 ^a	UCP4 (N-16)	SC17582 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	36	10	80	1:200	4-5h T ^a ambient	Anti-goat
UCP4 ^b	Rabbit polyclonal UCP4	AB-35204 Abcam, Cambridge, Anglaterra	36	10	80	1:50	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit

¹ Pes Molecular de la proteïna ² % d'acrilamida de la part separadora del gel ³ Quantitat (en µg) de proteïna utilitzada ⁴ Dil·lució de l'anticòs utilitzada

⁵ Mode d'incubació de l'anticòs primari ⁶ Anticòs secundari utilitzat

*Pes aparent en la imatge de la immunotransferència es 35 kDa

Continuació de la Taula 11.

ANTICOSSOS PRIMARIS (II)								
Anticòs	Descripció	Referència	P.M. (kDa) 1	% 2	µg 3	Dil·lució 4	Incubació 5	Anticòs Secundari 6
NRF1	Nuclear respiratory factor-1 (H-300)	SC33771-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	68	10	80	1:100	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
Nrf2 ^a	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (H-300)	SC13032- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	57	10	80	1:100	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
Nrf2 ^b	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (C-20)	SC722-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	57	10	80	1:100	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
SIRT1	Rabbit polyclonal to SIRT1 Sirtuin 1	AB28170 Abcam, Cambridge, Anglaterra	110	9	80	1:500	4-5h T ^a ambient	Anti-rabbit
mTFA	Mitochondrial transcription factor A (mtTFA A-17)	SC23588-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	25	12	80	1:100	4-5h T ^a ambient	Anti-goat
ATF6	Monoclonal Antibody to ATF6 (70B1413.1)	ALX-804-381 Alexis Biochemicals Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, EUA	70 i 50	10	25	1:1000	8-10 h 4 °C	Anti-mouse
PDI	Mouse monoclonal [RL90] to PDI	AB2792 Abcam, Cambridge, Anglaterra	59	10	25	1:500	8-10 h 4 °C	Anti-mouse
KDEL	Mouse monoclonal [10C3] to KDEL	AB12223 Abcam, Cambridge, Anglaterra	78-94	10	30	1:1500	8-10 h 4 °C	Anti-mouse
XBP1	X-Box binding protein-1 (XBP-1 M-186)	SC7160-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	31	12	20	1:2000	8-10 h 4 °C	Anti-rabbit
GRP78	Anti-GRP78/BiP (GL-19)	G8918 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA	78	10	30	1:2000	8-10 h 4 °C	Anti-rabbit
GRP94	GRP 94 (H-212)	SC11402-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	94	10	60	1:100	8-10 h 4 °C	Anti-rabbit
SOD1	Anti-Superoxide Dismutase (Cu/Zn Enzyme)	574597 Calbiochem, Darmstadt, Alemanya	20	10	10	1:1000	1h T ^a ambient	Anti-Sheep
Actina	Monoclonal anti-β-Actina	A5441 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA	42		10-80	1:10000	1h T ^a ambient	Anti-mouse
Porina	Porin	A31855 Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Anglaterra	31	10	10-80	1:5000	1h T ^a ambient	Anti-mouse

¹ Pes Molecular de la proteïna ² % d'acrilamida de la part separadora del gel ³ Quantitat (en µg) de proteïna utilitzada ⁴ Dil·lució de l'anticòs utilitzada

⁵ Mode d'incubació de l'anticòs primari ⁶ Anticòs secundari utilitzat

*Pes aparent en la imatge de la immunotransferència es 35 kDa

16.3. Electrotransferència

Una vegada les proteïnes estan separades en els gels, es transfereixen a una membrana de PVDF (Immobilion-P #IPVH00010 Millipore, Millford, MA, EUA) amb tamany de porus 0,45 µm. Primerament, les membranes es rehidraten amb metanol 100%, uns 3 min, seguidament es renten amb solució tampó de transferència [TRIS 25 mM, glicerol 192 mM, metanol 20% (v/v)]. També es posen en remull en la mateixa solució tampó de transferència dos retalls de paper de filtre (Gel Blotting Paper #GB005 Whatman). Es prepara el sandvitx paper-gel-membrana-paper (en sentit ànode-càtode) damunt del suport per a transferència en submarí usant els *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad, Munich, Alemanya). La transferència es realitza a voltatge constant, 100 V durant una hora, per gels de 0,75 i 1 mm de gruix i una hora i mitja per als de 1,5 mm.

