

Efecte de la restricció de metionina en el procés d'envelliment



“Res no beneficiarà tant la salut humana i incrementarà les possibilitats de supervivència de la vida sobre la Terra, com l'evolució cap a una dieta vegetariana.”

Albert Einstein

“La majoria de malalties; fins i tot aquelles que condueixen a qui les sofreix a un especialista, són causades únicament per una sèrie prolongada i continuada d'errors en la dieta i en el règim.”

Avicena

Agraïments

En aquest apartat, voldria mostrar el meu reconeixement a totes les persones que m'han ajudat i m'han suportat durant la realització del treball.

Primerament, voldria donar les gràcies a les dues tutores que he tingut en aquest treball de recerca: la [REDACTED], qui m'havia aconseguit un tutor al projecte d'Itinera, però que va haver de deixar l'institut i no va poder seguir coordinant el meu treball; i la [REDACTED], per haver-me ajudat en la redacció del treball i en l'elaboració d'una presentació excel·lent.

D'altra banda, voldria agrair al professor [REDACTED] per haver estat el meu cotutor del treball de recerca, per haver-me proporcionat les pràctiques a l'IRB i per haver-me deixat participar en la seva magnífica investigació, a tot el personal de l'IRB i, especialment, a la Irene Pradas, per haver-me ajudat, aguantat i suportat durant tots els mesos que he estat fent pràctiques i fins i tot després d'aquestes.

Finalment, no ens podem oblidar del suport que m'ha donat la família en tot aquest llarg i dur camí.

Abstract

From the beginning of the world, the human race has been searching for a way to live forever and to be immortal. Not so long ago, it was proposed that nutrition was linked to the ageing process and that through dietary interventions it was possible to live longer. Scientific investigation has led us to methionine restriction, a dietary intervention based on reducing the intake of methionine, a sulphur-containing amino acid. Subsequent experiments have constantly shown that these types of dietary interventions increase lifespan, and thus extend life, in a very wide range of model organisms. The mechanism through which these dietary interventions increase lifespan is currently unknown, but the involvement of the mTOR signalling pathway has already been determined. It has not however been established whether methionine restriction is capable of reversing the effects of ageing.

On the one hand, the main aim of our research is to determine whether it is possible to reverse the effects of ageing through an 80% methionine restriction and to restore an individual's youthfulness. To do this, we planned to evaluate whether an 80% methionine restricted aged animals would show any changes in comparison with individuals of the same age, but which were alimeted *ad libitum*, in terms of protein synthesis, autophagy and proteins in the mTORC1 complex.

On the other hand, this scientific investigation is very complicated to understand for students of 2nd Batxillerat; in this context, we will make the most of our presentation in order to reduce the level of complexity of the research and to make it more accessible.

We found that protein synthesis was only reduced in the liver of the restricted animals, evaluated through the expression of 4EBP1, S6K1 and eEF2. With the results obtained, it is impossible to conclude whether methionine restriction promotes a rejuvenation process, as only protein synthesis suffered a reduction, and only in the liver. More investigation is therefore needed to elucidate the mechanisms through which methionine restriction increases longevity and/or reverses the effects of ageing.

ÍNDEX

ÍNDEX	5
Índex de figures	9
Índex de taules	11
ABREVIACIONS	12
Abreviacions	13
INTRODUCCIÓ	14
1. Envelliment	15
1.1. L'envelliment associat als mitocondris	16
1.1.1. La teoria mitocondrial de l'envelliment mitjançant radicals lliures	16
1.1.2. Els radicals lliures	16
1.1.3. Els mitocondris i la producció de ROS	18
1.1.4. La biogènesi mitocondrial	20
2. Restriccions dietètiques i envelliment	22
2.1. La investigació amb la restricció dietètica	22
2.2. La restricció calòrica	25
2.3. La restricció proteica	26
2.4. La restricció de metionina	27
2.4.1. Per què la metionina?	27
3. Actuació de les proteïnes de la via de senyalització de la mTOR	29
3.1. Estructura del complex mTORC1	30
3.1.1. mTOR	31
3.1.2. RAPTOR	31
3.1.3. FKBP12	31
3.2. Síntesi proteica	31
3.2.1. eEBP1	32
3.2.2. S6K1	32
3.2.3. eEF2	32
3.3. Autofàgia	32
3.3.1. ATG13	33
3.3.2. LC3B	33
3.3.3. p62	33
3.3.4. Ubiquitina	33
3.4. Biogènesi i metabolisme mitocondrials	34
3.5. La resposta de mTORC1 davant aminoàcids	34

HIPÒTESIS I OBJECTIUS	35
4.Hipòtesis i objectius	36
MATERIALS I MÈTODES	37
5.Materials i mètodes	38
5.1.Anticossos i reactius	38
5.1.1.Reactius	38
5.1.2.Anticossos	38
5.2.Animals utilitzats	39
5.3.Dietes	39
5.4.Processament previ de la mostra	41
5.4.1.Homogeneïtzació dels teixits	41
5.4.2.Quantificació de proteïnes	41
5.5.Immunodetecció per Western Blot	43
5.5.1.Preparació dels gels	43
5.5.2.Preparació de la mostra	45
5.5.3.Electroforesi	45
5.5.4.Electrotransferència	46
5.5.5.Bloqueig de la membrana	48
5.5.6.Immunodetecció	48
5.5.7.Revelat	49
5.5.8.Tinció de la membrana amb coomassie	50
5.5.9.Anàlisi de dades	51
RESULTATS OBTINGUTS I DISCUSSIÓ	54
6.Resultats obtinguts i discussió	55
6.1.Complex mTORC1	55
6.1.1.mTOR	55
6.1.2.RAPTOR	56
6.1.3.FKBP12	56
6.2.Síntesi proteica	57
6.2.1.4EBP1	57
6.2.2.S6K1	58
6.2.3.eEF2	59
6.3.Autofàgia	60
6.3.1.ATG13	60

ÍNDEX

6.3.2.LC3B	60
6.3.3.p62	61
6.3.4.Ubiquitina	62
CONCLUSIONS	63
7.Conclusions	64
7.1.Conclusions científiques	64
7.2.Conclusions personals	65
BIBLIOGRAFIA	66
8.Bibliografia	67
ANNEX	76
9.Annex	77
9.1.Annex 1	77
9.2.Annex 2	78

Índex de figures

Figura 1. Formació d'un radical lliure a partir d'un àtom normal d'oxigen. _____	17
Figura 2. Peroxidació lipídica. _____	17
Figura 3. Mecanisme d'acció d'un antioxidant. _____	18
Figura 4. Diagrama esquemàtic dels processos mitocondrials que són importants per l'envelliment. _____	19
Figura 5. L'exercici físic i la incentivació de la biogènesi mitocondrial. _____	21
Figura 6. Llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . _____	23
Figura 7. Cuc <i>Caenorhabditis elegans</i> . _____	23
Figura 8. Mosca de la fruita <i>Drosophila melanogaster</i> . _____	24
Figura 9. Població centenària de la Sicília Occidental. _____	24
Figura 10. Individus centenaris d'Okinawa. _____	25
Figura 11. Fórmula molecular de la metionina. _____	28
Figura 12. Esquema de la via de senyalització de la mTOR. _____	29
Figura 13. Complex mTORC1: precursors, estructura i funcions. _____	30
Figura 14. Esquema senzill dels processos en què intervé la via de senyalització de la mTOR. _____	36
Figura 15. Kit de Bradford de Bio-Rad. _____	42
Figura 16. Procés de polimerització dels gels _____	45
Figura 17. Esquema de muntatge de la cubeta de l'electroforesi. _____	46
Figura 18. Muntatge de l'electroforesi. _____	46
Figura 19. Material necessari per l'electrotransferència. Extret de Bio-Rad. _____	47
Figura 20. Muntatge per a dur a terme l'electrotransferència. _____	47
Figura 21. Electrotransferència en marxa. _____	48
Figura 22. Membrana tallada. _____	49
Figura 23. Rentat de les membranes amb TBST 0,1 %. _____	49
Figura 24. Sistema ChemiDoc. _____	50
Figura 25. Programa Image Lab amb l'opció <i>colorimetric</i> . _____	51
Figura 26. Membrana amb la banda de la proteïna d'interès. _____	52
Figura 27. Eina <i>Lanes and Bands</i> . _____	52
Figura 28. Fórmules matemàtiques emprades en la realització del test estadístic. _____	53
Figura 29. Representació dels processos software seguits per fer les representacions gràfiques i estadístiques amb el programa GraphPad Prism 5.0. _____	53
Figura 30. Quantificació de l'expressió proteica de mTOR obtinguda per Western Blot. _____	55
Figura 31. Quantificació de l'expressió proteica de RAPTOR obtinguda per Western Blot. _____	56
Figura 32. Quantificació de l'expressió proteica de FKBP12 obtinguda per Western Blot. _____	56
Figura 33. Quantificació de l'expressió proteica de 4EBP1 obtinguda per Western Blot. _____	57
Figura 34. Quantificació de l'expressió de S6K1 obtinguda per Western Blot. _____	58
Figura 35. Quantificació de l'expressió proteica de eEF2 obtinguda per Western Blot. _____	59

Figura 36. Quantificació de l'expressió proteica de ATG13 obtinguda per Western Blot. _____	60
Figura 37. Quantificació de l'expressió proteica de LC3B obtinguda per Western Blot. _____	60
Figura 38. Quantificació de l'expressió proteica de p62 obtinguda per Western Blot. _____	61
Figura 39. Quantificació de l'expressió proteica d'ubiquitina obtinguda per Western Blot. _____	62
Figura 40. Esquema de les funcions de la via de mTOR amb els resultats obtinguts i les conclusions. _____	64

Índex de taules

Taula 1. Anticossos primaris i secundaris utilitzats. _____	38
Taula 2. Dieta dels animals experimentals. _____	40
Taula 3. Concentracions de BSA utilitzades en la prova de Bradford. _____	42
Taula 4. Quantitat necessària dels reactius per preparar el gel separador. _____	43
Taula 5. Quantitat necessària dels reactius per preparar el gel empilador. _____	44

ABREVIACIONES

Abreviacions

4EBP1: proteïna 1 d'unió al factor eucariòtic de l'inici de la traducció 4E.

AMPK: proteïna quinasa activada per AMP.

ATG13: proteïna 13 relacionada amb l'autofàgia.

ATP: adenosina 5'-trifosfat.

CR: restricció calòrica.

DNA: àcid desoxiribonucleic.

DR: restricció dietètica.

eEF2: factor d'elongació 2.

FKBP12: proteïna d'unió 12 a FK506.

IGF-1: factor de creixement insulínic de tipus 1.

LC3B: proteïna associada a microtúbuls 1 de cadena lleugera 3B.

MetR: restricció de metionina.

mTOR: diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer.

mTORC1: complex 1 de mTOR.

mTORC2: complex 2 de mTOR.

mtDNA: DNA mitocondrial.

PGC-1 α : coactivador-1 α del receptor- γ activat pel proliferador de peroxisomes.

PR: restricció proteica.

RAPTOR: proteïna associada a la regulació de mTOR.

ROS: espècies reactives d'oxigen.

S6K1: proteïna quinasa S6.

INTRODUCCIÓ

1. Envelliment

Definir l'envelliment és molt difícil, sobretot per la gran quantitat de processos que hi participen. L'envelliment es pot explicar com l'acumulació progressiva de canvis en el temps que redueixen la capacitat de l'individu per enfrontar-se a l'estrès, disminuint així les seves possibilitats de supervivència [1].

D'altra banda, el gerontòleg americà Bernard Strehler [2] va definir l'envelliment seguint quatre regles:

- 1) L'envelliment és universal, ja que afecta a tots els individus de totes les espècies, sobretot les multicel·lulars.
- 2) L'envelliment és intrínsec o endogen. Aquesta característica es refereix al fet que les causes d'aquest procés estan determinades, majoritàriament, per factors interns, com poden ser els gens, i no per l'ambient. Això s'ha verificat amb el fenomen que l'envelliment progressa encara que es protegeixi l'individu de qualsevol font de dany exterior i que existeixen diferents longevitats màximes en diverses espècies que viuen en un mateix ambient.
- 3) L'envelliment és progressiu: tots els efectes que produeix l'envelliment no apareixen de forma instantània, sinó que es van produint de forma progressiva i contínua.
- 4) L'envelliment és deleteri, és a dir, produeix efectes perjudicials en els individus i aquests es poden observar, més clarament, en cèl·lules postmitòtiques com les neurones i no en les que es divideixen contínuament [3]. De fet, deleteri es pot definir com a quelcom altament danyós o tòxic que posa en perill la vida.

Les principals causes de l'envelliment inclouen l'estrès oxidatiu i el deteriorament de la funció mitocondrial (conseqüència de l'estrès oxidatiu). D'altra banda, l'escurçament i "l'erosió" dels telòmers, la reducció dels sistemes de protecció, com la reparació del DNA i els antioxidants, i la pèrdua i el deteriorament de cèl·lules clau durant la vida i irremplaçables, com les neurones o les cèl·lules mare, també en són d'altres causes. La majoria d'aquestes causes estan desenvolupades en diverses teories, com la del desgast o la del marcapassos.

Altrament, la senescència cel·lular també ha estat estudiada en molts organismes model, però en alguns ha estat força difícil duu a terme aquest tipus d'estudis. En humans, s'ha vist que la senescència cel·lular apareix en les cèl·lules de cultiu després d'una sèrie de divisions, el que resulta en una pèrdua global del DNA telomèric, fet que, al seu torn, impulsa, progressivament, la resposta de dany al DNA [4]. Aquest desgast telomèric és la ruta principal de la senescència, però també

altres estressos la poden desencadenar, com pot ser l'activació oncogènica, el dany al DNA o l'estrès oxidatiu [5].

1.1.L'envelliment associat als mitocondris

1.1.1.La teoria mitocondrial de l'envelliment mitjançant radicals lliures

Hi ha innumerables teories de l'envelliment, que es poden classificar en estocàstiques (“aleatòries”), o no estocàstiques (mort programada). No obstant, aquí tractarem només la “Teoria mitocondrial d'envelliment mitjançant radicals lliures”, una teoria estocàstica.

