



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**

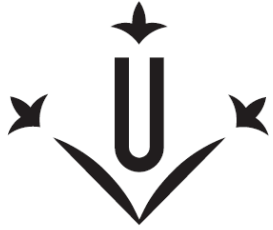
---

**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](http://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](http://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](http://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.

---



**Universitat de Lleida**  
Departament de Medicina  
Experimental

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

Memòria presentada per:

**ALBA NAUDÍ I FARRÉ**

Per optar al títol de Doctora per la Universitat de Lleida

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Reinald Pamplona Gras i Dr. Manel Portero Otín, del Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, programa d'Estudis Avançats en Ciències Biomèdiques.

Dr. Reinald Pamplona Gras

Dr. Manel Portero Otín

Alba Naudí Farré

Lleida, 20 de juliol de 2010



*"Els anys arruguen la pell,  
però renunciar a l'entusiasme arruga l'ànima"*

Albert Schweitzer  
(metge, filòsof i Premi Nobel de la Pau el 1952)



Al papa , a la mama,

al Gerard

i a la Carol



## AGRAÏMENTS

Per començar voldria agrair als màxims responsables de que s'hagi pogut realitzar aquesta tesi, als meus directors de tesi, al Reïnald i al Manel. Per la confiança dipositada en mí des del primer moment que vaig posar el primer peu al laboratori, per donar-me l'oportunitat de fer la tesi amb ells i per ser, abans que científics, persones. Al Reïnald per contagiar-me el seu entusiasme per la ciència, la seva força de voluntat, paciència, els seu pragmatisme i que les coses s'aconsegueixen pas a pas i una darrera l'altra, poc a poc, però sobretot, sent constant. Per ensenyar-me tot el que m'ha ensenyat i per ser com és. Al Manel per ajudar-me i resoldre'm qualsevol problema del laboratori en una frase i fer-me sempre les preguntes clau per a fer pensar i raonar. Per ensenyar-me tot el que m'ha ensenyat i per ser com és.

A la M<sup>a</sup> Josep per, sense ella saber-ho, convencem per entrar al grup a fer pràctiques i demostrar-me que les químiques també tenim un lloc a la investigació biomèdica.

A tot el grup del Dr. Gustavo Barja de Madrid, especialment a ell, a la Pilar i al Jose, ja que sense la seva col·laboració no s'haurien pogut realitzar tots els experiments d'aquesta tesi, per la seva acollida en la meva estada a Madrid i per ensenyar-me que l'HPLC és tot un món.

A la Víki, al David i la Katia. Amb els que vaig compartir el meu primer contacte en un laboratori d'investigació. A la Víki per ser tan propera, per ajudar-me des del primer moment i preocupar-se tant pels altres. Per fer-me sentir des del primer moment una més del grup i per l'amistat que tenim. Al David, per ensenyar-me i situar-me en el laboratori quan jo començava, per la feina que hem fet junts, per tenir sempre unes paraules amables i d'ànims i contagiar-me sempre el seu bon rotllo. A la Katia per ensenyar-me la seva visió de la ciència, per a les converses en anglès que teníem al principi, abans que aprenguéssim el castellà.



A la Mariona, per a convertir-se en més que una gran companya de laboratori, en una gran amiga. Per intentar sempre fer les coses fàcils, pràctiques i viables per tots, i per poder comptar amb ella sempre i en qualsevol situació.

A la resta del grup que ha anat arribant darrera meu, al Dani, el Jordi, l'Hugo, la Meri, la Jèssica, el Jose, la Saray, la Núria, l'Anna, l'Ana i l'Omar. Tot i que directament el meu treball del laboratori ho ha estat relacionat amb ells, he compartit a part del laboratori, més o menys moments amb tots ells. De tot se n'aprèn, no només de ciència. Al Dani per estar sempre disposat a ajudar i deixar sempre abans la seva feina per a donar-te un cop de mà, al Jordi per, tot i coincidir poc en el treball del laboratori, la seva ajuda, ràpida i bona; a l'Hugo per estar sempre disposat a donar-te conversa i a la Núria pels ànims i demostrar-te que el final de la tesi sempre arriba.

Als visitants del grup, a l'Arantza, al Jorge, a la Lorena, a la Pilar i al Jose per a ensenyar-me el que no només és important el saber, com també el saber ensenyar. A l'Arantza per les grans converses, els bons moments i les experiències compartides de les dos "novates" al laboratori. Al Jorge, pels bons moments amb les bidis, les xerradetes i els sopars. A la Lorena, per les converses i la compenetració en el treball.

A les companyes de tesi que s'han convertit en amigues. A la Xènia i la Rita per ser fantàstiques, úniques i lo millor, amigues. Per estar sempre al meu costat, compartir tots els bons moments i els no tan bons dels nostres anys de tesi, dins del departament i fora, els sopars, xerrades, viatges, vacances i més. I per saber que les tindrè sempre al meu costat, tot i potser no estar sempre aprop. A la Xènia, per ser la meva artista preferida, mil gràcies per tot i pel diseny gràfic de la tesi! A la Isis, per les grans converses, consells, per les vacances juntes i saber que a Barcelona sempre hi tindrè una amiga. A la Neus, per ser com és, autèntica. Per les grans estones que hem compartit amb el swing i amb els sopars, dinars i tot. Per a què continuï sempre així.

A la resta del grup de la 3<sup>a</sup>, amb els que també he compartit bons sopars i dinars i calçotades.

A tots els que hem compartit les hores de dinar amb els nostres "tupers" a la xocolatera. Les converses de tot tipus i les rialles que em tinguem amb els/les de bioquímica, les de bioestadística, els i les de la 3<sup>a</sup>.

Als del grup de Bioquímica, per deixar-nos sempre el que necessitàvem i especialment a la M<sup>a</sup> Alba, per la seva gran ajuda, sobretot al començament, amb la meua immersió amb les bidimensionals.

Als companys de l'Arnau, que tot i no treballar aprop, hem compartit bons moments, bàsicament, sopars. Especialment, a la Núria Eritja, els cursos de doctorat no haguessin estat el mateix sense ella; per ser així, autèntica i tal com raja i per tots els moments, situacions i grans rialles que hem compartit.

Als meus amics fora del laboratori, que sempre han cregut amb mí i m'han donat forces per a continuar. A la Janina per creure que sóc una "crack", perquè tot i que no estiguem aprop, sempre he pogut comptar amb ella i ha estat amb mí. A la Laia, per recolzar-me i animar-me sempre i estar sempre disposada a ajudar i per tots els bons moments que hem passat juntes. A l'Anna, la Cèlia i l'Eva per enviar-me bones vibracions i pels bons moments que hem compartit. A la Pilar, la Georgina i la Camí, perquè sempre m'han donat el seu recolzament i m'han escoltat, tot i moltes vegades sense entendre molt bé el que feia. Al Ramon Gassó per la seva inestimable ajuda amb la maquetació de la tesi i també pels seus ànims i forces que m'ha transmès sempre, i pels bons sopars que hem compartit. A l'Aibert pels rotllos que m'ha aguantat, pels sopars, xerrades i rialles que hem compartit i per creure en mí.

Al papa i a la mama, per ser fantàstics. Per recolzar-me incondicionalment en tot, creure en mí i demostrar-ho. Sí no hagués estat pel vostre esforç per a que pogués estudiar no estaria aquí. Per l'esforç que heu fet per entendre'm i, tot i no veure-ho

clar, sempre m'heu ajudat a tirar endavant. Mil gràcies! El padri Salvador estaria orgullós de veure'm aquí i no diguem la padrina i el iaío. A la iaia que sempre em pregunta com em va l'estudi que faig a lleida i sempre m'ha recolzat i transmés la seva força de voluntat en tot el que ha fet. Gràcies a tots, per a cuidar-me sempre, per estimar-me i per transmetre'm que l'important és fer el què a un li agrada.

Als meus germans, el Gerard i la Carol, per recolzar-me sempre i estimar-me. La pregunta mítica del Gerard: *que Alba, què has descobert avuí?* I les preguntes i curiositats que em preguntava de les coses del laboratori, amb les que sempre m'he divertit. La visió pràctica de la Carol, que sempre m'ha ajudat tant, els massatgets i els dinars que m'ha portat fets i l'ajuda que sempre m'ha donat. I també gràcies al Carles, per estar sempre disposat a ajudar i per fer-ho quan ha estat necessari.

A tots els meus tiets, la Conce, la tieta Rosita, el tiet Luís Fernando, el tiet Jordi, la tieta Isabel, la tieta Mari Carme i el Roman, per sempre creure en mí i valorar la meva feina. A tots els meus cosins, l'Estitxu, el Jordi, la Marta, la Núria, la Irina, l'Adrià, la Marina i la Núria, per ser-hi. A l'Estitxu per tota la informació que m'has pogut aconseguir per la meva tesi, m'has facilitat en molts moments la feina, i per tots els bons moments que hem passat juntes i els ànims que m'has transmés. A la Marta, per sempre animar-me a fer el que m'agrada i recolzar-me en la carrera i la tesi i tot..

A la família de Tèrmens, de Reus, als que ja no hi són. Als tiets i cosins de Lleida. Que tot i estar més lluny, també formen part de mí.

Per últim, als que d'alguna manera, sense ells saber-ho, m'han transmés energia i ganes per tirar endavant i han valorat la feina meva del dia a dia, que també són uns quants, i no menys importants.

Moltes gràcies a tots!

# ÍNDEX



<b>RESUM</b>	<b>19</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>23</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>27</b>
<b>ABREVIACIONS</b>	<b>31</b>
<b>ÍNDIX DE TAULES</b>	<b>37</b>
<b>ÍNDIX DE FIGURES</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>47</b>
<b>1. L'ENVELLIMENT</b>	<b>49</b>
1.1. LA PERSPECTIVA HISTÒRICA	49
1.2. DEFINICIÓ D'ENVELLIMENT	50
1.3. TEORIES DE L'ENVELLIMENT	51
<b>2. L'ESCENARI DE L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>55</b>
2.1. LA HISTÒRIA NATURAL DE L'OXIGEN	55
2.2. LA TOXICITAT DE L'OXIGEN	56
2.3. L'ORIGEN DE LA TEORIA DELS RADICALS LLIURES	57
2.4. LES ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN	59
2.4.1. La cadena de transport electrònic mitocondrial	60
2.4.2. La generació d'espècies reactives d'oxigen	62
2.4.3. Mecanismes fisiològics que influeixen en la producció de ROS	65
2.5. LES DEFENSES CEL·LULARS ANTIOXIDANTS	69
2.5.1. Els antioxidants enzimàtics	69
2.5.2. Els antioxidants no enzimàtics	70
2.5.3. Els sistemes antioxidants de reparació, recanvi o detoxificació	74
<b>3. ELS EFECTES DE L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>75</b>
3.1. ELS INTERMEDIARIS DE PRIMERA I SEGONA GENERACIÓ	75
3.2. LA LESIÓ ENDÒGENA DELS LÍPIDS	76
3.3. LA LESIÓ ENDÒGENA DE PROTEÏNES	79
3.4. LA LESIÓ ENDÒGENA DE L'ADN	86
<b>4. LA LONGEVITAT I L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>89</b>
4.1. ESTUDIS COMPARATIUS INTERESPÈCIES	90
4.1.1. La lesió endògena i els nivells d'antioxidants en la longevitat	90
4.1.2. La lesió endògena en l'envelliment	92
4.1.3. Els components cel·lulars estructurals resistents al dany oxidatiu	94
<b>5. LA METIONINA I L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>97</b>

5.1. EL METABOLISME ESSENCIAL DE LA METIONINA	97
5.2. EL PAPER FISIOLÒGIC DE LA METIONINA I DELS SEUS DERIVATS	100
5.3. L'OXIDACIÓ DE LA METIONINA	101
<b>6. LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS, LA LONGEVITAT I L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>103</b>
6.1. LA RESTRICCIÓ CALÒRICA I L'ESTRÈS OXIDATIU	104
6.2. EL MECANISME DE LA RESTRICCIÓ CALÒRICA	104
6.3. LA RESTRICCIÓ PROTEICA	105
6.4. LA RESTRICCIÓ DE METIONINA	106
6.5. LA SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA	107
<b>7. L'ENVELLIMENT I L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>109</b>
7.1. L'ESTRÈS DE RETICLE ENDOPLASMÀTIC	109
7.1.1. El plegament proteic i el control de qualitat	109
7.1.2. La resposta a l'estrès de RE	111
7.2. LA BIOGÈNESI MITOCONDRIAL	115
7.2.1. La mitocòndria	115
7.2.2. La regulació de la biogènesi mitocondrial	115
7.3. LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL I DE RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN L'ENVELLIMENT	120
<b>OBJECTIUS</b>	<b>125</b>
<b>DISSENY EXPERIMENTAL</b>	<b>131</b>
8. ANIMALS	133
9. INTERVENCIIONS DIETÈTIQUES	133
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>139</b>
10. REACTIUS	141
11. PROCESSAMENT PRÈVI DE LA MOSTRA	144
11.1. AÏLLAMENT DE MITOCÒNDRIES DE FETGE	144
11.2. HOMOGENEÏTZACIÓ DELS TEIXITS	144
11.3. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES	145
12. ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS AMINOÀCIDS	145
12.1. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	145
12.2. SISTEMA CROMATOGRÀFIC	146
12.3. CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES	146
12.4. QUANTIFICACIÓ DELS ANALITS	146
12.5. ÍNDEX CALCULATS	146
13. QUANTIFICACIÓ DEL DANY OXIDATIU A L'ADN MITOCONDRIAL	147
13.1. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	147

13.1.1.	Aïllament de l'ADN mitocondrial	147
13.1.2.	Precipitació de l'ADN mitocondrial	148
13.1.3.	Digestió de l'ADN mitocondrial	149
13.2.	SISTEMA CROMATOGRÀFIC	149
13.3.	CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES	149
13.4.	QUANTIFICACIÓ DELS ANALITS	150
14.	<b>QUANTIFICACIÓ DEL DANY OXIDATIU PROTEIC</b>	<b>151</b>
14.1.	PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	151
14.2.	SISTEMA CROMATOGRÀFIC	152
14.3.	CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES	152
14.4.	QUANTIFICACIÓ DELS ANALITS	152
14.5.	SÍNTESI D'ESTÀNDARDS INTERNS	153
15.	<b>ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS ÀCIDS GRASSOS</b>	<b>155</b>
15.1.	PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	155
15.2.	SISTEMA CROMATOGRÀFIC	156
15.3.	CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES	156
15.4.	QUANTIFICACIÓ DELS ANALITS	156
15.5.	ÍNDIX CALCULATS	156
16.	<b>IMMUNOTRANSFERÈNCIA</b>	<b>158</b>
16.1.	PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	158
16.2.	ELECTROFORESI	158
16.3.	ELECTROTRANSFERÈNCIA	161
16.4.	IMMUNODETECCIÓ	161
16.5.	QUANTIFICACIÓ DE LA INTENSITAT DEL SENYAL	162
17.	<b>ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL I IDENTIFICACIÓ DE PROTEINES MITJANÇANT MALDI-TOF</b>	<b>163</b>
17.1.	PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	163
17.2.	SEPARACIÓ EN LA 1ERA DIMENSIÓ: ISOELECTROENFOC	163
17.3.	SEPARACIÓ EN LA 2A DIMENSIÓ: ELECTROFORESI	164
17.4.	TINCIÓ DELS GELS	165
17.5.	ADQUISICIÓ I ANÀLISI DE LA IMATGE	166
17.6.	IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES	166
18.	<b>QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS DE LA METIONINA</b>	<b>167</b>
18.1.	<b>QUANTIFICACIÓ DE SAH I SAM EN TEIXIT MITJANÇANT HPLC</b>	167
18.1.1.	Preparació de la mostra	167
18.1.2.	Sistema cromatogràfic	167
18.1.3.	Condicions cromatogràfiques	168
18.1.4.	Quantificació dels analits	168
18.1.5.	Índexs calculats	168
18.2.	<b>QUANTIFICACIÓ DE MET, SAM I SAH EN TEIXIT MITJANÇANT LC ESI-QTOF MS</b>	168
18.2.1.	Preparació de la mostra	169



18.2.2.	Sistema cromatogràfic	169
18.2.3.	Condicions cromatogràfiques	169
18.2.4.	Quantificació dels analits	170
18.2.5.	Índex calculat	170
19.	<b>MÈTODES ESTADÍSTICS</b>	<b>172</b>
<b>RESULTATS</b>		<b>173</b>
20.	<b>L'ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS AMINOÀCIDS</b>	<b>175</b>
21.	<b>EL DANY OXIDATIU</b>	<b>176</b>
21.1.	EL DANY OXIDATIU A L'ADN MITOCONDRIAL	176
21.2.	EL DANY OXIDATIU PROTEIC	177
21.3.	EL DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICOXIDACIÓ	179
21.4.	EL DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LIPOXIDACIÓ	179
21.5.	EL DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICO I LIPOXIDACIÓ	180
21.5.1.	La carboximetilació en l'aminoàcid lisina, CML	181
21.5.2.	La carboximetilació en l'aminoàcid cisteïna, la CMC	182
21.5.2.1.	Detecció de CMC mitjançant GC/MS	182
21.5.2.2.	Estàndard intern de CMC marcat isotòpicament	184
21.5.2.3.	Quantificació de CMC en RMet40-80%	186
21.5.2.4.	Mecanismes proposats per a la formació de CMC	187
22.	<b>L'ANÀLISI COMPOSICIONAL DELS ÀCIDS GRASSOS</b>	<b>188</b>
22.1.	COMPOSICIÓ PERCENTUAL DELS ÀCIDS GRASSOS DE LA MEMBRANA LIPÍDICA	188
22.2.	ÍNDEXS DERIVATS DE LA COMPOSICIÓ EN ÀCIDS GRASSOS	193
22.3.	GRAU D'INSATURACIÓ DE LA MEMBRANA	198
23.	<b>LA IMMUNOTRANSFERÈNCIA</b>	<b>200</b>
23.1.	PROTEÏNES DELS COMPLEXES MITOCONDRIALS I AIF	200
23.2.	PROTEÏNES RELACIONADES AMB LA BIOGÈNESI MITOCONDRIAL	204
23.3.	PROTEÏNES RELACIONADES AMB L'ESTRÈS DE RETICLE	208
24.	<b>LA PROTEÒMICA EN RESTRICCIÓ DE METIONINA</b>	<b>210</b>
25.	<b>LA MESURA DELS METABÒLITS DE LA METIONINA</b>	<b>212</b>
25.1.	METABÒLITS DE LA METIONINA EN FETGE DE RATA	212
25.2.	METABÒLITS DE LA METIONINA EN CERVELL DE RATA	212
<b>DISCUSSIÓ</b>		<b>215</b>
26.	<b>L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS SOBRE EL DANY OXIDATIU ENDOGEN</b>	<b>217</b>
27.	<b>L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS EN LA COMPOSICIÓ EN ÀCIDS GRASSOS</b>	<b>222</b>
28.	<b>L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS EN LA QUANTITAT DE LES PROTEÏNES DELS COMPLEXES MITOCONDRIALS I AIF</b>	<b>227</b>

<b>29. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA EN LES PROTEÏNES RELACIONADES AMB LA BIOGÈNESI MITOCONDRIAL EN CERVELL DE RATA</b>	<b>231</b>
<b>30. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA EN LES PROTEÏNES RELACIONADES AMB L'ESTRÈS DE RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN CERVELL DE RATA</b>	<b>236</b>
<b>31. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ DE METIONINA SOBRE LA PROTEÒMICA EN MITOCÒNDRIA DE FETGE DE RATA</b>	<b>239</b>
<b>32. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA SOBRE LA QUANTITAT DELS SEUS METABÒLITS EN CERVELL DE RATA</b>	<b>241</b>
<b>33. SUMARI</b>	<b>245</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>247</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>253</b>
<b>ANNEX I</b>	<b>277</b>
<b>ANNEX II</b>	<b>285</b>



**RESUM**



El procés biològic bàsic subjacent a l'envelliment va gaudir de l'avenc aportat per Denham Harman l'any 1956 amb la teoria de l'envelliment basada en els radicals lliures. La reacció dels radicals lliures actius (produïts fisiològicament en l'organisme) juntament amb els constituents cel·lulars, inicien els canvis associats a l'envelliment. La implicació dels radicals lliures en l'envelliment està relacionada amb el seu paper clau en l'origen i evolució de la vida. La informació disponible avui en dia ens mostra que la composició específica de les macromolècules cel·lulars (proteïnes, àcids nucleics, lípids i carbohidrats) en les espècies animals longeves tenen intrínsecament una elevada resistència a la modificació oxidativa. Això contribueix probablement a la superior longevitat d'aquestes espècies, les quals presenten també una taxa reduïda de producció de radicals lliures i de lesió oxidativa endògena. No obstant això, la correlació entre longevitat màxima i menor estrès oxidatiu és condició necessària però no suficient per a validar una teoria de l'envelliment, ja que correlació no necessàriament vol dir que hagi d'existir una relació causa-efecte.

La restricció calòrica (RC) és la manipulació experimental millor coneguda que disminueix la taxa d'envelliment i augmenta la longevitat màxima en espècies tant d'invertebrats com vertebrats, i té efectes beneficiosos per a la salut en ratolins, rates, així com en primats i humans. Troballes recents qüestionen el consens clàssic que la reducció en la ingesta de calories per si mateixes és la causa de l'augment de la longevitat en la RC. Així, es coneix que la restricció de proteïnes (RP) i la restricció de metionina (RMet) mimetitzen els efectes de la RC, produint un 50% de l'efecte de la RC en l'augment de la longevitat. Tanmateix, es desconeixen els mecanismes moleculars responsables d'aquest efecte.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat intentar esbrinar quins factors causen la disminució de l'estrès oxidatiu i l'increment de la longevitat mitjana i màxima durant la RC; sent aquesta una manera de desvetllar alguns dels mecanismes fonamentals del procés d'envelliment. Per això s'ha realitzat diferents estudis d'intervencions nutricionals en rates Wistar, aplicant RP del 40%, RMet del 40% i del 80%, restricció de tots els aminoàcids del 40% excepte la metionina i finalment, suplementació de metionina. Els resultats mostren una disminució del dany oxidatiu endogen, a nivell de l'ADN mitocondrial, i de la lesió proteica derivada de glicació i lipoxidació produïda per una reducció de proteïnes i de metionina. També s'observa una disminució de la susceptibilitat a l'oxidació lipídica, mostrant canvis en la composició dels àcids grassos. La RMet mostra també un augment de proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial, acompanyada d'una disminució dels complexos mitocondrials productors d'espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès, *reactive oxygen species*), suggerint una major eficiència mitocondrial. Tot això situa a la metionina com un aminoàcid clau en la modulació de l'estrès oxidatiu i la longevitat en rosegadors.



**RESUMEN**





El proceso biológico básico que subyace al envejecimiento fue avanzado por Denham Harman el año 1956 con la teoría del envejecimiento basada en los radicales libres. La reacción de los radicales libres activos (producidos fisiológicamente en el organismo) conjuntamente con los constituyentes celulares, inician los cambios asociados al envejecimiento. La implicación de los radicales libres en el envejecimiento está relacionada con su papel clave en el origen y la evolución de la vida. Actualmente, la información disponible nos muestra que la composición específica de las macromoléculas celulares (las proteínas, los ácidos nucleicos, los lípidos y los carbohidratos) en las especies animales longevas tienen intrínsecamente una elevada resistencia a la modificación oxidativa. Este hecho contribuye probablemente a la superior longevidad de estas especies, las cuales presentan también una tasa reducida de producción de radicales libres y lesión oxidativa endógena. Sin embargo, la correlación entre longevidad máxima y menor estrés oxidativo es condición necesaria pero no suficiente para validar una teoría del envejecimiento, porque correlación no necesariamente significa que tenga que existir una relación causa-efecto.

La restricción calórica (RC) es la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la tasa de envejecimiento y aumenta la longevidad máxima en especies tanto de invertebrados como vertebrados, y tiene efectos beneficiosos para la salud en ratones, ratas, así como en primates y humanos. Hallazgos recientes cuestionan el consenso clásico de que la reducción en la ingesta de calorías por sí mismas es la causa del aumento de la longevidad en la RC. Así, se conoce que la restricción de proteínas (RP) y la restricción de metionina (RMet) mimetizan los efectos de la RC, produciendo un 50% del efecto de la RC en el aumento de la longevidad. No obstante, se desconocen los mecanismos moleculares responsables de dicho efecto.

El objetivo de esta tesis ha sido intentar averiguar que factores causan la disminución del estrés oxidativo y el incremento de la longevidad media y máxima durante la RC; siendo ésta una forma de desvelar algunos de los mecanismos fundamentales del proceso de envejecimiento. Para ello se han realizado diferentes estudios de intervenciones nutricionales en ratas Wistar, aplicando RP del 40%, RMet del 40% y del 80%, restricción de todos los aminoácidos del 40% excepto la metionina y por último, suplementación de metionina. Los resultados muestran una disminución del daño oxidativo endógeno, a nivel del ADN mitocondrial, y de la lesión proteica derivada de glico y lipoxidación producido por una reducción de proteínas y de metionina. También se observa una disminución de la susceptibilidad a la oxidación lipídica, mostrando cambios en la composición de los ácidos grasos. La RMet muestra también un aumento de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial, acompañada de una disminución de los complejos mitocondriales productores de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*), sugiriendo una mayor eficiencia mitocondrial. Todo ello sitúa a la metionina como un aminoácido clave en la modulación del estrés oxidativo y la longevidad en roedores.



**ABSTRACT**



The basic chemical process underlying aging was first advanced by Denham Harman in 1956 with the free radical theory of aging. The reaction of active free radicals, normally produced in the organisms, together with cellular constituents, initiates the changes associated with aging. The involvement of free radicals in aging is related to their key role in the origin and evolution of life. Nowadays, the available information shows that the specific composition of tissue macromolecules (proteins, nucleic acids, lipids and carbohydrates) in long-lived animal species gives them an intrinsically high resistance to modification that likely contributes to the superior longevity of these species, which also show a reduced rate of production of free radicals and endogenous oxidative damage. However, the correlation between maximum longevity and lower oxidative stress condition is necessary but not sufficient to validate a theory of aging, because correlation does not necessarily mean that it has to be a cause-effect relationship.

Calorie restriction (CR) is the best known experimental manipulation that decreases the rate of aging and increases the maximum longevity in species ranging from invertebrates to vertebrates. It also has beneficial effects in health of mice, rats, primates and humans. Recent findings challenge the traditional consensus that the reduction in caloric intake by itself is the cause of increased longevity in the CR. It is known that protein restriction (PR) and methionine restriction (MetR) mimic the effects of CR, producing 50% of the CR effect in increasing longevity. However, the molecular mechanisms responsible for this effect are unknown.

The aim of this study has been to elucidate the factors causing the reduction of oxidative stress and the mean and maximum longevity increase during the CR, in order to try to unravel some of the fundamental mechanisms of aging. In the present work, we have used different kinds of nutritional interventions in Wistar rats, like a 40% of PR, 40% and 80% of MetR, 40% of amino acids restriction except methionine, and finally, a methionine supplementation. Results show that protein and methionine restriction induce a significant decrease in endogenous oxidative molecular damage at the level of mitochondrial DNA and protein injury, albanderived from glyco and lipoxidative damage. These interventions also produce changes in the amino acid composition, showing a decrease in the susceptibility to lipid peroxidation. The MetR also shows an increase of proteins related to mitochondrial biogenesis, which is accompanied by a decrease in mitochondrial complexes, which produce the reactive oxygen species (ROS), suggesting increased mitochondrial efficiency. All these results place the methionine as a key aminoacid to modulate oxidative stress and longevity in rodents.