16.4. Immunodetecció

Una vegada ja s'han acabat de transferir les proteïnes separades en el gel a la membrana, a aquesta se li realitza un bloqueig amb agitació suau, per tal de bloquejar les posicions de la membrana on no s'han enganxat les proteïnes de la mostra, i evitar així falsos positius. Depenent de l'anticòs a aplicar es realitza el bloqueig estàndard durant 1 h a temperatura ambient amb solució de bloqueig [I-Block, Tween-20 0,1%, clorur de sodi 68 mM, hidrogenfosfat de sodi 58 mM i dihidrogenfosfat de sodi 17 mM] o el bloqueig específic determinat per la casa comercial (veure detall a Taula 11). Després del bloqueig es realitzen dos rentats de 5 min amb solució TBS-T 0.15 % [TRIS 2 M, clorur de sodi 2,5 M, Tween-20 0,05%] per retirar l'excés de bloquejant, i a continuació s'incuba amb l'anticòs primari dissolt en la mateixa solució en condicions normals o en altres solucions depenent de l'especificitat de l'anticòs (veure detall a Taula 11). La incubació del anticòs primari pot anar des d'una hora a temperatura ambient o 8 hores a 4 °C, fins a 4-5 hores a temperatura ambient, tot depèn de les característiques del anticòs. Després de la incubació de l'anticòs primari es realitzen 3 rentats de 5 min amb solució tampó TBS-T 0,15% i seguidament s'incuba amb l'anticòs secundari adequat, els quals estan acoblats a peroxidasa. En general, aquest es dissol en la mateixa solució de rentats, amb algunes excepcions (Taula 11). En tots els casos, però, la incubació sempre s'ha realitzat en una hora a temperatura ambient. Per últim, s'aplica a la membrana el substrat quimiluminescent [*Immobilon Western*

Chemiluminescent HRP Substrate] durant 5 min i es revela amb l'aparell *Molecular Imager ChemiDoc XRS* (Bio-Rad, Munich, Alemanya) i s'utilitza el programa *Quantity-One 4.5.0* (Bio-Rad, Munich, Alemanya).

16.5. Quantificació de la intensitat del senyal

Per a mesurar la intensitat del senyal de les bandes s'ha utilitzat el programa *Quantity One 4.5.0* (Bio-Rad, Munich, Alemanya). Sempre s'ha relativitzat el senyal de les bandes dels anticossos a la banda de l'anticòs utilitzat com a marcador de càrrega aplicat a la mateixa membrana després d'aplicar una neteja de la membrana. S'ha utilitzat com a marcador de càrrega total l'actina per a proteïnes citosòliques i la porina per a proteïnes mitocondrials (Taula 11).

Taula 12 Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.

ANTICOSSOS SECUNDÀRIS			
Anticòs	Descripció	Referència	Dil·lució utilitzada
Anti-mouse	ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep)	NA931 GE-Healthcare, Little Chalfont, Anglaterra	1:5000
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG, H&L, Horseradish Peroxidase-Linked species (from goat)	31460 Pierce Thermo Scientific Rockford, IL 61105 EUA	1:100000
Anti-goat	Donkey anti-goat IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species	SC2020 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA	1:12000
Anti-Sheep	Rabbit polyclonal to Sheep IgG H&L Horseradish Peroxidase-Linked species	AB6747 Abcam, Cambridge, Anglaterra	1:1000