Aquesta teoria es va postular per Denham Harman a mitjans del segle XX, quan es va descobrir que els radicals lliures d'oxigen, que es considerava que eren molt perjudicials i tòxics per les estructures biològiques, i que es formaven dintre dels organismes com a resposta a radiacions, intoxicacions per oxigen o, simplement, durant la respiració mitocondrial, és a dir, el metabolisme normal de les cèl·lules [6]. Aquestes molècules tenen la capacitat de generar dany i estrès oxidatiu, fet que condueix, finalment, al dany tissular i l'envelliment [7]. D'altra banda, també es van descobrir els sistemes antioxidants com l'enzima antioxidant superòxid dismutasa (SOD), per McCord i Fridovich el 1969, que va fer pensar que els radicals lliures s'havien de produir de forma contínua i en un gradient més alt que aquest antioxidant pogués controlar per produir l'envelliment. A més, es va determinar que les mitocondries eren el principal lloc de generació dels radicals lliures i les seves principals dianes [8], i que es produïen durant la respiració cel·lular, com el peròxid d'hidrogen.

Aquests radicals lliures són destructius i ataquen a gran quantitat de molècules de la cèl·lula, però sobretot són perjudicials pel grau de mutacions que poden originar en el DNA [9],[10]. Per sort, aquest dany es pot reparar, però encara així les estructures cel·lulars es deterioren progressivament, sobretot els mitocondris, i acaben produint l'envelliment i l'aparició de malalties relacionades amb aquest [11]. Aquest dany s'anomena dany oxidatiu, i produeix el que es coneix com estrès oxidatiu, que al seu torn, és causat per un desequilibri entre la producció de radicals lliures i la capacitat d'un sistema biològic de reparar el dany que produeixen, és a dir, la quantitat d'antioxidants [7].

1.1.2.Els radicals lliures

Un radical lliure és un àtom, una molècula, un compost, o qualsevol altra espècie química en general, amb un o més electrons desaparellats en el seu orbital més extern. Aquests radicals, a causa de ser molt electròfils, són altament perillosos en zones amb una alta activitat o inestabilitat electrònica, com per exemple els àtoms de nitrogen dels àcids nucleics (DNA) o els dobles enllaços dels àcids grassos insaturats de la membrana plasmàtica [7],[12].

Sovint, els radicals lliures se solen anomenar espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*, i els principals són: el radical superòxid (O_2^-), el radical hidroxil (OH^\cdot), el perhidroxil (HO_2^\cdot) i altres molècules com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), que també reaccionen amb altres radicals i són tòxics.

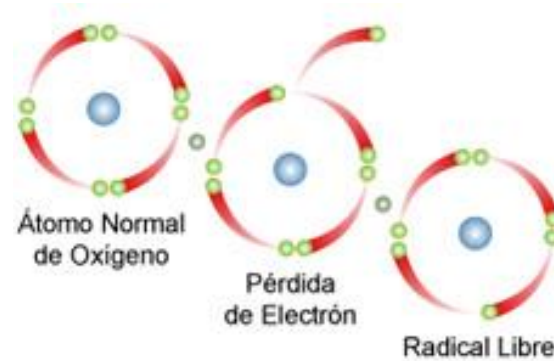


Figura 1. Formació d'un radical lliure a partir d'un àtom normal d'oxigen [13].

La peroxidació lipídica (Figura 2) és el procés d'obtenció d'electrons, per part dels radicals lliures, dels lípids de les membranes cel·lulars. Òbviament, té conseqüències nefastes, i s'ha associat amb malalties com el càncer.

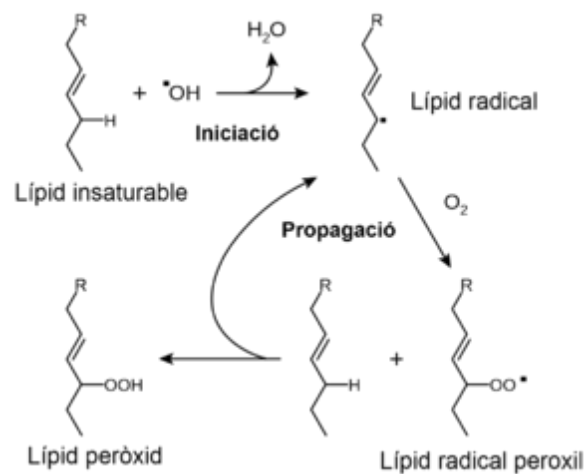


Figura 2. Peroxidació lipídica [14].

D'altra banda, els sistemes antioxidants ajuden a combatre aquestes molècules, ja que ajuden a prevenir l'oxidació i el dany produït per les ROS. Els sistemes principals són el superòxid dismutasa, el glutatió i la catalasa, i la seva funció és cedir electrons als radicals lliures perquè esdevinguin estables i, d'aquesta forma, impedir que siguin perjudicials per la cèl·lula. En relació amb això, en la fabricació d'aquests sistemes "anti-estrès oxidatiu" intervien diferents vitamines, com la E o la C, i aquestes es troben en la majoria de fruites i verdures. Per això, la consumició de

fruites i verdures és imprescindible per combatre les ROS, però tampoc s'ha de fer excessivament perquè pot produir problemes, que es justifiquen amb el fenomen de l'hormesi.

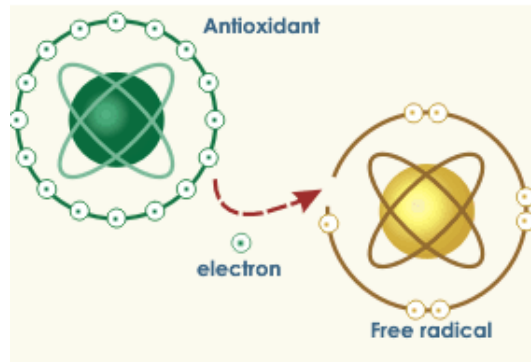


Figura 3. Mecanisme d'acció d'un antioxidant [15].

Com s'ha esmentat anteriorment, les ROS es generen durant processos metabòlics en els quals es consumeix oxigen, el principal dels quals és la cadena respiratòria mitocondrial.

1.1.3. Els mitocondris i la producció de ROS

La producció de ROS ocorre de forma contínua al llarg de la vida dels organismes en una taxa específica de cada espècie, independentment de la taxa de consum d'oxigen mitocondrial, però relacionada amb la seva longevitat [16]. A més, s'ha descobert en diversos estudis comparatius que la producció mitocondrial de ROS és menor en espècies més longeves [17],[18].

D'acord amb el fet que la cadena de transport electrònic produeix ROS a nivell mitocondrial, ja que és un procés que consumeix oxigen, podríem deduir que els mitocondris són una font d'aquests i que, per tant, serien uns bons òrgans en els quals centrar-se per entendre l'envelliment. A partir d'aquí, es va descobrir que la generació de ROS només té lloc en els complexos I [19]–[21] i III [22] de la cadena respiratòria, segurament pels substrats que s'hi utilitzen, i que les restriccions dietètiques només redueixen la producció de ROS del complex I. D'aquesta forma, podem considerar el complex I com el més important en la generació de ROS.

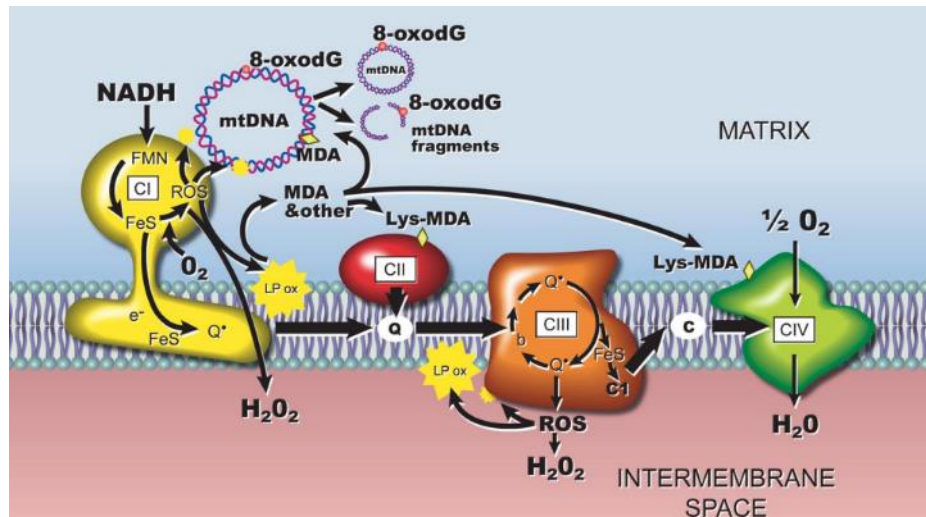


Figura 4. Diagrama esquemàtic dels processos mitocondrials que són importants per l'envelliment. La figura ens mostra que els complexos I i III són els principals generadors de radicals lliures. Diversos mecanismes fisiològics influencien la taxa de generació de ROS mitocondrials, que inclouen: la concentració relativa dels complexos respiratoris, el grau de reducció electrònica d'aquests generadors, les proteïnes desacobrades, el contingut de cardiolipina i algunes modificacions químiques específiques. Els radicals d'oxigen ataquen lípids, glúcids, proteïnes i DNA. Els productes de la peroxidació lipídica són molècules altament reactives que poden causar dany lipooxidatiu al DNA i a les proteïnes mitocondrials [23].

La generació de ROS, durant la cadena respiratòria, està fortament lligada amb la taxa de flux electrònic. D'aquesta manera, si hi ha poc flux electrònic, els electrons que queden en els complexos respiratoris augmenten el seu grau de reducció i tendeixen a formar ROS [20] i, d'altra banda, si el flux d'electrons és elevat, la generació de ROS, per conseqüència, disminueix. A més, si s'afegeix ADP als mitocondris la taxa de flux d'electrons augmenta molt i, per tant, es redueix la producció de ROS i el grau de reducció electrònica [24].

Curiosament, el flux d'electrons augmenta quan els mitocondris incrementen el consum d'oxigen i la producció d'ATP, és a dir, quan la demanda energètica es fa més gran. Així, podem considerar que fer exercici, sobretot resistència, té capacitats rejuvenidores, ja que redueix la generació de ROS, però l'exercici excessiu pot produir l'efecte contrari.

Les investigacions recents mostren que una restricció dietètica d'unes 6-7 setmanes té la capacitat de reduir la producció de ROS i el dany oxidatiu al DNA i al mtDNA (DNA mitocondrial) [25]. Curiosament, el mecanisme generador del descens de la producció de ROS no disminueix el consum mitocondrial d'oxigen, cosa que es contradia amb el pensament original, que suposa que aquests dos paràmetres es correlacionen. D'aquesta forma, podem deduir que els mitocondris dels animals restringits són molt més eficients fent la seva funció, ja que generen menys ROS realitzant el mateix treball.

En una altra línia d'investigació, que estudiava l'alteració genètica de l'expressió de diversos components de la cadena de transport d'electrons i de la fosforilació oxidativa, es va descobrir que

aquesta acció, òbviament, deteriora la funció mitocondrial, però va prolongar la vida [26],[27]. No obstant això, si s'elimina tot tipus d'expressió de les subunitats de la cadena respiratòria, l'individu mor. D'acord amb aquest fet curiós, es va arribar a la conclusió que la producció de ROS, per les mitocòndries, pot ser beneficiosa, però només en una proporció determinada, ja que permet activar una sèrie de vies que provoquen efectes protectors. Un exemple és la via de senyalització UPR^{mt}, que regula a l'alça diverses xaperones, que afavoreixen el plegament proteic correcte i, per conseqüència, intenten restaurar l'homeòstasi proteica [28]. Això s'ha relacionat amb el concepte de l'hormesi, que explica que una mica d'estrès pot protegir contra estressos posteriors majors, i quan es refereix a les mitocòndries, s'anomena mitohormesi [29],[30].

1.1.4.La biogènesi mitocondrial

Les investigacions recents han descobert que l'autofàgia és essencial al llarg de la vida, sobretot per endarrerir l'envelliment, ja que permet el reciclatge continu i la regeneració de les cèl·lules, el que, al seu torn, millora les funcions cel·lulars i els seus sistemes de protecció envers l'estrès oxidatiu, per exemple.

En relació amb aquest concepte, va aparèixer la mitofàgia, que bàsicament és el mateix procés però amb els mitocondris, i la biogènesi mitocondrial, que és la generació de nous mitocondris [28]. De fet, els mitocondris són uns orgànuls molt importants i que es deterioren amb el temps, així, la regulació adequada de la biogènesi mitocondrial i de la mitofàgia és clau en el procés d'envelliment i està determinada per moltíssims factors externs i interns, des de l'exercici i l'alimentació fins a l'expressió de diversos factors com el PGC-1 α (coactivador-1 α del receptor- γ activat pel proliferador de peroxisomes) i la transcripció de més de 1000 gens en 2 genomes diferents [7].

En els estudis experimentals, s'ha descobert que la restricció dietètica, el resveratrol i l'exercici incrementen l'activitat de PGC-1 α i de AMPK (proteïna quinasa activada per AMP) i, per conseqüència, la biogènesi mitocondrial i la longevitat [31]. D'altra banda, la AMPK també participa en el procés de l'autofàgia, mitjançant interaccions com l'activació de ULK1 (Quinasa 1 semblant a UNC-51) per fosforilació [32], i la bioenergètica, atès que intervé en el procés d'obtenció de glucosa, i s'ha estudiat la possibilitat d'activar-la com una diana terapèutica per tractar la diabetis de tipus 2 [33].

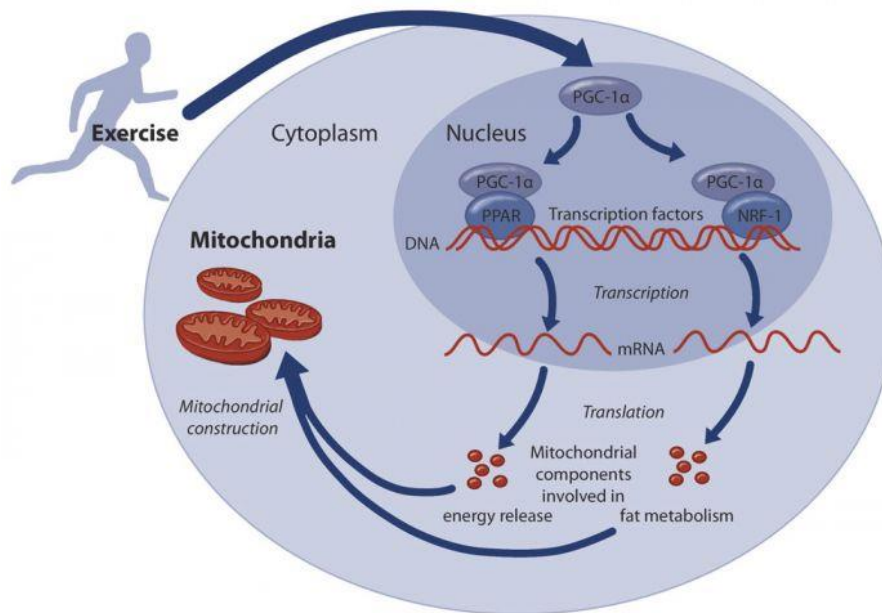


Figura 5. L'exercici físic i la incentivació de la biogènesi mitocondrial. L'exercici incentiva l'expressió del PGC-1 α i de diversos factors de transcripció que participen en la síntesi de RNA missatger mitocondrial que codifica per proteïnes mitocondrials involucrades en l'alliberament d'energia i el metabolisme de greixos, fet que desemboca en la millora de la biogènesi mitocondrial [34].