## **ABREVIACIONES**





<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADP</b>	Difosfat d'adenosina; de l'anglès, <i>adenosine diphosphate</i>
<b>AGD</b>	Malaltia de grans argidòfils ; del anglès, <i>argyrophilic grain disease</i>
<b>AHAC</b>	Àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic
<b>AHAV</b>	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric
<b>Ala</b>	Alanina
<b>AMP</b>	Monofosfat d'adenosina; de l'anglès, <i>adenosine monophosphate</i>
<b>AMPK</b>	AMP quinasa; de l'anglès, <i>adenine monophosphate-activated kinase</i>
<b>ARE</b>	De l'anglès, <i>antioxidant response element</i>
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ARNm</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Àcid aspàrtic
<b>ATF6/4</b>	Factor activador transcripcional; de l'anglès, <i>activating transcription factor 6/4</i>
<b>ATP</b>	Trifosfat d'adenosina; de l'anglès, <i>adenosine triphosphate</i>
<b>cAMP</b>	Monofosfat d'adenosina cíclic; de l'anglès, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>CEL</b>	N <sup>ε</sup> -carboxietil-D,L-lisina
<b>CHAPS</b>	De l'anglès, <i>3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate</i>
<b>CMC</b>	N-carboximetil-cisteïna
<b>CML</b>	N <sup>ε</sup> -carboximetil-lisina
<b>CPS</b>	Carbamoil fosfat sintasa; de l'anglès, <i>carbamoyl phosphate synthetase</i>
<b>Cys</b>	Cisteïna
<b>dG</b>	Desoxiguanosina
<b>DTPAC</b>	Àcid dietilenetriaminopentaacètic
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiamintetraacètic, de l'anglès, <i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
<b>eIF2α</b>	Factor eucariòtic iniciador de la traducció; de l'anglès, <i>eukaryotic initiation factor 2α</i>

<b>GC/MS</b>	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses; de l'anglès, <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
<b>GH</b>	Hormona del creixement; de l'anglès, <i>growth hormone</i>
<b>Glu</b>	Àcid glutàmic
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GRP78/94</b>	Proteïna reguladora de la glucosa 78/94; de l'anglès, <i>glucose regulated protein 78/94</i>
<b>GSH</b>	Glutatió reduït
<b>GSK-3</b>	Quinasa glicogen sintasa-3; de l'anglès, <i>glycogen synthase kinase-3</i>
<b>GSSG</b>	Glutatió oxidat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peròxid d'hidrogen
<b>Hcys</b>	Homocisteïna
<b>Hepes</b>	De l'anglès, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
<b>His</b>	Histidina
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució (de l'anglès, <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>Hsp</b>	Proteïnes de xoc tèrmic; de l'anglès, <i>heat shock proteins</i>
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoc
<b>IGH-1</b>	Factor de creixement insulínic del tipus 1; de l'anglès, <i>insulin-like growth factor 1</i>
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>IRE1</b>	De l'anglès, <i>Inositol Requiring Element 1</i>
<b>KEAP1</b>	De l'anglès, <i>kech-like ech-associated protein 1</i>
<b>LC ESI-QTOF MS</b>	Cromatografia líquida amb ionització per electroesprai acoblada a un quadrupol de temps de vol. amb detecció per espectrometria de masses; de l'anglès, <i>liquid chromatography with electrospray ionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografia líquida amb detector de masses-masses; de l'anglès, <i>liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry</i>
<b>Leu</b>	Leucina
<b>Lys</b>	Lisina
<b>m/z</b>	massa/càrrega

<b>MALDI-TOF</b>	De l'anglès, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time-Of-Flight</i>
<b>MAPK</b>	Proteïna quinasa; de l'anglès, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>MDAL</b>	Malondialdehid-lisina
<b>Met</b>	Metionina
<b>MOPS</b>	De l'anglès, <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
<b>mTFA</b>	Factor transcripcional mitocondrial A; de l'anglès, <i>mitochondrial transcription factor A</i> )
<b>mTFb1</b>	Factor transcripcional mitocondrial b1; de l'anglès, <i>mitochondrial transcription factor b1</i> )
<b>mTFb2</b>	Factor transcripcional mitocondrial b2; de l'anglès, <i>mitochondrial transcription factor b2</i> )
<b>NAD<sup>+</sup> / NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid
<b>NRF-1</b>	Factor respiratori nuclear 1; de l'anglès, <i>nuclear respiratory factor-1</i>
<b>NRF-2</b>	Factor respiratori nuclear 2; de l'anglès, <i>nuclear respiratory factor-2</i>
<b>Nrf2/NF-E2 related factor 2</b>	Factor nuclear (NF-E2) 2; de l'anglès, <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
<b>8-oxodG</b>	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
<b>PDI</b>	De l'anglès, <i>protein disulfur isomerase</i>
<b>PERK</b>	De l'anglès, <i>double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
<b>PGC-1</b>	De l'anglès, <i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1</i>
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>PiD</b>	Malaltia de Pick; de l'anglès, <i>pick disease</i>
<b>PPAR<math>\alpha</math>/<math>\delta</math>/<math>\gamma</math></b>	Receptors activadors i proliferadors del peroxisoma $\alpha$ / $\delta$ / $\gamma$ ; de l'anglès, <i>peroxisome proliferator-activated receptors <math>\alpha</math>/<math>\delta</math>/<math>\gamma</math></i>
<b>PRC</b>	De l'anglès, <i>PGC-1-related receptor coactivator</i>
<b>PVDF</b>	Poliflorur de vinilidè
<b>RAAs(-Met)</b>	Restricció d'aminoàcids excepte la metionina
<b>RC</b>	Restricció calòrica
<b>RE</b>	Reticle endoplasmàtic

<b>RIP140</b>	De l'anglès; <i>receptor-interacting protein 140</i>
<b>RMet</b>	Restricció de metionina
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen; de l'anglès, <i>reactive oxygen species</i>
<b>RP</b>	Restricció proteica
<b>SAAA</b>	Semialdehid amino-adípic
<b>SAG</b>	Semialdehid glutàmic
<b>SAH</b>	S-adenosil-homocisteïna
<b>SAM</b>	S-adenosil-metionina
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfat de sodi; de l'anglès, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
<b>Ser</b>	Serina
<b>SIM</b>	Monotorització de ions específics seleccionats; de l'anglès, <i>selected ion monitoring</i>
<b>Sir2</b>	De l'anglès, <i>silent information regulator 2</i>
<b>SIRT</b>	Sirtuina, de l'anglès, <i>sirtuin</i>
<b>SMet</b>	Suplementació de metionina
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometà
<b>TRIS-HCl</b>	Tris(hidroximetil)aminometà-àcid clorhídric
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UCPs</b>	Proteïnes desacobladores; de l'anglès, <i>uncoupling proteins</i>
<b>UPR</b>	Resposta a les proteïnes desplegadas; de l'anglès, <i>unfolded protein response</i>
<b>Val</b>	Valina
<b>XBP1</b>	De l'anglès, <i>X-box binding protein 1</i>

## **ÍNDIX DE TAULES**



<b>Taula 1</b> Teories clàssiques i modernes que intenten explicar el procés d'envelliment a diferents nivells d'organització biològica.....	54
<b>Taula 2</b> Espècies reactives d'oxigen.....	59
<b>Taula 3</b> Productes de l'oxidació d'aminoàcids en proteïnes.....	80
<b>Taula 4</b> Composicions de les dietes ingerides pels dos grups en l'experiment de restricció proteica del 40%.....	134
<b>Taula 5</b> Composicions de les dietes ingerides pels tres grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció de metionina del 80%.....	135
<b>Taula 6</b> Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció de metionina del 80%.....	136
<b>Taula 7</b> Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció del 40% de tots els aminoàcids excepte la metionina.....	137
<b>Taula 8</b> Composicions de les dietes ingerides pels dos grups experimentals en la intervenció nutricional de suplementació de metionina x 2,9.....	138
<b>Taula 9</b> Reactius utilitzats en tots els experiments realitzats.....	141
<b>Taula 10</b> Relació dels ions de m/z d'analits mesurats mitjançant GC/MS.....	153
<b>Taula 11</b> Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.....	159
<b>Taula 12</b> Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.....	162
<b>Taula 13</b> Anàlisi composicional dels aminoàcids en mitocondria de fetge de rata en l'experiment de restricció proteica del 40%.....	175
<b>Taula 14</b> Anàlisi composicional dels aminoàcids en Cervell de rata en l'experiment de restricció de metionina del 80%.....	176
<b>Taula 15</b> Composició lipídica de les mitocondries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció proteica del 40%.....	189
<b>Taula 16</b> Composició lipídica de les mitocondries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció de Metionina del 40 i 80%.....	190
<b>Taula 17</b> Composició lipídica del cervell de rata Wistar en l'experiment de restricció de metionina del 80%.....	191
<b>Taula 18</b> Composició lipídica de les mitocondries de fetge de rata Wistar en l'experiment de restricció del 40% de tots els aminoàcids excepte la metionina.....	192
<b>Taula 19</b> Composició lipídica de les mitocondries de fetge de rata Wistar en l'experiment de suplementació de metionina x 2,9.....	193
<b>Taula 20</b> Proteïnes identificades mitjançant MALDI-TOF.....	211





## **ÍNDEX DE FIGURES**



<b>Figura 1</b> Una possible classificació de les teories de l'envelliment i alguns exemples.....	52
<b>Figura 2</b> Reacció Fenton-Haber-Weiss. ....	58
<b>Figura 3</b> Sistema d'oxidació fosforilativa mitocondrial. ....	61
<b>Figura 4</b> Equacions de les reaccions que es donen en la cadena de transport electrònic mitocondrial. ....	62
<b>Figura 5</b> Principals espècies reactives d'oxigen derivades de la reducció univalent de l'oxigen molecular. ....	62
<b>Figura 6</b> Recorreguts possibles dels electrons dins de la cadena de transport electrònic i els possibles llocs de fuga d'electrons i generació del radical superòxid. ....	65
<b>Figura 7</b> Tipus d'antioxidants. ....	73
<b>Figura 8</b> Estructures químiques dels productes intermediaris de segona generació. ....	76
<b>Figura 9</b> Esquema de reacció radicalària amb àcids grassos en cadena.....	78
<b>Figura 10</b> Esquema de formació dels semialdehid glutàmic (SAG) i aminoadípnic (SAAA) i dels seus productes de reducció, l'àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric (AHAV) i l'àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic (AHAC). ....	82
<b>Figura 11</b> Esquema de la reacció de Maillard. ....	83
<b>Figura 12</b> Rutes químiques bàsiques i productes de la reacció de Maillard rellevants in vivo. .	84
<b>Figura 13</b> Estructura química dels productes de glicació avançada detectats in vivo. ....	85
<b>Figura 14</b> Estructura del nucleòsid 2'-deoxiguanosina i del producte de la seva oxidació mitjançant espècies reactives d'oxigen endògenes. ....	88
<b>Figura 15</b> Principals vies metabòliques implicades en el metabolisme dels aminoàcids sulfurats. ....	99
<b>Figura 16</b> Cicle d'oxidació-reducció de la metionina.....	102
<b>Figura 17</b> Resposta a les proteïnes mal plegades i l'estrès de reticle endoplasmàtic. ....	112
<b>Figura 18</b> Vies principals que governen la funció i la biogènesi mitocondrial. ....	119
<b>Figura 19</b> Cromatogrames SAM, [H <sup>2</sup> ] <sub>3</sub> -Met, Met i SAH. ....	171
<b>Figura 20</b> 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). ....	177
<b>Figura 21</b> 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)..	178
<b>Figura 22</b> Nivells de semialdehid amino-adípnic 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).....	178

<b>Figura 23</b> Nivells de N <sup>ε</sup> -(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).....	179
<b>Figura 24</b> Nivells de N <sup>ε</sup> -(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).....	180
<b>Figura 25</b> Esquema de formació dels biomarcadors N <sup>ε</sup> -carboximetil-lisina (CML) i N <sup>ε</sup> -carboximetil-cisteïna (CMC). .....	181
<b>Figura 26</b> Nivells de N <sup>ε</sup> -(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).....	182
<b>Figura 27</b> Cromatograma d'abundància-temps d'una mostra de CMC analitzada per GC/MS.	183
<b>Figura 28</b> Patró de fragmentació de la molècula S-carboximetil-cisteïna (CMC). .....	184
<b>Figura 29</b> 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).....	184
<b>Figura 30</b> Patró de fragmentació de la molècula U- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>15</sup> N-carboximetil-cisteïna (U- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>15</sup> N-CMC). .....	185
<b>Figura 31</b> Cromatogrames abundància/temps de mostres de mitocòndria de fetge de rata..	185
<b>Figura 32</b> Nivells de S-(Carboximetil)-cisteïna (CMC) en fetge en l'experiment de RMet40-80%. .....	186
<b>Figura 33</b> Possibles mecanismes de formació de N <sup>ε</sup> -carboximetil-cisteïna (CMC) i N <sup>ε</sup> -carboximetil-lisina (CML) a partir de glioxal i els aminoàcids respectius, cisteïna o lisina.....	187
<b>Figura 34</b> Registres del cromatògraf de gasos per a l'anàlisi composicional en àcids grassos. ....	188
<b>Figura 35</b> La longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos analitzats. ....	194
<b>Figura 36</b> Índex d'Àcids grassos saturats (AGS). .....	195
<b>Figura 37</b> Índex d'Àcids grassos insaturats (AGI). .....	195
<b>Figura 38</b> Índex d'Àcids grassos monoinsaturats (AGMI). .....	196
<b>Figura 39</b> Índex d'Àcids grassos poliinsaturats (AGPI) .....	196
<b>Figura 40</b> Índex d'Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6). .....	197
<b>Figura 41</b> Índex d'Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3). .....	198
<b>Figura 42</b> Índex de dobles enllaços. ....	199
<b>Figura 43</b> Índex de peroxidizabilitat. ....	199
<b>Figura 44</b> Quantitat de les subunitats CI <sup>a</sup> (NDUFA9) i CI <sup>b</sup> (NDUFS3) del complex I. ....	200
<b>Figura 45</b> Quantitat de la subunitat Flavoprotein del complex II. ....	201

<b>Figura 46</b> Quantitat de les subunitats CIII <sup>a</sup> (CORE 2) i CIII <sup>b</sup> (Rieske Iron-Sulfur) del complex III. ....	202
<b>Figura 47</b> Quantitat de la subunitat COXI del complex IV. ....	203
<b>Figura 48</b> Quantitat de la flavoproteïna mitocondrial anomenada factor d'inducció d'apoptosis (Apoptosis-Inducing Factor, AIF). ....	203
<b>Figura 49</b> Quantitat de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ ) i la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (Uncoupling Protein 4). ....	204
<b>Figura 50</b> Quantitat de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ ), de la sirtuïna SIRT1 (sirtuin 1) i del factor nuclear de respiració Nrf2 (NF-E2 related factor 2) .....	205
<b>Figura 51.</b> Quantitat de la proteïna sirtuïna SIRT1 (sirtuin 1) (I); de la proteïna coordinadora de la biogènesi mitocondrial PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ ) (II); del factor nuclear de respiració NRF1 (nuclear respiratory factor1) (III), del factor de transcripció mitocondrial A (mitochondrial transcription factor A). ....	206
<b>Figura 52</b> Quantitat del factor nuclear Nrf2 (NF-E2 related factor 2) (I) i de la superòxid dismutasa Cu/Zn (SOD1) (II). ....	207
<b>Figura 53</b> Quantitat de la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (Uncoupling Protein 4). ....	207
<b>Figura 54</b> Quantitat de les proteïnes xaperones i relacionades amb el reticle endoplasmàtic. ....	208
<b>Figura 55</b> Imatges dels gels tenyits amb plata, de la mostra del grup control i grup de RMet, esquerra dreta, respectivament. ....	210
<b>Figura 56</b> Nivells de S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteïna (SAH) i la relació SAM/SAH. ....	212
<b>Figura 57</b> Nivells de metionina (I), S-adenosilmetionina (SAM) (II), S-adenosilhomocisteïna (SAH) (III), la relació Met/SAM (IV) i la relació SAM/SAH (V). ....	213
<b>Figura 58</b> Biosíntesi dels àcids grassos de cadena llarga en els mamífers. ....	226



# **INTRODUCCIÓ**





## 1. L'ENVELLIMENT

### 1.1. La perspectiva històrica

El concepte d'envelliment ha anat canviant al llarg de la història, influït per tot, tant per la religió i la filosofia com per la ciència i la medicina. Cada societat i cada moment històric ha viscut aquest fenomen d'una manera diferent, però mai s'ha mostrat indiferent (Pamplona 2009). Avui dia, tal i com es porta fent durant mil·lennis, la humanitat continua lluitant contra les malalties, la por a la mort i la recerca de la immortalitat. Quin és el límit de la vida humana? La ciència pot oferir-nos estratègies per allargar la nostra expectativa de vida i permetre'ns una vida saludable? Existeix alguna combinació miraculosa que impossibiliti l'envelliment i les malalties associades? Quins són els components estructurals i els mecanismes fisiològics determinants del procés d'envelliment i de la longevitat? Quin és el paper que juguen aquests mecanismes en l'aparició de les malalties associades a l'edat, com la diabetis, l'arteriosclerosi i les malalties neurodegeneratives? Es pot allargar la longevitat de l'espècie humana? La comprensió i el coneixement de com i perquè es produeix el procés biològic de l'envelliment és essencial per a prendre decisions sobre la nostra salut, qualitat de vida i longevitat, i posar un granet de sorra més en aquest coneixement és el que es pretén en aquest treball que teniu en mans.

La persona més longeva documentada fins al moment ha estat la francesa Jeanne Calment, la qual va viure durant 122 anys i 164 dies. Tot i l'extraordinària longevitat, actualment, a data de 8 de juny del 2010, la precedeixen 77 persones (74 dones i 3 homes) amb l'edat igual o superior a 110 anys segons la base de dades creada pel grup de recerca americà *Gerontology Research Group* (Gerontology Research Group 2010). És a dir, no va ser un cas aïllat, sinó que avui dia existeixen persones que viuen fins als 110 anys. A més a més, 1 de cada 10000 persones dels països industrialitzats són centenaris. Segons les Nacions Unides, a l'any 2025 hi haurà 822 milions d'habitants al món amb l'edat de 65 anys o superior. La població gran creixerà amb un factor de 2,5 entre 1990 i 2025. Aquest creixement és superior al creixement de la població total, fet que suposa un increment de la població gran del 6,2 al 9,7% (Naudí et al. 2007b).

L'augment de l'expectativa de vida relacionada amb la millora en salut és el motiu més remarcable dels canvis en demografia del segle passat. L'expectativa de vida ha augmentat més del doble aquest temps, anant dels 30 als anys 1900 fins als 65 a l'any 2000, i la seva projecció apunta que a finals d'aquest segle s'arribi als 81 anys d'edat. Els fets històrics més remarcables els quals han ajudat a disminuir la mortalitat infantil recauen en les millores en salut pública, com el sanejament de l'aigua corrent i els descobriments mèdics, com les vacunes i els antibiòtics. Per contra, l'expectativa de vida guanyada les passades dècades, especialment en els països industrialitzats, està associada bàsicament a les reduccions de mortalitat en persones grans i de mitjana edat. Aquestes reduccions estan típicament associades a les millores en tecnologia mèdica, canvis en estils de vida i un augment considerable dels ingressos.

Quins són els components estructurals i els mecanismes fisiològics que determinen el procés d'envelliment? Perquè els humans poden arribar a viure, fins al moment, fins als 122 anys mentre que les rates tot just viuen 4 anys? "Fins quan es pot incrementar la longevitat en humans?" Aquesta és una de les preguntes que va tenir una menció especial en el recent 125è aniversari de la revista *Science* l'any 2005. En aquesta publicació la revista americana va proposar 125 preguntes considerades fronteres de la ciència en els propers 25 anys. Una resposta a la pregunta, si és possible, podria sorgir de molt variades vies d'investigació, però possiblement la més important podria ser l'examen de com la natura determina la gran diversitat de longevitats màximes al llarg de tot el regne animal.

## **1.2. Definició d'envelliment**

Dehman Harman va postular que l'envelliment és el resultat de la progressiva acumulació de canvis en les nostres cèl·lules i teixits que succeeixen amb el pas del temps. El procés d'envelliment suposa una pèrdua progressiva del rendiment fisiològic i una incapacitat per a mantenir l'homeòstasi, entesa com a equilibri funcional que ens permet respondre adequadament a les modificacions del nostre organisme enfront a estímuls tan interns com externs; fets que incrementen la probabilitat de sofrir una malaltia i/o la mort per a l'individu.

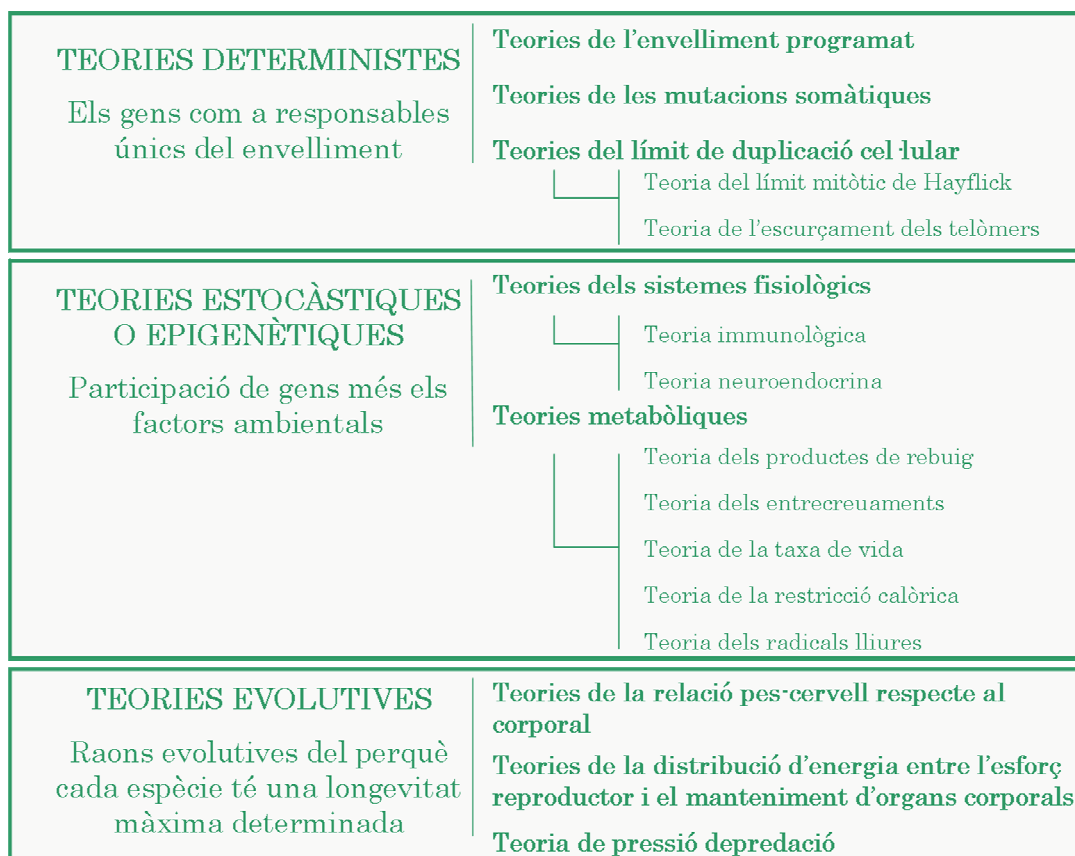
Una teoria amb capacitat explicativa i predictiva del procés d'envelliment hauria d'ajustar-se a les quatre característiques bàsiques del procés, postulades pel

gerontòleg Bernard Strehler: l'envelliment és progressiu, endogen, irreversible i deleteri per a l'individu (Strehler 1962). El caràcter progressiu de l'envelliment significa que la/les causa/es del envelliment han d'estar presents durant tota la vida, tant en individus joves com en individus d'edat avançada. L'envelliment és un procés endogen, per tant, els factors exògens (per exemple, les radiacions UV i els antioxidants de la dieta) no són la causa del procés intrínsec de l'envelliment, fet que no exclou que puguin interaccionar amb les causes endògenes potenciant o reduint els seus efectes. El caràcter endogen de l'envelliment significa que la velocitat d'envelliment de les diferents espècies animals, i per tant, la seva longevitat màxima, està genòtipicament determinada, no influenciada per l'ambient. Això explica perquè moltes espècies animals envelleixen a velocitats molt diferents en ambients molt similars. Per contra, la longevitat mitjana, que es calcula a partir de la quantitat de temps que viu cada individu, està bàsicament determinada per l'ambient i en un menor grau, pel genotip. Aquesta és la raó de perquè molts factors ambientals tals com el tabaquisme, la quantitat de grasses saturades de la dieta, les dietes desequilibrades, la vida sedentària i possiblement els antioxidants, són tan importants per a la determinació de l'expectativa de vida. I a la inversa, independentment del què mengi un elefant, mai envellirà com una rata sana i cap dieta farà que un ratolí pugui sobreviure fins als 85 anys. Així doncs, no s'ha de confondre mortalitat amb envelliment, tot i que l'envelliment augmenta la probabilitat de morir. En relació amb això últim, la variació interindividual en l'expectativa de vida dins d'una espècie donada (principalment per causes ambiental) no s'hauria de confondre amb les variacions interespecífiques en la longevitat màxima (la qual està genèticament determinada).

### **1.3. Teories de l'envelliment**

L'anàlisi dels mecanismes que determinen la duració de la vida dels animals, inclòs l'ésser humà, va iniciar-se quan el desenvolupament de les ciències experimentals va permetre abordar adequadament aquesta qüestió, això no va succeir fins al segle XIX. Al llarg de tot aquest temps s'han proposat un gran nombre de teories per a definir l'envelliment. Medvedev (Medvedev 1990) va revisar més de 300 teories l'any 1990, i el nombre ha anat augmentant (Figura 1). Totes aquestes teories podrien agrupar-se en dos grans blocs, les teories deterministes i les estocàstiques. Les primeres engloben totes aquelles teories que consideren els gens com a únics responsables del envelliment; és a dir, segons aquestes el procés d'envelliment estaria genèticament

programat. En el segon grup, el de les teories estocàstiques o epigenètiques, quedarien incloses totes les que tot i tenir en compte la participació dels gens, consideren que els factors ambientals juguen un paper important. En aquest grup es parla d'acumulació progressiva i danys irreversibles a l'atzar com a definició d'envelliment.



**Figura 1** Una possible classificació de les teories de l'envelliment i alguns exemples. (De la Fuente 2009).

Dos teories deterministes destacades són la teoria del límit mitòtic de Hayflick i la teoria dels telòmers i la telomerasa. La teoria de Hayflick afirma que les cèl·lules tenen un rellotge endogen que marca el nombre de divisions que són capaces de tenir *in vitro*, però no es capaç d'explicar-ho *in vivo*, en cèl·lules postmitòtiques (d'escassa o nul·la proliferació). El mateix passa amb la teoria dels telòmers i la telomerasa, la qual postula que l'escurçament en cada divisió cel·lular dels extrems dels cromosomes, els telòmers, estaria relacionat amb la taxa d'envelliment, de manera que el final de la divisió cel·lular es produiria quan s'arribés a l'escurçament total dels mateixos. Però aquesta teoria presenta moltes controvèrsies i una de clara és que els mamífers no moren com a resultat de l'esgotament del seu potencial mitòtic. Totes aquestes teories no expliquen el com envellim. És evident que la longevitat màxima, que varia

considerablement entre les diferents espècies, té una base genètica, però només un 1,8% dels gens investigats mostren canvis en la seva expressió durant l'envelliment (Vijg 1999). A més a més, els gens no controlen l'envelliment de forma directa, ho fan indirectament a través de múltiples mecanismes protectors o destructors de l'organització biològica inicial de l'organisme adult. Ara per ara, les dades disponibles demostren que només amb els "gerontogens" no resulta fàcil explicar l'envelliment dels individus (Vijg 1999).

Dins de les teories estocàstiques es diferencien dos subgrups, les teories dels sistemes fisiològics i les teories metabòliques. Les teories de l'envelliment del sistema fisiològic es basen en la demostrada disminució del rendiment funcional que té lloc a l'envellir i ho relacionen amb el sistema nerviós, endocrí i immunitari. Però per molt importants que siguin aquests sistemes, no tots els organismes que envelleixen tenen sistemes neuroendocrins o immunitaris complexes, és a dir, no són teories amb caràcter d'universalitat. L'altre subgrup, les teories metabòliques es centren amb les alteracions que el metabolisme experimenta al llarg del temps. Per exemple, la teoria de l'acumulació de productes de rebuig es basa en el fet de que totes les cèl·lules postmitòtiques van acumulant amb el temps productes del metabolisme que no poden ser renovats. Com a més rellevants tenim els pigments de lipofuscina, anomenats també "pigments de l'envelliment", els quals s'acumulen a l'interior de les cèl·lules d'animals vells i estan compostos per lípids i proteïnes d'alt grau de degradació, són insolubles i probablement estan oxidats. Però més que una causa seria un marcador d'envelliment. Una altra teoria rellevant dins de les metabòliques és la de *rate-of-living* (Pearl 1928). Segons aquesta, la longevitat màxima de les diferents espècies animals és inversament proporcional al metabolisme basal característic de cada espècie.

Per últim, existeixen un grup de teories evolutives de l'envelliment les quals intenten explicar el perquè de l'envelliment, en comptes del com. Aquestes teoritzen sobre el perquè cada espècie animal té una determinada longevitat màxima o velocitat d'envelliment. Entre les més curioses, existeix la que estableix un relació del pes del cos de l'animal i la seva longevitat, la qual es va perfilar posteriorment, concretant en vertebrats a la relació entre el pes del cervell i el pes promig de l'animal. Així, una espècie viu més quan més gran és l'excés de pes cerebral respecte del corporal. Es podria respondre al perquè té lloc l'envelliment dient que és la conseqüència de

mantenir una adequada activitat vital que permeti la reproducció i el manteniment de l'espècie.

La tasca de revisar aquestes teories és molt difícil ja que són molt específiques o estan ja desfasades. Tot i així, algunes de les hipòtesis antigues han ajudat a establir les bases del coneixement actual de l'envelliment per a la comunitat científica. En la Taula 1 es resumeixen les teories clàssiques i modernes que ens han servit per a oferir una explicació més satisfactòria de tots els aspectes de l'envelliment i per arribar a la teoria actual. La teoria acceptada actualment per a l'explicació de l'envelliment és la teoria dels radicals lliures, la qual va ser inicialment proposada per Harman als anys 50 (Harman 1956).

**Taula 1** Teories clàssiques i modernes que intenten explicar el procés d'envelliment a diferents nivells d'organització biològica.

(De la Fuente 2009) .

Autor (any de la publicació)	Concepte clau / causa de l'envelliment que aporta
<b>Weisman</b> (1891)	La causa de l'envelliment és la divisió del treball que van emprendre les cèl·lules dels organismes pluricel·lulars: amb cèl·lules que mostren una longevitat il·limitada, les germinals amb poder regeneratiu, i altres que envelleixen, les somàtiques, que són les que es distribueixen el treball i són més diferenciades.
<b>Minot</b> (1907)	L'envelliment és el "preu pagat per la diferenciació cel·lular".
<b>Pearl</b> (1928)	Envellir és l'efecte secundari del metabolisme.
<b>Williams</b> (1957)	L'envelliment és conseqüència dels efectes secundaris del producte dels gens que seran beneficiosos per aconseguir el màxim rendiment funcional en l'edat de reproducció, però que resultaran nocius després.
<b>Harman</b> (1956)	L'envelliment es degut a les lesions causades pels radicals lliures de l'oxigen.
<b>Miquel</b> (1980-1991)	L'envelliment és conseqüència de la vulnerabilitat del genoma mitocondrial a l'oxidació en les cèl·lules diferenciades postmitòtiques.

La teoria postula que els radicals lliures derivats del oxigen són els responsables del dany associat a l'envelliment. Posteriorment, el mateix Harman (Harman 1972) i un altre autor, Jaime Miquel (Miquel et al. 1980) van concretar la idea que les espècies

reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès, *Reactive Oxygen Species*) dins de la cèl·lula, es produeixen especialment per la cadena de transport electrònic mitocondrial. Actualment, aquesta teoria rep cada vegada més recolzament en base a les evidències obtingudes des de diferents paradigmes experimentats (Sanz, Pamplona & Barja 2006), a saber: i) les diferències en longevitat màxima i consegüentment en la velocitat d'envelliment, que és característic de l'espècie, ii) els canvis associats a l'edat que té lloc en un individu; i iii) les intervencions experimentals que modulen la taxa d'envelliment, així com les diferents longevitats de soques i mutants específics dins d'una mateixa espècie. D'acord amb el que s'ha exposat anteriorment, la teoria de l'envelliment basada en els radicals d'oxigen d'origen mitocondrial aparentment integra les quatre premisses considerades: els radicals d'oxigen es produeixen endogenament a nivell mitocondrial en condicions fisiològiques normals, es produeixen contínuament al llarg de la vida, i els seus efectes deleteris sobre les macromolècules poden produir lesions irreversibles durant l'envelliment especialment en aquells teixits post-mitòtics, precisament on aquests canvis són més rellevants (Pamplona, Barja 2007).

## **2. L'ESCENARI DE L'ESTRÈS OXIDATIU**

### **2.1. La història natural de l'oxigen**

L'oxigen va aparèixer en quantitats significatives a l'atmosfera terrestre (sobre un 1%) fa 2700 milions d'anys, i les evidències geològiques suggereixen que va ser degut a l'activitat fotosintètica dels cianobacteris (Lane 2003). A mesura que descomponien l'aigua per cobrir els seus requeriments essencials d'àtoms d'hidrogen, per tal d'obtenir poder reductor per conduir el seu metabolisme, els microorganismes alliberaven tones d'oxigen a l'atmosfera (Falkowski, Godfrey 2008). Els primers organismes eucariotes posseïdors de mitocòndries, resultants d'una via endosimbiòtica i de transferència lateral de gens a cèl·lules hostes eucariotes, van aparèixer fa entre 2300 i 2000 milions d'anys quan l'increment del nivell d'oxigen va ser entre un 5 i un 18% (Embley, Martin 2006). El lent increment d'oxigen en l'atmosfera va ser acompanyat de la formació de la capa d'ozó en l'estratosfera. Tant l'oxigen com la capa d'ozó van representar filtres contra la intensa llum solar que arribava a nivell superficial de la terra. Quan l'atmosfera terrestre va arribar als nivells d'oxigen del 20%, tal i com la coneixem actualment, les formes de vida anaeròbia existents en aquell moment es van adaptar, van morir o es van restringir en aquells llocs en els que la presència d'oxigen era



residual, sinó nul·la (Halliwell, Gutteridge 2007). Els organismes que van adaptar la seva capacitat per fer front a l'oxigen van ser els que van tenir més èxit donat que aquestes adaptacions van permetre la utilització de l'oxigen per a la producció eficient d'energia i altres reaccions metabòliques. La vida aeròbia va invocar nous reptes i va exigir innovacions metabòliques que, a la vegada, van permetre el sorgiment dels organismes multicel·lulars complexos (Pamplona, Barja 2007).

En aquest escenari d'evolució, les cèl·lules vives sorgides com a sistemes oberts, intercanvien matèria i energia amb el seu entorn, extraient i canviant energia per a mantenir-se a ells mateixos en un sistema dinàmic distant de l'equilibri. Una de les propietats distintives dels organismes vius és el gran grau de complexitat química i organització molecular, amb les funcions ben definides i les estretes interaccions ben regulades per cada un dels seus components. La interconnexió de totes les seqüències de reaccions entre tots els metabòlits cel·lulars constitueix el metabolisme cel·lular (Lehninger, Nelson & Cox 2005). El metabolisme està adaptat i optimitzat per aconseguir el balanç i economia (Melendez-Hevia, Montero-Gomez & Montero 2008). Per tant, un dels trets involucrats en l'evolució biomolecular és el fet de reduir les reaccions secundàries indesitjades (Pamplona, Constantini 2010). De fet, però, les reaccions incontrolades i potencialment perjudicials succeeixen, inclús en condicions fisiològiques. Les reaccions de reducció-oxidació (redox) són el nucli de la maquinària metabòlica (es reaccions redox consisteixen en la transferència d'electrons o àtoms d'hidrogen des d'una molècula a una altra). Amb l'excepció dels anaerobis i espècies aerotolerants, tots els organismes requereixen de l'oxigen per a l'eficient producció d'energia amb la utilització de les cadenes de transport electrònic que finalment donen electrons a l'oxigen (el qual és un acceptor electrònic ideal en els sistemes biològics), com succeeix en les mitocondries de les cèl·lules eucariotes i en les membranes de les cèl·lules de moltes bactèries.