17.ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL I IDENTIFICACIÓ DE PROTEINES MITJANÇANT MALDI-TOF

17.1. Preparació de la mostra

S'ha utilitzat mostra del grup control i mostra del grup de restricció de metionina al 80%. La mostra està formada en cada cas, per una mescla equitativa de mitocondries de fetge de 4 animals dels grups corresponents. A 100 μL de mostra s'hi afegixen 400 μL de solució urea 9 M i CHAPS al 4% (p/v), es mescla bé i es deixa 2h al termoagitador per tal que les mitocondries es dissolguin totalment en la solució de rehidratació i es puguin quantificar bé sense haver-hi interferències en la mesura. Tot seguit es mesura la concentració proteica de les mostres, fent 4 dil·lucions diferents de cada grup, les quals es quantifiquen per triplicat mitjançant el mètode Bradford (apartat 11.3) per tal d'afinar la concentració de proteïna de les mitocondries i minimitzar l'error. Una vegada es coneix el valor de la concentració de proteïna a les mostres, s'utilitza un volum de mostra corresponent a 200 μg de quantitat de proteïna i s'afegeix solució de tampó de rehidratació [Urea 9 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 50 mM i 0,5% amfòlits (v/v)] fins a un volum de 340 μL , i també es deixa mínim 2 h al termoagitador. Cal notar que aquesta etapa és el pas crític ja que la mostra ha d'estar totalment solubilitzada i les proteïnes desnaturalitzades. Per això s'utilitza la urea com a agent caotròpic, el qual provoca la desnaturalització de les proteïnes trencant els ponts d'hidrogen, deixant exposats els residus hidrofòbics que són solubilitzats pels agents tensioactius com el CHAPS. El DTT actua com a agent reductor, el qual serveix per completar la desnaturalització proteica trencant els ponts disulfur. Els amfòlits serveixen per crear un gradient estable de pH, són compostos amfòters de baix pes molecular (poliamines de 750 kDa) amb abundants grups àcids i bàsics, amb un pI de 3 a 10, amb gran capacitat de tamponació prop del seu pI i amb una gran solubilitat i conductivitat. El fet que hi hagi un gradient estable de pH dona alta resolució a l'isoelectroenfoc fent que les proteïnes es focalitzin podent separar proteïnes les quals difereixen en 0.001 unitats de pI.

17.2. Separació en la 1era dimensió: Isoelectroenfoc

Abans de separar les proteïnes en la primera dimensió, és a dir, en base amb el seu punt isoelèctric, es realitza la rehidratació de les tires d'isoelectroenfoc (IEF) les

quals estan formades per un gradient de pH de 3–11 immobilitzats en condicions desnaturalitzants i de 18 cm de llargària (Immobiline DryStrip pH 3-11 #17-6003-76 Amersham Bioscience, Madrid, Espanya). S'aplica la mostra al suport específic per a la rehidratació i es col·loca la tira d'IEF a sobre, de manera que la mostra i el gel immobilitzat estiguin en contacte, s'aplica damunt de les tires 1,5 mL d'oli mineral per tal que les tires es quedin fixades i tot seguit es disposa el suport amb les tires dins l'aparell d'isoelectroenfoc (Protean IEF Cell Bio-Rad, Munich, Alemanya) i es programa de 12 a 16 h a temperatura constant de 20°C. En aquest pas s'aconsegueix que les tires de IEF tornin al seu gruix original de 0,5 mm hidratant-se amb la solució tampó més la mostra. Després de la rehidratació, es realitza l'isoelectroenfoc. Per a realitzar-lo cal canviar les tires del suport de rehidratació al suport específic d'isoelectroenfoc. S'han de dipositar les tires de manera que el gel i els elèctrodes estiguin en contacte (cal posar les tires amb la part + de la tira en contacte amb la + del suport). Es torna a aplicar al damunt de les tires 1,5 mL d'oli mineral per tal que quedin ben fixades i es disposa el suport d'IEF dins de l'aparell. L'isoelectroenfoc s'ha realitzat amb un programa el qual consta de 4 passos; i) pas d'acondicionament: 250 V amb rampa linear. S'aplica un voltatge baix per tal d'eliminar les possibles sals i els contaminants carregats; ii) 250 V amb rampa ràpida durant 5 h; iii) 60000 V/h amb una rampa ràpid de voltatge, la variable és el temps i com ha màxim es pot programar a 10000 V/h; iv) pas d'espera, 250 V amb una rampa ràpida durant 5 h. Aquest pas es per prevenir la difusió de les proteïnes enfocades i permetre ajustar el temps de l'IEF. Finalment, es fixa una intensitat màxima per tira d'IEF de 50 µA.