2. Restriccions dietètiques i envelliment

La restricció dietètica (de l'anglès *dietary restriction*) (DR) constitueix un dels mecanismes que s'està estudiant per combatre l'envelliment i l'aparició de les malalties relacionades amb l'edat, atès que té la capacitat d'activar i desactivar una sèrie de vies metabòliques que, d'una manera o d'una altra, desemboquen en un increment de la longevitat. És un terme molt general, que engloba diferents tipus d'intervencions nutricionals com ara: restricció calòrica, restricció proteica, restricció glucídica, restricció lipídica i restricció de metionina.

2.1. La investigació amb la restricció dietètica

La primera evidència que una restricció dietètica té efectes beneficiosos sobre la salut, la vam obtenir de l'italià Luigi Cornaro al segle XVI, que, després d'haver estat a punt de morir a causa d'una sèrie de problemes de salut, conseqüències de la seva alta ingesta de menjar, va decidir canviar el seu estil de vida i va limitar la seva consumició de menjar. Cornaro va publicar uns articles, en els quals donava a conèixer la seva vitalitat incrementada, que va atribuir a les seves restriccions dietètiques, fins que va morir als 102 anys [28].

És important destacar que Clive McCay i Mary Crowell ja van començar a treballar amb la DR en rates i ratolins fa 80 anys, amb l'objectiu d'estendre la seva vida i millorar la seva salut. La majoria d'aquestes investigacions van aconseguir reduir el risc de desenvolupar i de morir a causa de càncer, de malalties cardiovasculars, o de diabetis tipus 2, entre d'altres. D'altra banda, també es va prevenir l'obesitat, a causa de la millora del metabolisme, i es va retardar l'aparició de la sarcopènia, la presbiacúcia i de l'atròfia del cervell en micos rhesus [35].

Hi ha moltes més línies d'investigació en organismes model com el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, que, gràcies a que és unicel·lular i té un genoma bastant simple, ha permès relacionar i entendre molts gens que participen en l'aparició de malalties relacionades amb l'edat (revisat en [36]). S'ha vist que durant una restricció dietètica, aquest organisme perd l'expressió de la quinasa TOR i Sch9, fet que impulsa l'extensió de la longevitat i de la RLS (esperança de vida replicativa)[37], que es podria definir com el nombre de divisions cel·lulars a les quals una cèl·lula mare es podria sotmetre. Malgrat tot, aquest organisme, en comparació amb nosaltres, és bastant simple en quan al nombre de gens i de vies que participen en la longevitat, fet que dificulta la veracitat de les investigacions.

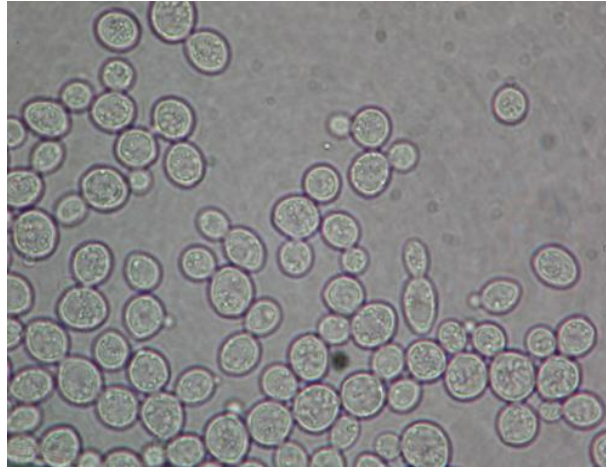


Figura 6. Llevat *Saccharomyces cerevisiae* [38].

D'altra banda, el cuc *Caenorhabditis elegans*, també ha estat força utilitzat en els últims 40 anys a causa de la gran quantitat de gens i vies de la longevitat que comparteix amb l'ésser humà i la seva facilitat de reproducció i cultiu. Curiosament, ha estat en aquest organisme que s'ha descobert que la modulació de només un gen pot estendre la longevitat màxima [39],[40]. A més, uns estudis han mostrat la importància de vies que engloben les vies mitocondrials, el metabolisme energètic, la resposta a l'estrès, la traducció proteica, l'expressió genètica i la seva variació durant una restricció calòrica [41].



Figura 7. Cuc *Caenorhabditis elegans* [42].

Altrament, la mosca de la fruita *Drosophila melanogaster* també s'utilitza molt en la investigació de l'envelliment, tenint una vida i un temps de generació relativament curts i senzills. Com els altres organismes model, la mosca també és sensible al canvi nutricional a través de la senyalització del factor de creixement insulínic i de la via de senyalització de la mTOR. Les intervencions dietètiques, genètiques [43] i farmacològiques [44] van aconseguir augmentar la seva esperança de vida, però també s'han detectat altres proteïnes que no estan presents en els humans i que també participen en la regulació de la longevitat [45]. No obstant, és difícil estudiar el fenotip d'aquests organismes, el que dificulta la investigació de l'envelliment.



Figura 8. Mosca de la fruita *Drosophila melanogaster* [46].

En humans, els efectes de la restricció són molt similars als dels ratolins, i s'han aconseguit efectes beneficiosos en termes de disminució de la rigidesa del miocardi, la quantitat de disfuncions anatòmiques, les vies inflamatòries del múscul esquelètic i la via pi3k/akt/foxo [47],[48]. No hem d'oblidar que mantenir una dieta tan estricta és molt difícil i, fins i tot, una restricció excessiva podria provocar problemes com anèmia, osteoporosi o arítmies cardíques [49]. Aquí és on les intervencions clíniques, o les dietètiques de nutrients específics, jugarien el seu rol, amb fàrmacs o consells dietètics “suaus” per aconseguir aquestes millores en la salut.

Curiosament, a la Sicília occidental se sap que la quantitat de persones centenàries és sis vegades més gran respecte de la mitjana nacional, i catorze vegades més alta que la mitjana nacional dels centenaris de sexe masculí. Aquest fet curiós s'ha relacionat amb l'estil de vida i la dieta dels habitants d'aquesta regió, que és la Mediterrània. Les persones d'aquesta zona realitzen una activitat física moderada i els seus àpats consten de petites quantitats de carn (proteïnes), i de grans quantitats de fruites, verdures, pèsols, olives i oli d'oliva. Si s'uneixen tots aquests factors amb la disminució del risc cardiovascular, l'obesitat i la taxa de mortalitat, podem deduir que és important seguir una alimentació equilibrada i baixa en proteïnes, sobretot d'origen animal.



Figura 9. Població centenària de la Sicília Occidental [50].

Una altra curiositat és la població d'Okinawa, que és una de les més longeves del món. Els seus habitants segueixen una dieta rica en verdures, fruites i grans, i només un 9% de les calories provenen de proteïnes, que són d'origen vegetal [51].



Figura 10. Individus centenaris d'Okinawa [52].

En general, el descobriment que la restricció dietètica i les intervencions farmacològiques, genètiques o dietètiques tenen la capacitat de retardar l'envelliment ha obert pas a una nova medicina preventiva per a les malalties relacionades amb l'edat [53]–[55].

2.2.La restricció calòrica

La restricció calòrica (CR) consisteix a limitar la ingesta energètica procedent de la dieta i s'ha realitzat al llarg dels anys en una multitud d'experiments amb l'objectiu de millorar la salut i de retardar l'envelliment. El 1934, Clive McCay i Mary Crowell havien observat que una restricció calòrica era capaç d'augmentar la longevitat de rates de laboratori el doble respecte de rates alimentades *ad libitum*. D'acord amb això, també es van obtenir uns resultats similars en rates i ratolins, els quals, gràcies a una restricció calòrica, van gaudir d'una esperança de vida major, concretament d'un 50% més respecte dels animals control [56]. Es va determinar la implicació de quatre vies: la via de la mTOR, la via de les sirtuïnes, la via de senyalització del factor de creixement insulínic i la via de la AMPK. A més a més, una DR de 6-7 setmanes va disminuir la taxa de generació de ROS mitocondrials i, per conseqüència, l'estrès i el dany oxidatiu, mesurats amb els nivells de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) en el DNA mitocondrial i nuclear [25].

D'altra banda, en la mosca de la fruita *Drosophila melanogaster* s'ha vist que una restricció alimentària és capaç d'augmentar la seva esperança de vida, amb efectes beneficiosos distingibles en un període de només 48 hores i amb una implicació de les vies de TOR i de IGF-1 [57].

El cuc *caenorhabditis elegans* també constitueix un dels organismes model en què s'estudien les intervencions dietètiques. En una investigació es va estudiar com una restricció dietètica severa podia impulsar l'extensió de l'esperança de vida d'aquest animal, en la qual hi van intervenir factors com Daf-16, l'homòleg de les proteïnes FOXO (de l'anglès *forkhead box proteins*) dels humans [58].

Paral·lelament, s'han realitzat molts estudis similars en micos rhesus, un altre organisme model. Així, es va observar que una DR del 30% era capaç de reduir les concentracions de glucosa i d'insulina basals al sèrum, en comparació amb els animals control, sense comptar que va alterar les proteïnes LDL, cosa que va desembocar en una inhibició de la aterogènesi [59]. A més, en un altre estudi es va obtenir un increment de la longevitat en els animals restringits calòricament [35].

Actualment, es difícil realitzar aquest tipus d'estudis en humans, sobretot pels problemes ètics que comporten. Alguns estudis minoritaris, amb individus voluntaris, han descobert que una restricció calòrica pot comportar a un augment de l'adaptació del cos a l'ús de qualsevol substrat energètic, ja siguin glúcids o lípids, fenomen anomenat "flexibilitat metabòlica" [60].

2.3.La restricció proteica

Després d'investigar els efectes de la restricció dietètica, es va pensar que els efectes beneficiosos observats en l'increment de la longevitat eren causa d'una reducció de la ingesta calòrica. D'altra banda, també es va plantejar la possibilitat que els efectes de la restricció calòrica venien donats per l'eliminació d'una sèrie de components específics de la dieta: lípids, proteïnes o hidrats de carboni.

Les restriccions lipídiques no van tenir èxit, és a dir, no es va aconseguir que una reducció de la ingesta de greixos augmentés l'esperança de vida màxima de les rates de laboratori, i fins i tot va incrementar la prevalença de malalties com la leucèmia, però va aconseguir retardar el desenvolupament de la nefropatia crònica i de les seves conseqüències negatives [61]. També es va estudiar la influència dels components lipídics en la mortalitat causada per neoplàsies, però tampoc no es va obtenir cap correlació significativa [62]. Igual que en el cas dels greixos, la restricció glucídica va mostrar uns canvis minoritaris en la longevitat, sense arribar a terrenys significatius [63].

A diferència de les restriccions lipídiques i glucídiques, la restricció proteica (PR) sí que va mostrar uns resultats considerables i va ser capaç d'incrementar la longevitat de rates i ratolins. Una PR del 40% ha estat capaç de disminuir la generació de ROS, específicament al complex I, i el dany oxidatiu al DNA de rates de laboratori, concretament en el seu fetge, d'una manera similar a una DR [64]. De fet, ni les restriccions lipídiques ni les glucídiques han pogut disminuir la producció de ROS [65],[66] i, per tant, no han demostrat tenir uns efectes considerables en l'extensió de la vida, com s'ha explicat prèviament. A més a més, la restricció de proteïnes va imitar alguns efectes de la DR, sense comptar la millora de la longevitat ni la reducció de la generació de ROS, com la

disminució de l'expressió de IGF-1 [67], però en una intensitat menor, el que suggereix que la meitat dels efectes de la DR, aproximadament, venen donats a causa de la reducció de la ingesta de proteïnes, i que aquestes biomolècules són les responsables, almenys en part, del procés d'envelliment [16].

2.4.La restricció de metionina

D'acord amb el fet que la restricció proteica té efectes beneficiosos en la longevitat, es va intentar determinar si aquests efectes eren conseqüència de les proteïnes en general, o si només d'alguns dels seus components, és a dir, d'alguns aminoàcids específics. Així, es va demostrar que només la restricció d'un parell d'aminoàcids incrementava la longevitat, que eren la metionina i el triptòfan, però la metionina mostrà uns resultats més consistents i, malgrat tot, el triptòfan no incrementà la supervivència [68],[69].

Actualment, s'estan obtenint, amb les restriccions de metionina, uns resultats similars als observats durant una CR o una PR, cosa que suggereix que la metionina juga un paper molt important i clau en l'envelliment i l'aparició i el desenvolupament de malalties relacionades amb l'edat, com les neurodegeneratives o el càncer. A nivell general, aquest tipus d'intervenció dietètica pot augmentar l'esperança de vida d'una gamma ampla d'organismes, des de *Drosophila* fins els micos rhesus, però només en unes condicions determinades, ja que, curiosament, la restricció de metionina (MetR) no va succeir sota unes condicions elevades d'aminoàcids [70]. En altres línies d'investigació, es va descobrir que la restricció de metionina disminueix la producció de ROS mitocondrials, sobretot als complexos I i III del fetge de rata [71], però també la producció general en el cervell i el ronyó [7]. D'acord amb això, la disminució del dany oxidatiu pot ser un dels mecanismes mitjançant els quals la restricció de metionina estén l'esperança de vida.

De fet, encara no es coneixen completament els mecanismes responsables d'aquests efectes. Una cosa és segura: igual que en el cas de la DR i la PR, hi estan involucrades les senyalitzacions de IGF-1 i de mTOR. La mTOR actua d'una manera dependent dels aminoàcids i, per conseqüència, és activada en presència d'aquests i inhibida per la seva manca, com per exemple durant una restricció de proteïnes o de metionina. A més, els nivells d'aminoàcids també es poden detectar d'acord amb GCN2, una proteïna que, a diferència de mTOR, s'activa en absència d'aminoàcids [72]. També se sap que, a causa de la reducció de l'expressió de mTOR, l'autofàgia es veu impulsada i s'activen una sèrie de vies metabòliques que tenen com a objectiu l'obtenció d'energia [73].

2.4.1.Per què la metionina?

La metionina és un dels 20 aminoàcids que existeixen, és essencial, hidrofòbic i actua com a donador de grups metil. Un dels seus trets distintius és que, juntament amb la cisteïna, conté sofre, i aquesta pot ser una de les raons perquè la seva restricció produeix una reprogramació metabòlica,

fet que desemboca en la disminució del dany i de l'estat oxidatiu; en altres paraules, la restricció de metionina redueix la quantitat de proteïnes oxidades, ja que el grup tiol que forma és molt susceptible a l'oxidació [74].