## 2.2. La toxicitat de l'oxigen

L'any 1878 es va publicar el treball de Paul Bert "*La pression barométrique: recherches de physiologie experimentale*", on es descriuen els efectes tòxics de l'aire i l'oxigen sotmesos a elevades pressions, així com l'oxigen sotmès només a altes concentracions (Bert 1878). Aquest va ser el primer experiment que va demostrar la toxicitat de l'oxigen en animals (Pamplona, Barja 2010). Durant els dos primers terços

del segle XX es van anar acumulant dades relatives a la letalitat i patologia associada a l'esmentat element. Així, es va constatar que la toxicitat de l'oxigen era particularment aguda en animals homeoterm<sup>a</sup>, mentre que en poiquiloterm<sup>b</sup> aquesta toxicitat augmentava en funció de la temperatura ambiental, suggerint l'existència d'una relació entre la toxicitat de l'oxigen i la taxa metabòlica. Tres sistemes orgànics es mostren especialment sensibles en animals sotmesos a elevades tensions d'oxigen (Halliwell, Gutteridge 2007). La majoria de mamífers exposats a un 100% d'oxigen normobàric condueix a la lesió pulmonar incloent edema, hemorràgies i la mort en pocs dies (efecte Lorraine-Smith). A nivells inferiors (entre 60-100% d' O<sub>2</sub>), la retina de nounats prematurs poden lesionar-se (fibroplasia retrolental) originant una ceguera permanent. En condicions hiperbàriques de pressions d'O<sub>2</sub> (200-300 kPa o superior) apareix una toxicitat aguda que afecta al sistema nerviós (efecte Paul Bert) amb convulsions i mort en hores o minuts. De fet, però, durant moltes dècades l'explicació científica a la causa de les reaccions nocives de l'oxigen no va existir.

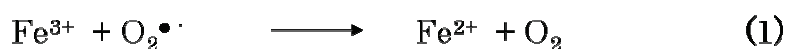
### 2.3. L'origen de la teoria dels radicals lliures

L'origen de la teoria del envelliment basada en l'estrès oxidatiu ens situa a finals del segle XIX (Pamplona, Barja 2010), quan Fenton (1984) va descobrir que el Fe(II) catalitzava l'oxidació del àcid tartàric mitjançant el peròxid d'hidrogen. Amb posterioritat, Haber i Willstätter (1931) i Haber i Weiss (1934) van proposar que els radicals hidroxil, el peròxid d'hidrogen i els anions superòxid tenien una reacció en cadena que resultava una conversió neta del peròxid d'hidrogen en aigua (Koppenol 2001) (Figura 2). Aquest és l'origen de la coneguda reacció de Haber-Weiss. Actualment considerada una reacció bàsica ja que constitueix el nucli de la cascada de reaccions que generen la majoria de les espècies reactives derivades de l'oxigen (ROS) en la cèl·lula. En aquesta època, tot i conèixer la toxicitat de l'oxigen, la seva connexió amb els radicals lliures era encara desconeguda. Al voltant de la dècada dels 50, estudis *in vitro* van suggerir que els ROS es produïen a l'interior de la cèl·lula. Utilitzant la ressonància d'espí electrònic, (Commoner, Townsend & Pake 1954) van publicar la primera evidència directa de la producció cel·lular de radicals lliures. També van demostrar que els nivells de producció de radicals lliures eren superiors en aquells

<sup>a</sup> Animal la temperatura interna del qual es manté constant i independent a despit de les variacions de la temperatura ambiental.

<sup>b</sup> Animal la temperatura interna del qual depèn completament de la del medi ambient, car no posseeix cap mecanisme per a regular-la.

teixits metabòlicament més actius. La hipòtesi de la toxicitat de l'oxigen produïda pels radicals lliures va ser proposada inicialment per Rebeca Gerschman i col·laboradors (Gerschman et al. 1954) després de considerar els resultats dels seus propis experiments amb oxigen hiperbàric, així com les observacions prèvies d'Ozorio de Almeida (Puig Muset 1976) referents a les similituds existents en els canvis histològics induïts per elevades tensions d'oxigen i per radiacions ionitzants. Pràcticament de forma simultània a la proposta de Gerschman relativa a la hiperòxia, Harman (Harman 1956) postulava que inclús en tensions normals, l'utilització de l'oxigen causava subtils lesions tissulars degudes als radicals lliures. Harman va integrar evidències derivades dels estudis amb ressonància d'espí electrònic, els estudis post-Hirosima sobre lesió per radiació, els descobriments de Fenton i les teories contemporànies que proposaven els mecanismes d'oxidació de compostos orgànics i dismutació del peròxid d'hidrogen per sals de ferro. Harman va proposar que el ferro i altres metalls dels sistemes fisiològics podrien originar la formació cel·lular de ROS mitjançant una ruta química de Haber-Weiss com a subproducte de les reaccions redox normals (Figura 2). Els ROS lesionarien les



Reacció neta:



**Figura 2 Reacció Fenton-Haber-Weiss.**

Encara que la reacció de Haber-Weiss també pot ser catalitzada pel ió de  $\text{Cu}^{2+}$  *in vivo*, la reacció de Haber-Weiss, la qual utilitza la química de Fenton, es considera com el principal mecanisme pel qual el potent reactiu, el radical hidroxil, es generat en sistemes biològics (Kehrer 2000).

estructures pròximes, les quals inclouen l'ADN, que a la vegada donaria lloc a mutacions. Va predir que l'administració de compostos fàcilment oxidables, tals com la cisteïna, alentirien el procés d'envelliment. La seva proposta constitueix, avui dia, la base de la teoria de l'envelliment que gaudeix del recolzament d'un gran cos d'evidències científiques. El descobriment de la superòxid dismutasa (McCord, Fridovich 1969) en els organismes vius, un enzim que catalitza la dismutació de superòxid (radical lliure derivat de l'oxigen) en oxigen i peròxid d'hidrogen, va ser un cop definitiu que va conduir a la consideració seriosa del paper dels radicals lliures en biologia. Si un

enzim, i per tant un gen, ha estat seleccionat i conservat durant l'evolució en un organisme, vol dir que els radicals lliures han d'existir en els sistemes biològics.

## 2.4. Les espècies reactives d'oxigen

Un radical lliure és qualsevol molècula capaç d'existir per si sola, la qual conté un o més electrons desaparellats. El terme ROS, espècies reactives d'oxigen (de l'anglès, *reactive oxygen species*) engloba una varietat de molècules i radicals lliures generats fisiològicament degut al metabolisme molecular de l'oxigen (Halliwell, Gutteridge 2007, Barja 2007, Pamplona, Barja 2006) (Taula 2). Tant les espècies reactives d'oxigen radicalàries com les no radicalàries tenen en comú el fet que són extremadament reactives i poden tenir efectes perjudicials dins de la cèl·lula, però per contra, també poden actuar com a missatgers secundaris en vies de transducció de senyals.

**Taula 2** Espècies reactives d'oxigen.

Radicals		No radicals	
Superòxid	$O_2^{\bullet-}$	Peròxid d'hidrogen	$H_2O_2$
Hidroxil	$OH^{\bullet}$	Ozó	$O_3$
Peroxil	$RO_2^{\bullet}$	Singlet d'oxigen	$^1\Delta_g O_2^a$
Alcoxil	$RO^{\bullet}$	Àcid hipoclorit	$HOCl^b$
Hidroperoxil	$HO_2^{\bullet}$	Peroxinitrit	$ONOO^{\bullet c}$

<sup>a</sup> Singlet d'oxigen  $^1\Delta_g$  es dona quan els dos electrons de l'últim orbital ocupat  $\pi^*2p$  estan en el mateix suborbital. No té electrons desaparellats però és una espècie molt oxidant, ja que no es estable. (L'oxigen molecular estable té els dos últims electrons amb spins paral·lels i un a cada suborbital  $2p$ ).<sup>b</sup> També pot ser considerat espècies reactives clorades <sup>c</sup> També pot ser considerat espècies reactives del nitrogen.

Les espècies reactives d'oxigen es poden generar en diversos llocs i en diverses condicions en la cèl·lula; com són, la NADPH oxidasa de membrana en leucòcits polimorfonuclears, en situacions d'isquemia-reperfusió, mitjançant reaccions enzimàtiques com la NADH oxidasa de membrana, lipoxigenases, cilooxigenases, peroxidases i altres hemoproteïnes, mitjançant l'enzim xantina oxidasa, peroxisomes o el sistema de detoxificació microsomal de la P-450 hepàtica. De totes maneres, i molt especialment en teixits post-mitòtics sans i en condicions fisiològiques, la majoria dels

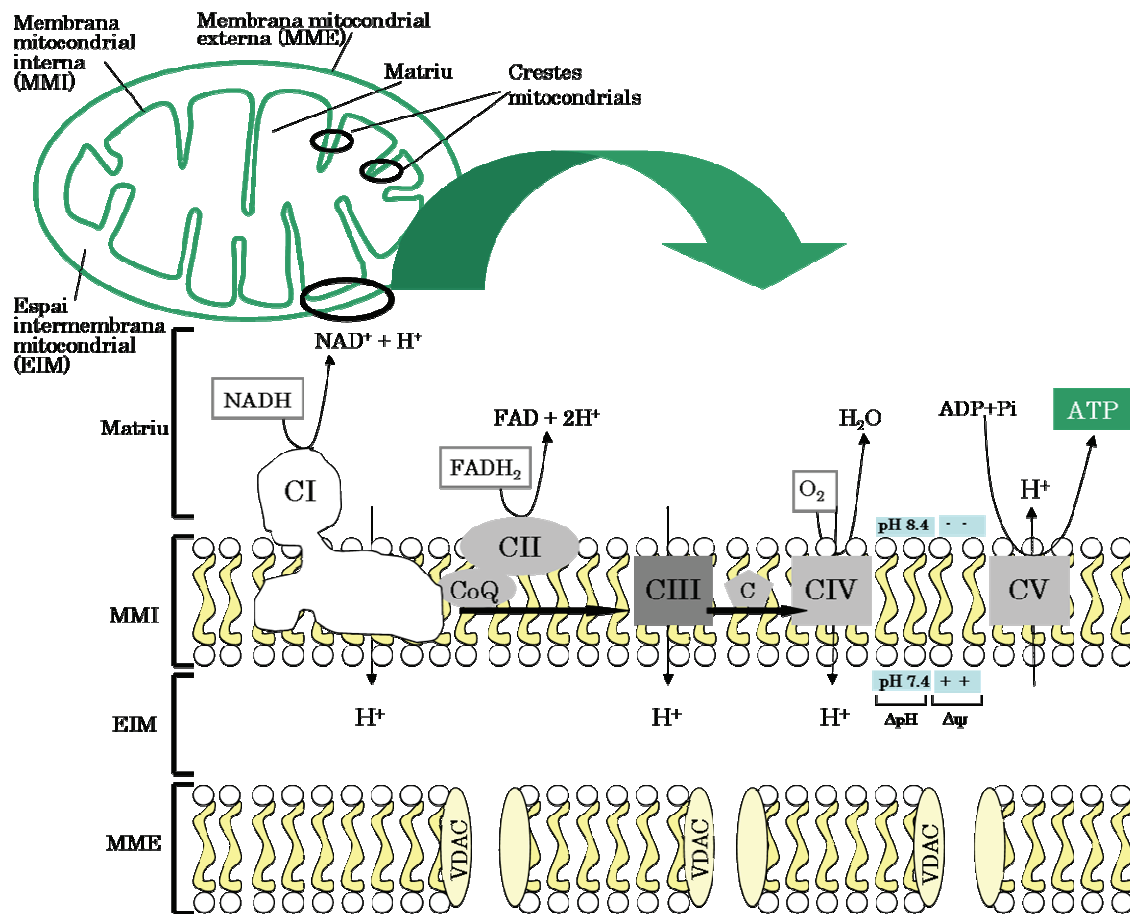
ROS tenen com a principal font de producció la cadena de transport electrònic mitocondrial.

#### 2.4.1. La cadena de transport electrònic mitocondrial

La mitocòndria consumeix entre un 85 i 90% del consum d'oxigen cel·lular; aquests orgànuls són la major font d'energia de la cèl·lula, mitjançant la fosforilació oxidativa s'obté energia en forma de la molècula d'adenosina trifosfat (ATP), en organismes aeròbics. Aquest orgànuls estan formats per una membrana mitocondrial interna (MMI) impermeable als ions i està envoltada d'una membrana mitocondrial externa (MME) permeable al ions, gràcies a les proteïnes de canal aniònic dependents de voltatge (VDAC, de l'anglès, *voltage-dependent anion channels*), també anomenades Porines. La doble membrana crea dos espais, l'espai intermembrana mitocondrial (EIM) i la matriu mitocondrial on es donen diferents processos metabòlics, com el cicle de Krebs, el metabolisme dels àcids grassos, la biosíntesi del grups hemo i de l'ubiquinol i el metabolisme dels lípids i la cardiolipina (Scheffler 1999).

Dins de la mitocòndria, existeixen els complexos multiproteics ensamblats en la membrana mitocondrial interna els quals formen la cadena de transport electrònic; aquests transporten els electrons des dels portadors reduïts (NADH pel CI, o el FADH<sub>2</sub> pel CII) fins a l'acceptor final que és l'oxigen i es forma aigua (Figura 3). Els portadors d'electrons reduïts el NADH i el FADH<sub>2</sub> provenen del cicle de Krebs, que a la vegada provenen de l'acetil-CoA format de l'oxidació de la glucosa o la beta oxidació dels àcids grassos. El transport electrònic es pot produir gràcies a les reaccions encadenades de reducció-oxidació que es donen al llarg de la cadena entre els complexos (CI al CIV) i amb els portadors electrònics que són el coenzim Q o ubiquinol i el citocrom c (cit-c) (Figura 4). Durant aquest transport es produeixen protons els quals són bombejats des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana, fet que produeix un diferencial de potencial electrònic ( $\Delta\psi$ ) i un gradient de protons ( $\Delta\text{pH}$ ) a través de la MMI. L'energia acumulada en aquest gradient electroquímic de protons, anomenada generalment força motriu de protons, pot ser utilitzada per treball químic, osmòtic o mecànic. La força motriu de protons està dominada pel  $\Delta\psi$  amb una contribució a la seva magnitud total aproximadament del 15% del  $\Delta\text{pH}$  (Koopman et al. 2010). Al complex V o F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATP sintasa es dona el retorn dels protons a la matriu mitocondrial sintetitzant a la

vegada ATP a partir de ADP i fosfat inorgànic ( $P_i$ ), utilitzant gran part d'aquesta energia creada per la força motriu de protons.

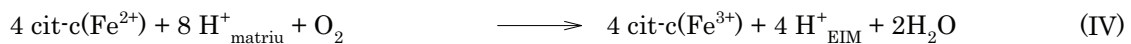
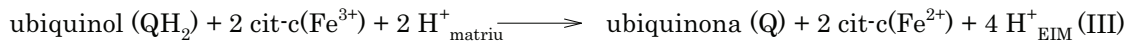
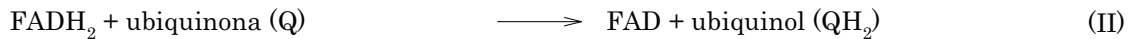
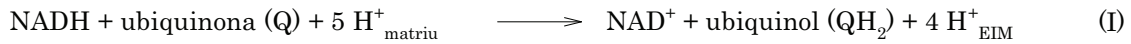


**Figura 3** Sistema d'oxidació fosforilativa mitocondrial.

La funció mitocondrial depèn de la força protó-motriu a través de la membrana mitocondrial interna (MMI). Aquesta força té dos components, l'elèctric ( $\Delta\psi$ ) i el químic ( $\Delta pH$ ) i es mantenen per la cadena de transport electrònic mitocondrial. Funcionalment, la cadena de transport electrònic es formada per 4 complexos multiproteics (CI al CIV) i dos portadors d'electrons, el coenzim  $Q_{10}$  (CoQ) i el citocrom C (C). Els electrons provenen del NADH (al CI) i del  $FADH_2$  (al CII) i es transporten al CIII mitjançant el CoQ. Seguidament, els electrons arriben al CIV gràcies al citocrom C, on són donats a l'oxigen molecular per formar aigua. L'energia alliberada pel transport electrònic es usada per a conduir el flux de protons a través de la MMI, i establint així la força protó-motriu. Al permetre el flux d'electrons, es produeix l'adenosina 5'-trifosfat (ATP) mitjançant la  $F_0F_1$ -ATP sintasa (CV). La membrana mitocondrial externa (MME) conté proteïnes de canal aniónic dependents del voltatge també anomenades Porines (*voltage-dependent anion channels*, VDAC) que permeten l'intercanvi de ions amb el citosol (Koopman et al. 2010).

A més a més de la utilització crucial d'aquesta força motriu de protons per a la formació d'ATP, també es utilitza per una gran varietat de processos dependents d'energia. Aquest processos estan indirectament conduïts tant per  $\Delta\psi$  o  $\Delta pH$ . Per exemple, la incorporació de  $Ca^{2+}$  mitocondrial, l'intercanvi ATP/ADP mitjançant el translocador adenina-nucleotid (ANT, de l'anglès, *adenine nucleotide translocase*), els fluxes de  $K^+$  i  $Na^+$  a través de la membrana mitocondrial interna, els quals són importants per a la regulació del volum mitocondrial i l'import de les pre-proteïnes codificades per l'ADN nuclear estan conduïdes pel  $\Delta\psi$ . Per altra banda, les proteïnes

de membrana que participen en el transport actiu secundari ja sigui en direccions oposades com l'aspartat/glutamat,  $H^+/K^+$ ,  $H^+/Na^+$ ,  $2H^+/Ca^{2+}$  o en el mateix sentit com  $H^+$ /piruvat,  $P_i/ADP$  estan regulades pel  $\Delta pH$  (Koopman et al. 2010).

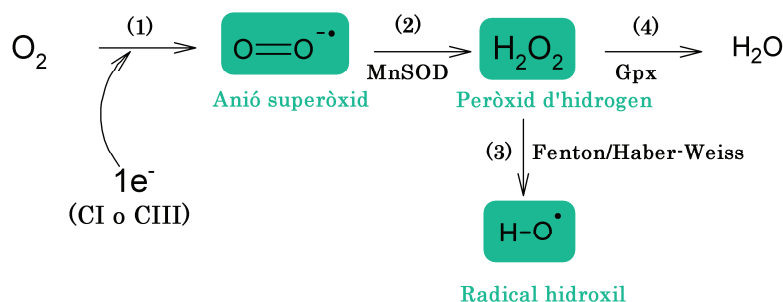


**Figura 4 Equacions de les reaccions que es donen en la cadena de transport electrònic mitocondrial.**

**(I)** Reacció del complex I o ubiquinona hidrogenasa. **(II)** Reacció del complex II o succinat:ubiquinona oxidoreductasa. Capta els electrons del pas de succinat a fumarat, és a dir, es coordina el cicle de krebs amb la cadena de transport electrònic. **(III)** Reacció del complex III o ubiquinona-citocrom c –oxidoreductasa. **(IV)** Reacció del CIV o citocrom c oxidasa. La ubiquinona o coenzim Q és un tipus de carotenoide (apartat 2.5). Els citocroms (cit) són proteïnes que es caracteritzen per tenir un grup hemo les quals accepten o donen electrons segons l'estat de reducció de l'àtom de Fe que contenen. N'hi ha diferents tipus depenent del grup hemo i les proteïnes que conenen. A més del cit-c, el qual actua de portador electrònic, existeixen el cit-c<sub>1</sub> i el cit-b els quals formen part del complex III.

## 2.4.2. La generació d'espècies reactives d'oxigen

La mitocòndria, com ja s'ha comentat, constitueix la major font de producció de ROS en la cèl·lula. Els ROS primaris són els que s'obtenen de la reducció parcial de l'oxigen molecular ( $O_2$ ) per un electró provinent de la cadena de transport electrònic. Els tres principals són l'anió superòxid ( $O_2^{\bullet -}$ ), el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i el radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Figura 5). Donat el fet que l' $O_2$  és un acceptor univalent relativament pobre ( $E_n = -160$  mV), només pot captar electrons de bons donadors, com ho és el complex I (Koopman et al. 2010). Per tant, la generació del radical superòxid s'ha de donar en llocs de la cadena de transport accessibles a l'oxigen molecular.



**Figura 5 Principals espècies reactives d'oxigen derivades de la reducció univalent de l'oxigen molecular.** **(1)** Reducció univalent de l'oxigen molecular per formar l'anió superòxid. **(2)** i **(4)** reaccions detallades en la Figura 7. **(3)** Reacció Fenton/Haber-Weiss de la Figura 2

Dins la matriu mitocondrial el radical superòxid es ràpidament dismutat a peròxid d'hidrogen mitjançant l'enzim mitocondrial Mn-SOD (reacció 2). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'elimina en la mitocòndria mitjançant la glutatió peroxidasa (reacció 4). El radical hidroxil és el més reactiu i es genera quan el superòxid reacciona amb el peròxid d'hidrogen (reacció 3) (Figura 5)

## LLOCS DE PRODUCCIÓ DELS ROS

S'han realitzat múltiples experiments en mitocòndries i partícules submitocondrials<sup>c</sup> de diferents teixits i en diverses condicions i, tot i que està clar que el complex I i el III són els productors de ROS en la mitocòndria hi ha discrepàncies entre els autors entre els llocs concrets dels dos complexes i la seva contribució en la producció d'espècies reactives d'oxigen (Pamplona, Barja 2006). En la Figura 6 es representa els recorreguts possibles dels electrons segons sigui la seva entrada, és a dir, depenent del substrat reduït a partir del qual provenen. Com també la possible transferència electrònica reversa, és a dir, els electrons passen del conezim Q al complex I. En la figura també es representen els diferents punts de fuga electrònica proposada per diferents autors. Els principals productors d'espècies reactives d'oxigen en condicions fisiològiques en la cèl·lula són el complex I i el III, encara que també s'ha descrit que hi ha producció de ROS produïda per l'oxidació dels àcids grassos, concretament l'oxidació de la palmitoil carnitina, la qual involucra la flavoproteïna transportadora d'electrons (ETF, de l'anglès, *electron transfer flavoprotein*) i la flavoproteïna transportadora d'electrons quinona oxidoreductasa (ETF QOR, de l'anglès, *electron transfer flavoprotein quinone oxido reductase*) que pot actuar com a possible font de ROS. El 1972, Boveris i Chance (Boveris, Oshino & Chance 1972) van descriure la possible formació de ROS per aquesta oxidació i anys més tard, uns altres autors St-Pierre i col·laboradors (St-Pierre et al. 2002), van relacionar l'ús dels lípids com a substrat amb un augment de l'expressió de les proteïnes desacobladores (UCPs, de l'anglès, *uncoupling proteins*) de mitocòndria. El metabolisme lipídic augmenta la producció del radical superòxid, aquest activa les proteïnes desacobladores de mitocòndria (augmentant la seva expressió) i aquestes protegeixen a la cèl·lula de les espècies reactives d'oxigen (Echtay et al. 2003).

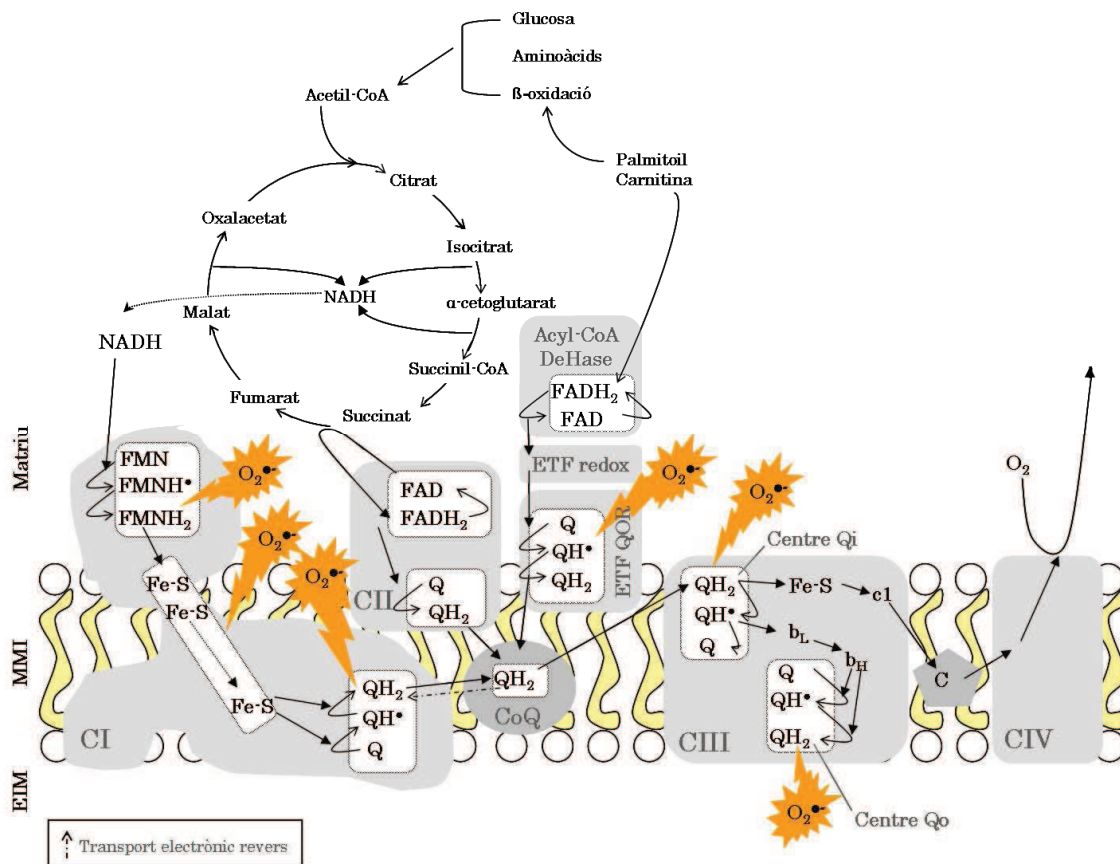
<sup>c</sup> Consisteix en l'aïllament de la matriu mitocondrial i la membrana interna mitocondrial, deixant els complexos mitocondrials exposats al medi extern (Genova et al. 2001).



Dins el complex I, hi ha tres centres diferents per al possible escapament de l'electró i la formació immediata de radical superòxid al reaccionar amb l'oxigen molecular i casi simultània formació de peròxid d'hidrogen. Els estudis es realitzen utilitzant diferents inhibidors dels complexos mitocondrials. Un dels tres centres generadors dins el complex I pot ser la flavina mononucleòtid la qual rep els electrons del donador reduït NADH provinent del cicle de Krebs. Liu i col·laboradors (Liu, Fiskum & Schubert 2002) demostren que en condicions fisiològiques la producció de ROS en mitocondries de cervell de rata es produeix per la flavina mononucleòtid. Posteriorment, Kudin i col·laboradors (Kudin et al. 2004) diuen que en mitocondries de cervell de rata i humana, la producció de peròxid del complex III és molt menor en comparació amb el complex I i que dins del CI, la productora és la flavina mononucleòtid. Estudis en fetge de rata, tant en hepatòcits com en mitocondries aïllades de fetge realitzats per Young i col·laboradors (Young, Cunningham & Bailey 2002) demostren que la producció de ROS pot ser tant per la flavina mononucleòtid com pels clústers de Fe-S. Herrero i Barja (Herrero, Barja 2000) també localitzen la principal producció de peròxid d'hidrogen en els clústers Fe-S, tot i que no descarten la possible implicació de les ubiquinones. També diuen que hi ha producció de peròxid d'hidrogen en el complex III, tot i que només en mitocondria de cor de rata i ratolí i en estat 4 (quan no hi ha producció d'ATP). Genova i col·laboradors (Genova et al. 2001) concreten encara més i diuen que el responsable de la producció del radical superòxid en el complex I és el clúster Fe-S N2, utilitzant partícules submitocondrials de cor de boví. En canvi, Kushnareva i col·laboradors (Kushnareva, Murphy & Andreyev 2002) diuen que en mitocondria de cervell de rata el productor de peròxid d'hidrogen és concretament el clúster Fe-S N-1a. Altres autors també donen importància a les ubisemiquinones, com a font de fuga d'electrons, com són Lambert i Brand (Lambert, Brand 2004b, Lambert, Brand 2004a) i Ohnishi i Salerno (Ohnishi, Salerno 2005).

Per altra banda en el complex III també s'ha demostrat la seva implicació en la producció d'espècies reactives d'oxigen (Sugioka et al. 1988, Trumpower 1990, Boveris, Cadenas 2000, Demin, Kholodenko & Skulachev 1998), hi ha dos centres possibles d'escapament de l'electró dins el complex. El centre d'ubiquinona que està orientat cap a l'espai intermembrana  $Q_0$  i l'altre centre d'ubiquinona, anomenat  $Q_i$ , que està localitzat a la membrana mitocondrial interna i que mira cap a la matriu mitocondrial. El radical superòxid produït pel centre  $Q_i$  entra a la matriu mitocondrial. En canvi, el centre  $Q_0$  allibera el superòxid a l'espai intermembrana, el qual passa al

citòsol (Chen et al. 2003), a diferència del complex I que tot el superòxid que allibera es queda a la part de la matriu mitocondrial (St-Pierre et al. 2002), com el centre  $Q_i$ .



**Figura 6** Recorreguts possibles dels electrons dins de la cadena de transport electrònic i els possibles llocs de fuga d'electrons i generació del radical superòxid.

El sentit de les fletxes indica el seu recorregut. Adaptat de (Hoffman, Brookes 2009).

### 2.4.3. Mecanismes fisiològics que influeixen en la producció de ROS

Existeixen però diferents mecanismes fisiològics que poden influir en la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen (Pamplona, Constantini 2010). El grau de reducció electrònic dels portadors de la cadena de transport i la pressió parcial de l'oxigen en la mitocondria en són un exemple. A alt consum d'oxigen, la cadena de transport funciona ràpid, els portadors electrònics no es troben molt temps en estat reduït i la reducció de l'oxigen és ràpida i en abundància, fet que fa que sigui baixa la concentració de l'oxigen molecular en la mitocondria i el grau de reducció dels portadors, fets que no afavoreixen la producció del radical superòxid. Això lliga amb el fet que durant l'exercici, on hi ha un augment de consum d'oxigen, no s'escurça la vida de rates ni humans, a part de que crea beneficis en molts òrgans de mamífers. És a dir, no està directament relacionat un augment del consum d'oxigen amb un augment

de producció d'espècies reactives d'oxigen, perquè en restricció calòrica en rates, augmenta la longevitat, disminueix la producció d'espècies reactives d'oxigen i no varia el consum d'oxigen (Barja 2007). Aquests resultats en restricció calòrica indiquen que el mecanisme de disminució de producció del radical superòxid sigui deguda a la reducció del grau de reducció del complex I, ja que la baixa producció de ROS per complex I desapareix quan el complex I està totalment reduït. El mateix s'ha trobat en estudis d'espècies de diferents longevitats. Hi ha diferents mecanismes potencials que poden ser responsables de la disminució dels ROS en animals sotmesos a restricció calòrica. Una possibilitat que explicaria aquesta reducció pot ser la diferent expressió de determinades subunitats produint una selecció eficient per una menor producció del complex I (Sanz, Pamplona & Barja 2006).

També s'ha descrit que la pressió parcial de l'oxigen mitocondrial regula l'expressió de l'ADN mitocondrial que codifica el complex I, en condicions d'hipòxia es produeix una baixa regulació selectiva de l'expressió d'algunes subunitats del complex I. Aquest efecte és relativament ràpid i reversible i es dona a nivells moderats d'hipòxia (Piruat, Lopez-Barneo 2005). El gradient de pH també està relacionat amb la producció del radical superòxid pel complex I, Lambert i Brand (Lambert, Brand 2004b) confirmen que a un gradient baix de pH, la producció de radical superòxid pel complex I mitjançant un transport electrònic revers és menor. En cèl·lules intactes el gradient de pH a través de la membrana mitocondrial interna és generalment alt. Per tant, la producció del radical superòxid en cèl·lules intactes dependrà del corrent electrònic aportat pel NADH i la ubiquinona i pel valor de corrent de l'increment de pH, el qual està regulat per la incorporació de calci, per la permeabilitat de la membrana o per les proteïnes desacobladores (Lambert, Brand 2004b).