17.3. Separació en la 2a dimensió: Electroforesi

Prèviament a la separació electroforètica cal realitzar un pas intermedi posterior a l'isoelectroenfoc. Aquest pas consisteix en l'equilibració de les tires d'IEF amb tampó SDS per a transformar les proteïnes focalitzades amb complexes proteïna-SDS, les quals queden completament desplegadas i amb càrrega negativa. Les següents condicions van ser optimitzades, descrites en (Westermeier, Naven & Höpker 2008).

Solució d'equilibració : SDS 2 % (p/v), TRIS-HCl pH 8.8 50 mM, Urea 6 M, Glicerol 30% (v/v).

L'equilibració es realitza amb dos passos de 15 minuts cada un. El primer s'utilitza 10 mL de la solució d'equilibració més DTT al 1% (p/v). I el segon s'utilitza iodoacetamida 2,5 % (p/v) en lloc de DTT. El DTT s'utilitza com a reductor, ja que

després de l'enfoc de les proteïnes, cal tornar-les a reduir. La iodoacetamida s'utilitza com a agent alquilador, serveix per alquilar completament les cisteïnes i evitar així la modificació parcial per l'acrilamida i millorar la identificació per espectrometria de masses; i també per evitar les línees artefactuals que poden formar-se horitzontalment en el gel al voltant dels 40-50 kDa (Westermeier, Naven & Höpker 2008).

Una vegada ja tenim les proteïnes separades en funció de les seves propietats elèctriques i equilibrades, el següent pas es separar-les en funció del seu pes molecular mitjançant l'electroforesi en gels d'acrilamida amb presència de SDS. Per a realitzar la segona dimensió s'utilitzen gels del 12 % d'acrilamida per la part del separador i del 5 % per la part de l'apilador, partint d'una solució comercial d'acrilamida-bisacrilamida [30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (2.6% C)]. La part del separador conté, a més, SDS 10%, TRIS-HCl 1,5 M pH 8.8 i els agents catalitzadors, per a forçar la polimerització, persulfat amònic al 10% (p/v) i TEMED al 0.03% (v/v). La part de l'apilador es diferencia amb la solució de TRIS-HCl 0,5 M pH 6.5, a part del % d'acrilamida. Els gels es poden guardar preparats fins a dos o tres dies a 4 °C. Es col·loca la tira d'IEF a la part superior del gel apilador i s'hi afegeix 2 mL de solució d'agarosa al 0,5 % amb Blau de Bromofenol al 0,01% (p/v), per a marcar el front de migració de les proteïnes en el gel. L'agarosa s'escalfa a 60 °C per a poder dipositar-la sobre la tira, i tarda pocs minuts en solidificar-se. L'agarosa té diferents funcions, entre les quals destaca el fet de mantenir la tira fixa al començament del gel, evitar bombolles i omplir els buits entre el gel i la tira d'IEF, aconseguir continuïtat en el gel i reduir els efectes electroendosmòtics a pH extrems en les tires d'IEF. Abans de dipositar l'agarosa, s'injecten 5 µL de marcador de pesos moleculars [MagicMark XP Western Protein Standard]. L'electroforesi es realitza a intensitat constant de 30 mA per gel.

17.4. Tinció dels gels

Després de realitzar la separació bidimensional de les proteïnes es necessari realitzar una tinció dels gels per a poder visualitzar les proteïnes. S'ha realitzat una tinció de plata de les proteïnes, utilitzant un lot comercial (Silver Staining Kit, Protein #17-1150-01 Amersham Biosciences, Madrid, Espanya) i seguint el seu protocol.