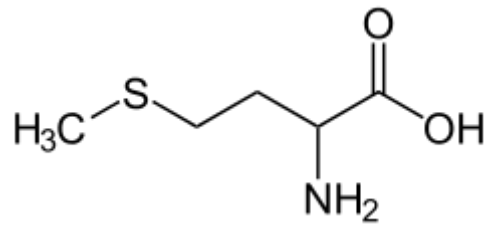


Figura 11. Fórmula molecular de la metionina [75].

D'altra banda, en el seu metabolisme hi conflueixen components com la S-adenosil-metionina, que també actua com a donador de grups metil, i l'homocisteïna. En relació amb això, se sap que l'increment d'homocisteïna en el plasma, induït per la metionina, pot portar a fenòmens com l'oxidació, l'aterosclerosi, el desenvolupament malalties degeneratives i, fins i tot, el càncer [76]–[78].

D'acord amb això, aquí intentarem determinar si una restricció de metionina serà capaç de rejuvenir els individus d'edat avançada, utilitzant com a organismes model rates Wistar adultes.

3. Actuació de les proteïnes de la via de senyalització de la mTOR

La mTOR (diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer) és un component de la via de supervivència cel·lular de la fosfatidíol-3-quinasa (PI3K), que controla la disponibilitat nutricional, els nivells energètics cel·lulars i part del metabolisme mitocondrial; per conseqüència, constitueix un important factor en processos que afecten el creixement i la proliferació cel·lulars [79]. Pot existir en dos complexos diferents: mTORC1 i mTORC2, els quals participen en el creixement cel·lular i la síntesi proteica [80]. Concretament, el mTORC1 participa sobretot en la síntesi proteica, l'autofàgia i en processos regulats pel metabolisme mitocondrial, com pot ser la biogènesi mitocondrial o l'adipogènesi. D'altra banda, el mTORC2 regula processos com el transport d'ions o la funció del citoesquelet, que promouen la supervivència cel·lular.

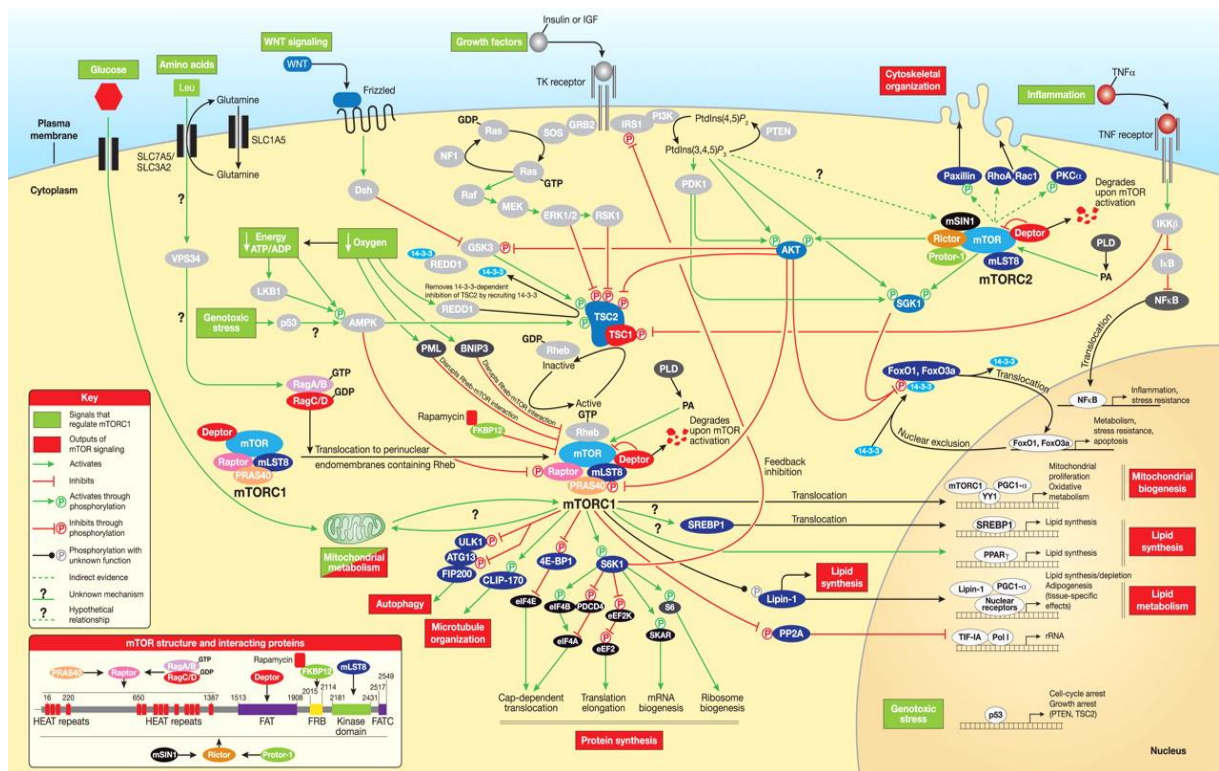


Figura 12. Esquema de la via de senyalització de la mTOR. S'hi pot observar la gran complexitat d'aquesta via metabòlica, que intervé en una infinitat de processos cel·lulars, com la síntesi proteica o l'autofàgia [81].

Curiosament, només el mTORC1 respon als canvis nutricionals, i, de fet, es regula positivament mitjançant aminoàcids [82]. D'acord amb això, en un treball com aquest, que avalua els canvis de mTOR durant una restricció de metionina, només ens interessa estudiar les funcions del mTORC1.

3.1. Estructura del complex mTORC1

Com s'ha explicat prèviament, mTORC1 és un dels dos complexos de mTOR, i està constituït per una sèrie de proteïnes, i les principals són: la mTOR, que és la subunitat catalítica del complex; la Raptor (proteïna associada a la regulació de mTOR), DEPTOR (proteïna interactuant amb mTOR que conté el domini DEP) i PRAS40 (substrat d'AKT ric en prolina de 40kDa).

En aquest cas, mTOR desenvoluparia la seva funció mitjançant la fosforilació de diverses proteïnes, que s'explicaran posteriorment, com 4EBP1 i S6K1. PRAS40 i DEPTOR actuen com uns reguladors negatius de mTORC1 [83]–[85], impeding, per exemple, el reclutament de substrats que proporciona la Raptor [86]. A més, l'activació de mTORC1 comporta la fosforilació de PRAS40, fet que redueix la seva activitat i augmenta, per conseqüència, la del complex [83],[86].

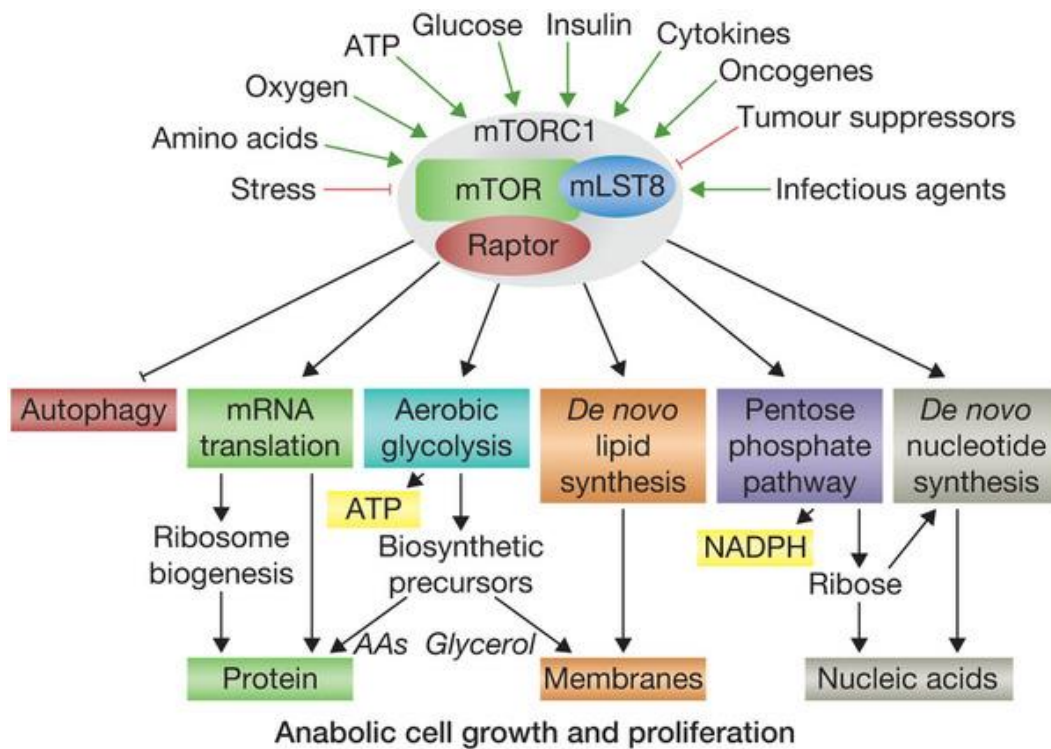


Figura 13. Complex mTORC1: precursors, estructura i funcions. Aquest esquema ens mostra les molècules i els processos que afecten el mTORC1, activant-lo o inactivant-lo, i l'estructura d'aquest, amb proteïnes com mTOR i Raptor, explicades a continuació. A més, s'hi pot distingir la gran quantitat de processos cel·lulars en què intervé, des de l'autofàgia fins a la síntesi de nucleòtids, que formen part de l'anabolisme, el creixement i la proliferació cel·lulars [87].

3.1.1.mTOR

La mTOR és una serina/treonina proteïna quinasa que regula l'homeòstasi cel·lular de l'organisme mitjançant la coordinació anabòlica i catabòlica dels processos relacionats amb els nutrients, l'energia, la disponibilitat d'oxigen i la senyalització del factor de creixement [12].

Quan el complex mTORC1 s'activa, mTOR fosforila la proteïna PRAS 40, cosa que debilita la seva associació amb el complex i promou l'activitat de la quinasa del complex [84],[85],[88]. A més, fosforila 4EBP1 i S6K1, fet que incentiva la síntesi proteica [12].

D'altra banda, mTOR participa en l'autofàgia mitjançant la fosforilació de ATG13, ULK1 i ULK2, fet que les inhibeix i impedeix l'associació de les dues darreres amb FIP200 i, per conseqüència, regula a la baixa els processos d'autofàgia [89].

3.1.2.RAPTOR

La RAPTOR està involucrada en el control de l'activitat del mTORC1. Funciona com una "bastida" pel reclutament de substrats del mTORC1, com S6K1 i 4EBP1, interactua amb elles i facilita la seva unió i la seva posterior fosforilació [90]. La seva forma fosforilada, causada per AMPK, no és capaç de realitzar aquesta funció, s'inhibeix de forma al·lostèrica, s'uneix a una proteïna 14-3-3 i inhibeix el complex mTORC1 [91].

3.1.3.FKBP12

La FKBP12 (proteïna d'unió 12 a FK506) és una proteïna reguladora de mTOR que s'uneix a fàrmacs immunosupressius com FK506 o la rapamicina i és un inhibidor directe de mTOR, és a dir, interactua directament amb mTOR i li impedeix realitzar la seva funció, encara que també es creu que pot inhibir la formació del complex mTOR-RAPTOR, que constitueix el complex mTORC1, i, per conseqüència, pot dificultar la interacció entre mTOR i S6K1 i 4EBP1 [92].

Recentment s'ha descobert que la inhibició o deleció de FKBP12 incentiva les interaccions de mTOR amb RAPTOR i altres proteïnes com S6K1 o 4EBP1, fet que impulsa processos com la traducció i la síntesi proteica. A més, també incrementa la fosforilació de mTOR [93].

3.2.Síntesi proteica

El mTORC1, a nivell general, controla positivament la síntesi proteica mitjançant la fosforilació de 4EBP1 i de S6K1. La fosforilació de 4EBP1 impedeix la seva unió a eIF4E, el que promou la traducció i la biogènesi de RNAm [94]. A més, l'estimulació de l'activitat de S6K1 pel mTORC1 també condueix a un increment de la biogènesi de RNAm, la traducció, la biogènesi ribosomal i

l'elongació, a través de la inhibició per fosforilació de eEF2K, cosa que activa eEF2, i a través de l'activació d'altres proteïnes [95].

3.2.1.4EBP1

La 4EBP1 (proteïna 1 d'unió al factor eucariòtic d'inici de la traducció 4E) està involucrada, com el seu propi nom indica, en la traducció proteica i, per tant, en la síntesi de proteïnes. Aquesta proteïna té la capacitat d'inhibir el complex eIF4F mitjançant una inhibició competitiva, que manté amb les proteïnes eIF4G, per unir-se a eIF4E, fet que n'impedeix la traducció [96],[97]. D'altra banda, la fosforilació d'aquesta proteïna, gràcies al mTORC1, regula a la baixa la síntesi proteica, atès que bloqueja la seva capacitat inhibidora [97],[98], i promou la progressió del creixement i el cicle cel·lulars.

3.2.2.S6K1

La S6K1 (proteïna quinasa S6) és un dels substrats de la senyalització de mTOR i, concretament, del complex mTORC1. La fosforilació d'aquesta proteïna mitjançant el complex mTORC1 regula a l'alça la síntesi proteica i promou la biogènesi de RNAm i la progressió i el cicle cel·lulars [12],[95]. De fet, la seva forma fosforilada interactua amb eEF2K, inhibint-la, fet que permet l'activació de eEF2 i la consegüent millora de la síntesi proteica [99]. A més, augmenta la lipogènesi mitjançant la regulació de SREBP [100].

3.2.3.eEF2

El eEF2 (factor d'elongació 2) és una proteïna que participa en la síntesi proteica segons el seu estat de fosforilació. La proteïna quinasa eEF2 (eEF2K) fosforila eEF2 i, així, inhibeix la seva funció i perjudica la síntesi proteica (revisat en [101]).

D'altra banda, també hem de tenir en compte que la proteïna S6K1 inactiva la eEF2K per fosforilació i, per conseqüència, podem considerar la S6K1 com un activador indirecte de eEF2, i, per tant, de la síntesi de proteïnes [99].

3.3.Autofàgia

L'autofàgia, que és el reclutament de compostos intracel·lulars a autofagosomes i la seva degradació pels lisosomes, és un procés catabòlic clau per la degradació d'òrgans i el reemplaçament de les proteïnes. En condicions de poca disponibilitat de nutrients, l'autofàgia permet continuar realitzant processos anabòlics com la síntesi proteica i la producció d'energia [102]. S'ha demostrat que la inhibició de mTOR incrementa l'autofàgia, i la seva activació fa el contrari [103].