Les proteïnes desacobladores anomenades genèricament UCPs (de l'anglès, *uncoupling proteins*) són un tipus de proteïnes mitocondrials de transport aniònic localitzades a la membrana mitocondrial interna. Són específiques de teixit, i s'han anat descobrint diferents funcions alhora que s'han descrit diferents tipus (UCP1-UCP5). Les funcions conegudes fins al moment són les d'exportar anions d'àcids grassos de la mitocòndria, regular la secreció d'insulina en cèl·lules pancreàtiques beta i produir desacoblament, per tal de disminuir la producció de superòxid, protegint així del dany oxidatiu (Echtay et al. 2003, Echtay 2007). Concretament, la proteïna desacobladora UCP4 és específica de cervell i s'ha descrit com a mitjancera entre el canvi en el

metabolisme energètic i un increment de la resistència neuronal a l'estrès oxidatiu i metabòlic (Mattson, Magnus 2006). El desacoblament es induït pel mateix anió superòxid (o els seus productes) el qual activa el mecanisme de transport de protons de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana mitocondrial, dissipant així la força protó motriu usada per l'ATP sintasa durant la fosforilació oxidativa (Echtay et al. 2002). Un dels productes de l'anió superòxid que activa les proteïnes desacobladores és el 4-hidroxinonenal (HNE), el qual és un dels majors productes de la peroxidació de les membranes lipídiques. És a dir, el 4-hidroxinonenal és un subproducte de les espècies reactives d'oxigen i a la vegada actua en la senyalització cel·lular activant les proteïnes desacobladores i fent que disminueixi la producció de les espècies reactives d'oxigen (Echtay et al. 2003).

La cardiolipina és un fosfolípid d'una estructura inusual la qual està casi exclusivament present en la membrana mitocondrial interna i formada bàsicament per àcids grassos insaturats (el 90% dels quals és l'àcid linoleic (18:2n-6)). La seva presència és bàsica en la membrana mitocondrial ja que juga un paper important en la bioenergètica mitocondrial, optimitzant l'activitat de proteïnes de la membrana mitocondrial claus, com molts portadors aniònics i alguns dels complexos de transport electrònic. En mitocòndries de cor de rata amb isquèmia-reperfusió, baixa en un 50% el contingut de cardiolipina, acompanyat d'una pèrdua d'activitat del complex III, la qual es veu revertida si es fusionen les mitocòndries d'isquèmia-reperfusió amb liposomes de cardiolipina, indicant una clara relació de la cardiolipina amb l'activitat del complex III (Petrosillo et al. 2003). El mateix succeeix amb el complex I en la mateixa condició d'isquèmia-reperfusió (Paradies et al. 2004).

La proteïna AIF (de l'anglès, *apoptosis-inducing factor*) és una flavoproteïna la qual està situada en l'espai intermembrana mitocondrial. La seva funció més coneguda és la seva actuació en situacions d'apoptosi, la qual transloca al nucli i provoca una condensació de la cromatina i una fragmentació de l'ADN nuclear a gran escala. A part, però, aquesta proteïna s'ha demostrat que té una marcada activitat NADH oxidasa, la qual no depèn de la seva funció apoptogènica. Miramar i col·laboradors van demostrar que la inactivació química de la seva part de dinucleòtid de flavina i d'adenina (FAD, de l'anglès, *flavin adenine dinucleotide*), necessària per a l'activitat redox, no bloquegen la funció proapoptòtica en sistemes cel·lulars (Miramar et al. 2001). A més, el mateix any Loeffler i col·laboradors demostren també que les mutacions que

destrueixen el lloc d'unió a FAD tampoc afecten la funció apoptogènica dels assajos en transfecció cel·lulars (Loeffler et al. 2001). La seva funció fisiològica no apoptòtica, però, no està clara, tot i que estudis més recents demostren una relació de l'AIF amb la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa mitocondrial, especialment amb el complex I. Els ratolins Harlequins (Hq) tenen una mutació hipomòrfica de l'AIF, els quals desenvolupen neurodegeneració amb atàxia (debilitat i pèrdua del control muscular) deguda a una atrofia del cerebel com a tret característic, com també una ceguera deguda a una degeneració de la retina (Klein et al. 2002), aquests són els símptomes més comuns associats a defectes en la cadena de transport electrònic en mamífers (Vahsen et al. 2004). Aquests ratolins mostren una expressió reduïda de l'AIF en un 10-20% respecte al valor normal degut a una inserció retroviral en el primer intró del gen de l'AIF. S'ha trobat un augment de la mort de les cèl·lules neuronals degut a un augment de l'estrès oxidatiu en aquests animals (Klein et al. 2002), suggerint una contribució antioxidant del AIF (Klein, Ackerman 2003, Lipton, Bossy-Wetzel 2002). En particular s'ha demostrat que tan *in vivo*, els ratolins Hq, com *in vitro*, amb models cel·lulars, l'expressió reduïda d'AIF comporta una disminució del complex I (Vahsen et al. 2004); assenyalant aquesta proteïna com a necessària per a l'oxidació fosforilativa mitocondrial (Porter, Urbano 2006). Ara bé, el mecanisme o mecanismes com ho realitza no s'han descobert.

Per últim, un altre factor que pot influir en l'activitat dels complexos, fent-los més ineficients, és la modificació química dels mateixos. El peroxinitrit, una espècie reactiva de nitrogen derivada del monòxid de nitrogen (NO), inhibeix el complex I, el II, el IV i l'ATP sintasa. La presència de l'enzim iNOS (de l'anglès, *inducible Nitric Oxid Synthase*) (enzim que catalitza la formació de NO) en cèl·lules i teixits exhibeix una inhibició del complex I fet que pot contribuir a patologies inflamatòries, com per exemple en la malaltia del Parkinson o en el xoc sèptic (Brown, Borutaite 2004, Galkin, Moncada 2007) confirmen observacions prèvies en relació a la inhibició del complex I per agents nitrosiladors. A més a més, ells demostren que la susceptibilitat del complex I a la inhibició depèn de l'exposició del residu de cisteïna per a que es doni la modificació química, ja sigui per S-nitrosilació o per S-glutationilització. És a dir, influeix la conformació del complex I en la seva inhibició, la qual succeeix en la forma desactivada.

## 2.5. Les defenses cel·lulars antioxidants

Una defensa cel·lular antioxidant es refereix a qualsevol mecanisme i/o substància que impedeix, retarda, elimina o protegeix contra els efectes perjudicials de l'oxidació a la molècula diana. Donat el fet que les cèl·lules contínuament produeixen radicals lliures, l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu només es pot mantenir si els antioxidants endògens hi són presents. Al llarg de l'evolució s'han conservat un gran nombre de defenses antioxidants endògenes, tant enzimàtiques com no enzimàtiques, per a combatre la gran varietat de ROS i les seves possibles conseqüències moleculars (Pamplona, Constantini 2010).

### 2.5.1. Els antioxidants enzimàtics

Els enzims antioxidants que reaccionen directament amb les espècies reactives d'oxigen són la superòxid dismutasa (SOD), la glutatió peroxidasa (Gpx) i la catalasa (CAT).

#### SUPERÒXID DISMUTASA (SOD)

La SOD elimina el radical superòxid convertint-lo en oxigen i peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) (Figura 7A). Existeixen diferents formes d'aquest enzim: la forma que conté Cu i Zn la qual es present en el citosol i en el compartiment intermembrana de la mitocondria (Okado-Matsumoto, Fridovich 2001), i la forma que conté Mn la qual es present en la matriu mitocondrial. La SOD com a tal, però, no podria considerar-se estrictament com un antioxidant ja que a la vegada que elimina el radical superòxid, produeix peròxid d'hidrogen; és a dir, una altra espècie reactiva de l'oxigen. De fet, altres enzims treballen coordinadament per eliminar el peròxid produït per la SOD i per altres potencials formacions. Els altres dos enzims cinèticament complementaris que eliminen el  $H_2O_2$ , són la catalasa i el glutatió peroxidasa.

#### CATALASA I GLUTATIÓ PEROXIDASA

La catalasa (CAT) descompon el  $H_2O_2$  quan aquest es troba a altes concentracions i mostra una baixa afinitat pel peròxid d'hidrogen, per tant és útil per a pics d'alta concentració i acumulació de  $H_2O_2$  (Figura 7A). Aquests pics poden donar-se *in vivo*, ja

que l'atalassemina incrementa l'estrès oxidatiu i provoca patologies en humans (Goth 2000). Les glutatió peroxidases [Gpx(s)], presents en formes dependents o no de seleni, són complementaries a la catalasa, ja que descomponen el  $H_2O_2$  de forma lenta però amb alta afinitat (Figura 7A). Per tant, aquests enzims són més útils en situacions fisiològiques normals quan la producció d'  $H_2O_2$  és petita però constant. L'activitat de la glutatió peroxidasa es responsable del 91% del consum de  $H_2O_2$  mentre que la catalasa compleix un menor paper, i s'ocupa del 9% restant (Boveris, Cadenas 2000). S'han descrit diferents formes de Gpx(s) en el citosol, la mitocòndria i en les membranes cel·lulars, i totes elles poden reduir els peròxids inorgànics i orgànics. Les Gpx(s) tenen les mateixes localitzacions que la SOD, suggerint que les Gpx(s) són els enzims principals que eliminen el  $H_2O_2$  produït per la CuZnSOD en el citosol i per la MnSOD en la mitocòndria.

### 2.5.2. Els antioxidants no enzimàtics

Existeixen diferents tipus d'antioxidants endògens no enzimàtics en les cèl·lules i teixits. Encara que aquests es consumeixen quan reaccionen amb els ROS, les seves formes oxidades normalment es reciclen a la forma antioxidant mitjançant la seva reducció per altres molècules. El seu baix pes molecular pot ser un gran avantatge alhora d'eliminar els ROS en llocs poc accessibles per molts altres enzims. A més a més, hi ha antioxidants no enzimàtics dissenyats especialment per a actuar en compartiments hidrofílics o lipofílics. Els principals antioxidants no enzimàtics de baix pes molecular endògens són el glutatió i l'àcid ascòrbic. Existeixen també antioxidants no enzimàtics que funcionen de manera òptima en el medi lipofílic de les membranes. Els dos més importants la vitamina E i els carotenoides.

## GLUTATIÓ

El glutatió és un tripèptid format per tres aminoàcids, glicina, cisteïna i àcid glutàmic (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteïnil-glicina o GSH) (Sies 1999) (Figura 7B) i és particularment abundant en molts teixits on pot arribar a nivells de 10 mM en la seva forma reduïda, és a dir, en el seu estat protegit, GSH. La seva activitat antioxidant es deguda a la reducció del grup tiol del seu residu de cisteïna. Pot reaccionar directament amb els ROS protegint contra el dany oxidatiu actuant de co-substrat dels enzims Gpx. El glutatió juga un paper central en el manteniment del balanç redox

cel·lular (Cnubben et al. 2001) ja que GSSG/GSH és la parella redox més abundant en la cèl·lula. Canvis en la relació GSSG/GSH sembla influenciar l'entrada en diferents estats cel·lulars incloent proliferació, diferenciació o apoptosi (Schafer, Buettner 2001, Deplancke, Gaskins 2002).

## **ÀCID ASCÒRBIC o VITAMINA C**

L'àcid ascòrbic és l'altre antioxidant no enzimàtic abundant en les cèl·lules (Figura 7B). Encara que els humans no el puguin sintetitzar degut a l'absència de l'enzim que catalitza l'últim pas de la seva síntesi (Mandl, Szarka & Banhegyi 2009), i l'ingereixin com a vitamina C, en altres mamífers i vertebrats es sintetitza endogenament i es manté a alts nivells en els teixits (per exemple, 1 mM en rates). Aquest reacciona amb ROS i es converteix en la forma oxidada, la qual retorna a la seva forma reduïda mitjançant les reductases dehidroascorbat dependents de NADPH o GSH. Els dos principals antioxidants hidrofílics de baix pes molecular, el GSH i l'àcid ascòrbic, interaccionen cooperativament *in vivo* (Meister 1994).

## **VITAMINA E**

La vitamina E és el terme genèric que engloba els diferents compostos amb l'activitat biològica d' $\alpha$ -tocoferol. S'han descrit vuit substàncies amb activitat de vitamina E, la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  tocoferol i els seus corresponents tocotrienols (Figura 7B). Entre tots aquests, l' $\alpha$ -tocoferol és la forma en que es troba, en un 90% aproximadament, la vitamina E en els teixits animals (Debier, Larondelle 2005), encara que el  $\gamma$ -tocoferol, és la forma majoritària en plantes i llavors de les dietes occidentals, el qual sembla ser especialment cardioprotector (Jiang et al. 2001). La vitamina E és el principal antioxidant lipofílic exogen en cèl·lules animals. Les membranes, però, no contenen grans quantitats de tocoferol: la proporció més comú és d'una molècula de tocoferol per mil cadenes d'àcids grassos poliinsaturats. La seva activitat antioxidant es deguda a la capacitat reductora del grup hidroxil del seu anell. La seva liposolubilitat fa que pugui accedir als grups peròxids dels lípids, reduint-los a hidroperòxids, i evitant així la reacció en cadena de la peroxidació lipídica (Esterbauer, Schaur & Zollner 1991). Per tant, la vitamina E és un antioxidant que talla la seqüència de reacció de la peroxidació lipídica convertint-se ella mateixa en un radical durant el procés. La vitamina E pot també reduir els radicals alcoxi dels lípids a alcohols. La forma oxidada



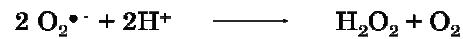
de la vitamina E es pot reciclar a la seva forma reduïda gràcies a l'activitat de l'àcid ascòrbic o la ubiquinona (coenzim Q). La seva reducció mitjançant l'àcid ascòrbic possiblement es dona en la interfase citosol membrana, ja que aquest no es liposoluble, i això explicaria els efectes sinèrgics de les dues vitamines. L'alternativa és la reducció del radical de la vitamina E a vitamina E mitjançant la ubiquinona (coenzim Q) present en la membrana.

## **CAROTENOIDES**

Conjuntament amb la vitamina E, els carotenoides són els antioxidants lipofílics exògens en cèl·lules animals (Figura 7B). Aquests poden enganxar al oxigen singlet, i interaccionar amb els ROS en els teixits fisiològics en condicions parcials de pressió d'oxigen. Els carotenoides tenen cadenes llargues d'hidrocarburs alternant enllaços simples i dobles. L'esquelet bàsic dels carotenoides és de 40 àtoms de carboni i poden estar modificats per ciclació en un o ambdós extrems de la cadena, reduint certs dobles enllaços o per l'addició de grups funcionals que contenen oxigen. Un dels carotenoides més importants és el coenzim Q, que és una hidroquinona sintetitzada i present en totes les membranes cel·lulars. Les ubiquinones (coenzim Q) són uns dels carotenoides més importants. Aquestes són hidroquinones intrínseques presents en totes les membranes, on representen el principal antioxidant lipofílic sintetitzat per cèl·lules animals (Barja 2001). La seva activitat antioxidant es basa en la capacitat per a interceptar els radicals lipídics i regenerar la vitamina E. La regeneració del coenzim Q es porta a terme per enzims amb activitat reductasa que utilitzen com a cofactors NADPH o NADH. A més a més s'han descrit centenars de carotenoides diferents, encara que alguns d'ells com el  $\alpha$ - i  $\beta$ -caroté, la luteïna, licopé, xantina o la criptoxantina, estan presents en teixits i plasma animals a concentracions rellevants (Krinsky 1993). La seva capacitat antioxidant s'ha demostrat en liposomes, homogenats, lipoproteïnes, membranes, en totes les cèl·lules i animals a concentracions entre 0,1 i 100 mM, i poden ser relacionades a la seva acció antiinflamatòria, antimutagènica i anticancerígena encara que a altes tensions d'oxigen com les que es donen en els pulmons poden donar-se paradoxalment efectes procarcinogènics.

**(A) Antioxidants enzimàtics**

**a.1. Superòxid dismutasa (SOD1, SOD2)**



**a.2. Catalasa (CAT), glutatió peroxidasa (Gpx)**

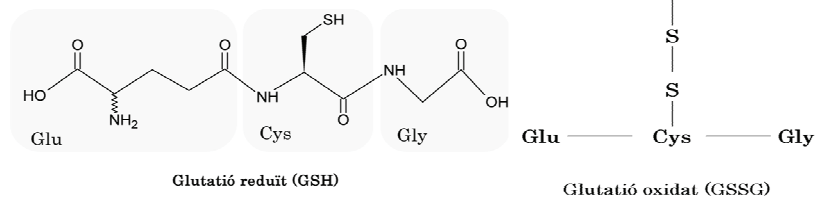


**a.3. Glutatió peroxidasa (Gpx)**

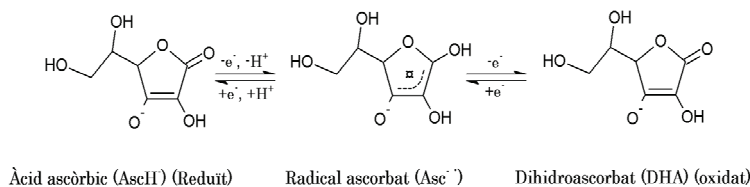


**(B) Antioxidants no enzimàtics**

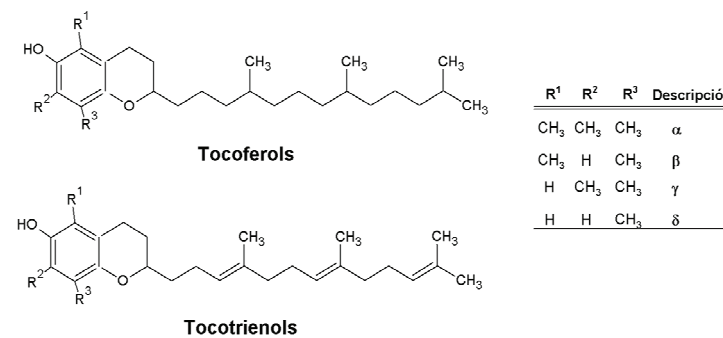
**b.1. Glutatió**



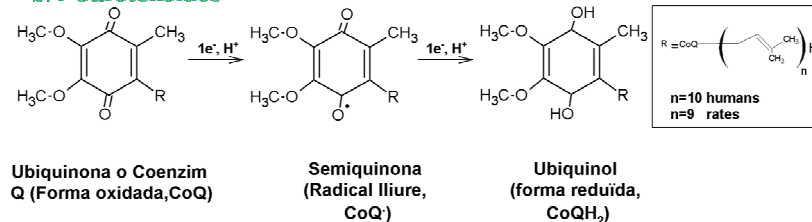
**b.2 Àcid ascòrbic (Vit C)**



**b.3 Vitamina E**



**b.4 Carotenoides**



**Figura 7 Tipus d'antioxidants.**

**(A) Antioxidants enzimàtics: (a.1)** La superòxid dismutasa (SOD) catalitza la dismutació del radical superòxid. Existeixen dos tipus, la SOD1 o CuZnSOD de 32 kDa i localitzada al citosol i a l'espai intermembrana de la mitocondria, i la SOD2 o MnSOD de 40 kDa i localitzada a la matriu mitocondrial. **(a.2)** La catalasa catalitza la dismutació del peròxid d'hidrogen a altes concentracions d'aquest. El seu enzim cinèticament complementari és la glutatió peroxidasa **(a.3)**, la qual catalitza la mateixa reacció que la catalasa a baixes concentracions de peròxid d'hidrogen i necessita un substrat reduït, el GSH. **(B) Antioxidants no enzimàtics: (b.1)** El glutatió reduït GSH i la seva forma oxidada GSSG, formant pont disulfur amb l'àtom de sofre que aporta la cisteïna. **(b.2)** L'àcid ascòrbic o vitamina C. A pH fisiològic la seva forma és la d'anió ascorbat (AscH<sup>-</sup>) que també és la forma reduïda i quan s'oxida es forma el radical ascorbat (Asc<sup>•-</sup>) i després el dihidroascorbat (DHA), la forma oxidada estable. **(b.3)** La vitamina E engloba els diferents compostos amb l'activitat biològica d'α-tocoferol i els seus corresponents tocotrieneols. **(b.4)** La ubiquinona és un tiopus de carotenoides present en totes les membranes cel·lulars.

### 2.5.3. Els sistemes antioxidants de reparació, recanvi o detoxificació

#### EN LA CÈL·LULA

La degradació de les proteïnes no funcionals i oxidades és una part essencial del sistema antioxidant de les cèl·lules. Les cèl·lules eucariotes tenen un gran nombre de vies per la degradació de proteïnes en general: les proteases lisosomals, les proteases calci-dependents i el sistema proteasomal. A més a més, moltes proteïnes són degradades per proteases específiques, per exemple les caspases. Aquestes vies proteolítiques s'han conegut per a substrats específics o funcions metabòliques específiques. El major sistema proteolític, però, és el sistema proteasomal el qual és el responsable d'eliminar les proteïnes oxidades del citosol. Aquest sistema consisteix amb un nucli "20S core" i multitud de reguladors. La seva organització, estructura i funció va ser revisat per (Grune 2000). El proteasoma es localitza al citosol i al nucli de les cèl·lules dels mamífers i està enganxat al reticle endoplasmàtic i a la membrana cel·lular. En cèl·lules sanes, l'acumulació de les proteïnes oxidades es prevé amb l'eliminació ràpida d'aquestes proteïnes danyades abans que aquestes s'agreguin, perquè la modificació de l'oxidació de les proteïnes fa que aquestes siguin susceptibles a la proteòlisis. Encara que l'oxidació progressiva de les proteïnes incrementa la seva degradació via el sistema proteasomal, les proteïnes entrecruades i les que estan severament oxidades són substrats pobres per al proteasoma i fan que siguin resistents a la degradació (Grune 2000).

#### EN LA MEMBRANA CEL·LULAR

El sistema de protecció de les membranes cel·lulars s'aconsegueix amb un sistema addicional que involucra diferents mecanismes: reparació o substitució dels lípids, eliminació d'espècies carboníliques reactives que són els productes finals derivats de la peroxidació lipídica, i la degradació i eliminació de molècules modificades (Hulbert et al. 2007, Pamplona et al. 2008, Pamplona 2008). L'acció de trencament de cadenes mitjançant els antioxidants pot provocar la formació d'hidroperòxids lipídics. Alguns d'aquests poden ser metabolitzats per enzims antioxidants com les glutatió peroxidases [Gpx(s)], la qual reacciona amb el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i també amb hidroperòxids d'àcids grassos lliures, reduint-los a alcohols dels àcids grassos. El fet, però, és que és necessari primer extreure els hidroperòxids de la membrana lipídica

abans de ser reparats. S'ha descrit, però, una glutatió peroxidasa d'hidroperòxids de fosfolípids (PHGPX), en alguns teixits de mamífers, la qual és capaç d'actuar sobre cadenes d'àcids grassos peroxidats que estan esterificats en fosfolípids de la membrana lipídica, fet que és molt important per la defensa antioxidant *in situ* (Imai, Nakagawa 2003).

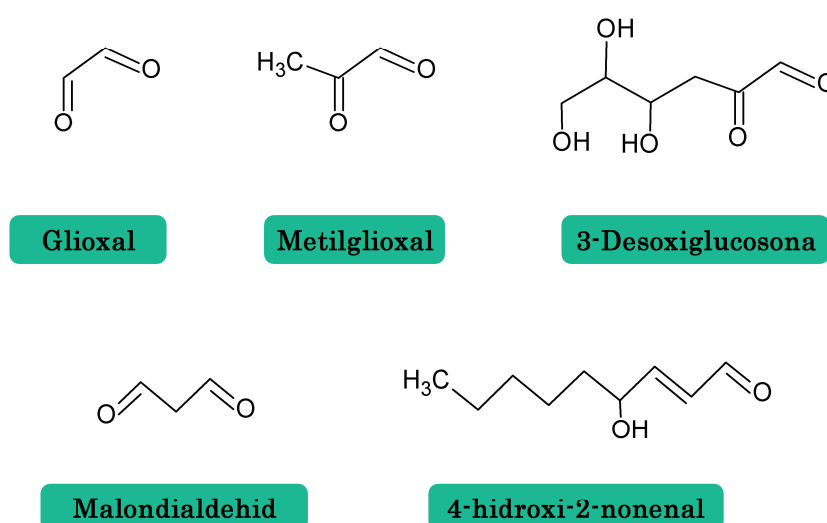
### 3. ELS EFECTES DE L'ESTRÈS OXIDATIU

#### 3.1. Els intermediaris de primera i segona generació

Una constel·lació d'intermediaris reactius (electròfils<sup>d</sup> i radicals lliures) amb capacitat per a lesionar els constituents cel·lulars (proteïnes, ADN, lípids i carbohidrats) es generen contínuament durant els processos fisiològics normals. En molts casos, els intermediaris reactius generats inicialment converteixen determinats constituents cel·lulars en intermediaris de segona generació també amb capacitat per produir dany, expandint i amplificant la lesió inicial (Naudí et al. 2009). La majoria dels intermediaris reactius que podríem denominar de primera generació són produïts inevitablement com a conseqüència de la nostra existència en un ambient aeròbic, com ja s'ha explicat. La utilització de l'oxigen per a la producció d'energia ens col·loca en situació de risc degut a la generació d'oxidants reactius que són productes derivats de la reducció de l'oxigen. En la Figura 5 ja s'han detallat les tres espècies reactives de l'oxigen (ROS). De tots ells, el radical hidroxil és extremadament reactiu i pot generar-se per la combinació del radical superòxid i  $H_2O_2$  en presència de quantitats traça de ferro o coure durant la reacció de Fenton-Haber-Weiss (Figura 2). Així, encara que estrictament el  $H_2O_2$  no sigui un radical lliure, pot difondre des de les fonts de producció de ROS per a acabar generant radicals hidroxil i altres espècies reactives en altres localitzacions cel·lulars, propagant i estenent la lesió oxidativa a altres ubicacions cel·lulars. Altres ROS probablement rellevants en termes biològics són el radical hidroperòxid, l'òxid nítric i el singlet d'oxigen (Taula 2), encara que el paper d'aquests en el procés d'envelliment no ha estat avaluat. En el cas de la mitocòndria, la producció d'òxid nítric és molt menor que la del radical superòxid. De totes maneres, aquesta producció d'òxid nítric podria ser important degut a la seva capacitat per a interaccionar amb el radical superòxid i altres radicals i produir espècies reactives, en

<sup>d</sup> Electròfil: dit del reactant que té afinitat pels electrons i que no contribueix amb electrons a la formació d'un enllaç covalent amb un altre reactant, que és el que els forneix.

aquest cas derivades del nitrogen com el peroxinitrit, que té la capacitat de modificar molts tipus de macromolècules i probablement contribuir a diversos processos patològics. És a dir, els intermediaris reactius de primera generació poden reaccionar amb determinats components cel·lulars (carbohidrats, àcids grassos poliinsaturats i inclús aminoàcids) i generar un ampli ventall de productes d'oxidació inestables i electròfils que es converteixen en intermediaris reactius que podríem denominar de segona generació, expandint d'aquesta manera la lesió oxidativa inicial. En la Figura 8 es mostra l'estructura química d'alguns d'aquestes intermediaris reactius de segona generació els quals poden expandir la lesió oxidativa reaccionant amb altres components cel·lulars, com els aminoàcids de les proteïnes o l'ADN.



**Figura 8 Estructures químiques dels productes intermediaris de segona generació.**

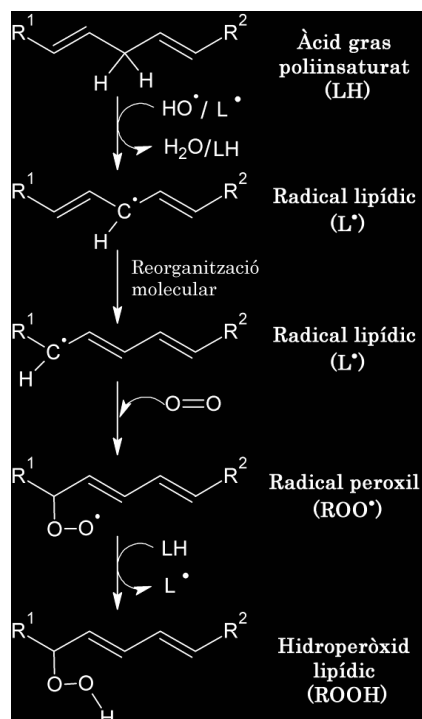
Són productes derivats de glicació i lipoxidació els quals poden propagar la reacció d'oxidació endògena i danyar els constituents cel·lulars..

### 3.2. La lesió endògena dels lípids

Com ja s'ha dit, les espècies reactives d'oxigen ataquen a totes les macromolècules cel·lulars. A part de la modificació de proteïnes i ADN (seccions posteriors), la lesió als lípids de les membranes cel·lulars és especialment rellevant (Hulbert et al. 2007, Pamplona 2008). D'aquesta manera, la susceptibilitat dels lípids de la membrana a la lesió oxidativa està relacionada amb dues característiques inherents, les propietats físico-químiques de la bicapa lipídica i la reactivitat química dels àcids grassos que componen la membrana. La primera propietat està relacionada amb el fet que l'oxigen i els radicals lliures són cinc vegades més solubles en els lípids de membrana que en el compartiment aquós (Halliwell, Gutteridge 2007). A més, l'oxigen és de 5 a 10 vegades

més soluble en una membrana lipídica que en el medi aquós (Pamplona 2008). Així doncs, aquestes diferències de solubilitat són importants en el moment de considerar la "disponibilitat" de l'oxigen i radicals lliures per a reaccions químiques en els sistemes vius: les regions orgàniques poden contenir més radicals lliures que les regions aquoses. La segona propietat està relacionada amb el fet que els àcids grassos poliinsaturats presents en els fosfolípids de la membrana són extremadament sensibles a l'oxidació (Bielski, Arudi & Sutherland 1983). Cada un dels fosfolípids de la membrana conté un àcid gras insaturat esterificat al grup 2-hidroxil de l'esquelet del glicerol. Molts d'aquests àcids grassos insaturats són poliinsaturats i la presència d'un grup metil entre dos dobles enllaços el transforma en sensible a la lesió induïda per ROS, augmentant exponencialment la seva sensibilitat a l'oxidació en funció del nombre de dobles enllaços per molècula d'àcid gras (Bielski, Arudi & Sutherland 1983). Conseqüentment, l'elevada concentració d'àcids grassos poliinsaturats en els fosfolípids no tant sols els converteix en dianes prioritàries de la reacció amb agents oxidants sinó que també els capacita per a participar en reaccions oxidatives en cadena. Els radicals lliures poden arrancar àtoms d'hidrogen dels àcids grassos poliinsaturats. Un àtom d'hidrogen ( $^1\text{H}$ ) té només un electró, aquest hidrogen està enllaçat a un carboni amb esquelet de l'àcid gras per un enllaç covalent, compartint així dos electrons, un de cada un. Per tant, el carboni a partir del qual el  $^1\text{H}$  ha estat arrencat, ara es queda amb un electró desaparellat, i el converteix en radical lliure (Figura 9). Els àcids grassos poliinsaturats (amb dos o més dobles enllaços) són molt més sensibles a l'atac pels radicals lliures que els que són saturats (sense dobles enllaços) o monoinsaturats (un sol enllaç). Quan es generen els radicals deixant l'electró desaparellat en el carboni ( $\text{C}^\bullet$ ) de l'àcid gras dins de la membrana lipídica, el destí més probable és que es combini amb l'oxigen dissolt en la membrana. El radical peroxil resultant és molt reactiu: pot atacar a les proteïnes de la membrana i oxidar els àcids grassos poliinsaturats propers en el seu espai immediat (Pamplona 2008). Així, la reacció es repeteix i el procés global continua en una reacció en cadena dels radicals lliures, generant hidroperòxids lipídics (Spiteller 2001). Els hidroperòxids lipídics són més hidrofílics que els àcids grassos no peroxidats, i intenten migrar cap a la superfície de la membrana per interaccionar amb l'aigua, fent que l'estructura, la fluïdesa i altres propietats funcionals de la membrana es vegin afectades. Els hidroperòxids que es generen durant la peroxidació lipídica, així com altres modificacions oxidatives anomenades *endoperòxids*, poden progressar cap a estats finals irreversibles que impliquen la fragmentació dels àcids grassos poliinsaturats i la generació d'un ampli

ventall de compostos "intermediaris" reactius com els alcans, alquenals, hidroxi-alquenals, glioxal (GO), malondialdehid (MDA) i hidroxinonenal (HNE), entre molts altres (Esterbauer, Schaur & Zollner 1991).