17.5. Adquisició i anàlisi de la imatge

Una vegada tenyits els gels, s'han escanejat (Calibrated Densitometer #GS-800 Bio-Rad, Munich, Alemanya) i guardat en el format adequat per tal de poder-los analitzar amb el programa *PDQuest 7.2.0* (Bio-Rad, Munich, Alemanya). Amb aquest programa s'ha realitzat un anàlisi automàtic de les diferències entre les taques de les proteïnes del gel control envers les del gel de MetR80% (s'han analitzat tres gels per grup), amb una prèvia normalització. Els límits de l'anàlisi s'han fixat en diferències de 2 vegades, o més, d'augment o de disminució en el grup control respecte el grup de restricció de metionina (RMet80%).

17.6. Identificació de les proteïnes

La identificació de les proteïnes s'ha realitzat mitjançant espectrometria de masses amb un espectròmetre de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*) i s'ha realitzat en un servei extern a la Universitat de Lleida (Servei de Proteòmica de LP-CSIC-UAB, Barcelona). Les mostres, en les que s'ha detectat senyals als espectres de MALDI-TOF però que no s'han pogut identificar, s'han analitzat per cromatografia líquida amb detector de masses-masses (LC-MS/MS; de l'anglès, *liquid chromatography-mass spectrometry*). Per a processar la mostra abans de l'anàlisi s'ha realitzat una digestió trípica de les proteïnes retallades del gel emprant un digestor automàtic (DigestPro MS, Intavis). Les mostres s'han tractat amb ditiotreitòl (DTT) i iodoacetamida (IAA) abans de la seva digestió amb tripsina a 37 °C durant 8 h. Els pèptids trípics resultants s'han analitzat mitjançant espectrometria de masses amb un espectròmetre de MALDI-TOF (Voyager De-PRO, Applied Biosystems). A partir dels espectres obtinguts en l'anàlisi per MALDI-TOF s'ha realitzat una cerca en base de dades per *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) emprant el programa Protein Prospector. Les bases de dades emprades han estat SwissProt i NCBIInr.

Per a l'anàlisi de les mostres per LC-MS/MS s'ha emprat un sistema d'HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) acoblat a una trampa de ions lineal LTQ (ThermoFisher, San Jose, CA). Els espectres de MS/MS obtinguts es cercaren emprant el motor de cerques SEQUEST (Bioworks v3.3.1 SP1, ThermoFisher, San Jose, CA, EUA) en front la base de dades UniProt (Rodent) juntament amb la seva còpia inversa.

Les identificacions obtingudes es filtraren per a obtenir pèptids amb un $Sf^g > 0.6$ i una $P(\text{pep})^h < 0.001$ i es validaren manualment.

18. QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS DE LA METIONINA

18.1. Quantificació de SAH i SAM en teixit mitjançant HPLC

Per a la detecció i quantificació de S-adenosilmetionina (SAM) i S-adenosilhomocisteïna (SAH) s'ha utilitzat un mètode basat en (Wang et al. 2001) en el que s'utilitza la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, de l'anglès, *high performance liquid chromatography*).

18.1.1. Preparació de la mostra

S'ha pulveritzat en nitrogen líquid 100 mg de teixit congelat en un morter, s'ha transferit a un vial prèviament tarat amb quatre volums d'àcid perclòric 0,4 M i s'ha agitat durant 10 min en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya). Després d'una centrifugació a 11000 rpm, el sobrenedant s'ha filtrat amb tubs *Whatman* de 0,22 μm de diàmetre de porus (#UFC3LTK00 Millipore, Millford, MA, EUA). com també les dilucions dels estàndards de SAM i SAH. Tot seguit, s'ha congelat a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ fins al seu anàlisi cromatogràfic.