3.3.1.ATG13

La ATG13 (proteïna 13 relacionada amb l'autofàgia) és una proteïna requerida per la formació de l'autofagosoma i la mitofàgia, que són processos clau en el rejuveniment i unes de les conseqüències principals d'una restricció dietètica, en la qual la disponibilitat nutricional es redueix i l'autofàgia permet suplir aquestes deficiències [103]. De fet, la mTOR inhibeix la ATG13 per fosforilació, això explica el fet que la senyalització reduïda de la mTOR, durant una restricció de metionina, afavoreix l'activitat d'aquesta família de proteïnes i la conseqüent millora de l'autofàgia [104],[105].

La ATG13 s'uneix a les proteïnes ULK, fet que facilita la fosforilació de FIP200 per aquestes proteïnes i, per conseqüència, incentiva la formació de l'autofagosoma i millora l'autofàgia [89].

3.3.2.LC3B

La LC3B (proteïna associada a microtúbuls 1 de cadena lleugera 3B) és una proteïna involucrada en la síntesi de fibronectina i també es considera un marcador de l'autofàgia. Curiosament, se sap que el seu nombre és correlaciona directament amb el nombre d'autofagosomes d'una cèl·lula i s'utilitza per avaluar el nivell d'autofàgia [106]. A més, Akt es considera un dels seus inhibidors, i es coneix que la inhibició d'aquesta proteïna per fosforilació, durant un procés de depravació, per exemple, augmenta la quantitat de LC3B [107].

3.3.3.p62

La p62, també anomenada Nup62 (glicoproteïna p62 del porus nuclear), és una proteïna essencial del complex del porus nuclear. Aquesta proteïna és un regulador clau de la senyalització de nutrients en la via de la mTOR, concretament en el complex mTORC1, ja que no participa en el mTORC2. La participació de p62 en aquest complex es realitza mitjançant la interacció, d'una manera dependent dels aminoàcids, amb Raptor i mTOR, activant així el complex [108]. En relació amb això, uns estudi paral·lels van demostrar l'existència d'una interacció directa entre p62 i LC3 per coordinar l'autofàgia [109], [110]. De fet, ambdues proteïnes constitueixen bons marcadors per avaluar l'autofàgia, ja que la primera és degradada durant el procés, i la segona no [109],[110].

A més, s'ha descobert que aquesta proteïna incentiva l'autofàgia durant una restricció nutricional a través de la inhibició del mTORC1, i que, curiosament, la seva deleció augmenta la quantitat de LC3B, és a dir, impulsa la formació d'autofagosomes [108].

3.3.4.Ubiquitina

La ubiquitina és una proteïna involucrada en la degradació proteica, però també s'ha descobert que juga un paper important en processos com l'endocitosi o la reparació del DNA [111]. A més, se sap que participa en l'autofàgia selectiva mitjançant el seu procés d'ubiquitinació, és a dir, té la capacitat de "marcar" les molècules que puguin influir en el control de l'homeòstasi i, posteriorment, es degraden autofàgicament mitjançant un mecanisme força complex que involucra p62 i LC3B, però

de forma paral·lela [109],[112]. En cas que esdevingui deficient, es podrien produir malalties com el càncer o la neurodegeneració [113].

Aquest sistema d'autofàgia selectiva i l'activitat del proteasoma, un sistema de degradació proteica, han estat revisats per Shaid i col·legues [114].

3.4. Biogènesi i metabolisme mitocondrials

El metabolisme i la biogènesi mitocondrials es regulen pel mTORC1, a través de l'activitat transcripcional de PGC-1 α , un cofactor nuclear que participa en la biogènesi mitocondrial i el metabolisme oxidatiu mitjançant l'alteració de la seva interacció física amb un altre factor de transcripció, el yin-yang 1 (YY1) [115]. A més, la inhibició d'aquest complex, per la rapamicina, disminueix el potencial de membrana mitocondrial, el consum d'oxigen i els nivells d'ATP cel·lulars, cosa que desemboca en un increment de la biogènesi mitocondrial i l'autofàgia [116]. Recentment, s'ha descobert que la deleció de RAPTOR en el múscul esquelètic redueix l'expressió dels gens involucrats en la biogènesi mitocondrial [117].

3.5. La resposta de mTORC1 davant aminoàcids

S'ha vist que els aminoàcids regulen positivament el mTORC1 [82]. La leucina, per exemple, és un aminoàcid essencial que es requereix per l'activació del complex [118]. Es va descobrir que les proteïnes Rag, una família de quatre petites GTPases, interactuen amb el mTORC1 i són necessàries per la seva activació mitjançant aminoàcids [119],[120]. En presència d'aminoàcids, aquestes proteïnes s'uneixen a RAPTOR i promouen una relocalització de mTORC1 a una zona que conté el seu activador Rheb [120]. La dissociació física de mTORC1 i Rheb amb la deprivació d'aminoàcids podria explicar perquè els activadors de Rheb, com els factors de creixement, no poden estimular la senyalització de mTORC1 en absència d'aminoàcids.

Així, el nostre objectiu serà identificar totes aquestes dianes de mTOR i els seus possibles canvis davant d'una restricció de metionina, avaluant, a nivell hepàtic, la quantitat d'aquestes i, per tant, determinar com canviaria el complex.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

4.Hipòtesis i objectius

Ja se sap que una restricció de metionina té la capacitat de retardar l'envelliment i l'aparició de les malalties relacionades amb l'edat, però encara s'està estudiant la possibilitat que aquesta restricció dietètica revertís els efectes de l'envelliment i retornés la joventut a l'individu. D'acord amb això, definim les nostres hipòtesis i els objectius:

El nostre objectiu principal és determinar si una restricció de metionina pot revertir el procés d'envelliment i retornar la joventut a l'individu restringit. Per aconseguir-ho estudiarem algunes de les funcions cel·lulars de la via de la proteïna mTOR a nivell hepàtic de rates Wistar mascles. En aquest sentit, creiem que s'observaran diferències degut a la restricció de metionina en l'àmbit de la síntesi proteica, l'autofàgia i les proteïnes del complex mTORC1.

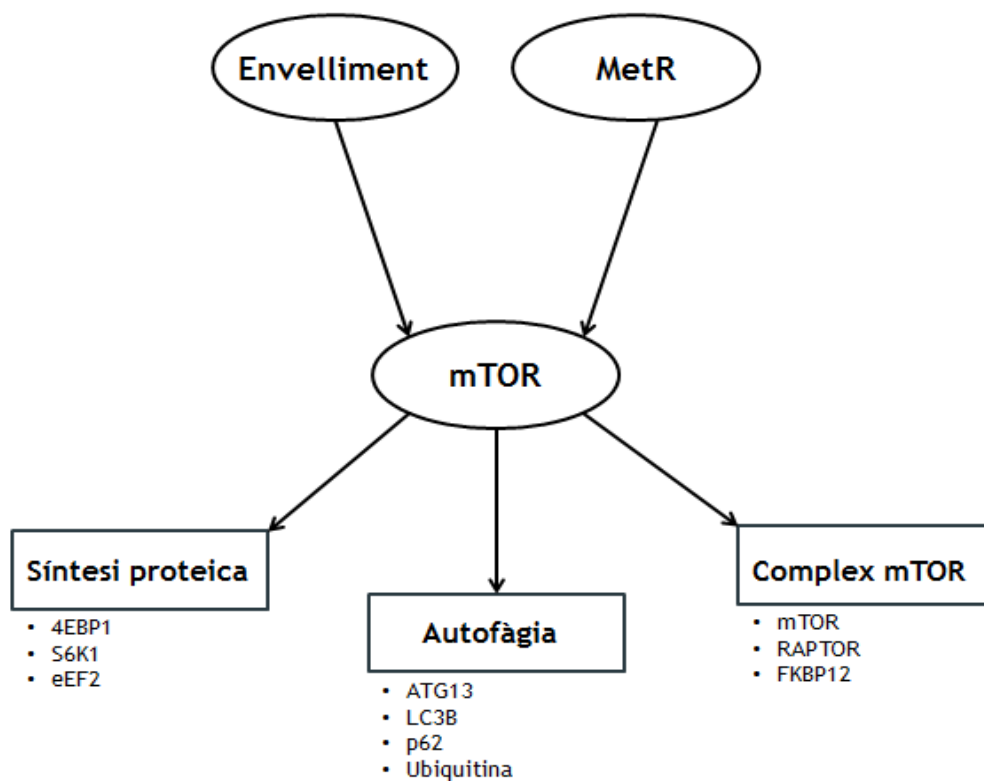


Figura 14. Esquema senzill dels processos en què intervé la via de senyalització de la mTOR. L'envelliment i la restricció de metionina són dos factors que condicionen l'acció d'aquesta via en processos cel·lulars com la síntesi proteica i l'autofàgia. En la síntesi proteica intervenen 4EBP1, S6K1 i eEF2. En l'autofàgia intervenen ATG13, LC3B, p62 i la ubiquitina. En el control del complex intervenen mTOR, RAPTOR i FKBP12. Totes aquestes proteïnes esmentades anteriorment s'estudiaran en la investigació.

MATERIALS I MÈTODES

5. Materials i mètodes

5.1. Anticossos i reactius

5.1.1. Reactius

El TEMED (T9281), el colorant *coomassie* en pols (G1041), el β -Mercaptoetanol (M6250), la BSA i el blau de bromofenol en pols (B0126) van ser proporcionats per Sigma-Aldrich. El *running buffer* (LA0041) i el *transfer buffer* (NP0006) es van obtenir d'Invitrogen. El luminol i la HRP (WBKLS0500) eren de Millipore. El reactiu de Bradford (#5000006) era de Bio-Rad. L'acrilamida/Bis 30% (NBS-2100-10) va ser proporcionada per nbs biologicals.

5.1.2. Anticossos

Taula 1. Anticossos primaris i secundaris utilitzats.

Tipus d'anticossos	Anticossos	Casa Comercial	Número de referència	Nivell de dilució
Anticossos primaris	p70 S6 Kinase Antibody	Cell signaling	9202	1:1.000
	LC3B Antibody	Cell signaling	2775	1:1.000
	mTOR Antibody	Cell signaling	2972	1:1.000
	Raptor (24C12) Rabbit Antibody	Cell signaling	2280	1:1.000
	Atg 13 (D4P1K)	Cell signaling	13273	1:1.000
	SQSTM1/p62 Antibody	Cell signaling	5114	1:1.000
	Anti-EEF2 antibody [EP880Y]	ABCAM	ab75748	1:10.000-1:50.000
	Anti-eIF4EBP1 antibody [Y329]	ABCAM	ab32024	1:5.000-1:10.000
	Anti-FKBP12 antibody	ABCAM	ab2918	1:1.000
	Anti-Ubiquitin antibody	SIGMA	U5379	1:100
Anticossos secundaris	Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody	Pierce	31460	1:5.000-1:200.000

5.2. Animals utilitzats

En aquest treball experimental s'han utilitzat un total de 30 rates Wistar mascles, provinents de Iffa-Creddo (Lyon, França). Es van dividir en tres grups: les rates adultes o joves, les velles i les velles que han sofert una restricció de metionina. L'experiment es va iniciar quan les rates joves tenien 8 mesos d'edat i un pes corporal de $468,9 \pm 37,8$ g, i van constituir un dels grups control. D'altra banda, amb les altres 20 rates es van fer dos grups més, les velles de 26 mesos d'edat amb un pes corporal de $595,4 \pm 69,9$ g, un altre grup control, i les velles que han estat restringides en metionina. Totes les rates s'han engabiat individualment i s'han mantingut a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ i a una humitat relativa del $50 \pm 10\%$. A més, també se'ls ha aplicat un cicle de llum:fosc de 12:12 hores durant el primer mes d'adaptació i el posterior període experimental de restricció de metionina.

5.3. Dietes

Per avaluar l'efecte d'una restricció de metionina, s'han aplicat, òbviament, unes dietes, dos de fet, que han estat elaborades en el propi laboratori i d'acord amb els criteris de la dieta AIN 93, de l'Institut de Nutrició dels Estats Units d'Amèrica [121], però amb petites variacions en les quantitats d'aminoàcids. Per més informació, consultar la taula 2.

Els animals control han estat alimentats amb la dieta esmentada anteriorment i els animals restringits amb la mateixa, però variant la quantitat de metionina (que era del 0,86% en els animals control). Cal destacar que es va reduir un 80% el contingut en L-metionina de la dieta control i es va augmentar el consum d'altres components en proporció directa a la seva abundància en la dieta. No hem d'oblidar que treballem amb variacions molt petites de metionina, per conseqüència, podem considerar que l'alimentació era pràcticament idèntica en els tres grups. La ingesta s'ha controlat diàriament.

Aquesta intervenció ha durat 7 setmanes, ja que s'ha descobert que aquest període de temps és suficient per observar canvis fisiològics, com per exemple la reducció de la producció de radicals lliures i la disminució o l'increment de l'expressió de proteïnes relacionades amb l'envelliment i el metabolisme. Després, els animals es van sacrificar per dislocació cervical i es va recollir la sang per mitjà de tubs heparinitzats per a la posterior obtenció de plasma, el qual s'ha emmagatzemat a -20°C fins al seu ús. A continuació, es va extreure el fetge i es va congelar i emmagatzemar en nitrogen líquid a -80°C fins a la seva anàlisi.

Taula 2. Dieta dels animals experimentals.

Components (g/100g)	Dieta Control	Dieta RMet 80%
L-Arginina	1,12	1,13
L-Lisina	1,44	1,45
L-Histidina	0,33	0,33
L-Leucina	1,11	1,12
L-Isoleucina	0,82	0,83
L-Valina	0,82	0,83
L-Treonina	0,82	0,83
L-Triptòfan	0,18	0,18
L-Metionina	0,86	0,17
L-Àcid Glutàmic	2,70	2,72
L-Fenilalanina	1,16	1,17
L-Glicina	2,33	2,35
Dextrina	5,00	5,04
Midó de blat de moro	43,61	43,91
Sacarosa	20,00	20,14
Cel·lulosa	5,00	5,04
Bitartrat de colina	0,20	0,20
AIN 93 Vitamina MIX	1,00	1,01
AIN 93 Mineral MIX	3,50	3,52
Oli de blat de moro	8,00	8,06

5.4. Processament previ de la mostra

5.4.1. Homogeneïtzació dels teixits

En aquest pas s'han utilitzat entre 50-150 mg de teixit en una solució tampó. Aquesta solució conté 180 mM de clorur de potassi, 5 mM de MOPS (de l'anglès, *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*), 2 mM de EDTA (de l'anglès, *ethylenediamine-tetraacetic acid*), 1 mM de DTPAC (de l'anglès, *dethyltriamine-penta 41olori acid*) i 1 µM de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), ajustat a un pH 7,4. La presència de BHT, igual que d'altres components, és imprescindible per tal d'evitar els quelants de metalls i l'oxidació, dels lípids per exemple, durant el processament de la mostra. Per a la tècnica de la immunodetecció per Western Blot s'ha afegit una mescla comercial d'inhibidors de proteases (#80-6501-23 Amersham Biosciences, Madrid, Espanya) i de fosfatases (ortovanadat de sodi 1 mM i fluorur de sodi 1 mM). L'homogeneïtzació s'ha realitzat amb un Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemanya). A continuació, la mostra s'ha centrifugat a 750 x g a 4°C durant 1 min amb l'objectiu d'eliminar les restes tissulars que hi poden haver. Els sobrenedants obtinguts són els que s'han emprat en els diferents experiments, després de la quantificació i la igualació de proteïnes.