**Figura 9** Esquema de reacció radicalària amb àcids grassos en cadena (Esterbauer, Schaur & Zollner 1991)

Aquests compostos, que majoritàriament presenten un grup carbonil lliure o més d'un, (representats alguns d'ells en la Figura 8) tenen propietats úniques si els contrastem amb els radicals lliures (Pamplona 2008). Per exemple, comparant amb els ROS o les espècies reactives de nitrogen (RNS), aquests aldehids reactius tenen una vida mitja molt més llarga (de minuts, en lloc de micro o nanosegons com succeeix amb els radicals lliures). A més, aquests compostos carbonil no tenen càrrega fet que els permet migrar amb relativa facilitat a través de les membranes hidrofòbiques i els medis hidrofílics, i per tant, poden arribar a migrar a molta distància del seu lloc de producció. Basant-nos només en aquestes característiques, els compostos carbonílics poden ser molt més destructius que els propis radicals lliures i tenir efectes perjudicials a distància sobre dianes ubicades dins i fora de les membranes. Així, aquests compostos poden reaccionar amb els grups nucleofílics<sup>e</sup> de proteïnes i ADN (i, altres molècules com aminofosfolípids) provocant modificacions químiques que poden ser

<sup>e</sup> Nucleòfil : dit del reactant que conté un excés de densitat electrònica i dona un parell d'electrons disponibles al substrat electròfil per formar un nou enllaç covalent.

detectades i quantificades mitjançant tècniques analítiques basades en espectrometria de masses (Pamplona 2008). Concretament en aquesta tesi s'han determinat mitjançant aquesta tècnica tres molècules formades per la reacció dels intermediaris reactius amb l'aminoàcid lisina. Aquests són el malondialdehid-lisina (MDAL), la N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML) i la N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL), a partir de malondialdehid, glioxal i metilglioxal (Figura 8), respectivament.

### 3.3. La lesió endògena de proteïnes

Les proteïnes són un altre grup de macromolècules susceptibles a l'oxidació endògena com a conseqüència natural de la vida aeròbica. Els productes d'oxidació dels aminoàcids són indicadors de la modificació química de les proteïnes en els sistemes biològics (Portero-Otín, Pamplona 2006, Dean et al. 1997, Stadtman, Levine 2003). Aquestes modificacions inclouen aminoàcids oxidats, aminoàcids modificats per espècies reactives derivades del nitrogen (RNS), reaccions de cloració i entrecreuaments formats per una combinació de mecanismes enzimàtics i no-enzimàtics. En la Taula 3 s'indiquen els diferents productes d'oxidació possibles depenent del tipus d'aminoàcid.

Els residus d'aminoàcids d'una proteïna són molt susceptibles a l'oxidació per una o més espècies reactives. Els mecanismes d'aquestes reaccions d'oxidació que es porten a terme per espècies reactives d'oxigen van ser elucidats exposant solucions d'aminoàcids, pèptids i proteïnes a radiacions ionitzants en condicions en les que es generava radicals hidroxil o una mescla de radicals hidroxil i superòxid. Els resultats d'aquests estudis van demostrar que l'abstracció depenent del radical hidroxil d'un àtom d'hidrogen del carboni alfa de l'aminoàcid, de l'esquelet del polipèptid i també de les cadenes laterals alifàtiques dels aminoàcids hidrofòbics de les proteïnes són els llocs inicials i preferents de l'atac (Dean et al. 1997, Stadtman, Levine 2003). A més a més dels mecanismes anomenats, les cadenes laterals dels aminoàcids d'algunes proteïnes són fàcilment oxidables per sistemes d'oxidació catalitzats per ions metàl·lics. L'oxidació de les cadenes laterals de lisina, arginina, prolina i treonina s'ha observat que generen la formació de derivats carbonílics, mentre que la histidina es converteix en 2-oxo-histidina. L'oxidació de metionina genera metionina sulfòxid. Donat que la generació de derivats carbonílics té lloc a través de diversos i variats mecanismes, els nivells de grups carbonil en les proteïnes, encara que inespecífics, estan àmpliament



utilitzats com a marcador de lesió oxidativa a proteïnes. És a dir, la carbonilació proteica engloba el major nombre de modificacions dels aminoàcids de les proteïnes derivats de la lesió endògena. Aquesta carbonilació, sempre tractant-se d'oxidació proteica no enzimàtica, es pot donar mitjançant dos mecanismes diferents: i) una oxidació proteica directa, la qual introdueix els carbonils a les cadenes laterals de certs aminoàcids (Requena et al. 2001), i ii) la reacció de grups nucleofílics de les cadenes laterals d'aminoàcids específics amb espècies carboníliques reactives, les quals són electròfiles.

**Taula 3** Productes de l'oxidació d'aminoàcids en proteïnes.  
(Naudí et al. 2009).

Aminoàcid	Producte de l'oxidació	Aminoàcid	Producte de l'oxidació
Arginina	Semialdehid glutàmic	Metionina	Sulfòxid de metionina
Cisteïna	Disulfur de cisteïna Àcid sulfpenic	Fenilalanina	Orto- i meta-tirosina
Histidina	Aspartat Asparagina 2-oxoimidazolina 2-oxohistidina	Prolina	Glutamat Semialdehid glutàmic 2-pirrolina Àcid piroglutàmic
Leucina	3-,4-,5- monhidroxilleucina	Treonina	Àcid 2-amino-3-cetobutíric
Leucina, valina, isoleucina, prolina i altres	Carbonils proteics	Triptòfan	2-,4-,5-,6- o 7-hidroxitriptòfan N-formilquinureinina quinurenina
Lisina	Semialdehid amino- adípica	2-tirosina	Di-tirosina (entrecruaments Tir-Tir) dihidroxifenilalanina (DOPA) 3-nitotirosina 3-clorotirosina

L'oxidació proteica directa, catalitzada per metalls, genera derivats aldehydics. El semialdehid glutàmic (SAG) és un producte de l'oxidació dels aminoàcids arginina i prolina, i el semialdehid amino-adípica (SAAA) de l'oxidació de la lisina (Taula 3 i Figura 10). Aquests dos compostos que contenen carbonils són els principals productes

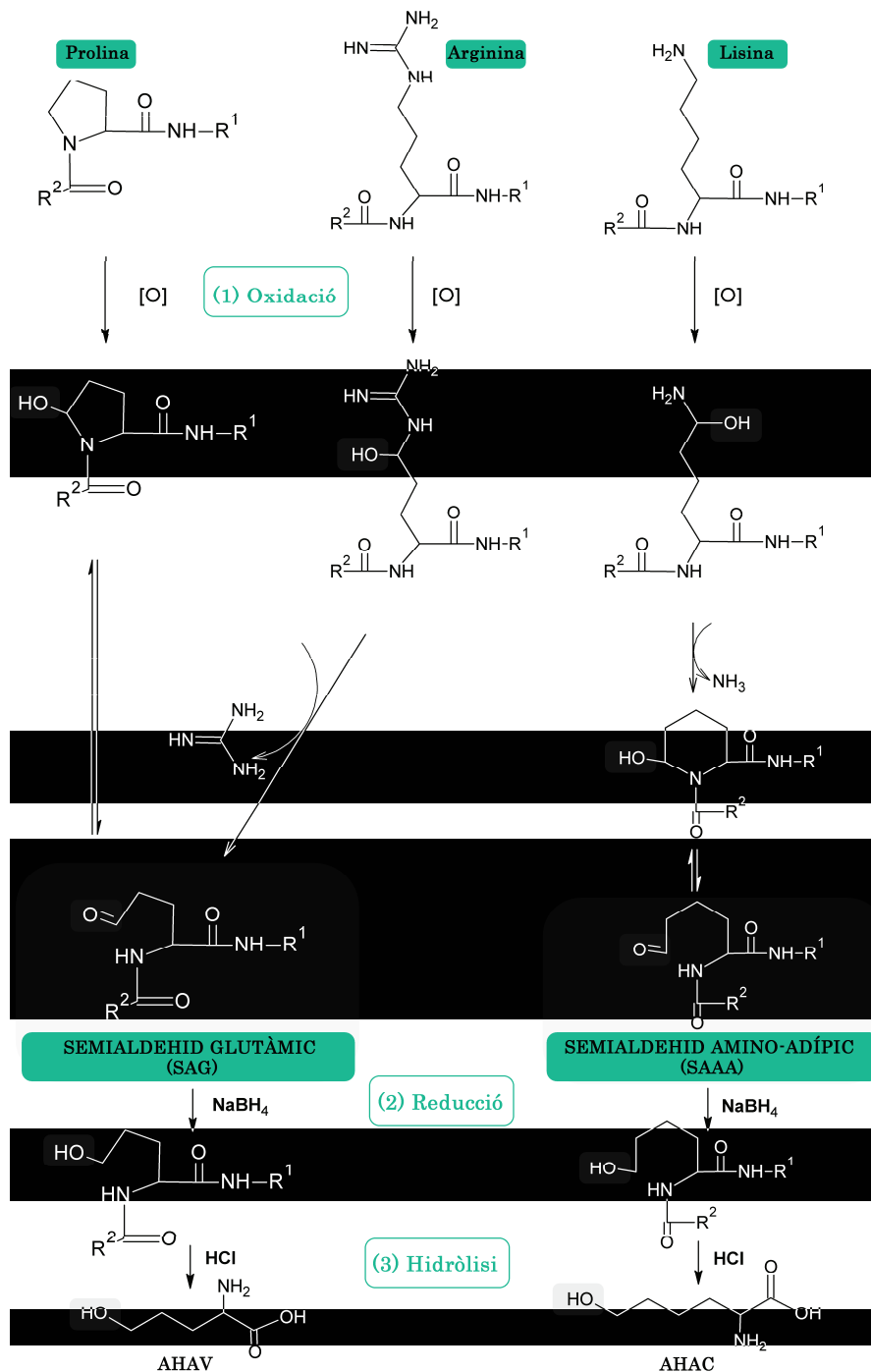
carbonílics resultants de l'oxidació proteica directa catalitzada per metalls, representant entre un 55 i un 100% del valor total de carbonils. Conseqüentment, contribueixen quantitativament al valor total dels carbonils proteics tissulars. Mitjançant un mètode analític molt sensible, la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses, es poden quantificar en mostres biològiques (Naudí et al. 2009, Portero-Otín, Pamplona 2006). Per tant, els dos han estat els marcadors de lesió proteica quantificats en els teixits analitzats en aquesta tesi.

Les espècies carboníliques reactives que reaccionen amb grups nucleofílics de les cadenes laterals de certs aminoàcids provocant dany oxidatiu proteic, poden provenir de productes carbonílics produïts per la lipoxidació, com s'ha explicat en l'apartat anterior, o bé poden provenir de productes derivats de reaccions de glicació i oxidació, anomenada també la reacció de Maillard (Pamplona 2008, Portero-Otín, Pamplona 2006).

La reacció de Maillard, originalment descrita pel químic Louis-Camille Maillard el 1912, pot apreciar-se de forma clara durant la preparació dels aliments. La reacció química no enzimàtica que té lloc entre els sucres reductors i grups amino origina la formació de productes de reacció aromàtics. De totes maneres, un procés d'escalfament excessiu llarg dona com a resultat la formació de gustos desagradables, molècules (melanoïdines) que són actives als raigs UV, fluorescentes i sovint, entrecruades. Mentre que les formes exògenes de la reacció de Maillard poden tenir importants propietats biològiques i inclús genotòxiques quan s'ingereixen, la reacció de Maillard "endògena", és a dir, la formació de productes de la reacció de Maillard *in vivo*, coneguda també com reacció de glicació, es reconeguda avui dia com una de les nombroses modificacions no enzimàtiques de macromolècules, i especialment de proteïnes, que no només contribueix al procés d'envelliment, sinó que també pot tenir un paper regulador important en respostes fisiològiques i processos patològics (Monnier 2003).

Una de les conseqüències més importants dels estudis sobre glicació durant la dècada dels 80 va ser el reconeixement de que les reaccions oxidatives, i per inferència, l'estrès oxidatiu i les espècies reactives d'oxigen, catalitzen *in vivo* la modificació química de les proteïnes per la reacció de Maillard (Baynes et al. 2005). Els compostos carbonílics reactius formats durant l'oxidació de carbohidrats, lípids i

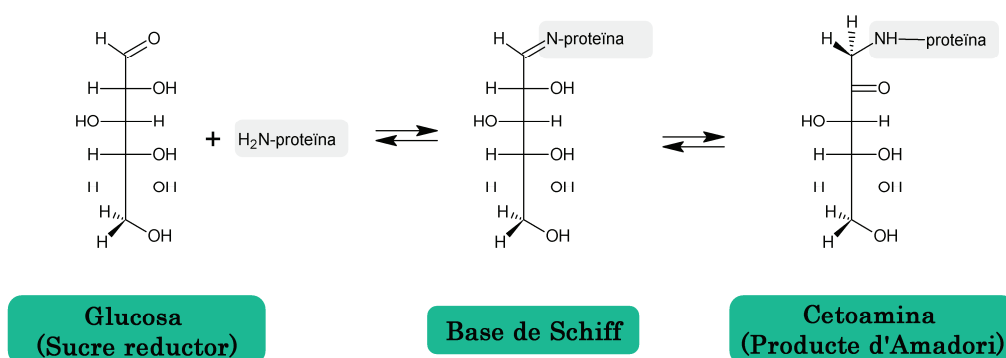
aminoàcids van ser identificats com els intermediaris responsables de la formació dels denominats productes finals de lipoxidació i glicoxidació avançada (AGE/ALEs, de l'anglès, *advanced glycoxidation and lipoxidation end-products*) que amb caràcter irreversible es generaven en les proteïnes modificades (Thorpe, Baynes 2003).



**Figura 10** Esquema de formació dels semialdehid glutàmic (SAG) i aminoadipic (SAAA) i dels seus productes de reducció, l'àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric (AHAV) i l'àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic (AHAC).

(1) Generació dels semialdehids glutàmic i amino-adipic a través de l'oxidació dels residus proteics de prolina, arginina i lisina. (2) Reducció amb Borhidrdur de sodi ( $NaBH_4$ ). (3) Hidròlisi àcida amb àcid clorhídric ( $HCl$ ) i formació dels productes AHAV i AHAC detectables per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (Requena et al. 2001).

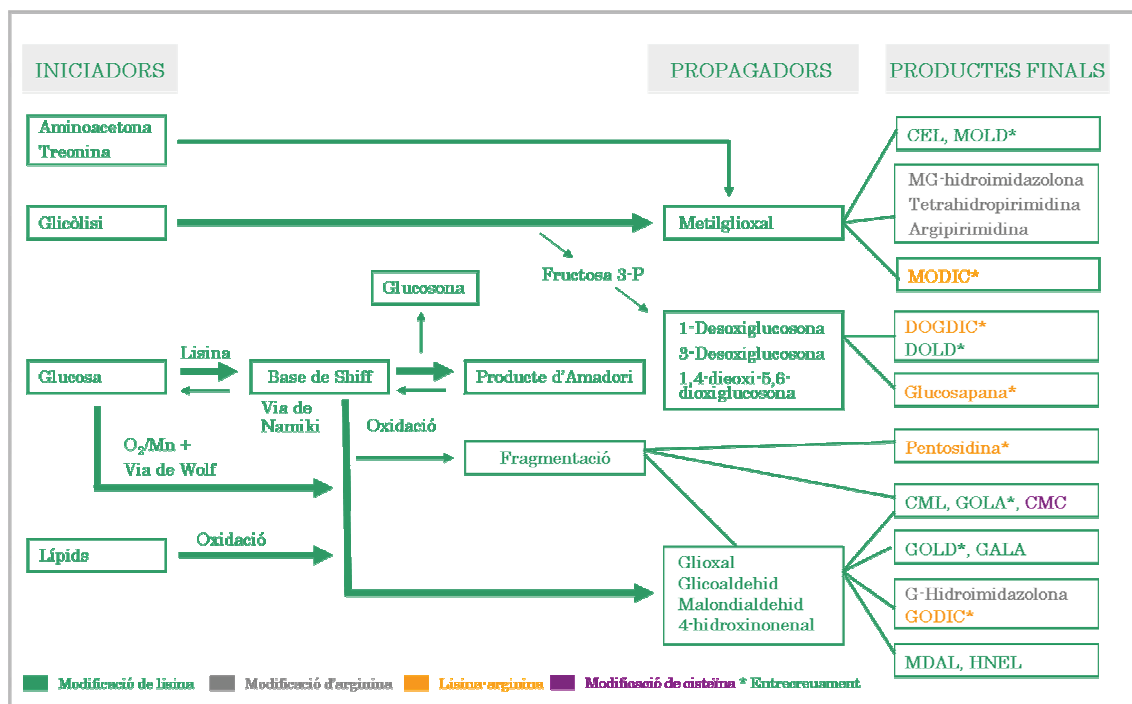
El primer estadi de la reacció de Maillard clàssica és la formació d'una base de Schiff i un producte Amadori entre sucres reductors i grups amino lliures en la proteïna (Figura 11). El producte Amadori format a partir de la glucosa pateix *in vivo* reaccions de reordenació i hidròlisis, alliberant 1- i 3-deoxiglucosones (1DG, 3DG) que mantenen preservat l'esquelet carbonat del sucre, però que presenten alhora dos grups carbonil reactius, d'aquí el fet que se'ls anomeni dicarbonils reactius Figura 8. La base de Schiff i el producte Amadori també poden sofrir oxidacions i fragmentacions que donen lloc a sucres de cadena curta i intermediaris reactius com el glioxal (GO) i el metilglioxal (MGO) (Figura 8 i Figura 12). Altres intermediaris reactius com la glucosona, i inclús el propi glioxal, poden també produir-se a partir de l'oxidació produïda pel peroxinitrit a la glucosa. Els compostos dicarbonílics reactius, descrits com a intermediaris formats durant el segon estadi de la reacció de Maillard (els propagadors representats en la Figura 12), poden de nou reaccionar amb la lisina, arginina i altres aminoàcids presents en les proteïnes i generar un ampli ventall de compostos i entrecreuaments considerats com a productes avançats de la reacció de Maillard durant el tercer i últim estadi de l'esquema clàssic de la reacció. En la Figura 13 es representen els productes avançats de glicació.



**Figura 11** Esquema de la reacció de Maillard.

A més a més de la multiplicitat d'estructures dels productes de la reacció de Maillard, actualment està reconegut i assumit que existeixen múltiples vies de formació d'aquests productes a partir dels sucres reductors: alguns provenen del compost d'Amadori, mentre que altres venen de la base de Schiff o de l'autooxidació directa dels carbohidrats. Alguns productes, com els compostos fluorescents vesperlisina i crosolisina, mantenen intacta l'estructura carbonada de la glucosa i per tant es pot dir que provenen directament de la glucosa. Per contra, la formació de pentosidina, un altre producte de la reacció de Maillard format a partir de la glucosa, requereix una fragmentació oxidativa i una pèrdua d'un àtom de carboni; la formació de pentosidina

a partir de pentoses també requereix condicions oxidatives. Per contra, la formació de pirralina a partir de la glucosa sembla ser un procés no oxidatiu. Altres productes, com la N<sup>ε</sup>-(carboximetil)lisina (CML) i la N<sup>ε</sup>-(carboxietil)lisina (CEL), requereixen fragmentació oxidativa de l'esquelet carbonat de la glucosa, però poden formar-se també a partir d'altres hexoses, pentoses, intermediaris glicolítics o l'àcid ascòrbic. El terme producte de glicoxidació (Baynes 1991) va introduir-se originalment per a caracteritzar els productes formats a partir de la seqüència de reacció de glicació i reacció d'oxidació.

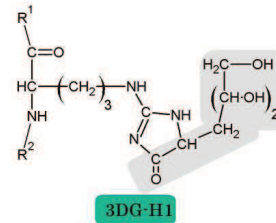
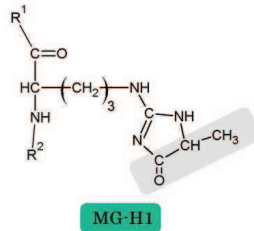
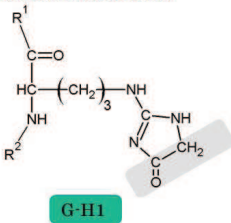


**Figura 12** Rutes químiques bàsiques i productes de la reacció de Maillard rellevants *in vivo*.

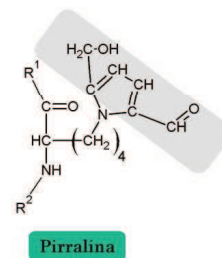
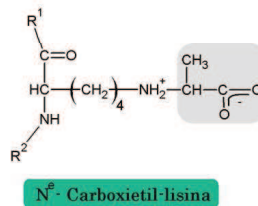
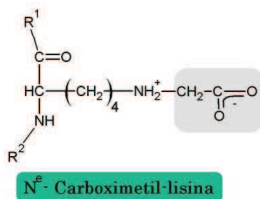
De fet, però, alguns productes de glicoxidació derivats de la glucosa poden també derivar d'altres precursors per rutes diferents, com és el cas de la CEL a partir de les trioses fosfat o MGO, que són productes del metabolisme anaeròbic. La CML es pot formar també a partir d'altres fonts, incloent productes d'oxidació de lípids i inclús d'aminoàcids. Així, el terme glicoxidació, encara que és útil per descriure els processos sinèrgics de glicació i oxidació, no es pot aplicar en sentit estricte als productes específics com la CML, a no ser que es conegui el seu origen químic. Quan la CML es forma a partir dels lípids, es descriu com un producte de lipoxidació avançada i en els casos en els que el seu origen és incert, com pot succeir en les proteïnes intracel·lulars, la CML i altres compostos relacionats com podria ser la MOLD, estan millor descrits com a compostos mixtes de glico- i lipoxidació. Cada vegada són més les

evidències que indiquen que els lípids són tant importants com els carbohidrats en la modificació química de les proteïnes tissulars (Thorpe, Baynes 2003).

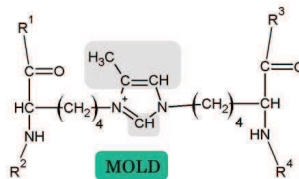
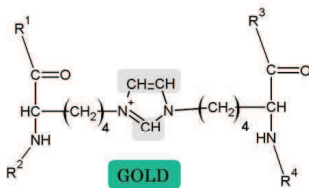
## HIDROIMIDAZOLONES



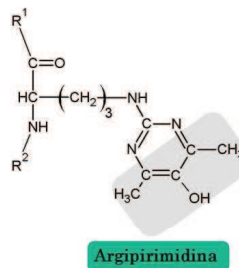
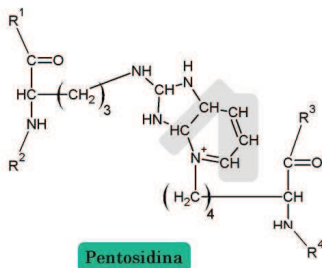
## ADDUCTES DERIVATS DE LISINA



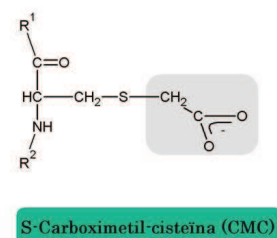
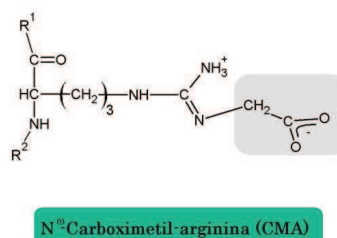
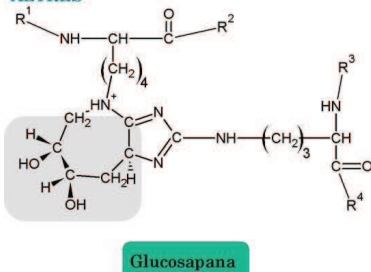
## ENTRECREUAMENTS DE LISINES



## ENTRECREUAMENTS FLUORESCENTS



## ALTRES



**Figura 13** Estructura química dels productes de glicació avançada detectats *in vivo*.

Les hidroimidazolones es formen per la reacció del glixal, metilglixal i 3-deoxiglucosona (3DG) formant G-H1 [N<sup>ε</sup>-5-hidro-4-imidazol-2-il]ornitina], MG-H1 [N<sup>ε</sup>-5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il]ornitina] i 3DG-H1 [N<sup>ε</sup>-5-hidro-5-(2,3,4-trihidroxibutyl)-4-imidazol-2-il]ornitina] i isòmers estructuralment relacionats, respectivament. Els compostos entrecruats GOLD i MOLD són derivats del glixal i del metilglixal, respectivament (Naudí et al. 2010).

La formació dels productes de la reacció de Maillard, de la mateixa manera que el metabolisme de carbohidrats, pot ser no oxidatiu o oxidatiu, anaeròbic o aeròbic, mentre que la formació dels productes de lipoxidació avançada requereix una química oxidativa per a formar intermediaris. El metabolisme, en qualsevol cas, és un contribuïdor important als processos no enzimàtics com la glicoxidació i la lipoxidació. Els compostos intermediaris del metabolisme de carbohidrats, incloent productes de la glicòlisis (trioses fosfat) i de la via dels poliols (fructosa o fructosa-3-fosfat), són potents modificadors de les proteïnes o precursors d'intermediaris reactius. D'una manera similar, a més de la formació no enzimàtica d'isoprostans, les ciclooxigenases i lipooxigenases són fonts importants d'endoperòxids i hidroperòxids precursors de productes de lipoxidació avançada en els teixits. Així doncs, la reacció de Maillard pot ser vista com un conjunt de reaccions químiques no catalitzades amb substrats i intermediaris en el metabolisme que, anàlogament a la lesió oxidativa directa, també afecta a les propietats físico-químiques i biològiques d'aquelles molècules sobre les que es forma. Així s'han descrit alteracions de la mobilitat electroforètica, alteracions de l'estabilitat tèrmica, augment de la resistència a la digestió proteolítica, canvis conformacionals, canvis en l'activitat enzimàtica i hormonal, alteracions de l'afinitat i especificitat a receptors i tendència a la formació d'agregats, entre altres canvis (Naudí et al. 2009).

Com a conseqüència d'aquestes modificacions químiques tant la oxidació directa o no, les proteïnes sofreixen una multitud de canvis estructurals i funcionals tals com fragmentacions, formació d'entrecruaments intra i interproteïnes que poden conduir a la formació d'agregats, desnaturalitzacions i pèrdues d'activitat funcional, entre altres (Portero-Otín, Pamplona 2006). La majoria de les modificacions oxidatives a proteïnes són irreversibles, per tant, l'única manera de reparar la proteïna és mitjançant el seu recanvi.

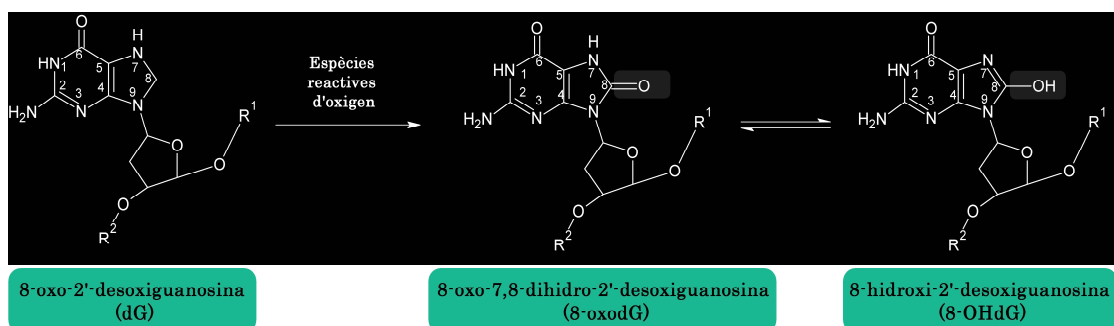
### **3.4. La lesió endògena de l'ADN**

El material genètic cel·lular, l'ADN, és l'altre grup de macromolècules cel·lulars, el qual està també directament exposat a l'atac d'electròfils i oxidants endògens els quals originen la lesió oxidativa (Naudí et al. 2009). Podríem distingir tres tipus de lesió de l'ADN, segons siguin els seus precursors: i) lesió oxidativa produïda per les espècies reactives d'oxigen; ii) lesió produïda per carbonilació; i iii) metilació de l'ADN.

La lesió de l'ADN pot ser el resultat de reaccions amb les bases del l'àcid nucleic, els residus de desoxiribosa o l'esquelet fosfodièster. El grau de lesió oxidativa, que s'ha avaluat examinant el contingut de les diferents modificacions en diferents teixits i espècies, s'ha quantificat i oscil·la entre nivells baixos com 1 en  $10^9$  nucleòtids fins a nivells elevats de 1 en  $10^6$  nucleòtids, el qual correspon a un rang d'entre 3-3000 modificacions per cèl·lula. La conseqüència més important de la lesió de l'ADN és el fet que provoca mutacions (Halliwell, Gutteridge 2007). El radical hidroxil pot reaccionar amb els dobles enllaços de les bases nitrogenades de l'ADN o arrancar un àtom d'hidrogen dels grups metil o de la desoxiribosa. El radical hidroxil reacciona amb les purines afegint-se al doble enllaç de la posició 7,8 generant la 8-oxo-7,8-dihidrodesoxiguanosina (8-oxo-dG) que és més abundant que la 8-oxo-7,8-dihidrodesoxiadenosina (8-oxodA). La 8-oxo-dG és el marcador de la lesió oxidativa a l'ADN més universalment estudiat en els treballs d'envelliment i patologies associades a l'edat, per no dir que és pràcticament l'únic (Figura 14). Aquest marcador es fàcilment mesurable mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, de l'anglès, *high performance liquid chromatography*) (Barja 2004a). El radical hidroxil pot també afegir-se al doble enllaç de la posició 5,6 de les pirimidines generant glicols de pirimidina. Alternativament, l'abstracció d'un hidrogen del grup 5-metil de la timina pot generar un radical centrat en el carboni que reacciona amb l'oxigen molecular per formar un hidroperòxid; aquest hidroperòxid es redueix a hidroximetil-dU. L'abstracció d'un àtom d'hidrogen de la desoxiribosa pot conduir a la fragmentació concomitant amb la formació d'enals a nivells de les bases que poden, a la vegada, reaccionar amb altres grups nucleofílics d'altres parts de l'ADN. 8-oxodG indueix transversions a T o C tant en experiments de replicació *in vitro* com en experiments de mutagènesis *in vivo*. S'han observat mutacions A → C com a resultat de la replicació *in vitro* de 8-oxodA. Es coneix que la 8-oxodG i la 8-oxodA sofreixen obertures de l'anell imidazol a adductes formamidopirimidina (FAOy), que són productes menors de l'oxidació de purines. La reparació dels adductes 8-oxodG i FAPy es realitza per glicosilases en sistemes procariotes i eucariotes. Les lesions de pirimidines per radicals hidroxil també són mutagèniques. 5-hidrosideoxicitidina (5-hidroxiC) indueix mutacions C → T i C → A *in vitro* i transicions C → T *in vivo*. 5-hidroxiC també es desamina a 5-hidroxi-deoxiuracil, que codifica com a T. Això proporciona un mecanisme addicional per a la inducció de transicions C → T. El glicol de timidina causa mutacions T → C *in vivo*.



L'òxid nítric pot generar intermediaris reactius, com ja s'ha discutit anteriorment, que també poden lesionar directament l'ADN. Entre els diferents marcadors de la lesió per òxid nítric de l'ADN podem destacar la 8-nitro-dG com una de les més abundants. També s'ha observat que aquestes modificacions poden induir mutacions i fragmentacions de l'ADN. Així mateix, la generació d'hipoclorit representa una nova via de modificació de l'ADN però, en aquest cas, per halogenació de les bases. S'ha observat que la 5-cloro-dC és el principal producte resultant de la reacció del hipoclorit amb l'ADN i s'ha detectat en teixits humans. Aquesta i altres modificacions d'aquest tipus també descrites s'han mostrat inductores d'errors i poden causar transicions i transversions.



**Figura 14** Estructura del nucleòsid 2'-deoxiguanosina i del producte de la seva oxidació mitjançant espècies reactives d'oxigen.

En realitat el producte són dos molècules en equilibri: la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) i la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG).

Els compostos carbonílics generats per la lesió oxidativa de carbohidrats i àcids grassos poliinsaturats poden reaccionar amb grups amino exocíclics de dG, dA i dC i formar una àmplia diversitat de productes (Marnett 2002). Alguns dels compostos carbonílics típics que poden causar la lesió a l'ADN són, entre altres, malondialdehid, acroleïna, crotonaldehid i hidroxinonenal. Aquests "enals" són electròfils bifuncionals ja que tenen dos grups carbonílics reactius que poden reaccionar amb l'ADN. Els adductes més comuns que es formen a partir dels enals són adductes exocíclics com l'adducte d'eté a partir de dA, dG i dC, un adducte pirimidopurinona (M 1 dG) a partir de la dG; i l'adducte 8-hidroxiopropanodeoxiguanosina (HO-PdG) a partir de dG, entre altres. Els adductes d'eté han demostrat que són mutagènics en bacteries i cèl·lules eucariotes, encara que s'han descrit diferències significatives en el grau de mutagènesi depenent del tipus de modificació. Les bacteries i animals posseeixen vies de reparació per escissió de la base per a poder actuar sobre els adductes de l'eté. 1, N<sup>6</sup>-eté-dA i, en un menor grau, 3,N<sup>4</sup>-eté-dC s'ha demostrat que està reparada per una timina-ADN

glicosilasa específica del error. L'adducte M 1 dG és el resultat de la reacció de malondialdehid amb dG i també és mutagènic ( $G \rightarrow A$  i  $G \rightarrow T$ ).