18.1.2. Sistema cromatogràfic

Les mostres s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa mitjançant una columna analítica de 4.60 mm C18 25 cm [Phenomenex-Kromasil 5u 100A C18] en un sistema d'Agilent Technologies. L'aparell utilitzat està compost per una bomba binària G1312A de la sèrie 1200, un desgasificador G1379A de la sèrie 1100, un injector de mostres automàtic G1313A de la sèrie 1100, un termostatitzador per la columna G1316A de la sèrie 1200 i un detector de llum ultravioleta (UV) VWO G1314B de la sèrie 1200 (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya).

^g Puntació que assigna el Bioworks a cadascun dels pèptids identificats. Com més gran, millor.

^h Probabilitat del pèptid.

18.1.3. Condicions cromatogràfiques

La fase mòbil utilitzada consta de dos eluents diferents, la Fase A: dihidrogenfosfat de sodi 50 mM, àcid 1-Heptasulfònic 8 mM ajustat a pH 3 amb àcid fosfòric; i la fase B: metanol 100%. La columna s'ha equilibrat amb 80% de la fase A i un 20% de la fase B. S'ha injectat un volum de 60 µL d'alíquota per mostra i aquesta s'ha separat utilitzant un gradient de concentracions. Aquest gradient ha consistit en 8 min de condicions d'equilibri; 30 s per incrementar fins al 40% de fase B; 12,5 min en la nova condició; 30 s per retornar a les condicions d'equilibri i 10 min en la situació d'equilibri fins a la pròxima separació. El temps de la cursa ha estat de 30 min, el flux de la fase mòbil ha estat constant a 1 mL/min i la temperatura de la columna s'ha mantingut constant a 45 °C. Els temps de retenció i les àrees dels pics s'han monitoritzat a 254 nm amb un detector UV. Totes les solucions, després de ser ajustades al pH s'han filtrat amb un filtre de 0.45 µm de tamany de porus (#HVLP04700 Millipore, Millford, MA, EUA).

18.1.4. Quantificació dels analits

Els analits SAH i SAM s'han identificat d'acord amb els seus temps de retenció i la coelució amb els seus respectius estàndards. Els seus temps de retenció són 5.8 min per SAH i 9.7 min per SAM. La quantificació s'ha basat en la integració de les àrees dels seus pics i comparat amb les corbes de calibració dels estàndards. S'ha observat linealitat en el rang de concentracions estudiat, 2-200 µM per ambdós analits. Els resultats s'han recalculat per a expressar-los com a nmol/g de teixit.

18.1.5. Índexs calculats

Com a paràmetres quantitius de reaccions intracel·lulars de metilació s'ha calculat la relació SAM/SAH, anomenada potencial (o índex) de metilació (Waterland 2006). I la relació Met/SAM.

18.2. Quantificació de Met, SAM i SAH en teixit mitjançant LC ESI-QTOF MS

Per a detectar i quantificar metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM) i S-adenosilhomocisteïna s'ha utilitzat la cromatografia líquida amb ionització per

electrosprai acoblada a un quadrupol de temps de vol amb detecció per espectrometria de masses (LC ESI-QTOF MS, de l'anglès, *liquid chromatography with electrospray ionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry*). Mètode adaptat de (Burren et al. 2006).

18.2.1. Preparació de la mostra

S'ha pulveritzat en nitrogen líquid 100 mg de teixit congelat en un morter, s'ha transferit a un vial prèviament tarat amb 200 µL de 4 mM d'acetat d'amoni, 0.1% d'àcid fòrmic, 0.1% d'àcid heptafluorobutíric i 440 pmols de metionina deuterada d₃-Met (com a estàndard intern) a pH 2.5 i s'ha agitat durant 15 min en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya). La solució s'ha escalfat a 80 °C en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya) durant 5 min per tal de precipitar les proteïnes, tot seguit s'ha refredat en gel durant 2 min i s'ha centrifugat a 14000 rpm durant 15 min per precipitar qualsevol partícula. Els sobrenedants s'han filtrat amb tubs *Whatman* de 0,22 µm de diàmetre de porus (#UFC3LTK00 Millipore, Millford, MA, EUA) com també les solucions d'estàndards de Met, SAM i SAH. I s'ha congelat a -20 °C fins al seu anàlisi cromatogràfic.