5.4.2. Quantificació de proteïnes

La quantificació de proteïnes va ser clau en la investigació, i es va realitzar mitjançant el mètode de Bradford, que és una tècnica de quantificació utilitzada per determinar la quantitat de proteïnes en una solució determinada.

Aquest mètode està basat en el canvi de color del colorant *coomassie brillante blue* G-250 segons la variació de la concentració proteica d'una solució. El colorant existeix en tres formes: catió (vermell), neutral (verd) i anió (blau). En condicions àcides, es troba en color vermell a causa de l'excés de protons i, quan s'uneix a proteïnes, es converteix en blau a causa de la pèrdua d'aquests. D'acord amb això, podem deduir que com més proteïnes hi ha en una solució, més blava es tornaria si s'afegeix aquest colorant.

La concentració proteica de les mostres s'ha estudiat per la interpolació de les dades obtingudes a partir d'una recta patró realitzada amb concentracions conegudes de BSA (albúmina del sèrum boví), que es troben en la taula 3.

Taula 3. Concentracions de BSA utilitzades en la prova de Bradford.

Volum de BSA (μL)	Volum d'aigua (μL)
0	160
2	158
6	154
14	146
20	140
40	120

A les solucions patró de BSA, així com a les mostres, s'han afegit 40 μL del reactiu de Bradford (Protein Assay #500-0006 Bio-Rad, Munich, Alemanya) i s'ha esperat 10 minuts perquè la reacció es pogués produir correctament. Posteriorment, s'ha analitzat l'absorbància de cada mostra per espectrofotometria mitjançant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem), a una longitud d'ona de 595 nm. De fet, vam fer tres rèpliques de cada quantitat.



Figura 15. Kit de Bradford de Bio-Rad.

5.5. Immunodetecció per Western Blot

Per avaluar les proteïnes involucrades en l'envelliment i el metabolisme s'ha utilitzat una tècnica analítica anomenada Western Blot.

Aquesta tècnica es realitza seguint els passos següents:

5.5.1. Preparació dels gels

Un pas imprescindible per realitzar l'electroforesi era la creació dels gels, l'empilador i el separador. El primer permet que les proteïnes s'agrupin i el segon que se separin segons el seu pes molecular, tot això durant l'electroforesi. El gruix del vidre era d'1mm.

El gel separador

La quantitat necessària dels reactius per preparar aquest gel es mostra en la taula següent:

Taula 4. Quantitat necessària dels reactius per preparar el gel separador.

Sols. STOCK	7,5% 10mL	10% 10mL	15% 10mL
Acrilamida/Bis 30% (mL)	2,5	3,34	5
Tris 1.5M pH8.9 (mL)	2,5	2,50	2,5
SDS 10% (µL)	100	100	100
PA 10% (µL)	80	80	80
H ₂ O (mL)	4,8	3,96	2,30
TEMED (µL)	7,5	7,5	7,5

En primer lloc, s'agafen els vidres i es netegen amb etanol, sobretot per la part que estarà en contacte amb el gel. A continuació, es realitza el muntatge amb les pinces i la subjecció correcta, i es comprova si s'ha fet correctament abocant-hi aigua destil·lada per veure si surt per sota. Si tot està correcte, s'aboca l'aigua a l'aixeta i s'asseca amb paper de filtre fins que quedi ben sec.

Es realitza la preparació del gel en un Falcon seguint l'ordre següent: primerament s'afegeix l'aigua, l'acrilamida (Acrilamida/Bis 30%), que és un sòlid que experimenta, en una dissolució aquosa, una autopolimerització espontània i lenta, que s'accelera en presència de radicals lliures; el Tris (1,5M), que és una barreja de diferents sals que actua com a tampó perquè no reacciona amb la majoria de

proteïnes; i el SDS, que és un detergent que serveix per desnaturalitzar les proteïnes en polipèptids individuals perquè totes les proteïnes presents tinguin una densitat de càrrega uniforme. Finalment s'aboquen el PA, que genera radicals lliures i que, per tant, permet iniciar la polimerització del gel, i el TEMED, que és una diamina de forma molecular $C_6H_{12}N_2$ que també incentiva la polimerització, amb rapidesa però amb cura, ja que la reacció comença tot just quan aquests dos reactius s'han afegit. S'ha de barrejar suaument per evitar la formació de bombolles. A continuació, amb una pipeta, s'afegeix la barreja entre els dos vidres fins arribar a la línia verda. Es poden afegir 40 μ L d'isopropanol perquè polimeritzi més ràpidament i que quedi "recte" i polit. Finalment, després de la polimerització del gel, s'aboca l'isopropanol a l'aixeta, es renta amb aigua i s'asseca amb un paper de filtre.

Els gels al 7,5% van ser utilitzats per estudiar les proteïnes RAPTOR i mTOR, a causa del seu elevat pes molecular, perquè, durant l'electroforesi, les proteïnes "corren" més ràpidament i podrem diferenciar millor les bandes de pes molecular major (150kDa, per exemple). D'altra banda, els gels al 15% tenen les propietats contràries, i per això vam emprar-lo per estudiar proteïnes com FKBP12 i LC3B, de pes molecular baix. Finalment, els gel del 10% els vam utilitzar en proteïnes com p62 i ATG13.

El gel empilador

La quantitat necessària dels reactius per preparar aquest gel es mostra en la taula següent:

Taula 5. Quantitat necessària dels reactius per preparar el gel empilador.

Sols. STOCK	5% 6mL
Acrilamida/Bis. 30% (mL)	1
Tris 0.5M pH 6,5 (mL)	1,50
SDS 10% (μ L)	60
PA 10% (μ L)	40
H ₂ O (mL)	3,4
TEMED (μ L)	7,5

La preparació del gel empilador és molt similar, fins i tot idèntica que la del separador, l'únic que canvia és la quantitat de reactius, el Tris utilitzat és 0,5M, i la zona on es col·loca perquè polimeritzi també és diferent. D'acord amb l'afirmació anterior, s'ha de destacar que s'introdueix entre els vidres amb la pipeta fins dalt de tot i, seguidament, es col·loquen els pintes respectius (d'1mm) abans que solidifiqui.

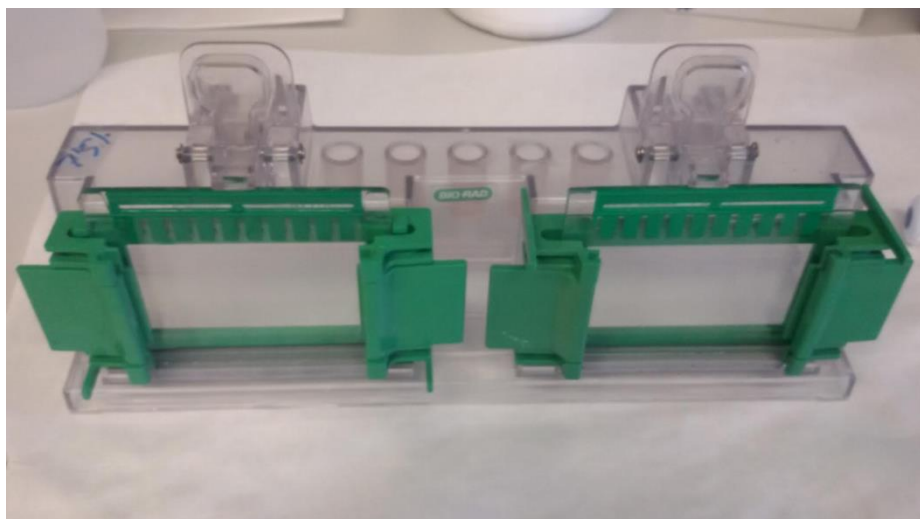


Figura 16. Procés de polimerització dels gels

5.5.2.Preparació de la mostra

D'acord amb els resultats de la quantificació proteica, s'han utilitzat concentracions de $80\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteïna, i s'han normalitzat amb la solució Tris (hidroximetil) aminometà-àcid clorhídric (TRIS-HCl) $62,5\text{ mM}$ pH 6,8, SDS (de l'anglès, *sodium dodecyl sulfate*) al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2- β -mercaptoetanol al 20% (v/v) i Blau de Bromofenol 0,02% (p/v). Posteriorment, s'ha realitzat la desnaturalització proteica mitjançant l'escalfament a 95°C durant 3 minuts en un bany sec (l'embloc Selecta, Barcelona, Espanya). A més, també s'ha de fer un *spin* de les mostres fins a 13.000 rpm abans de carregar-les al gel.

5.5.3.Electroforesi

Aquest pas va permetre separar les proteïnes segons el seu pes molecular, presents en les mostres carregades.

Es realitza el muntatge de la cubeta d'electroforesi (Figura 17) afegint *running buffer* 1x, que permet la corrent elèctrica, a l'espai delimitat entre els dos gels i a la cubeta. És imprescindible que tot quedi ben cobert fins a dalt de *running buffer* també per fora de l'espai. Llavors, es retiren les pintes amb molta cura per evitar fer malbé el gel (trençar els pouets) i es carreguen les mostres ($20\mu\text{L}$) i el *marker* ($5\mu\text{L}$) (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards).

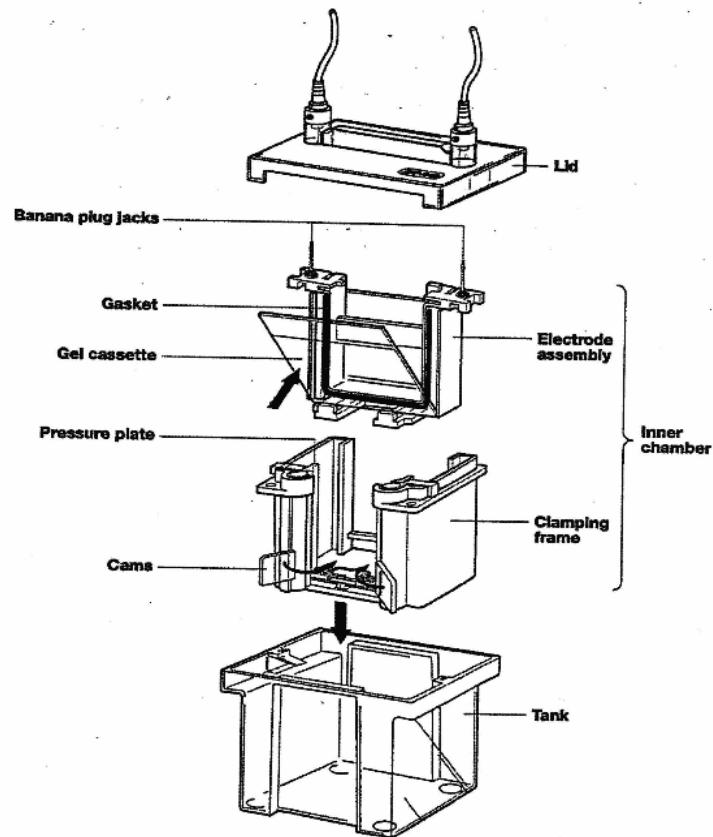


Figura 17. Esquema de muntatge de la cubeta de l'electroforesi [122].

Després de carregar les mostres, s'ha de córrer el gel amb un amperatge (A) constant de 15 mA/gel durant 1h. En el moment en què ja ha passat pel gel empilador, podem pujar l'amperatge fins a 20 mA/gel. En cas de proteïnes d'elevat pes molecular, com mTOR, es pot allargar fins a 3 hores.



Figura 18. Muntatge de l'electroforesi. Hi apareixen la cubeta i la font, respectivament.

5.5.4. Electrotransferència

Aquest procés va permetre traslladar les proteïnes del gel a una membrana, amb la qual treballarem en els passos posteriors.

Abans de començar aquest pas, és necessari preparar el *transfer buffer* (200mL metanol, 100mL Transfer, 700mL H₂O) i, per cada gel, 2 esponges i 2 cartrons.



Figura 19. Material necessari per l'electrotransferència. Extret de Bio-Rad.

En primer lloc, cal marcar les membranes d'una forma que entenguem quins anticossos hi haurem d'aplicar en processos posteriors. A continuació, s'haurà d'hidratar la membrana, que consisteix a incubar-la en metanol reciclat durant 1 minut en agitació en una caixa, i incubar-la en *transfer buffer* durant 10 minuts més en agitació.

Després, en una safata que conté *transfer buffer* es prepara, per a cada gel, 2 esponges i 2 cartrons. Es separen els vidres que comprimeixen el gel fent palanca amb una espàtula i es talla el gel empilador i les ondulacions, que puguin molestar durant la transferència, també amb aquesta.

Per muntar el *sandwich* és molt important fer-ho d'acord amb el següent ordre per tal d'assegurar la migració proteica des del càtode (-) a l'ànode (+):

Del càtode a l'ànode: esponja-cartró-gel-membrana-cartró-esponja.

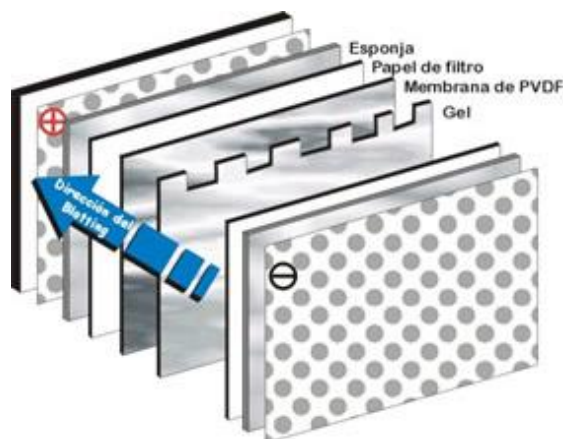


Figura 20. Muntatge per a dur a terme l'electrotransferència (ordre del *sandwich*) [123].