La metilació de l'ADN es dona mitjançant la reacció no enzimàtica de bases amb S-adenosilmetionina i altres agents metilants exògens (Bignami et al. 2000). Els llocs més comuns de lesió són sobre 2'-desoxitimidina (dT), formant O<sup>4</sup>-metil-dT; sobre dG, formant O<sup>6</sup>-metil-dG i N<sup>7</sup>-metil-dG; i sobre dA, formant N<sup>3</sup>-metil-dA, N<sup>6</sup>-metil-dA, i N<sup>7</sup>-metil-dA. La metilació enzimàtica de citosina amb S-adenosilmetionina juga un paper clau en la regulació gènica i el fenomen d' *imprinting* en els mamífers, que pot conduir a la inactivació funcional dels gens. Les bases metilades s'aparellen malament *in vitro* i *in vivo* i pot interferir amb la unió d'enzims de l'ADN i elements reguladors. Els events mutagènics en *Escherichia coli* i cèl·lules de mamífers revelen que la O<sup>6</sup>-metil-dG aparella malament amb la timidina per generar transicions  $G \rightarrow A$ . O<sup>4</sup>-metil-dT causa transicions  $T \rightarrow C$ , mentre que la N<sup>3</sup>-metil-dA i N<sup>6</sup>-metil-dA promou transicions  $A \rightarrow G$  i formació de llocs abàsics. La metilació de purines en N<sup>7</sup> causa la desestabilització del enllaç glicosídic, i la següent depurinació a un lloc abàsic.

#### 4. LA LONGEVITAT I L'ESTRÈS OXIDATIU

Una vegada plantejada la hipòtesi més acceptada de la teoria que explica l'envelliment el què cal és observar si les evidències disponibles recolzen o refusen les prediccions de la hipòtesi. De manera simplista hi ha dos rutes bàsiques que poden ser responsables de l'impacte de les espècies reactives d'oxigen en el procés d'envelliment: i) les rutes que afecten al flux net de ROS en l'organisme o bé als òrgans estratègics de l'organisme. És a dir, el conjunt entre les que produeixen i eliminen els ROS, i ii) aquelles que contribueixen a reparar o recanviar les estructures lesionades pels ROS. Inclouen els sistemes de reparació/recanvi d'ADN, proteïnes i lípids. L'equilibri entre les dos, i no una d'elles per si sola, determinen el valor absolut o flux net d'estrès oxidatiu en l'organisme o el teixit determinat (Pamplona, Barja 2007).

Amb aquestes premisses, si la teoria de l'envelliment fos certa, s'haurien de complir les prediccions: a) l'estat basal de les biomolècules lesionades oxidativament hauria de ser menor en espècies longeves comparades amb les de longevitat més curta. Aquests canvis podrien donar-se per una menor producció de ROS i consegüentment una menor capacitat antioxidant, o bé una major o menor capacitat de reparació/recanvi de

les biomolècules oxidades; b) els nivells de lesió oxidativa haurien d'augmentar amb l'edat, i c) les manipulacions, ja siguin de la dieta, farmacològiques o genètiques, les quals augmenten la longevitat perquè retarden l'envelliment, també haurien de mostrar una menor lesió oxidativa a les biomolècules, fet que es discutirà en l'apartat 6.

#### **4.1. Estudis comparatius interespecies**

Les evidències disponibles apunten a dos mecanismes clau per a la taxa d'envelliment d'una espècie. Aquestes són la disminució de la taxa de generació endògena, és a dir, la disminució de generació mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i el fet de posseir macromolècules menys sensibles a la lesió oxidativa, el què es tradueix en el fet de tenir una menor taxa endògena de lesió oxidativa (Pamplona, Barja 2007).

##### **4.1.1. La lesió endògena i els nivells d'antioxidants en la longevitat**

La relació entre producció mitocondrial de radicals lliures i longevitat màxima s'ha realitzat des d'una aproximació comparada de fisiologia animal. Els resultats obtinguts demostren que majoritàriament existeix una relació negativa entre la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i la longevitat màxima (Sanz, Pamplona & Barja 2006, Pamplona, Barja 2007). És a dir, les espècies longeves produeixen menys radicals lliures que les espècies de longevitat més curta. Així els estudis realitzats en diferents òrgans de mamífers que difereixen en la seva longevitat màxima constaten l'existència d'una correlació exponencial negativa entre producció de ROS (radicals superòxid i peròxid d'hidrogen) i longevitat màxima. S'han obtingut resultats idèntics comparant mamífers i aus. Les aus són vertebrats homeotèrmics que, comparades amb els mamífers de tamany corporal similar, són extremadament longeves, tot i que paradoxalment tenen elevades taxes de consum d'oxigen, així com temperatura corporal, taxa metabòlica i glucèmia, entre altres variables. En el context de l'estrès oxidatiu, és evident que l'elevació d'aquests paràmetres hauria de contribuir, en principi, a una acceleració de la lesió molecular. Però no és aquest el cas, fet que suggereix que les aus posseeixen adaptacions moleculars que prevenen o protegeixen de la lesió oxidativa. Doncs bé, els estudis portats a terme sistemàticament demostren que la producció mitocondrial de ROS és menor en les aus en comparació amb els

mamífers. En tots aquests casos, les diferències s'observen a nivell del complex I mitocondrial. S'han obtingut resultats idèntics comparant rosegadors de tamany corporal similar però que diferien en la seva longevitat màxima, o entre rosegadors i ratpenats (aquests últims són iguals de longeus que les aus). En aquesta mateixa línia, si la producció mitocondrial de radicals lliures juga un paper clau en el control de la taxa d'envelliment, la taxa de producció de ROS d'animals amb diferents taxes metabòliques i diferents tamany corporals però amb similar longevitat màxima hauria de ser igual. Això és exactament el que succeeix quan es compara la producció mitocondrial de ROS de ratolins (longevitat màxima 3,5 anys) i rates (longevitat màxima 4 anys). De totes maneres, aquests estudis comparats també demostren que les diferències en la producció mitocondrial de ROS són més petites que les diferències en longevitat màximes, fet que suggereix que han d'existir altres variables que també poden participar en el procés d'envelliment.

A més a més, els estudis comparatius ens aporten més informació. El fet que les espècies longeves posseeixin constitutivament una menor producció mitocondrial de radicals lliures es tradueix de manera immediata en dos conseqüències, les espècies longeves contenen una menor dotació d'antioxidants endògens i la lesió oxidativa a l'ADN mitocondrial és menor.

En concordança amb la baixa producció de radicals lliures mitocondrials de les espècies longeves, hi ha una resposta adaptativa referent als sistemes antioxidants cel·lulars endògens (Pamplona, Barja 2007, Pamplona, Barja 2006). És a dir, vertebrat longeus, incloent els mamífers, constitutivament tenen nivells menors d'enzims antioxidants i d'antioxidants endògens de baix pes molecular en comparació amb els animals de vida curta. Aquesta característica pot explicar perquè els antioxidants endògens tissulars correlacionen negativament amb la longevitat entre les espècies: els animals longeus tenen constitutivament nivells menors d'antioxidants ja que ells tenen una taxa de producció menor de ROS. Si els animals longeus tinguessin altes produccions de ROS juntament amb nivells baixos d'antioxidants, les seves cèl·lules no podrien mantenir l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu. En canvi, disminuint la producció dels ROS mitocondrials en lloc d'incrementar els sistemes de reparació d'antioxidants té sentit quan es considera des d'un punt de vista de l'evolució de la vida entre les espècies (Pamplona, Barja 2007).

#### 4.1.2. La lesió endògena en l'envelliment

Durant les últimes dècades, s'han realitzat un gran nombre d'estudis utilitzant una gran varietat d'espècies animals, que van des dels invertebrats als humans, amb l'objectiu de respondre si la concentració o el nivell basal de les molècules oxidades augmenten amb l'edat de l'animal. Els estudis demostren que existeix un augment associat amb l'edat en la quantitat basal dels productes resultants de l'atac per les espècies reactives d'oxigen i els seus derivats reactius sobre les macromolècules com les proteïnes, els lípids i l'ADN en una gran varietat d'òrgans i espècies (Pamplona, Barja 2007, Pamplona 2008, Sanz et al. 2009). Així, s'ha observat augment del contingut en carbonils proteics en cervell, ronyó, cor i fetge de ratolí (Sohal et al. 1994, Ayala, Cutler 1996, Dubey et al. 1996), en fetge i fibroblasts d'humans (Ayala, Cutler 1996, Oliver et al. 1987) i en múscul esquelètic de mono rhesus (Zainal et al. 2000) amb l'edat. També s'ha vist augment de metionina sulfòxid en el col·lagen de la pell dels humans (Wells-Knecht et al. 1997) i del marcador d'oxidació proteica directa de HAVA en fetge d'humà (Ayala, Cutler 1996). Pel que fa a la lipoxidació s'ha trobat un augment d'hidroperòxids lipídics en mitocòndries de fetge i en fetge de rata (Laganieri, Yu 1987, Jeon et al. 2001), un augment de MDA-TBARS en fetge de ratolí (Koizumi, Weindruch & Walford 1987) i en fetge, cervell i cor de rata (Jeon et al. 2001, Sawada, Carlson 1987) i una disminució de la fluïdesa de la membrana amb l'edat en diferents teixits de rata: en mitocòndries de fetge (Yu, Suescun & Yang 1992, Kim, McCarter & Yu 1996) de cervell (Gabbita et al. 1997) i de cor (Lee, Yu & Herlihy 1999) i en teixit total de cervell, cor i fetge (Sawada, Carlson 1987, Sawada, Sester & Carlson 1992). Pel que fa al marcador de glicoxidació CEL, s'ha observat un augment en el col·lagen del cartílag (Verzijl et al. 2000) i en proteïnes del cristal·lí (Ahmed et al. 1997) en humans i en mitocòndries de fetge de rata (Lambert et al. 2004) amb l'edat. I referent al dany oxidatiu al material genètic, s'ha trobat un augment en cervell, fetge i ronyó de rata (Draper et al. 1995, Cai, Tian & Wei 1996) de la modificació de l'ADN per malondialdehid (MDA-ADN). També existeixen diferents estudis els quals han trobat un increment en el nivell basal de 8-oxodG durant l'envelliment en cervell, cor o fetge en ADN nuclear o en ADN mitocondrial en rosegadors i humans (Sohal et al. 1994, Fraga et al. 1990, Mecocci et al. 1993, de la Asuncion et al. 1996, Hamilton et al. 2001). Per altra banda, existeixen també estudis experimentals on no s'observa augment de lesió amb l'edat de l'animal, com l'estudi en fetge, cor i cervell de rates de 3 a 24 mesos no observen augment de paràmetres de dany oxidatiu proteic (Davies et

al. 2001), com tampoc s'ha trobat augment de dany oxidatiu a l'ADN en (Hirano et al. 1996).

En qualsevol cas, l'increment del dany oxidatiu a les macromolècules no és suficientment fort per demostrar l'acumulació amb l'edat. Aquesta acumulació podria no ser consistent amb el gran ventall de formes de reparació del dany oxidatiu en els teixits, que contràriament al que es creia al principi, els nivells d'antioxidants endògens no disminueixen amb l'edat (Barja 2004a, Benzi, Moretti 1995). De fet però, aquest increment de l'oxidació amb l'edat podria representar un reajustament del flux del dany oxidatiu i reparació de les macromolècules cel·lulars perjudicades a nivells alts d'oxidació en individus vells, cosa que contribuiria a la deterioració associada a l'envelliment (Pamplona, Barja 2010, Pamplona, Barja 2006).

Com ja s'ha comentat una de les conseqüències més importants del dany oxidatiu en l'envelliment és la constant generació de les mutacions de l'ADN en cèl·lules postmitòtiques, com les que es donen en l'ADN mitocondrial (Barja 2000, Melov et al. 1997, Khrapko, Ebralidse & Kraytsberg 2004), perquè es van acumulant amb l'edat. Està ben demostrat que succeeixen mutacions en l'ADN mitocondrial en cor, cervell i altres teixits (Melov et al. 1997, Khrapko, Ebralidse & Kraytsberg 2004, Ozawa 1999). Es ven possible que un nombre relativament baix de mutacions pugui causar efectes deleteris importants i permanents durant l'envelliment en les cèl·lules que les conté, com en cèl·lules properes dins el mateix teixit o potser en cèl·lules situades ben lluny en altres teixits. Per exemple, s'ha proposat que cèl·lules anaeròbiques mutades indueixen oxidació en les LDL del plasma fet que comporta una amplificació del dany oxidatiu en molts altres òrgans de l'organisme (de Grey 2000). A més a més, s'ha observat un paral·lelisme entre el dany a l'ADN nuclear i mitocondrial a nivell de 8-oxodG amb l'envelliment i les mutacions somàtiques dels dos tipus d'ADN. Tant els nivells de 8-oxodG com les mutacions somàtiques en l'ADN estan unes 10 vegades augmentades en l'ADN mitocondrial respecte al nuclear. Aquest fet suggereix una relació causa-efecte entre la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i l'acumulació de mutacions a l'ADN mitocondrial amb l'edat (Pamplona, Barja 2006).

### 4.1.3. Els components cel·lulars estructurals resistent a danys oxidatius

Estudis recents recolzen la idea d'una altra línia de defensa basada en la sensibilitat inherent de les macromolècules al dany oxidatiu. Aquesta susceptibilitat, definida com la facilitat en que aquestes molècules sofreixen un dany oxidatiu, està intrínscament lligat a la seva estructura i composició química dels carbohidrats, lípids, àcids nucleics i proteïnes. Per tant, els intermediaris glicolítics, els àcids grassos altament insaturats, la guanina i la metionina són dins dels grups dels monosacàrids, àcids grassos, nucleobases i aminoàcids, respectivament, els tipus de macromolècules més susceptibles a l'oxidació per espècies reactives d'oxigen (Pamplona, Barja 2007).

#### MONOSACÀRIDS

Les dades dels nivells d'intermediaris glicolítics intracel·lulars (els monosacàrids més inestables i reactius) mostren que les seves concentracions estan al rang de micromolar, per contra, els nivells de glucosa (el monosacàrid més abundant i estable en la forma d'anell) es troben en el rang de milimolar. Com menor és la concentració cel·lular d'intermediaris glicolítics altament reactius, menor és l'estrès biològic (Monnier et al. 1991). A partir d'aquest fet es va proposar que la glucosa havia arribat a ser el portador més important d'energia de cèl·lula a cèl·lula en espècies animals, precisament perquè és el carbohidrat més estable i més lent a reaccionar (Bunn, Higgins 1981).

#### ÀCIDS GRASSOS

Els àcids grassos altament insaturats, més de dos dobles enllaços, són els àcids grassos menys abundants en les membranes cel·lulars (Pamplona 2008). Els àcids grassos insaturats són les macromolècules més susceptibles al dany oxidatiu en les cèl·lules, i la seva sensibilitat incrementa en funció del nombre de dobles enllaços que posseeixen (Hulbert et al. 2007, Pamplona 2008, Holman 1954). Això significa que les cadenes d'àcids grassos saturats i monoinsaturats són essencialment més resistent a l'oxidació i per contra, els poliinsaturats són fàcilment més oxidables (Hulbert et al. 2007, Pamplona 2008). S'ha constatat que les membranes cel·lulars i mitocondrials d'òrgans com el fetge, cor, múscul esquelètic i ronyó de mamífers i aus longeves contenen àcids grassos amb un índex global de saturació més baix que els no longeus,

fet que constitutivament protegeix les seves membranes cel·lulars, proteïnes i ADN contra la lesió derivada de la peroxidació lipídica (Pamplona, Barja 2003, Pamplona, Barja & Portero-Otin 2002). Aquest menor grau d'insaturació de les membranes de les espècies longeves també es tradueix en una menor susceptibilitat a la peroxidació lipídica *in vivo* i *in vitro*. Els animals longeus adquireixen un baix índex de dobles enllaços principalment evitant els àcids grassos altament insaturats com el 22:6n-3, i a vegades el 20:4n-6, i substituint-los pels 18:3n-3 i el 18:2n-6. Aquest ajust redueix el grau d'insaturació sense modificar la quantitat total dels àcids grassos poliinsaturats, permetent un fort descens en la sensibilitat a la peroxidació lipídica probablement sense grans canvis en la fluïdesa de membrana, fenomen que s'ha denominat adaptació de la homeoviscositat a la longevitat (Pamplona, Barja & Portero-Otin 2002). Tanmateix, no hi ha evidències que constatin que els efectes de les intervencions nutricionals sobre la longevitat esdevinguin en els mateixos termes que els observats en els estudis comparatius entre espècies animals.

Com ja s'ha explicat, la peroxidació lipídica genera productes aldehydics que poden atacar i modificar covalentment a proteïnes i ADN. En aquest sentit, també s'ha observat que el grau de modificació lipoxidativa de proteïnes de diferents òrgans és menor en els mamífers i aus longeves que en les espècies de menor longevitat. Per tant, quant major és la longevitat d'una espècie, menor és el contingut de dobles enllaços, i també menor es la seva sensibilitat a la peroxidació lipídica i conseqüentment, els seus nivells de modificació proteica derivada de lipoxidació.

## NUCLEÒTIDS

De tots els nucleòtids, la guanina és el menys abundant en l'ADN mitocondrial (Samuels 2005). La guanina és la nucleobase amb el potencial d'oxidació més baix i això fa que sigui la que més fàcilment es pugui oxidar (Bjelland, Seeberg 2003). La lesió de l'ADN pot ser especialment rellevant per al procés d'envelliment ja que pot produir la pèrdua o alteració irreversible de la informació genètica de forma especialment rellevant en les cèl·lules postmitòtiques. A més, l'ADN mitocondrial està situat molt a prop o casi en contacte amb els llocs de producció de ROS en la mitocondria. Donat que els vertebrats longeus tenen taxes baixes de generació de ROS, això afecta al nivell de lesió oxidativa i mutacions somàtiques en el seu ADN mitocondrial. D'acord amb aquesta noció, s'ha demostrat que els nivells de 8-oxodG en



l'ADN mitocondrial de cervell i cor correlacionen negativament amb la longevitat màxima en mamífers i aus (Barja 2004a). Aquest fet lliga amb la baixa excreció urinària de 8-oxodG detectada en animals longeus. A més a més, els nivells de 8-oxodG, tant en cervell com en cor, són de l'ordre de 10 vegades més elevats en l'ADN mitocondrial en relació a l'ADN nuclear, en totes les espècies de mamífers i aus estudiades, una diferència similar a l'observada per les mutacions espontànies comparant també ambdós tipus d'ADN. Tant l'atac per ROS com la reparació del dany oxidatiu a l'ADN semblen ser més intensos a l'ADN mitocondrial d'animals de vida curta que en els longeus, i estan també més augmentats en l'ADN mitocondrial amb relació al nuclear en totes les espècies independentment de la seva longevitat.

## **AMINOÀCIDS**

Varies línies d'evidències també suggereixen que la metionina o els seus metabòlits poden estar implicats en la longevitat màxima (Pamplona, Barja 2006). Així, s'ha observat que la metionina és l'únic aminoàcid present en les proteïnes intracel·lulars de cor que correlacionen amb la longevitat màxima en mamífers, i aquesta correlació és negativa (Ruiz et al. 2005), també és negativa la mateixa correlació en plomes d'espècies de mamífers de diferents longevitats (ho demostren resultats recents i no publicats del nostre grup). A més, el contingut proteic de metionina també és menor en teixits (múscul esquelètic i cervell) d'aus longeves que en els mamífers de similar tamany corporal però amb longevitat més curta (Portero-Otin et al. 2004, Pamplona et al. 2006). Aquests resultats suggereixen que quant major és la longevitat d'una espècie, menor és el contingut de metionina de les seves proteïnes. Els residus de metionina d'una proteïna estan entre els aminoàcids més susceptibles a l'oxidació per radical lliures i la sensibilitat de les proteïnes a l'estrès oxidatiu augmenta en funció del numero de residus de metionina (Stadtman, Moskovitz & Levine 2003). En relació amb aquest fet, un treball recent en el qual realitzen un meta-examen de les seqüències dels genomes de 248 espècies animals de longevitat màxima coneguda, incloent els mamífers, ocells, peixos, insectes, revela que la freqüència en que la cisteïna es codificada per l'ADN mitocondrial és un indicador molecular específic i filogenèticament ubic de la longevitat en el medi aeròbic. Les espècies longeves sintetitzen els complexos de la cadena de transport mitocondrial reduïnt estructuralment els seus nivells de cisteïna (Moosmann, Behl 2008). Conjuntament, totes aquestes evidències

suggereixen que el contingut dels aminoàcids sulfurats en les proteïnes és inversament proporcional a la longevitat de les espècies.

## 5. LA METIONINA I L'ESTRÈS OXIDATIU

La metionina és un aminoàcid essencial en la dieta i juga un paper clau i únic tant en la estructura de les proteïnes com en el metabolisme cel·lular. És un dels quatre aminoàcids sulfurats més comuns; els altres tres són la cisteïna, l'homocisteïna i la taurina. D'aquests, només la cisteïna, conjuntament amb la metionina, formen part de les proteïnes. L'homocisteïna apareix com a intermediari metabòlic en el metabolisme de la metionina i la taurina apareix en el catabolisme de la cisteïna (Figura 13) (Lehninger, Nelson & Cox 2005).

L'estructura de la metionina està caracteritzada per un grup metil unit covalentment a un àtom de sofre, tret químics crucials per les seves funcions estructurals i metabòliques. És l'aminoàcid més hidrofòbic gràcies al seu grup metil de la cadena lateral. Això explica el fet que més de dos terços dels residus de metionina de les proteïnes globulars es troben en l'interior hidrofòbic de les mateixes (Brosnan, Brosnan 2006). Per tant, la resta dels residus de metionina, que es troben en la superfície, són susceptibles a ser danyats per les espècies reactives d'oxigen, oxidant l'àtom de sofre i formant sulfòxid; a més a més, en dominis proteics de membrana, la metionina es troba sovint interaccionant amb la bicapa lipídica.

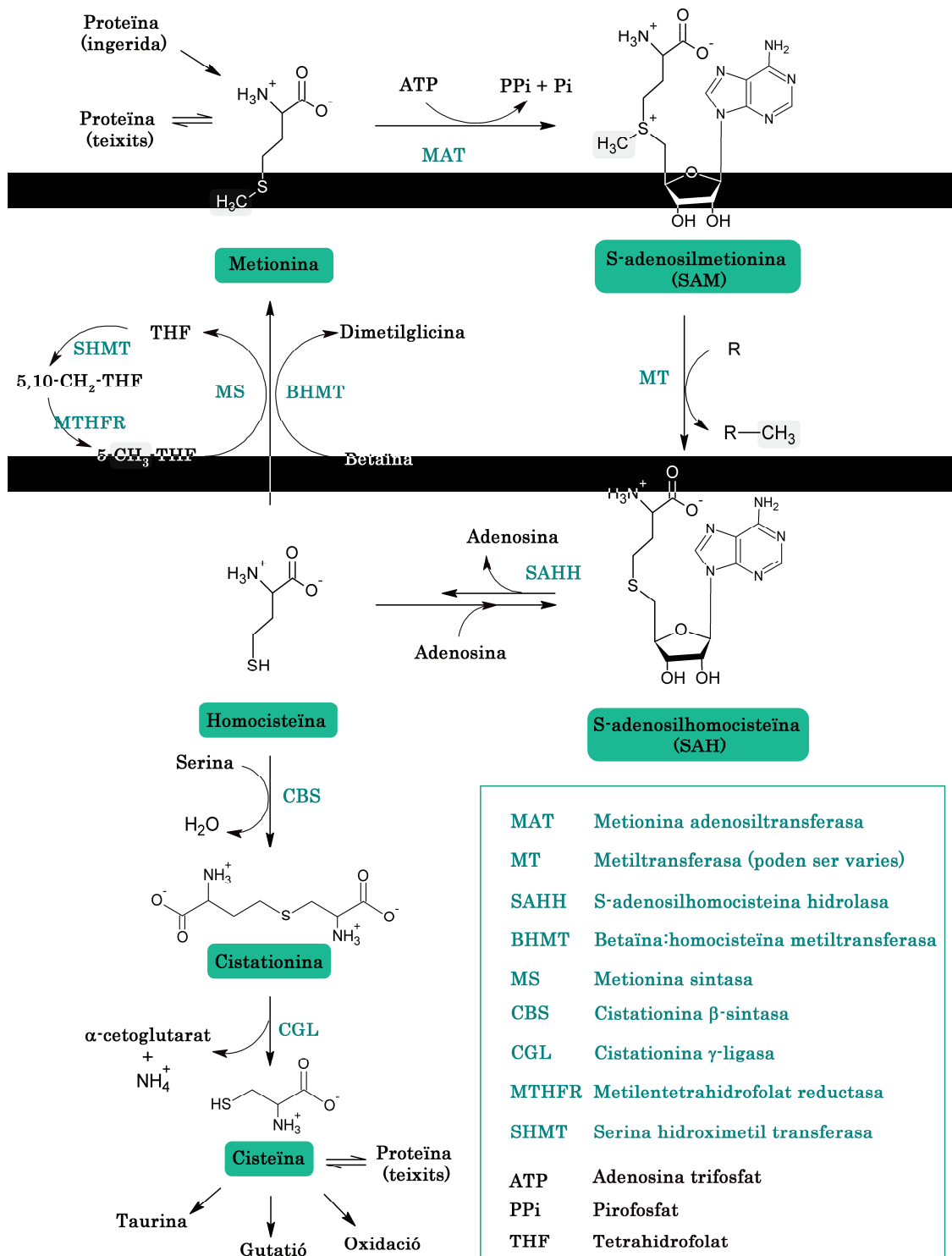
### 5.1. El metabolisme essencial de la metionina

En el metabolisme de la metionina existeixen tres vies diferenciades, la transmetilació, la remetilació i la transulfuració. La transmetilació, ubiqüa a nivell cel·lular, involucra un consum d'energia en forma de molècula d'ATP, la qual activa la metionina per formar S-Adenosilmetionina (SAM) mitjançant una reacció catalitzada per la metionina adenosiltransferasa (MAT), seguida per la transferència del grup metil de la S-adenosilmetionina mitjançant una metiltransferasa (MT) per a donar S-adenosilhomocisteïna (SAH) (Figura 13). La transmetilació es completa amb la hidròlisi reversible de SAH en homocisteïna i adenosina mitjançant una S-adenosilhomocisteïna hidrolasa (SAHH). El destí metabòlic de l'homocisteïna varia depenent del teixit i de la disponibilitat dels grups metils làbils.

La via de remetilació permet tornar a regenerar metionina a partir d'homocisteïna i de grups metils tant de nous o reusant els mateixos, els quals es transfereixen als acceptors mitjançant una reacció de metiltransferència depenent de SAM. La metionina sintasa (MS), un enzim ubic, remetila l'homocisteïna cap a metionina, d'aquesta manera es conserva l'esquelet carbonat d'aquest aminoàcid. L'homocisteïna també pot ser metilada, en el fetge com també en els ronyons d'algunes espècies, mitjançant la betaïna:homocisteïna metiltransferasa (BHMT) (Selhub 1999). La remetilació es regulada primàriament per la necessitat de grups metil. Quan la ingestió de grups metil làbils és generosa, la necessitat per remetil·lar és menor i per tant l'homocisteïna es catabolitzada; el contrari succeeix quan la ingesta de grups metils és limitada. La combinació de la transmetilació i la remetilació abraça el cicle de la metionina (Figura 13), el qual es dona en moltes cèl·lules.

El catabolisme de la metionina requereix de la via de la transsulfuració, una seqüència de dos reaccions catalitzades per dos enzims les quals produeixen cisteïna a partir de l'homocisteïna. La condensació d'homocisteïna amb la serina produeix cistationina, catalitzada per la cistationina beta-sintasa (CBS); la cistationina s'escindeix en cisteïna, alfa-cetoglutarat i amoni, reacció catalitzada per la cistationina gamma-ligasa (CGL). La conversió d'homocisteïna a cisteïna és irreversible. La via de transsulfuració, a diferència de les altres dos, té una distribució molt més limitada, sent activa només en fetge, ronyó, intestí prim i pàncrees.

Una característica important del metabolisme de la metionina és la seva dependència amb l'estat de la vitamina B. En el seu metabolisme estan involucrades quatre vitamines, tres en la via de remetilació i una en la via de transsulfuració. L'àcid fòlic, com a 5-metiltetrahidrofolat, és la font de grups metil per a la metionina sintasa (MS). El 5-metiltetrahidrofolat es produït per la metiltetrahidrofolat reductasa (MTHFR) la qual conté una forma derivada de la riboflavina (FAD) com a cofactor



**Figura 15** Principals vies metabòliques implicades en el metabolisme dels aminoàcids sulfurats. Adaptat de (Brosnan, Brosnan 2006).

La metionina sintasa és un dels dos únics enzims que contenen un grup prostètic derivat de la vitamina B12, en els mamífers. Tant la cistationina beta-sintasa CBS com la cistationina gamma-ligasa CGL utilitzen el fosfat de piridoxal com a grups prostètics (vitB6).

El complex metabolisme de la metionina es regulat pel comportament al·lostèric de la S-adenosilmetionina (SAM) i per l'expressió d'enzims claus. El metabolisme de l'homocisteïna, remetilació o transsulfuració, sembla que està coordinat en resposta a les concentracions de SAM o a la necessitat de generar grups metil per la metionina. Altes concentracions de SAM en fetge, normalment produïdes per un excès d'ingesta de metionina, facilita la transsulfuració mentre que limita la remetilació de l'homocisteïna. En canvi, baixes concentracions de SAM provoquen una remetilació i per tant, una conservació de metionina. És a dir, SAM és a la vegada un inhibidor al·lostèric de l'enzim metiltetrahidrofolat reductasa (MTHFR) i un activador al·lostèric de la cistationina beta-sintasa (CBS). El resultat d'aquest control és coordinar tant la regulació de la concentració de SAM cel·lular com el manteniment d'una concentració d'homocisteïna que sigui compatible amb la necessitat de la síntesi *de novo* de grups metil.

El flux de metionina a través de la transsulfuració en respecte a la remetilació es regulada per la concentració de l'homocisteïna mitjançant paràmetres cinètics dels enzims presents en aquestes vies. Els valors de  $K_M$  dels enzims de la transsulfuració per als seus substrats tendeixen a ser majors que les  $K_M$  involucrades en els enzims-substrats del cicle de re i transmetilació. La  $K_M$  de la cistationina beta-sintasa (CBS) és al menys un ordre de magnitud major que la  $K_M$  de les dos metiltransferases de l'homocisteïna (a major  $K_M$  més dificultat cinètica per a que es doni la reacció enzim-substrat). És a dir, les activitats dels enzims que participen en les vies de transmetilación, remetilació, i transsulfuración poden variar en resposta a la ingesta de proteïnes, més concretament, a la ingesta d'aminoàcids sulfurats.

## 5.2. El paper fisiològic de la metionina i dels seus derivats

A part del seu paper estructural, la metionina juga altres dos papers, no menys importants, tant en síntesi proteica o com a precursora de la molècula portadora de grups metil. En síntesi proteica, la metionina juga un paper clau com a aminoàcid iniciador de la síntesi de proteïnes en organismes eucariotes (en procariotes la N-formilmetionina realitza la mateixa funció). Aquests residus de metionina que inicien la seqüència són subseqüentment eliminats, fet que demostra el seu paper essencial en la iniciació o translació més que en la pròpia estructura proteica. A més, el seu caràcter

hidrofòbic sembla ser que és crucial per a la formació de l'enllaç de l'iniciador carregat del RNA de transferència amb el factor eucariòtic iniciador de la traducció (eif-2, de l'anglès, *eukaryotic initiation factor 2*) en l'assemblatge del complex preiniciador de la síntesi (Drabkin, RajBhandary 1998).