18.2.2. Sistema cromatogràfic

Les mostres s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució mitjançant una bomba nano (G2226A) d' Agilent Technologies de la Sèrie 1200 acoblat a un equip QTOF LC-MS (G6510A) (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). Una alíquota de 4 µL dels extractes de les mostres s'ha separat mitjançant una columna de fase reversa C18 (Luna 3n pfp(2), 100A, 150 x 2mm ID, Phenomenex, CA, EUA).

18.2.3. Condicions cromatogràfiques

El flux s'ha mantingut constant a 200 µL/min; la fase A conté un 0.1% d'àcid fòrmic i la fase B conté un 95% d'acetonitril i un 5% d'aigua milliQ la qual conté 0.1% d'àcid fòrmic. El gradient ha consistit en un 0% de la fase B durant 5 min, després pujar a

100% de fase B en 20 min, es manté 5 min i seguidament es reequilibra en 100% de fase A durant 6 min. Les dades s'han recollit en mode positiu de l'electrosprai el qual ha operat en mode *full-scan* de 100 a 3000 m/z. El voltatge del capil·lar ha estat fixat a 3500 V amb una raó d'escanejament d'un escan/segon; el flux del nebulitzador ha estat de 5 L/min.

18.2.4. Quantificació dels analits

La quantificació s'ha realitzat mitjançant una estandardització externa usant corbes dels estàndards construïdes a partir de mesclades dels estàndards de Met, SAM i SAH i de l'estàndard intern deuterat ($[H^2]_3$ -Met) la qual s'ha afegit per tenir la mateixa concentració final que a als extractes de les mostres. En la es mostren cromatogrames representatius dels estàndards, els quals s'han utilitzat per a realitzar les corbes d'estandarització i el temps de retenció (T.R.) per a confirmar-los en les mostres. S'ha observat linealitat en tot el rang de concentracions estudiat, 0.07-335 μ M, 0.25-50 μ M i 0.26-130 μ M per Met, SAM i SAH, respectivament. Per a recollir els resultats s'ha utilitzat el programa *Masshunter Data Analysis* i per a analitzar-los s'ha utilitzat el programa *Masshunter Qualitative Analysis*. Els valors de m/z utilitzats per a la quantificació han estat: m/z 150.0533 $[M+H]^+$ per Met, m/z 399.14506 $[M+H]^+$ per SAM, m/z 385.12886 $[M+H]^+$ per SAH i m/z 153.07716 $[M+H]^+$ per d3-Met. Els resultats s'han expressat com a nmol/g de teixit.

18.2.5. Índex calculat

Com a paràmetres quantitius de reaccions intracel·lulars de metilació s'ha calculat la relació SAM/SAH, anomenada potencial (o índex) de metilació (Waterland 2006). També s'ha calculat la relació Met/SAM per determinar diferències en quantitat de la formació de SAM a partir de Met.