També s'ha d'utilitzar el corró, suaument, per adherir i aplanar bé el gel, la membrana i els dos cartrons.

Després del muntatge, s'agafa la cubeta i s'hi afegeix *transfer buffer* fins cobrir els elèctrodes, el *sandwich*, l'imant i el sistema de refrigeració (aigua destil·lada a -80°C). A continuació, es transfereix a voltatge (V) constant de 100V durant 2 hores en una campana (ja que el *transfer buffer* conté metanol) i sobre una font magnètica.



Figura 21. Electrotransferència en marxa.

5.5.5. Bloqueig de la membrana

Aquest procés permet omplir les zones de la membrana sense proteïna i, per conseqüència, es realitza perquè la membrana necessita unir-se a proteïnes de forma inespecífica. D'acord amb això, és imprescindible bloquejar els llocs d'unió que han quedat lliures després de la transferència. En cas contrari, l'anticòs (de naturalesa proteica) que s'utilitza per la detecció pot unir-se a un altre anticòs que ha ocupat un espai lliure de la membrana (sense unir-se a la proteïna), cosa que impediria la distinció entre el complex antígen-anticòs que es forma amb la proteïna que es busca. Això provocaria els anomenats falsos-positius.

S'ha realitzat el bloqueig de la membrana amb BSA (20ml/membrana) durant 1 hora. A continuació, s'han realitzat tres rentats amb TBST 0,1% (TRIS 2 M 10 ml pH 8, NaCl 2,5 M 50 ml i TWEEN 1 ml), durant 5 minuts en agitació. Per afegir el TWEEN en la preparació de TBST s'ha hagut de tallar la pipeta, ja que és molt viscos.

5.5.6. Immunodetecció

Les membranes, després del bloqueig, s'incuben amb l'anticòs primari, que correspon a la proteïna que es vol estudiar (veure la taula 1) diluït en 3 ml de TBST 0,1%/membrana, durant 2 hores o *overnight* en agitació, en un *roller*.

De fet, també es pot tallar la membrana amb un bisturí (Figura 22). Aquesta acció permet incubar les membranes resultants amb anticòsos primaris diferents i, òbviament, es realitza amb l'objectiu d'estudiar diverses proteïnes de pesos moleculars diferents.



Figura 22. Membrana tallada.

A continuació, es realitzen 3 rentats amb TBST 0,1% i, immediatament, s'incuben amb l'anticòs secundari durant 1 hora en agitació. La dilució de l'anticòs secundari varia d'acord amb la casa comercial i el tipus (veure la taula 1). Finalment, es realitzen 3 rentats més amb TBST 0,1 % (Figura 23).



Figura 23. Rentat de les membranes amb TBST 0,1 %.

L'anticòs secundari està conjugat amb peroxidasa, amb l'objectiu de poder reduir el substrat i donar lloc a un producte quimioluminiscent, que s'il·lumina amb luminol.

5.5.7.Revelat

Abans de tot, s'ha de preparar la solució de 750µl de luminol i de 750µl de HRP (de l'anglès, *Horseradish peroxidase*) en un falcon i dos papers transparents, on s'introduiran les membranes. S'ha de tenir en compte que les membranes han de situar-se de cara a la solució amb el luminol.

Passats uns 5 minuts, s'ha d'eliminar l'excés de líquid i es fa el *sandwich* amb els dos papers transparents, sempre tenint cura d'evitar la formació de bombolles.

Finalment, es determina la luminiscència amb l'equip ChemiDoc™ MP imaging System (BioRad, Munich, Alemanya) i s'analitza amb el programa Image Lab software v4.0 (Bio-Rad, Hèrcules, CA, EE.UU.). La quantitat de luminiscència és proporcional a la quantitat proteica.



Figura 24. Sistema ChemiDoc.

També s'han de congelar les membranes amb paper transparent.

5.5.8. Tinció de la membrana amb *coomassie*

Aquesta tinció permet obtenir, amb el sistema ChemiDoc, la quantitat total de proteïnes que hi ha en una membrana, cosa que és imprescindible per realitzar els càlculs posteriors. Aquesta quantificació es realitza amb el programa Image Lab, i s'aplica l'opció *colorimetric*, amb una exposició d'imatge de 5 segons.

Primerament, s'ha de sotmetre la membrana en Blau *Coomassie* durant 5 minuts en agitació. A continuació, es realitzen dos rentats de 10 segons amb decolorant manualment. Finalment, es realitza un últim rentat de 5 minuts amb aigua i es deixa assecar la membrana.

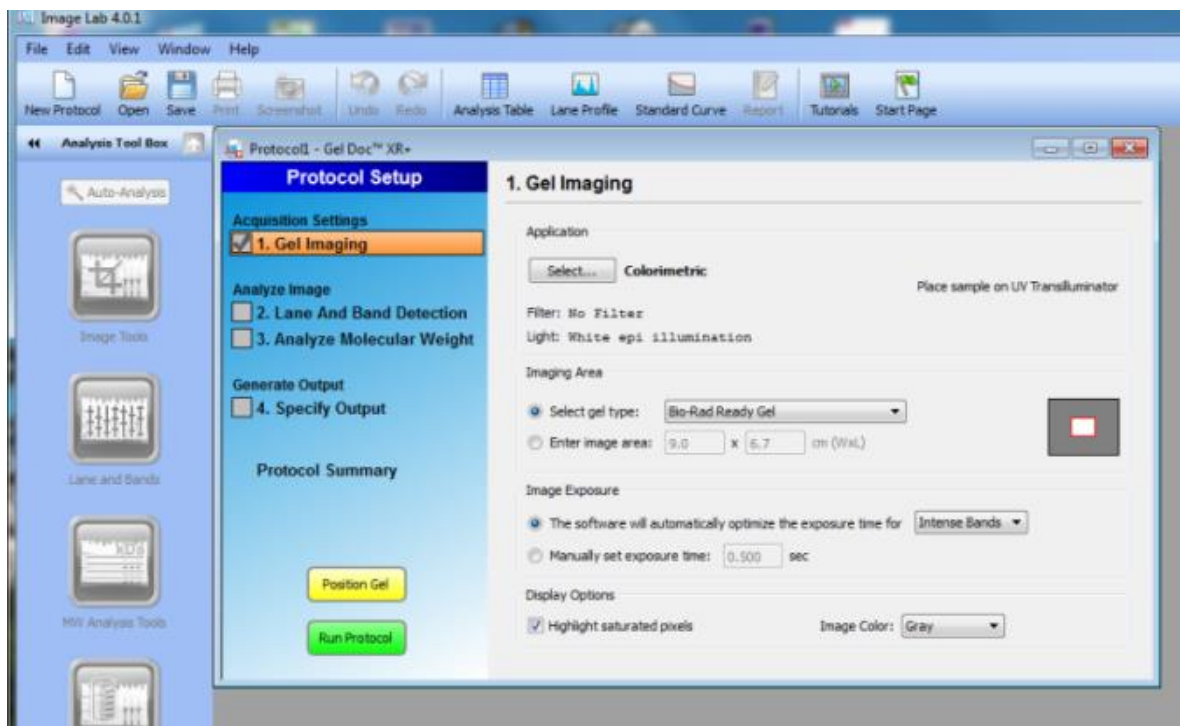


Figura 25. Programa Image Lab amb l'opció *colorimetric*.

5.5.9. Anàlisi de dades

Després d'haver realitzat els passos anteriors amb el ChemiDoc, procedim a la quantificació de les bandes de proteïna per un costat, i de la proteïna total per l'altre.

En el primer cas, retallarem la zona de la membrana que conté la proteïna d'interès (Figura 26) i, amb l'eina *Lanes and Bands* (Figura 27), definim primer, manualment, els 9 carrils (*Lanes*) i, un cop fet això, seleccionem les bandes (*Bands*). El programa ens donarà, automàticament, el càlcul del volum de cada una de les bandes en cada carril.

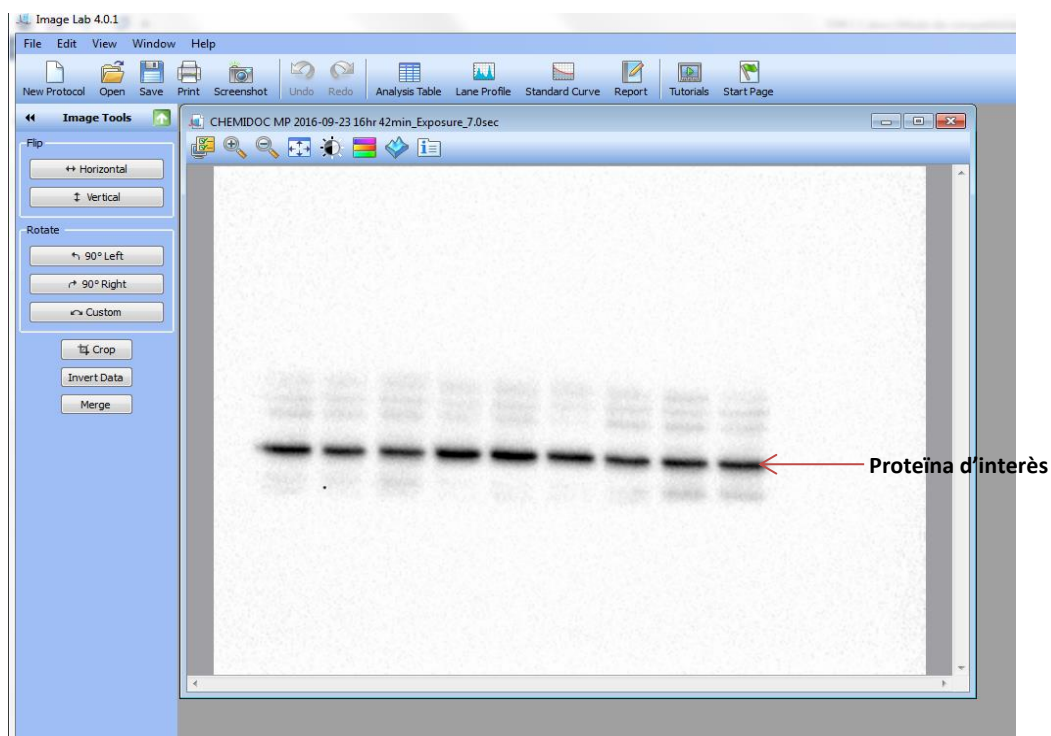


Figura 26. Membrana amb la banda de la proteïna d'interès.

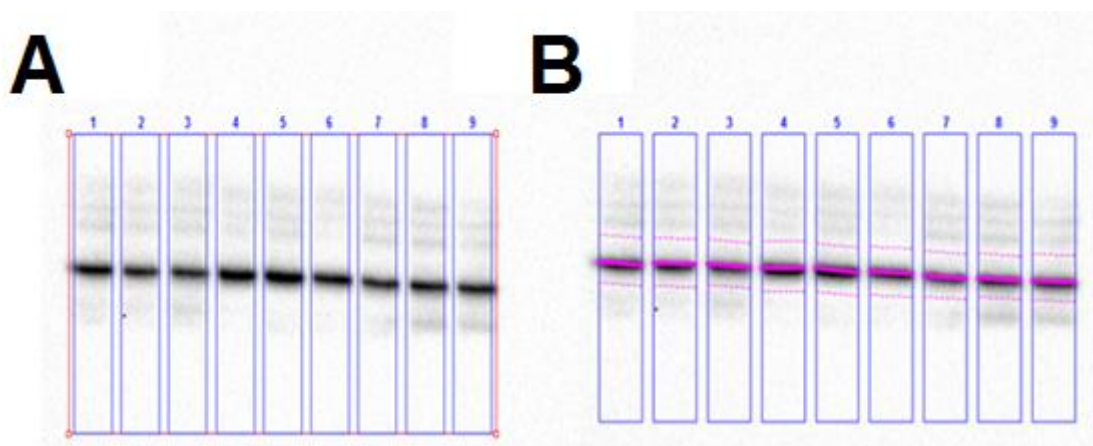


Figura 27. Eina *Lanes and Bands*. En la il·lustració A s'hi observen els carrils definits (*Lanes*) i en la B les bandes (*Bands*), que corresponen a la proteïna d'interès.

D'altra banda, per calcular la proteïna total utilitzarem la membrana tenyida amb *coomassie*. D'acord amb això, gràcies a l'eina *Volume tools* podrem seleccionar, manualment, l'àrea del carril, de manera que el programa ens calcularà la quantitat de proteïna carregada en cada carril.

Un cop hem obtingut totes aquestes dades, per poder comparar els valors de la proteïna d'interès entre individus, calcularem, per a cada carril, el ratio d'expressió de proteïna amb la següent fórmula:

$$\text{Expressió relativa} = \text{Expressió detectada} / \text{Proteïna total}$$

Aquest procés es repeteix fins que ens permeti obtenir un nombre n de valors per realitzar els corresponents tests estadístics.

Així, es calcula, per a cada grup experimental, la mitjana (M) de l'expressió relativa de la proteïna, la seva desviació estàndard (SD) i el seu error (SEM), segons les fórmules següents:

$$M = \frac{\sum x}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Figura 28. Fórmules matemàtiques emprades en la realització del test estadístic.

Per realitzar l'estadística i la seva representació gràfica s'ha utilitzat el programa GraphPad Prism 5.0.