L'altre aspecte clau de les funcions metabòliques de la metionina és el fet de ser la servidora, mitjançant S-adenosilmetionina (SAM), de grups metil per a totes les reaccions biològiques de metilació conegudes, amb l'excepció de les reaccions de metilació de l'homocisteïna (Stipanuk 2004). El metabòlit S-adenosilmetionina (SAM) és essencial degut a la seva funció de donador de grups metils i està involucrat en un gran nombre de processos biològics. Les metilacions dependents de SAM són essencials per 1) la biosíntesi de fosfolípids, particularment fosfatidilcolina, com també d'una varietat de components cel·lulars que inclouen la creatinina, epinefrina i la carnitina; 2) la modificació de macromolècules com les proteïnes, ARN i ADN com a mecanisme per a establir i mantenir patrons d'expressió gènica específics de teixits; 3) la detoxificació de xenobiòtics<sup>f</sup> (per exemple, tiols i arsenit), i 4) inactivació metabòlica de neurotransmissors (per exemple, les catecolamines, epinefrina, norepinefrina i dopamina).

La cisteïna, metabòlit de la metionina generat en la via de transsulfuració, és un aminoàcid semiessencial per aquest motiu. Aquest aminoàcid sulfurat, té una funció crítica en l'estructura proteica per la seva capacitat de formar ponts disulfur inter i intra-proteïnes amb els altres residus de cisteïna. Molts dels enllaços disulfur que es troben en les proteïnes estan destinats a ser exportats o residir en la membrana plasmàtica. A part del seu paper estructural, la cisteïna és necessària per a la síntesi de glutatió i la taurina. El primer és important degut al seu paper d'antioxidant cel·lular contra l'estrès oxidatiu. Un fet interessant és que gràcies a la regulació redox de l'activitat de la cistationina beta-sintasa és pot promoure la transsulfuració en lloc de la remetilació, independentment del nivell de metilació, tot això quan l'organisme pateix una necessitat per a la síntesi de glutatió, és a dir, urgeix de la síntesi de cisteïna.

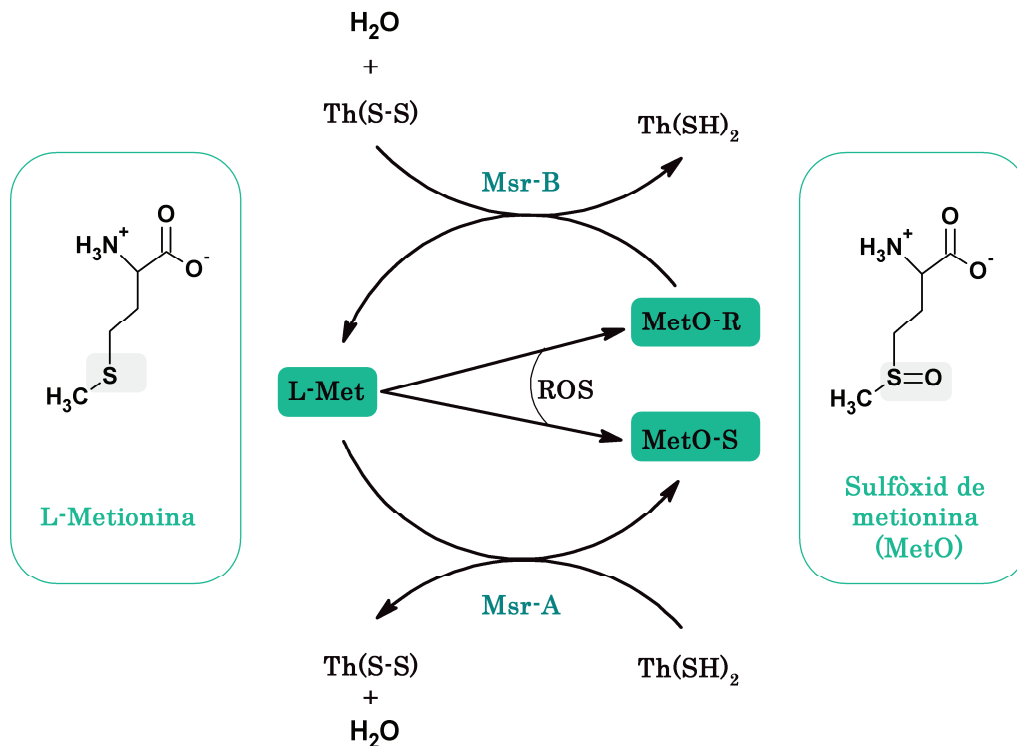
### 5.3. L'oxidació de la metionina

Com ja s'ha comentat la metionina és un dels aminoàcids més susceptibles al dany oxidatiu produït per l'atac de les espècies reactives d'oxigen. Aquest atac oxidatiu a

---

<sup>f</sup> Compost sintetitzat per la indústria química que normalment no és produït o metabolitzat pels organismes vius.

l'àtom de sofre dels residus de metionina i també de cisteïna de les proteïnes genera sulfòxid de metionina i ponts disulfurs entre les proteïnes, fets que suposen la pèrdua de l'activitat biològica de la proteïna (Chao, Ma & Stadtman 1997), i priva també a la metionina de la seva funció de donadora de grups metil.



**Figura 16** Cicle d'oxidació-reducció de la metionina.

Interconversió cíclica de la metionina (Met) amb els isòmers R- i S- del sulfòxid de metionina (MetO-R i MetO-S) respectivament. Msr-A i Msr-B es refereixen a les metionina sulfòxid reductases que són específiques per la reducció dels isòmers R i S de la MetO, respectivament. Th(SH)<sub>2</sub> i Th(S-S) es refereixen a les formes de tioredoxines reduïda i oxidada, respectivament (Stadtman et al. 2005).

La majoria del dany oxidatiu proteic genera modificacions irreversibles les quals generalment s'eliminen mitjançant el catabolisme proteic. No obstant, algunes modificacions són reversibles, com la metionina sulfòxid i els disulfurs. Aquest tipus de modificació pot ser reparat mitjançant l'enzim metionina sulfòxid reductasa la qual es depenent d'una reacció de tioredoxina (Moskovitz et al. 2001). Moltes cèl·lules contenen dos reductases diferents que catalitzen la mateixa reacció de reducció de metionina sulfòxid a metionina. Aquestes dos enzims dependents de tioredoxina difereixen en la conformació del substrat. És a dir, si la metionina oxidada és l'epímer S, l'enzim específic és la metionina sulfòxid reductasa A, i si es tracta de l'epímer R, l'enzim específic és la metionina sulfòxid reductasa B (Figura 16). La forma oxidada de la tioredoxina (Th-S-S) produïda en la reducció de la metionina sulfòxid es reconverteix en la seva forma reduïda (Th(SH)<sub>2</sub>) mitjançant l'enzim tioredoxina reductasa (Thr) en

una reacció dependent de NADPH. Els ponts disulfur poden tornar als residus de cisteïna mitjançant reaccions de canvi de tiol-disulfurs (-SH/-S-S-). Aquestes reaccions són portades a terme per les tiol reductases –glutatió S-transferasa- que catalitzen reaccions entre el glutatió i la tioredoxina per regenerar els grups sulfidril de les proteïnes. La formació del pont disulfur en les proteïnes degut a la tionilització del sofre pel glutatió es reduït a grup sulfidril mitjançant la glutaredoxina (Jung, Thomas 1996).

## 6. LES INTERVENCIONS NUTRICIONALS, LA LONGEVITAT I L'ESTRÈS OXIDATIU

Els resultats dels estudis sobre la teoria de l'envelliment dels radicals lliures mitocondrials poden explicar en part la gran variació de la longevitat en les diferents espècies animals estudiades. Ara bé, la correlació entre longevitat màxima i baixos nivells d'estrès oxidatiu endogen és necessari però no suficient per a validar la teoria de l'envelliment, perquè correlació no necessàriament ha de representar causa-efecte (Pamplona, Barja 2006). Per tant, són necessaris altres estudis experimentals en els quals la velocitat d'envelliment es modificada experimentalment per a clarificar si la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i l'estrès oxidatiu varia en el sentit esperat.

Existeixen diferents tipus de manipulacions ja sigui de la dieta, farmacològiques o genètiques les quals retarden l'envelliment. Entre totes aquestes, la restricció calòrica és la que està més àmpliament estudiada i coneguda, la qual no sols incrementa la longevitat en espècies filogenèticament distants, des dels vertebrats fins als primats, sinó que produeix efectes beneficiosos per a la seva salut i retarda l'aparició de malalties associades a l'envelliment com les neurodegeneratives, cardiovasculars i la diabetis, fins i tot en humans (Colman et al. 2009). Ara bé, estudis demogràfics en *Drosophila melanogaster* demostra que la restricció dietètica només disminueixen la mortalitat a curt termini (Mair et al. 2003). Referent a les manipulacions farmacològiques i genètiques, s'han realitzat un gran nombre de treballs en els que s'ha incrementat la quantitat d'antioxidants, ja sigui mitjançant inducció farmacològica o amb tècniques transgèniques, i tot i que en alguns casos s'ha augmentat la vida mitja de l'animal no ha estat capaç d'augmentar la longevitat màxima en mamífers (Pamplona, Barja 2006, Barja 2004a). Com tampoc s'ha demostrat una variació de la



longevitat en animals en els quals se'ls hi ha silenciats gens antioxidants. Aquests animals mostren diverses patologies però la velocitat d'envelliment sembla no estar modificada (Muller et al. 2003).

### **6.1. La restricció calòrica i l'estrès oxidatiu**

L'efecte de la restricció calòrica en la producció d'espècies reactives d'oxigen s'ha estudiat en rosegadors, especialment en rates (Sanz, Pamplona & Barja 2006, Barja 2004a). Tots aquests estudis són consistents en la demostració de que la restricció calòrica, usualment una restricció del 40%, disminueix significativament la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen en els teixits de rata, concretament, cor, cervell, múscul esquelètic, fetge i ronyó (Sanz, Pamplona & Barja 2006, Pamplona, Barja 2007). A més a més, la disminució de la producció de ROS mitocondrial produït per la restricció calòrica observada en rates va acompanyada d'una disminució significativa dels nivells de 8-oxodG tant en l'ADN mitocondrial sol, com en l'ADN mitocondrial i nuclear, depenent del teixit estudiat. Aquest fet també va acompanyat d'una disminució de la insaturació de la membrana, del dany produït en el teixit i proteïnes mitocondrials derivat de la oxidació, glicoxidació i lipoxidació (Sanz, Pamplona & Barja 2006, Hulbert et al. 2007, Pamplona 2008, Portero-Otín, Pamplona 2006, Barja 2004a, Pamplona, Barja & Portero-Otín 2002). En resum, la disminució de la producció de ROS mitocondrial sembla ser un mecanisme molt conservat el qual involucra tant la restricció dietètica com les espècies longeves.

### **6.2. El mecanisme de la restricció calòrica**

L'estudi de la restricció calòrica i els seus efectes s'està estudiant des de fa més de 70 anys i tot i la extensa caracterització fisiològica d'aquesta intervenció en totes les espècies estudiades, no es coneix el mecanisme o mecanismes que provoquen l'allargament de la longevitat. Durant aquests anys s'han demostrat molts efectes beneficiosos de la restricció calòrica. Disminueix el pes de greix corporal com també la temperatura corporal, augmenta el recanvi proteic, disminuint les proteïnes oxidades i augmentant l'activitat del proteasoma (Scrofano et al. 1998, Koubova, Guarente 2003). Atenua la progressió de canvis biològics associats amb l'envelliment com la pèrdua de l'elasticitat del col·lagen, el desenvolupament de la resistència a insulina, el declini de la funció immune i les alteracions en paràmetres neuro-comportamentals; i retarda

l'inici i la incidència de malalties associades amb l'envelliment, com molts càncers, i malalties renals i autoimmunes, diabetes com també malalties neurodegeneratives (Barger, Walford & Weindruch 2003). I modifica també l'expressió de molts gens (Lee et al. 2002). Actualment, està ben demostrat que la restricció calòrica promou una disminució de la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i dany oxidatiu a les macromolècules cel·lulars, disminueix la glicació de macromolècules cel·lulars i extracel·lulars, les quals es veuen també disminuïdes en espècies longeves (Pamplona, Barja 2006, Sell et al. 1996).

Inicialment es creia que el factor en si determinant de la disminució de la longevitat induïda per la restricció calòrica és la reducció en si de les calories, ara bé, hi ha treballs que demostren que no són les calories en si, ja que variant les proporcions d'alguns components de la dieta també es veu modificada la longevitat (Mair, Piper & Partridge 2005, Murtagh-Mark et al. 1995, Archer 2003).

### **6.3. La restricció proteica**

Si no es tracta de la disminució de les calories en sí, es podria tractar d'algun component de la dieta en concret. En aquest sentit s'han realitzat alguns experiments encarats a estudiar la restricció dels carbohidrats o dels lípids amb la longevitat i cap ha donat cap resultat clarificant. Només existeixen dos estudis de restricció de carbohidrats en longevitat en rates, els quals donen pocs i contradictoris canvis en longevitat (Ross 1976, Khorakova et al. 1990), com tampoc demostren un augment de la longevitat els dos estudis publicats on apliquen una restricció dietètica dels lípids en rates Fischer 344 (Shimokawa et al. 1996, Iwasaki et al. 1988). A més a més, s'ha mesurat la producció mitocondrial de ROS i el dany oxidatiu a l'ADN nuclear i mitocondrial en mitocondries de fetge de rata les quals han estat sotmeses a restricció del 40% de carbohidrats i de lípids, per separat, i cap de les dues intervencions ha mostrat diferències significatives amb la producció de ROS ni amb el dany a l'ADN (Sanz et al. 2006b, Sanz et al. 2006a). En referència però, als efectes de la restricció proteica sobre la velocitat d'envelliment, els estudis clàssics realitzats en rosegadors mostren un increment de la longevitat màxima casi en tots els experiments realitzats. Deu dels onze estudis publicats en rata o ratolí demostren que la restricció proteica incrementa la longevitat màxima d'aquests animals, encara que la magnitud d'aquest increment ha estat sistemàticament menor en referència a l'increment produït per la

restricció calòrica. La mitjana de l'increment de la longevitat produït per la restricció proteica en els diferents experiments és d'un 19,2%, i l'increment produït per una restricció calòrica del 40%, en mitjana és d'un 40%. El grau de restricció proteica realitzat en aquests estudis és del 66,7%, si calculem l'increment mitjà que suposaria una restricció proteica del 40%, ens dona un increment del 11.5% (assumint una proporcionalitat entre la intensitat de l'efecte de longevitat i el grau de la restricció proteica, com es sap que passa amb la restricció calòrica). Per tant, una reducció del 40% en la ingesta proteica sembla que seria responsable d'un terç de l'efecte en la longevitat produït per la restricció calòrica del 40% en rosegadors.

S'ha demostrat una disminució de la producció mitocondrial de ROS, de la fuga de radicals lliures de la cadena de transport electrònic i dels nivells de 8-oxodG en ADN mitocondrial en mitocòndries de fetge de rata les quals han estat sotmeses a una restricció proteica del 40% (Sanz, Caro & Barja 2004). Succeeix el mateix que en les mitocòndries de fetge de rates sotmeses a una restricció calòrica del 40% (Gredilla, Barja & Lopez-Torres 2001, Ramsey et al. 2004). Sorprenentment, la magnitud, el tipus de canvis i els mecanismes i llocs d'acció d'aquestes disminucions són molt similars en les dos restriccions, tant la proteica com la calòrica. Ara bé, falta determinar si la disminució del 40% de proteïnes també disminueix el dany oxidatiu proteic i el grau de peroxidabilitat, tal i com succeeix en fetge de rates sotmeses a restricció calòrica del 40% (Lambert et al. 2004).

#### **6.4. La restricció de metionina**

Donat el fet que dels tres components nutricionals bàsics, els carbohidrats, els lípids i les proteïnes, només la restricció d'aquestes últimes s'ha demostrat que disminueix la producció mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen i pot explicar part de l'augment de la longevitat produït per la restricció calòrica, el següent pas lògic es buscar quin dels components de les proteïnes podria ser responsable d'aquest efecte. Atès que es coneix que la restricció de metionina (RMet) incrementa la longevitat màxima, sense una restricció energètica, és lògic pensar que la metionina ingerida en la dieta pot estar involucrada en aquest efecte. Un experiment de longevitat en ratolins sotmesos a restricció de metionina al 65%, publicat abans d'acabar-se, mostra un increment del 10% de la longevitat màxima dels animals (Miller et al. 2005). Aquest increment és molt similar al increment en longevitat calculat per la restricció proteica

del 40%, és a dir un 11.5%. Els estudis de restricció de metionina del 80% en rata mostren un increment del 44% (Richie et al. 1994) i del 11% (Orentreich et al. 1993) en longevitat màxima, fet que equivaldria a un increment mitjà del 14% per una restricció del 40% de metionina. Aquest valor continua estant dins el rang dels increments de longevitat produïts per la RMet en ratolins (10%) i per RP en rates i ratolins (11.5%) (Pamplona, Barja 2006). Els estudis disponibles en restricció de metionina suggereixen que la reducció de la ingesta d'aquest aminoàcid en la dieta pot ser responsable de tot l'efecte en la longevitat produït per la restricció proteica. La disminució de la ingesta de metionina sembla ser responsable d'un terç (11-14%) de l'efecte de la restricció calòrica del 40% en l'increment de la longevitat en rosegadors.

En relació a l'estrès oxidatiu i la restricció de metionina, s'han descrit canvis en els nivells de glutatió en fetge i sang (Richie et al. 1994), però el possible dany oxidatiu a les macromolècules no s'ha avaluat. L'augment de la longevitat màxima en rates i ratolins va acompanyat per baixos nivells de glutatió en fetge i probablement un increment de l'export hepàtic de glutatió en sang, provocant uns nivells elevats de glutatió en sang, un increment en la resistència al dany oxidatiu en fetge, una disminució del desenvolupament de cataractes, una disminució dels canvis associats amb l'edat en els limfòcits T (CD8, CD8M, CDP4 i CDP8), alts nivells del macròfag MIF (*migration inhibitor factor*) el qual es coneix el seu valor elevat en altres models de rosegadors de longevitat elevada; nivells baixos de glucosa en sèrum, d'insulina, de IGF-I i T4 (Miller et al. 2005, Richie et al. 1994, Orentreich et al. 1993, Richie et al. 2004).

## **6.5. La suplementació de metionina**

A part de la restricció de metionina, existeix una altra evidència que suggereix que la metionina o els seus metabòlits poden estar involucrats en l'envelliment i la longevitat. D'aquesta manera i en contra dels efectes beneficiosos de la restricció de metionina, una ingesta excessiva de metionina en la dieta suposa un dany en els òrgans vitals i incrementa l'estrès oxidatiu en els seus teixits. A més, la suplementació de metionina incrementa els nivells d'hidroperòxids i de colesterol LDL en plasma de rosegadors (Hidiroglou et al. 2004), augmenta també el ferro i la peroxidació lipídica, els diens conjugats i el colesterol en fetge de rata (Mori, Hirayama 2000, Lynch, Strain 1989), és hepatotòxic i altera els antioxidants del fetge com la SOD, la catalasa, la

glutatió peroxidasa i el glutatió en rates (Mori, Hirayama 2000, Lynch, Strain 1989, Robin et al. 2004), incrementa l'estrès oxidatiu en fetge (Robin et al. 2004), augmenta els nivells d'homocisteïna en plasma, cor i aorta generant angiotoxicitat i degeneració mitocondrial en cèl·lules arterials del múscul llis (Hidiroglou et al. 2004, Robin et al. 2004, Matthias et al. 1996), accelera l'envelliment en el sistema vascular de la rata (Fau, Peret & Hadjiisky 1988), induïx hipertensió i malalties coronaries (Robin et al. 2004, Toborek et al. 1995) disminueix els nivells de vitamina E en fetge i cor (Hidiroglou et al. 2004) i possiblement accelera l'envelliment del cervell (Mori, Hirayama 2000). A més, l'alt contingut de metionina de la dieta occidental podria predisposar als humans a patir malalties cardiovasculars (Mori, Hirayama 2000).

Un fet interessant és que s'ha detectat alguns efectes negatius similars als de la suplementació de metionina en rates alimentades amb un alt increment en el contingut de proteïna (50%) i alt increment en el contingut de metionina (2%) durant 2 anys (Fau, Peret & Hadjiisky 1988). La ingesta, en rates, de dietes altes en proteïna (50% durant una setmana) i les dietes riques en caseïna en comparació amb les dietes riques en soja, incrementen els carbonils en plasma i la colesterolemia i aterogenia (Hidiroglou et al. 2004, Petzke et al. 1999), fet que és interessant ja que la caseïna té un alt contingut en metionina en comparació amb la proteïna de soja i perquè l'oxidació proteica sembla que juga un paper important en l'arteriosclerosi i també altres malalties degeneratives (Dean et al. 1997).

Un contingut elevat de metionina en la ingesta pot ser també perjudicial pel fet que pot convertir-se en homocisteïna. S'ha demostrat que l'increment d'homocisteïna en plasma induït per la suplementació en metionina incrementa la producció de ROS, el qual provoca l'oxidació de les LDL i arteriosclerosi (Hidiroglou et al. 2004). Els nivells d'homocisteïna en plasma en humans augmenten amb l'edat i representen un factor de risc per l'envelliment i les malalties degeneratives associades a l'estrès oxidatiu, com l'arteriosclerosi, el deteriorament cognitiu, la trombosis, el càncer, els accidents cerebrovasculars, la malaltia crònica de ronyó i la malaltia de Parkinson (Droge 2002, Durand et al. 2001, Ferrari 2004, Ninomiya et al. 2004). L'homocisteïna té un grup tiol lliure (Figura 15) el qual pot ser fàcilment oxidable i generar pots disulfur intra i interproteïnes. S'ha observat que l'addició de glutatió oxidat (GSSG) al complex I mitocondrial incrementa la seva generació de radical superòxid (Taylor et al. 2003).

Tot i que les evidències apunten un dany endògen degut a la suplementació de metionina, no existeixen treballs en els que s'hagi avaluat de manera específica paràmetres de dany oxidatiu en animals sotmesos a una dieta amb un alt contingut de metionina.

## **7. L'ENVELLIMENT I L'ESTRÈS OXIDATIU**

El procés d'envelliment està intrínsecament lligat a la vulnerabilitat de l'organisme a sofrir malalties associades a aquest procés, com són les malalties neurodegeneratives i altres com la diabetis o l'arteriosclerosi. És a dir, amb l'edat augmenta la probabilitat de que es produeixi un trencament de l'homeòstasi, fet que provoca un desequilibri fisiològic i la generació d'un escenari idoni per a l'aparició de qualsevol d'aquestes malalties. El terme hormesis es defineix com una resposta adaptativa de les cèl·lules i organismes per a moderar l'estrès, normalment intermitent (Calabrese et al. 2008). Recentment s'han elucidat vies de senyalització cel·lular i mecanismes moleculars que intervenen en les respostes adaptatives, entre aquests s'han trobat enzims com quinases i desacetilases, factors de transcripció com Nrf2. Com a resultat de l'activació d'aquestes vies les cèl·lules incrementen la seva producció de proteïnes citoprotectors i reconstituents, les quals inclouen factors de creixement, enzims antioxidants i xaperones. Per a entendre millor el funcionament d'aquestes vies i mecanismes és necessari conèixer la funció de les proteïnes xaperones del reticle endoplasmàtic i els factors i cofactors de la transcripció de la biogènesi mitocondrial i la seva interacció.

### **7.1. L'estrès de reticle endoplasmàtic**

El reticle endoplasmàtic (RE) és un orgànul multifuncional contigu al nucli cel·lular i que s'estén pel citoplasma, el qual coordina el plegament proteic, la biosíntesi dels lípids i el seu emmagatzematge i l'alliberament del calci. Les pertorbacions que alteren a l'homeòstasi d'aquest orgànul provoquen una disrupció del plegament i porten a una acumulació de proteïnes mal plegades i agregades, les quals són perjudicials per a la cèl·lula. Qualsevol d'aquestes pertorbacions generen l'anomenat estrès de RE.

#### **7.1.1. El plegament proteic i el control de qualitat**

L'interior del RE, el lumen, és un medi que difereix molt del citosol, és altament concentrat i oxidant. S'estima que la concentració proteica del lumen és

aproximadament de 100 mg/mL i que la relació entre el glutatió reduït i oxidat (GSH/GSSG), la qual marca l'estat redox, es troba entre 1:1 a 3:1, a diferència del citosol, on el medi és molt més reduït i la relació GSH/GSSG és de 50:1 (Malhotra, Kaufman 2007, Ferrari, Soling 1999). En condicions fisiològiques normals moltes de les proteïnes residents en els orgànuls dins de les vies de secreció, com les proteïnes que s'expressen en la superfície cel·lular o es secreten per la cèl·lula, es transloquen al lumen com a cadenes de polipèptids desplegadas. Dins el lumen, gràcies a la gran quantitat de xaperones, proteïnes plegadores, lectines i enzims que processen carbohidrats assisteixen al correcte plegament de les proteïnes naixents o desplegadas. Sovint aquestes proteïnes són modificades per glicans en la posició N-terminal, després són plegades en les estructures secundàries i terciàries corresponents i estabilitzades mitjançant ponts disulfur, i finalment, en molts casos, s'acoblen formant complexos polimèrics. Totes les xaperones, les proteïnes plegadores, les lectines i els enzims que processen carbohidrats es troben en l'interior del RE en altes concentracions i participen tant en el pegament com en el control de qualitat de les proteïnes. Aquest control de qualitat es basa en el fet de detectar quan una proteïna no està correctament plegada, és a dir, una exposició de les regions hidrofòbiques, de les cisteïnes desaparellades o la tendència a agregar-se de les proteïnes són característiques detectables i que fan retenir-les en l'interior del RE. Les xaperones clau i enzims que assisteixen al plegament de les proteïnes inclouen la proteïna reguladora de glucosa 78 (GRP78, de l'anglès, *glucose regulated protein 78*) i la GRP94; les lectines, calnexina i calreticulina, i les tiol-disulfur oxidoreductases, la PDI (de l'anglès, *protein disulfur isomerase*). Una xaperona és una proteïna capaç d'ajudar a les proteïnes desplegadas o plegades incorrectament per aconseguir el seu estat nadiu. Això ho aconsegueixen proporcionant un entorn en el qual les reaccions d'agregació i pèrdua es minimitzen (Ferrari, Soling 1999).

La xaperona GRP78, també coneguda com BiP (de l'anglès, *immunoglobulin binding protein*) i més recentment Hsp5A, forma part de la família de les proteïnes de xoc tèrmic 70, Hsp 70 (de l'anglès, *heat shock proteins 70*). És una de les xaperones més ben caracteritzades i interacciona amb els dominis hidrofòbics d'un gran ventall de proteïnes. Aquesta unió als dominis hidrofòbics ajuda a prevenir el mal plegament durant la translocació al RE i és un procés dependent d'energia. És una proteïna amb un extrem N-terminal amb domini de ATPasa (amb capacitat de desfosforilar l'ATP, en

el lumen) i un extrem C-terminal (en el citosol) amb un domini de lligand-substrat (Figura 17).

La xaperona GRP94 forma part de la família de les proteïnes de xoc tèrmic 90, Hsp 90 (de l'anglès, *heat shock proteins 90*). És una de les proteïnes més abundants del RE i té capacitat d'unió a calci amb uns 15 llocs d'unió possibles i es creu que funciona com a portadora d'aquest element. A diferència de la GRP78, aquesta no s'associa a pèptids naixents sinó que s'associa a plegaments d'intermediaris més avançats o a proteïnes que s'han acoblat incompletament (Figura 17).

Les lectines, calnexina i calreticulina són les proteïnes responsables del control de qualitat de la glicosilació. La calnexina és una proteïna transmembrana i la calreticulina és el seu homòleg en el lumen (Figura 17) (Naidoo 2009).

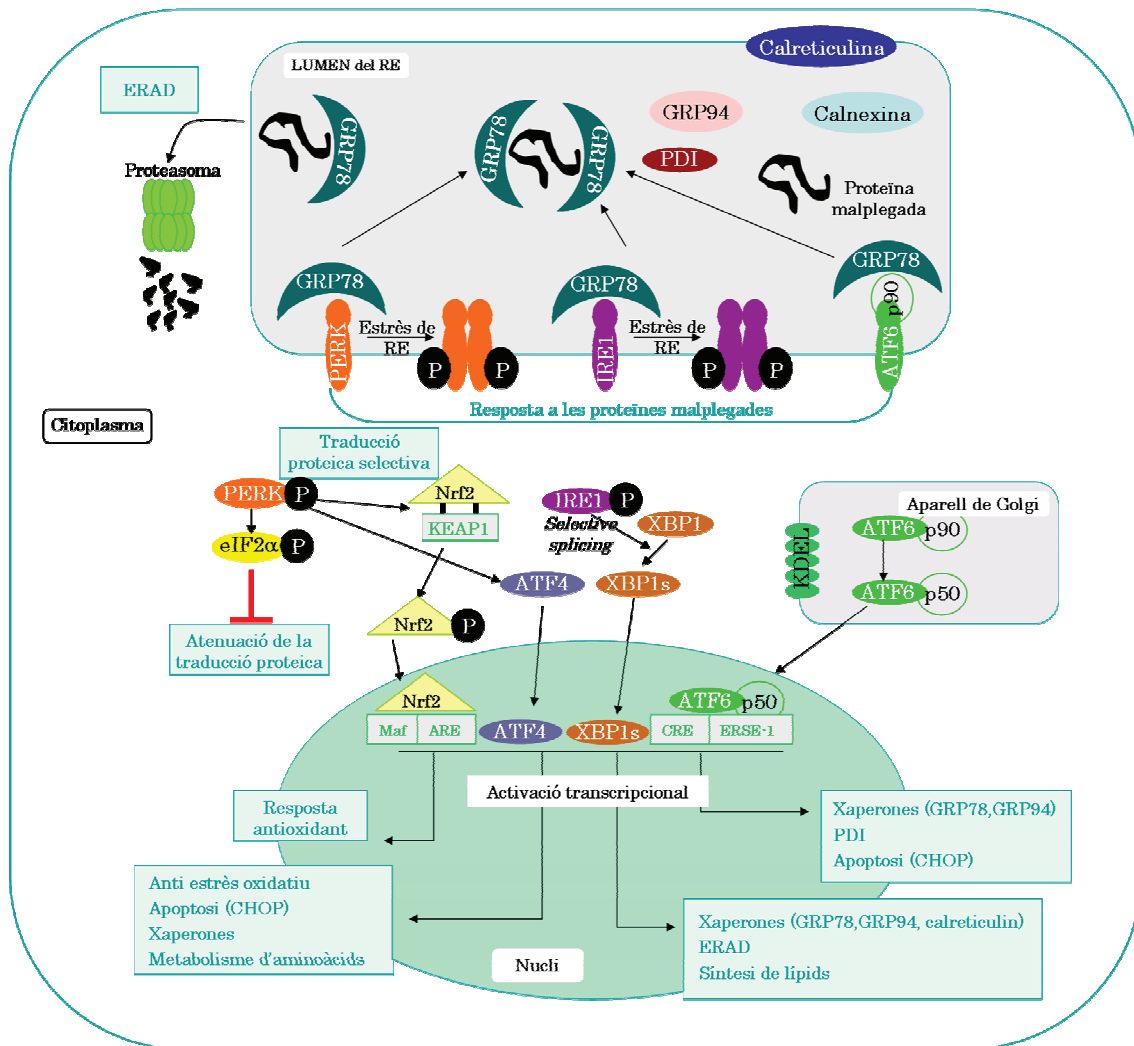
La proteïna PDI és membre de la família de les tioredoxines les quals, depenent de l'estat redox del lumen del RE, pleguen i despleguen les proteïnes formant o reduint els ponts disulfurs de les cisteïnes. Aquesta és una proteïna clau i principal en el plegament i control de qualitat gràcies a la seva capacitat per ajudar a formar ponts disulfur, també existeixen altres proteïnes amb capacitat d'oxidoreductases, com la ERp57, ERp72, PDIR, P5 (Ferrari, Soling 1999).

Les proteïnes xaperones GRP78, GRP94 i la proteïna plegadora PDI tenen una seqüència C-terminal que reconeix el receptor KDEL. Aquesta és una proteïna transmembrana receptora situada a la membrana de l'aparell de Golgi la qual actua de retrotransportadora de les xaperones des del complex de Golgi al RE (Figura 17) (Capitani, Sallese 2009).

### **7.1.2. La resposta a l'estrès de RE**

L'estrès de RE pot ser provocat per una varietat de condicions fisiològiques, com les pertorbacions en l'homeòstasi del calci, la manca de glucosa i energia, canvis redox cel·lulars, isquèmia, hiperhomocisteïnèmia, infeccions virals, mutacions i l'envelliment.