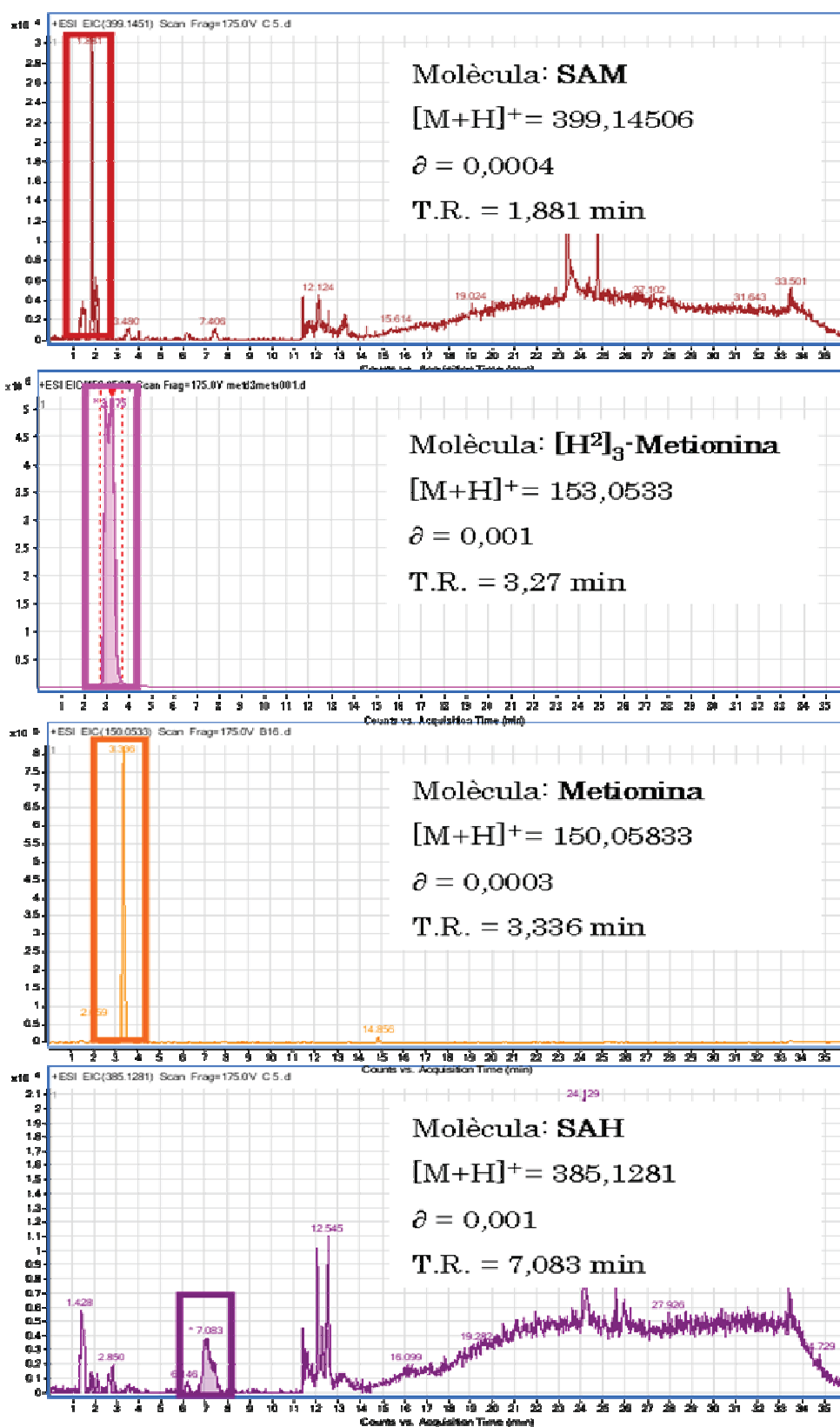


Figura 19 Cromatogrames SAM, $[H^2]_3$ -Met, Met i SAH.

$[M+H]^+$ massa/càrrega del ió protonat de la molècula identificada, δ error de massa entre l'estàndard i la mostra, T.R. temps de retenció.

19. MÈTODES ESTADÍSTICS

Com a prova estadística per a valorar les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals s'ha utilitzat un anàlisi de la variància (ANOVA) d'una via. La normalitat i igualtat de les variants entre els grups s'han comprovat prèviament a l'aplicació d'aquesta prova estadística. El test de Duncan s'ha realitzat per les comparacions entre parells de grups (en el cas de l'experiment de RMet 40-80%).

El nivell mínim de significació ha estat 0,05 en totes les comparacions. El Grau de significació obtingut s'ha representat a totes les gràfiques com: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Els paràmetres i les proves estadístiques s'han realitzat amb el programa *SPSS Statistics 17.0*. (Inc. Chicago, IL, EUA).