**Figura 17** Resposta a les proteïnes mal plegades i l'estrès de reticle endoplasmàtic.

Esquema representatiu dels tres components principals de la resposta a les proteïnes mal plegades. Les proteïnes mal plegades o desplegades alliberen a GRP78 dels tres transductors del estrès de RE: PERK, IRE-1, ATF6. PERK s'activa fosforilant-se, el qual a la vegada fosforila a eIF2 $\alpha$  i aquest atenua la traducció proteica i fosforila Nrf2 el qual sobre-regula la resposta antioxidant. La forma ATF6 de 50 kDa activa la inducció de xaperones moleculars GRP74, PDI, GRP94, etc. L'activació de IRE-1 induïx l'splicing selectiu de XBP-1, l'activació transcripcional de xaperones i l'estimulació de la degradació proteica. Adaptat de (Naidoo 2009).

Abreviacions de l'anglès: *KEAP1*: Kelch-like Echinoid-associated protein 1; *ARE*: antioxidant response element; *sMaf*: factor de transcripció (small Maf); *CRE*: ATF/cAMP response element; *ERSE-1*: ER stress response element 1; *ERAD*: endoplasmatic reticulum-associated degradation.

Aquesta resposta cel·lular protectora a l'estrès de RE està formada per tres vies cel·lulars diferents: 1) una sobreexpressió de les xaperones del RE com GRP78; 2) l'atenuació de la translació proteica, i 3) la degradació de les proteïnes mal plegades mitjançant el proteasoma. Aquestes tres respostes són mesures de protecció per evitar una acumulació de proteïnes i atenuar l'estrès de RE. Quan aquestes vies de protecció fallen o no són suficients, és a dir, quan l'estrès és excessiu i perllongat s'activa una resposta cel·lular d'apoptosi.

Els dos primers tipus de resposta cel·lular es basen amb tres proteïnes transmembrana del RE. Els senyals d'estrès del RE són transmesos a través de la membrana del RE pels tres sensors en resposta a les proteïnes desplegadas, dos d'aquests són dues proteïnes quinases, el IRE1 (de l'anglès, *inositol requiring element 1*) i el PERK (de l'anglès, *double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*) i l'altre és el factor ATF6 (de l'anglès, *activating transcription factor 6*). Aquests tres sensors es mantenen inactius en la membrana del RE quan estan units a la proteïna GRP78 present en el lumen del RE. Quan hi ha una acumulació de les proteïnes desplegadas, la proteïna GRP78 es dissocia dels tres sensors per a enganxar-se a les proteïnes mal plegades, permetent d'aquesta manera l'activació d'un o més dels traductors de l'estrès (ATF6, IRE1 i PERK). La proteïna GRP78 és la màxima reguladora de la resposta a les proteïnes desplegadas (UPR) (Figura 17).

La sobreexpressió de les xaperones del RE és activat tan pel sensor ATF6 com per la quinasa IRE1. El factor ATF6 és de 90 kDa en la seva forma a la membrana, quan s'activa mitjançant la resposta UPR es transloca a l'aparell de Golgi i es trenca mitjançant dos proteases específiques quedant en la forma d'ATF6-50kDa (Figura 17). Aquesta forma de la proteïna es transloca al nucli on codifica pels gens de les xaperones del RE com GRP78 i GRP94. Això fa que incrementin els nivells d'aquestes proteïnes i augmenti així l'activitat plegadora del RE. Altres dianes del ATF6 són la XBP1, PDI i el factor proapoptòtic CHOP (un dels noms que s'utilitza per anomenar la proteïna que codifica pel gen anomenat: *DNA-damage-inducible transcript 3*).

Quan la proteïna IRE1 s'activa, el seu domini citoplasmàtic guanya l'activitat d'endoribonucleasa i trenca 26 nucleòtids del ARN missatger que codifica per la proteïna XBP1 (de l'anglès, *X-box binding protein 1*), fet que genera una variant XBP1s la qual funciona com a potent transactivador transcripcional dels gens involucrats en l'expansió del RE, com també de la exportació i degradació de les proteïnes mal plegades. IRE1 també degrada els ARN missatgers dianes del RE, així disminueix la producció de noves proteïnes a dins de l'orgànul.

L'atenuació de la translació proteica està activat per PERK. PERK és una proteïna transmembrana que forma part del tipus I de serina treonina quinasa la qual està present en molts tipus de cèl·lules. Quan està inactiva, es troba enllaçada a la proteïna

GRP78 en el seu estat monomèric (Figura 17). Una vegada es trenca l'enllaç, la PERK homodimeritza i es fosforila ella mateixa, activant-se a ella mateixa i alhora inicia l'activitat quinasa de l'eIF2 $\alpha$  (de l'anglès, *eukaryotic initiation factor  $\alpha$* ) fosforilant-lo a la Ser51. La fosforilació del factor iniciador de la traducció, eIF2 $\alpha$ , disminueix els nivells del complex ternari actiu necessari per al reconeixement del codó d'iniciació de la transcripció proteica, fet que provoca la disminució de la traducció de moltes proteïnes (Naidoo 2009). Paradoxalment, però, la fosforilació de l'eIF2 $\alpha$  indueix la transcripció d'aproximadament un terç dels gens dependents de la resposta UPR, un d'aquests és el factor activador de la transcripció ATF4 (de l'anglès, *activating transcription factor 4*). Es coneix també que la via PERK/ eIF2 $\alpha$ / ATF4 és necessària per a l'expressió de gens que codifiquen per a la biosíntesi d'aminoàcids, per a funcions de transport, de resposta antioxidativa a l'estrès, i d'apoptosi com CHOP. Concretament el factor nuclear Nrf2 (de l'anglès, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) també és substrat de l'activitat quinasa de PERK. El factor Nrf2 està present en el citoplasma associat a la proteïna KEAP1 (de l'anglès, *Kech-like Ech-associated protein 1*) en la seva forma inactiva. Quan PERK fosforila Nrf2 aquest es dissocia de KEAP1 i es transloca al nucli, on s'enllaça a ARE (de l'anglès, *antioxidant response element*) i a sMaf (de l'anglès, *small Maf*) per a activar la transcripció de gens relacionats amb defenses antioxidants com l'aldo-ceto reductases (AKR, de l'anglès, *aldo-keto reductases*); la subunitat catalítica i reguladora de la glutamant cisteïna ligasa (GCLc, GCLm, de l'anglès, *glutamate cysteine ligase catalytic subunit and regulatory subunit*); la glutatió S-transferasa (GST, de l'anglès, *glutathione-S-transferase*); la glutatió sintetasa (GS, de l'anglès, *glutathione synthetase*); l'hemoxigenasa 1 (HO-1, de l'anglès, *heme-oxygenase 1*); les metal·lotioneïnes; l'epòxid hidrolasa microsomal (mEH, de l'anglès, *microsomal epoxide hydrolase*); les oxidoreductases NAD(P)H:quinina (NQO, de l'anglès, *NAD(P)H:quinine oxidoreductases*); la peroxiredoxina 1; les superoxid dismutases (SOD1, SOD2); les tioredoxines reductases (TrxR); les tioredoxines (Trx) i la UDP-glucuronosil transfereases (UGT) (Malhotra, Kaufman 2007, Copple et al. 2008).

El tercer tipus de resposta a l'estrès de RE és l'anomenada degradació proteica associada al RE, aquest mecanisme s'ha conservat des dels eucariotes petits com els llevats, fins als humans. Les proteïnes que no passen el control de qualitat del RE són degradades per prevenir la seva acumulació. Tant les proteïnes mal plegades com les subunitats que hi ha en excés de les proteïnes polimèriques tornen a ser transportades cap al citosol mitjançant una proteïna específica, similar a la transportadora usada per

entrar al lumen del RE. Aquest procés retrotransportador està acoblat normalment a la ubiquitinització, la qual es dona a la superfície citosòlica del RE (Figura 17). La ubiquitina és una proteïna petita universalment conservada en totes les cèl·lules eucariotes. La ubiquitinització dels substrats és un procés amb múltiples passos que depenen de l'enzim activador, del conjugador i del lligant. Els substrats ubiquitinitzats són degradats pel proteasoma 26S citosòlic. Aquest sistema resulta ser important per al manteniment de la homeòstasis del RE en condicions fisiològiques normals (Ma, Hendershot 2004).

## **7.2. La biogènesi mitocondrial**

### **7.2.1. La mitocòndria**

La mitocòndria és un orgànul essencial ja que, tal i com ja s'ha explicat, genera energia mitjançant la via de l'oxidació fosforilativa. A part de la producció d'energia, la mitocòndria conté enzims essencials per a múltiples processos biosintètics (incloent, la síntesi de lípids, colesterol, nucleòtids, grup hemo i esteroides) i juga un paper important en el metabolisme dels aminoàcids i l'homeòstasi dels ions. A més a més, mitjançant les espècies reactives d'oxigen i el calci senyalitza els processos crítics per a les vies de mort cel·lular. Per tant, degut als seus papers de bioenergètica, metabòlica i de senyalització cel·lular la regulació de la massa i funció mitocondrial és bàsica i essencial per a l'organisme. Evidentment, la massa, la funció i la morfologia d'aquest imprescindible orgànul és diferent depenent del tipus cel·lular i també està regulat per una gran varietat de senyals fisiològiques com l'activitat física, la disponibilitat de nutrients, la temperatura, les senyals circadianes i l'exposició a agents infecciosos (Hock, Kralli 2009).

### **7.2.2. La regulació de la biogènesi mitocondrial**

Les mitocòndries velles o danyades de la cèl·lula s'eliminen i se'n sintetitzen de noves constantment, per tant es crític el coneixement dels mecanismes de la seva formació (Vina et al. 2009). La biogènesi mitocondrial, però, és un procés molt complex que requereix de la síntesi, importació i incorporació de proteïnes i lípids dins de l'espai mitocondrial, com també de la replicació del ADN mitocondrial. El proteoma

mitocondrial compren entre unes 1100 a 1500 proteïnes, de les quals el 98% estan codificades pel genoma nuclear. El genoma mitocondrial codifica per 13 proteïnes mitocondrials les quals totes pertanyen als components de la cadena de transport electrònic.

La coordinació de la transcripció de molts gens nuclears i molts menys mitocondrials, però essencials, es realitzada per proteïnes mitocondrials que estan codificades pel genoma nuclear, algunes d'aquestes són la mTFA (de l'anglès, *mitochondrial transcription factor A*), mTFb1 (de l'anglès, *mitochondrial transcription factor 1b*), mTFb2 (de l'anglès, *mitochondrial transcription factor 2b*) les quals controlen la transcripció i la replicació de l'ADN mitocondrial i són induïdes en resposta a senyals que promocionen la biogènesi mitocondrial. Aproximadament el 50% dels gens mitocondrials s'expressen de manera dependent del teixit, suggerint que una gran part del proteoma mitocondrial es dedica a funcions específiques. L'expressió d'un gran nombre de gens necessaris per a la biogènesi i funció mitocondrial està controlada per una xarxa de factors transcripcionals vinculats a l'ADN nuclear i factors coordinadors. Aquesta xarxa permet una àmplia i robusta activació del programa de biogènesi mitocondrial en resposta a una gran varietat de senyals fisiològics, com també modificacions de l'expressió gènica i funció mitocondrial dependent del teixit o de la senyal específic.

## **FACTORS TRANSCRIPCIONALS**

El factor respiratori nuclear 1 (NRF-1, de l'anglès, *nuclear respiratory factor-1*) (Figura 18) és un regulador dels complexos de la cadena de transport i dels factors transcripcionals i de replicació de l'ADN mitocondrial. És a dir, activa l'expressió del components de la cadena de transport mitocondrial, de transportadors mitocondrials i de proteïnes ribosomals i mitocondrials. A més a més, regula l'expressió de mTFA, mTF1b, i mTFb2 i també coordina l'increment de l'expressió de gens mitocondrials codificats pel genoma nuclear amb un increment de la replicació i expressió de l'ADN mitocondrial.

El factor respiratori nuclear 2 (NRF-2, de l'anglès, *nuclear respiratory factor-2*) (Figura 18) és un heterotetràmer amb dos subunitats diferents no relacionades, una amb domini lligat al ADN i l'altra amb domini d'activació transcripcional. També regula

l'expressió dels components de cadena de transport mitocondrial, l'expressió de mTFA, mTF1b, i mTFb2 (els quals codifiquen per factors de transcripció del ADN mitocondrial) (Scarpulla 2008). Receptors activadors i proliferadors del peroxisoma (PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , de l'anglès, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) (Figura 18) són reguladors del metabolisme lipídic. És a dir, són receptors nuclears sensors dels lípids, del seu control i homeòstasi. Els tres receptors tenen distribució i funcions fisiològiques diferents. PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , s'expressen principalment en fetge, el primer, múscle esquelètic i cor, el segon i teixit adipós, el tercer. Tots ells actuen com a heterodímers i regulen un gran ventall de gens involucrats en l'absorció, l'emmagatzematge i el metabolisme dels lípids, incloent els gens que codifiquen pels enzims mitocondrials de l'oxidació dels àcids grassos. El metabolisme dels lípids està íntimament relacionat amb la funció de la mitocòndria ja que també proporciona substrats per a la respiració mitocondrial. Els PPARs també regulen l'expressió de gens que codifiquen per les proteïnes desacobladores, anomenades UCPs (de l'anglès, *uncoupling proteins*). Aquestes proteïnes desacobladores estan en la membrana mitocondrial interna i són importants per la termogènesis, la producció de ROS i la capacitat oxidativa (explicades en l'apartat 2.4.3). Els receptors PPAR permeten l'adaptació mitocondrial segons les necessitats energètiques i metabòliques de la cèl·lula, ja que els seus lligands es produeixen endogenament, probablement per la lipòlisis, segons l'estat fisiològic específic o el senyal exterior determinat (dejuni, exposició al fred, exercici). El fet important és que aquestes accions reguladores dels PPAR estan integrades amb altres funcions de reguladors de biogènesi mitocondrial, com el NRF-1 i NRF-2, PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$ , els quals interaccionen físicament amb els PPAR i milloren la seva capacitat d'induir gens diana.

Els receptors relacionats amb els estrògens (ERR $\alpha$ , ERR $\beta$ , ERR $\gamma$ , de l'anglès, *estrogen-related receptors*) (Figura 18) són membres de la superfamília de receptors nuclears i com el seu nom indica tenen seqüències similars als receptors d'estrògens, però no són activats per estrògens o molècules similars. La seva activitat transcripcional es regulada per la interacció física amb els coreguladors, coactivadors com PGC-1 $\alpha$  o els repressors com RIP140. El receptor ERR $\alpha$  és el millor caracteritzat, es coneix que està implicat en la regulació de gens relacionats amb l'oxidació lipídica, com també altres gens mitocondrials relacionats amb la cadena de transport electrònic i el cicle de Krebs, l'import i dinàmica mitocondrial i defenses de l'estrès oxidatiu.

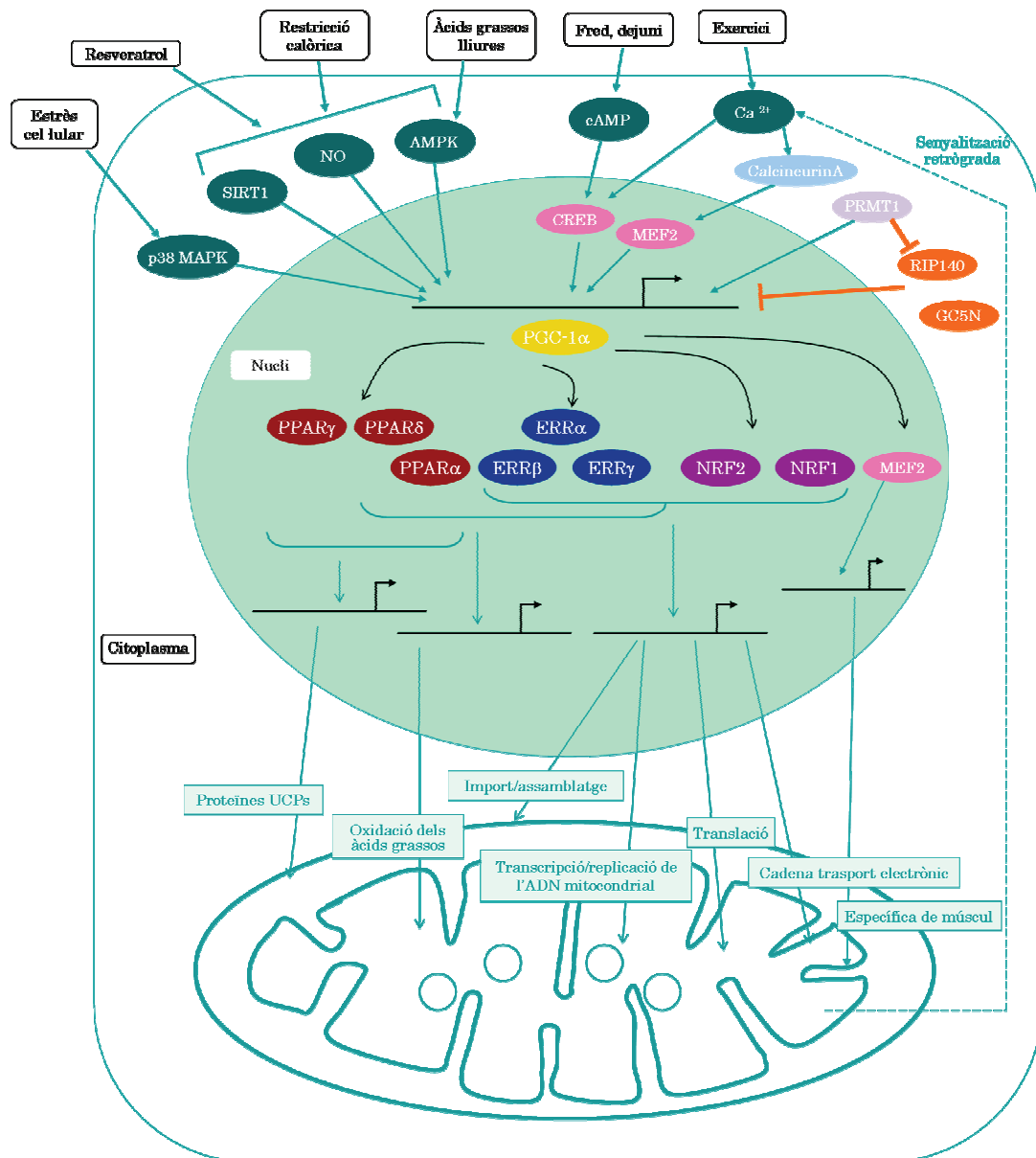
## COREGULADORS TRANSCRIPCIONALS

Els membres de la família dels PPAR $\gamma$  coactivadors-1 (PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$ , de l'anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1  $\alpha/\beta$*  i PRC, *PGC-1-related receptor coactivator*) (Figura 18) són els promotors de la biogènesi mitocondrial. Aquests coactivadors controlen la funció i la biogènesi mitocondrial integrant els senyals fisiològics i coordinant la millora de la funció de diversos factors transcripcionals que actuen com a gens mitocondrials.

El mode d'acció dels coactivadors de PGC-1 és simple, el PGC-1 s'acobla sobre els factors de transcripció enllaçats als seus respectius llocs d'unió i permet el reclutament de les acetiltransferases d'histones i del complex mediador, millorant així la iniciació de la transcripció i/o elongació. Un dels aspectes biològics més interessants de la família dels coactivadors PGC-1 és el seu potencial de coregular els senyals de les necessitats energètiques o metabòliques i transformar aquests senyals en canvis en l'expressió gènica, sent el PGC-1 $\alpha$  el prototip d'aquesta família de coreguladors en realitzar aquest paper. La senyalització de la informació està integrada en dos nivells, el nivell de regulació transcripcional i la de regulació posttranslacional. A nivell transcripcional, el PGC-1 $\alpha$  s'expressa diferencialment segons el teixit, sent més elevada l'expressió en teixits amb alta demanda d'energia. A nivell posttranslacional, l'activitat de PGC-1 $\alpha$  es regula via la fosforilació de la proteïna quinasa p38-MAPK (de l'anglès, *mitogen-activated protein kinase*), de la proteïna serina/treonina quinasa AKT, de la AMP quinasa AMPK (de l'anglès, *adenine monophosphate-activated kinase*), i la quinasa glicogen sintasa-3 (GSK-3, de l'anglès, *glycogen synthase kinase-3*), acetilació i deacetilació mitjançant l'acetiltransferasa GCN5 i la deacetilasa Sirtuina 1 (homologa del Sir2 en llevat), respectivament, metilació mitjançant l'arginina metiltransferasa PRMT1, ubiquitinització per SCF<sup>cdc4</sup> i interacció amb el repressor MYBBP1A (Hock, Kralli 2009) (algunes d'aquestes modificacions posttranslacionals estan il·lustrades en la Figura 18).

Existeix també una proteïna que és l'antítesi dels coactivadors de la família del PGC, la proteïna RIP140 (de l'anglès, *receptor-interacting protein 140*) (Figura 18). Aquest receptor corepressor actua com un fre en la transcripció de la biogènesi mitocondrial, interaccionant amb un gran nombre de receptors nuclears. Estudis *in vitro* i *in vivo* suporten la idea del paper de RIP140 en la funció mitocondrial. De la

mateixa manera que PGC-1 $\alpha$ , RIP140 es regulada per modificacions proteiques, com l'acetilació. Però el fet més interessant és que la mateixa arginina metiltransferasa PRMT1 que és capaç de modificar PGC-1 $\alpha$  també modifica RIP140. Mitjançant la metilació PRMT1 promou l'activitat de PGC-1 $\alpha$  i alhora suprimeix l'activitat de RIP140, suggerint que PRMT1 pot actuar d'interruptor entre PGC-1 $\alpha$  i RIP140 (Figura 18).



**Figura 18** Vies principals que governen la funció i la biogènesi mitocondrial.

El PGC-1 $\alpha$  és el màxim coordinador d'aquesta xarxa de vies de la biogènesi mitocondrial. Dins el nucli hi ha representats els factors transcripcionals clau, els quals són dianes de PGC-1 $\alpha$  i actuen sobre gens nuclears que tenen les funcions mitocondrials indicades en els requadres. L'activació de PGC-1 $\alpha$  mitjançant CREB (de l'anglès, *cyclic AMP response element binding*) en resposta al fred (termogènesis), dejuni (gluconeogènesis) i exercici està ben documentat. Els mecanismes de la inducció de PGC-1 $\alpha$  a partir de l'òxid nítric (NO) no està del tot establert però pot involucrar la eNOS (de l'anglès, *endothelial NO synthase*) com a productora de NO. Existeix també una via potencial de senyalització retrògrada a través del calci, la qual està mediada per MEF2 (de l'anglès, *myocyte enhancer factor 2*), el qual és un potent activador de la transcripció de PGC-1 $\alpha$  en múscul (Scarpulla 2008). Adaptat de (Hock, Kralli 2009, Scarpulla 2008, Lopez-Lluch et al. 2008).



## ESTATS FISIOLÒGICS QUE PROMOUEN LA BIOGÈNESI MITOCONDRIAL

L'expressió gènica de la biogènesi i funció mitocondrial es regula en resposta a senyals fisiològiques que acompanyen increments en demandes d'energia o deficiència energètica. Els estats fisiològics que es coneixen que augmenten la biogènesi mitocondrial són un exercici físic de resistència, una exposició al fred i una restricció calòrica sense malnutrició. L'exercici de resistència incrementa la biogènesi mitocondrial en el múscul, una exposició llarga al fred induïx biogènesi en teixit adipós marró en animals petits, fet que els permet tenir més capacitat per adaptar-se a la termogènesi, i la restricció calòrica sense malnutrició millora la biogènesi mitocondrial en rosegadors i humans. Aquests estímuls fisiològics diferents que induïxen la biogènesi mitocondrial utilitzen senyals comuns, com un augment de les vies induïdes per concentracions del ió calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i el sensor cel·lular d'estat energètic, l'AMPK. L'AMPK nota la deficiència energètica quan la relació de AMP/ATP és alta i aquesta s'activa en exercici de resistència, en restricció calòrica i en altres estats.

El SIRT1 és una deacetilasa dependent de  $\text{NAD}^+$ , la seva homòloga en llevat és la Sir2, la qual mitja els efectes de la longevitat en llevats sotmesos a restricció calòrica. SIRT1 s'activa en estats de manca de nutrients, com estats de dejuni o restricció calòrica. SIRT1 deacetila i activa al PGC-1 $\alpha$ , revertint els efectes de l'acetiltransferasa GCN5, la qual acetila i reprimeix al PGC-1 $\alpha$ . El resveratrol incrementa l'activitat de SIRT1, induïx la biogènesi mitocondrial en múscul i millora el rendiment de l'exercici en ratolins, a més a més també activa a l'AMPK.

Altres senyals que s'activen per diferents estats fisiològics són el monofosfat d'adenosina cíclic cAMP (de l'anglès, *cyclic adenosine monophosphate*), les neuregulines i l'òxid nítric (Hock, Kralli 2009).

### 7.3. La funció mitocondrial i de reticle endoplasmàtic en l'envelliment

El procés d'envelliment porta associat una pèrdua de les capacitats funcionals de l'organisme, i un dels màxims responsables cel·lulars es coneix que és la mitocondria, ja que és un orgànul que juga un paper essencial en l'energètica cel·lular. Evidentment, com tots els altres components cel·lulars, la funció d'aquest orgànul

també es mostra alterada amb l'edat. Diferents estudis mostren canvis en el contingut i funció mitocondrials amb l'edat, fins i tot en humans. En múscul d'humans la capacitat oxidativa mitocondrial disminueix un 8% per dècada (Lanza, Nair 2010).

Els canvis dependents de l'envelliment i responsables del conjunt del declini funcional de la mitocòndria estan involucrats en múltiples nivells, des de l'expressió dels gens fins a l'assamblatge funcional de l'òrganul. Per tal d'entendre els mecanismes responsables del declini de la funció mitocondrial en l'envelliment, numerosos investigadors han examinat diferents perturbacions moleculars i cel·lulars produïdes per aquest procés. Entre els diferents processos mitocondrials alterats en l'envelliment s'ha descrit canvis en les proteïnes relacionades amb l'estrès de reticle i la biogènesi mitocondrial.

Existeixen diferents treballs que demostren una disminució de xaperones del RE amb l'edat, com també l'oxidació d'aquestes, fet que afecta a les seves funcions. Diferents estudis en rates i ratolins indiquen una disminució de l'expressió de GRP78 amb l'edat com també una disminució de la seva activitat. La calnexina, però no la calreticulina, s'ha trobat disminuïda amb l'edat en rata i en fibroblasts d'humans. I la proteïna PDI mostra una disminució en els seus nivells com també en l'activitat amb l'edat en rates i ratolins. Recentment s'ha trobat també un increment de l'oxidació de proteïnes clau residents al RE amb l'envelliment. GRP78, PDI i calreticulina es troben carbonilades en fetge de ratolí amb l'edat, compromentent el plegament proteic, la formació de ponts disulfur i la glicosilació (Naidoo 2009).

L'estrès de RE s'ha trobat que està implicat en el desenvolupament de la diabetis, l'arteriosclerosi i malalties neurodegeneratives associades a l'envelliment com l'Alzheimer, el Parkinson i l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (Naidoo 2009). Dos treballs recents demostren també una implicació de l'estrès de reticle i canvis en la biogènesi mitocondrial en les malalties neurodegeneratives del Pick (PiD, del anglès, *Pick Disease*) i de grans argidòfils (AGD, del anglès, *Argyrophilic Grain Disease*) (Ilieva et al. 2010b, Ilieva et al. 2010a)

En cervell dels malalts de Pick existeix una disminució significativa de les xaperones GRP78 i 94, disminució més marcada en el còrtex frontal (on hi ha canvis morfològics produïts per la malaltia) però el còrtex occipital, el qual, en un principi, està

morfològicament preservat, també disminueixen (Ilieva et al. 2010b). Aquest fet suggereix una alteració de les proteïnes relacionades amb el control del plegament proteic en l'envelliment, possiblement previ a l'aparició de malalties associades a l'envelliment. En canvi, els resultats de l'hipocamp dels malalts d'AGD, mostren una disminució clara d'aquestes xaperones, com també del sensor d'estrès de RE, l'ATF6 i l'IRE1 (Ilieva et al. 2010a). Recentment també s'ha descrit que en el cerebel, en l'hipocamp i en el lòbul parietal inferior de cervell d'humans que sofreixen un deteriorament cognitiu transitori entre l'envelliment normal i la patologia de l'Alzheimer, existeix una inducció general de les xaperones de la família de les HSPs (de l'anglès, *heat shock proteins*) (Di Domenico et al. 2010). En conjunt, l'alteració del sistema proteic de xaperones observat en aquestes tres patologies suggereix que pot contribuir a la patogènesis i progressió de les mateixes.

Mentre que la disfunció de la biogènesi mitocondrial afecta a tot l'organisme durant l'envelliment, els seus efectes són particularment perjudicials a nivell del sistema nerviós central. El factor transcripcional mitocondrial, mTFA, el qual és necessari per a la transcripció i replicació de l'ADN mitocondrial, mostra un increment (del 1,5 al 2,4) en cerebel, fetge i ronyó de rata Wistar d'edat avançada (Dinardo et al. 2003). Un increment similar s'observa també en múscul d'humans d'edat avançada (Lezza et al. 2001, Pesce et al. 2001). L'organisme intenta compensar la pèrdua de mitocondries, les quals estan danyades, però no va acompanyat d'una eficiència energètica. Fet que queda palès en el cerebel, on l'augment de mTFA i d'ADN mitocondrial sembla necessari per a compensar la disminució substancial de l'activitat transcripcional (sobre un 60%), mesurat com la relació de molècules d'ARN/ADN mitocondrials, per tant el nombre total de molècules mitocondrials transcrites es manté invariable (Dinardo et al. 2003). En la malaltia neurodegenerativa AGD, també existeix una disfunció mitocondrial caracteritzada per una disminució dels complexos de la cadena de transport mitocondrial, tot i un considerable augment dels reguladors de la biogènesi mitocondrial (Ilieva et al. 2010a). El manteniment inadequat de l'activitat mitocondrial durant l'envelliment sembla ser un factor clau per al desenvolupament de les malalties neurodegeneratives (Lopez-Lluch et al. 2008).

Recentment, Piantadosi introdueix la idea de que la biogènesi mitocondrial, entesa com a factor de supervivència, està íntegrament connectada amb el control redox i les defenses cel·lulars contra la toxicitat xenobiòtica i l'estrès oxidatiu (Piantadosi et al.

2008). El factor clau és el factor Nrf2, factor de transcripció crític per a la protecció de les substàncies electròfiles, inflamació i toxicitat química (Wakabayashi et al. 2004). Nrf2 connecta la biogènesi mitocondrial amb les defenses antioxidants i a xenobiòtics mitjançant un mecanisme redox basat en el monòxid de carboni (CO). En cardiomiòcits, la sobreexpressió de l'hemoxigenasa-1 (HO-1) fa que NRF1 es transloqui al nucli i activa mTFA, el factor de transcripció de l'ADN mitocondrial, i augmenta així el nombre de còpies d'ADN mitocondrial. HO-1 i CO regulen la translocació al nucli de NRF1 mitjançant la fosforilació d' AKT amb una conseqüent transcripció gènica de NRF1 sota el control de Nrf2 (Piantadosi et al. 2008).

Actualment, la restricció calòrica és una estratègia que mengua els defectes en l'activitat i la funció mitocondrial durant l'envelliment. Dos estudis in vitro amb cèl·lules humanes demostren una millora en la massa i funció mitocondrial i un augment de l'expressió de la SIRT1 en cèl·lules humanes (Lopez-Lluch et al. 2006, Cohen et al. 2004). I tot i que els estudis en humans són limitats, n'existeix un realitzat en humans el qual demostra que una RC de 6 mesos incrementa l'expressió de SIRT1, PGCalfa i TFAM i el nombre de mitocòndries en múscul (Civitarese et al. 2007).

Poc es coneix, però, de l'efecte de la restricció de metionina sobre la biogènesi mitocondrial, existeix només un treball en teixit adipòs i múscul de rata el qual va en el mateix sentit que la RC (Perrone et al. 2010). Es necessari, però, explorar més aquets camp, principalment a nivell del sistema nerviós central per la seva implicació amb les malalties neurodegeneratives associades a l'envelliment.