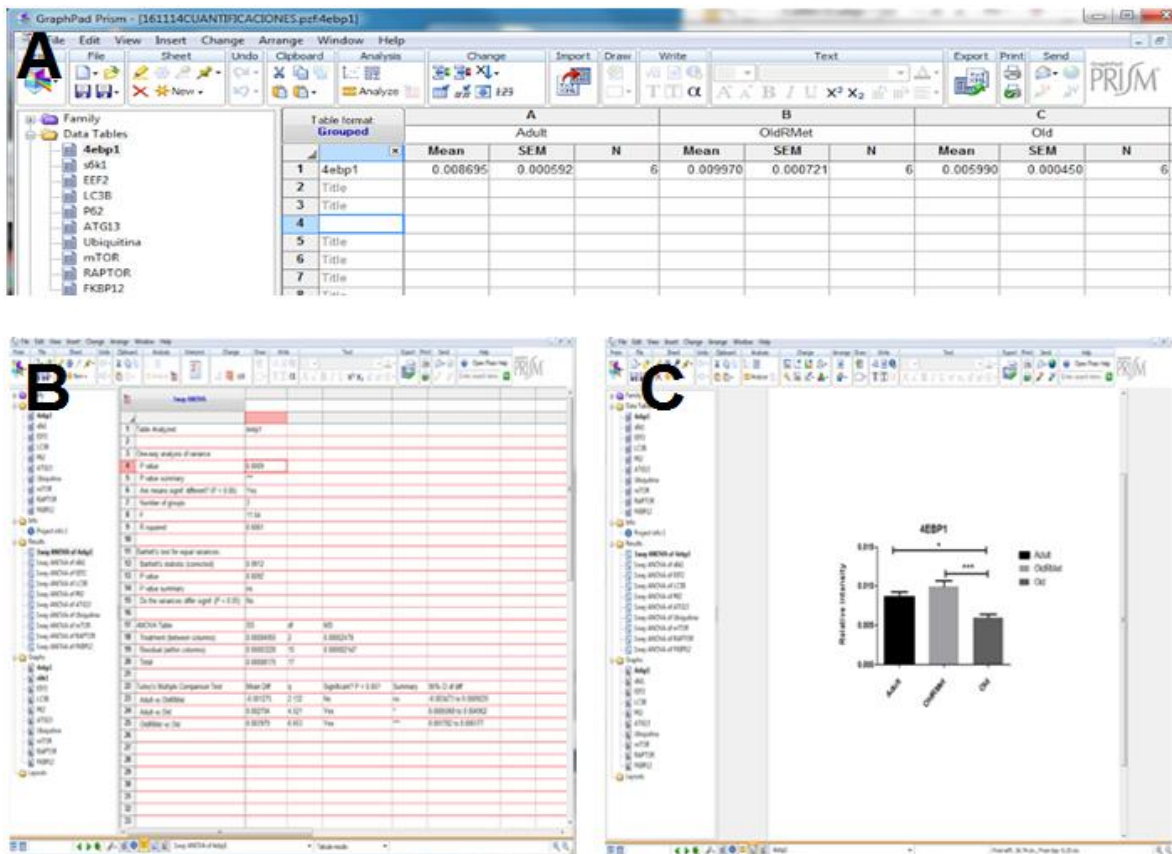


Figura 29. Representació dels processos software seguits per fer les representacions gràfiques i estadístiques amb el programa GraphPad Prism 5.0. Primerament, s'han recollit les dades obtingudes dels càlculs del document Excel (A). A continuació, el programa realitza unes operacions determinades i determina si les diferències obtingudes entre els diferents grups són significatives, d'acord amb el valor de P=0,05 (B). Finalment, s'obté la representació gràfica dels resultats, amb el seu error i les diferències significatives si s'escalen (C).

RESULTATS OBTINGUTS I DISCUSSIÓ

6. Resultats obtinguts i discussió

A continuació es mostren i s'analitzen els resultats obtinguts en quant a l'expressió proteica dels diferents grups experimentals. Per dur-ho a terme, organitzarem els resultats en tres grups:

- Complex mTORC1
- Síntesi proteica
- Autofàgia

6.1. Complex mTORC1

6.1.1. mTOR

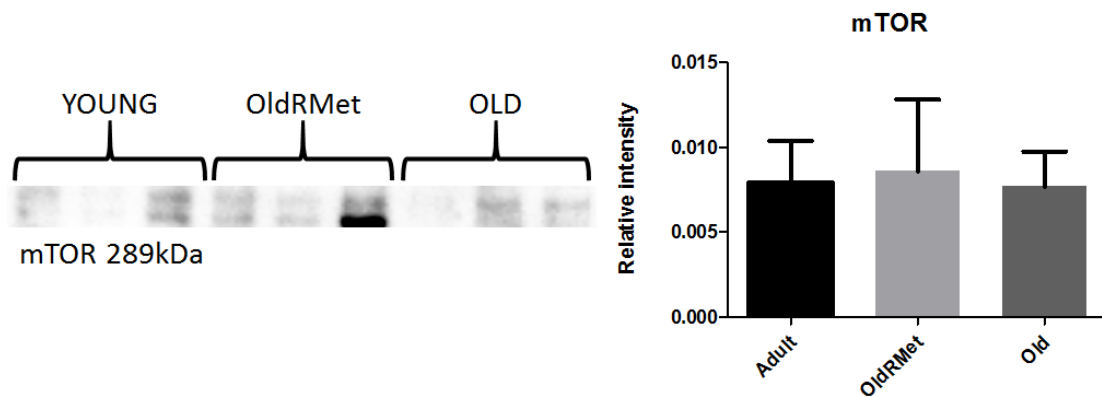


Figura 30. Quantificació de l'expressió proteica de mTOR obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

En la figura 30 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi de mTOR. Observant el gràfic, veiem un petit augment d'expressió en el grup de restricció, però amb un error entre mostres molt gran. Si ens fixem en el Western, podem observar que un dels individus presenta una sobreexpressió de mTOR, mentre que els altres dos ni tan sols tenen proteïna. Aquest fenomen justifica l'error tan gran que presenta aquest grup. A més, aquest fet també ha succeït en els altres dos grups, encara que en una intensitat menor, i, per tant, arribem a la conclusió que l'expressió d'aquesta proteïna podria estar lligada a cada individu de forma independent de l'edat o la dieta.

De fet, podríem predir que la intervenció nutricional ha incrementat l'expressió de mTOR; no obstant, per poder determinar l'estat de la funció del complex seria necessari comprovar l'expressió de la proteïna fosforilada en cadascun dels grups, perquè, normalment, aquesta actua en el seu estat fosforilat.

6.1.2.RAPTOR

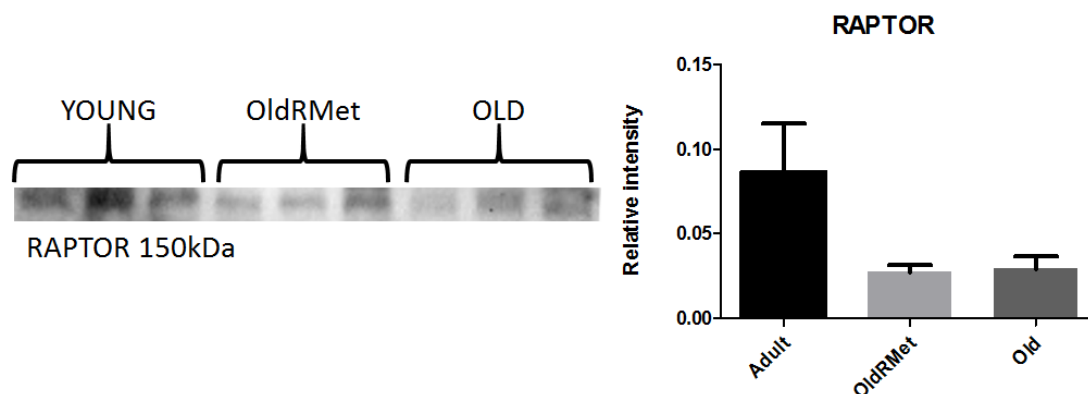


Figura 31. Quantificació de l'expressió proteica de RAPTOR obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de RAPTOR, representats en la figura 31, mostren una diferència considerable entre el grup adult i els altres dos, però no arriba a ser significativa a causa de l'error obtingut. D'acord amb això, podríem especular que la restricció de metionina ha aconseguit reduir l'expressió de RAPTOR i, així, també ha disminuït el reclutament de 4EBP1 i de S6K1 a mTOR, fet que, possiblement, ha desembocat en una reducció de la síntesi proteica en el grup de restricció respecte del grup vell, però per determinar-ho millor, seria necessari avaluar també la proteïna en estat fosforilat.

6.1.3.FKBP12

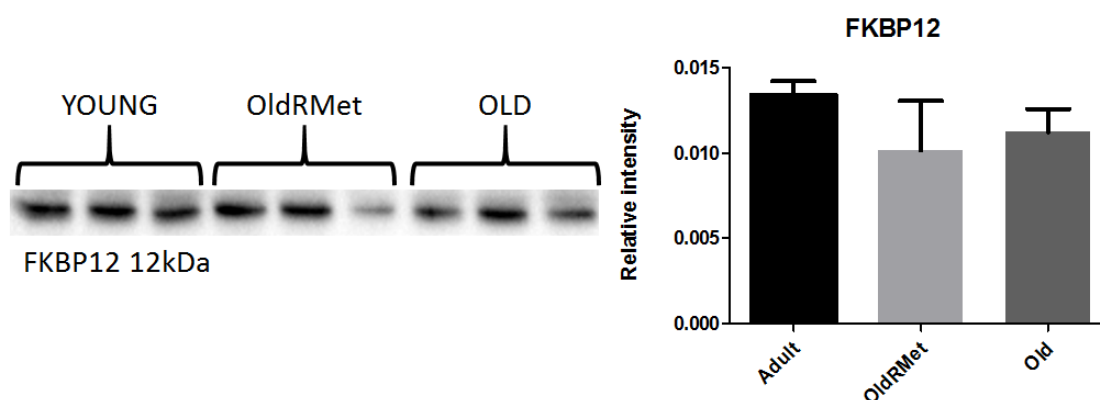


Figura 32. Quantificació de l'expressió proteica de FKBP12 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

En la figura 32 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi de FKBP12. Igual que en els dos casos anteriors, no s'observen diferències significatives entre els diversos grups, atès que l'error ha estat considerable i l'expressió de la proteïna ha estat força similar entre els diversos grups. FKBP12 actua com un inhibidor de mTOR i del mTORC1 quan s'uneix a factors com FK506 o la rapamicina [92]. A més, s'ha descobert que el *knockout* de FKBP12 incrementa la fosforilació de S6K1 i de mTOR, cosa que incentiva la síntesi de proteïnes [93]. D'acord amb això, podem considerar que en tots els grups hi ha una inhibició similar del complex.

Investigant el complex mTORC1, hem vist que les expressions de mTOR i RAPTOR són molt característiques de cada individu, és a dir, que factors com la dieta o l'edat poden no ser-hi determinants. D'altra banda, els resultats de FKBP12 ens han mostrat que la seva expressió és similar en tots els individus, amb poques diferències.

6.2. Síntesi proteica

6.2.1.4EBP1

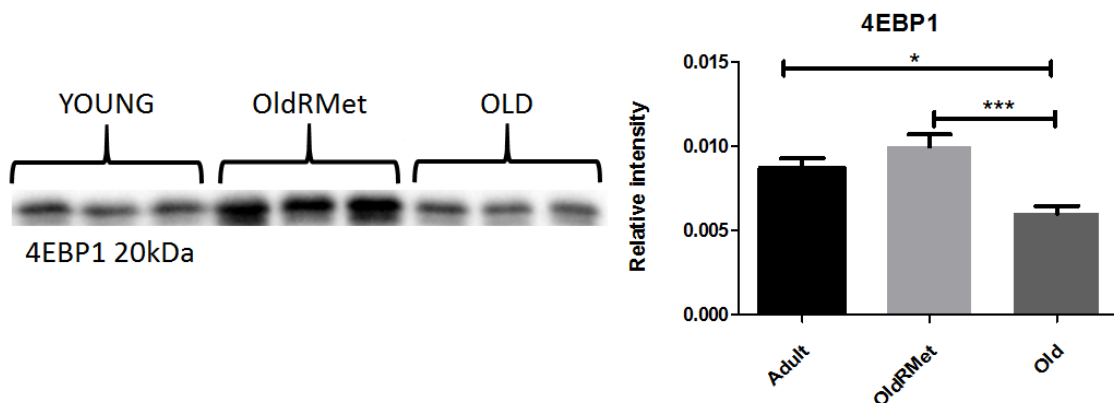


Figura 33. Quantificació de l'expressió proteica de 4EBP1 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm de 6 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*. * $P < 0,05$ i *** $P < 0,001$.

A diferència de les proteïnes del complex mTORC1, 4EBP1 ha mostrat uns resultats diferents entre els diversos grups, com es pot apreciar en la figura 33: una diferència significativa entre el grup adult i el grup vell, i una diferència molt significativa entre el grup vell de restricció i el grup vell; amb un error baix en tots tres casos. D'acord amb això, podem observar que el grup en què predomina més l'expressió de 4EBP1 és el de restricció, superant a l'adult i el vell. Així, deduïm que la síntesi proteica es veuria reduïda en el grup vell de restricció respecte dels altres dos grups, sobretot del vell, ja que inhibeix el complex eIF4F i, indirectament, la traducció de proteïnes [96]. A més, en una

investigació que avaluava els canvis en la quantitat de 4EBP1 en el fetge de rata en resposta a una ingesta baixa en aminoàcids sense sofre, es van aconseguir uns resultats similars als nostres [97].

D'altra banda, no hem d'oblidar que seria recomanable quantificar aquesta proteïna en el seu estat fosforilat, però no s'ha realitzat en aquest estudi.

6.2.2.S6K1

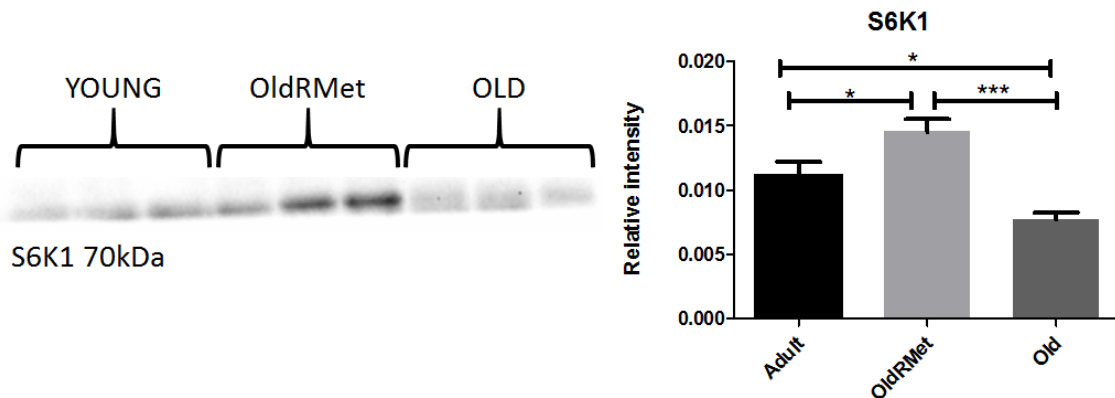


Figura 34. Quantificació de l'expressió de S6K1 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm de 6 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*. * $P < 0,05$ i *** $P < 0,001$.

De la mateixa manera que 4EBP1, S6K1 també ha demostrat tenir unes diferències significatives entre tots els grups, sobretot entre el vell i el vell de restricció. Observem en la figura 34 que la quantitat de S6K1 és el doble en el grup vell de restricció respecte del grup vell, i major respecte de l'adult. De fet, S6K1 només actua sobre proteïnes com eEF2K en el seu estat fosforilat, fet que incentiva la síntesi proteica [99] i promou la progressió del cicle cel·lular [95]. Així, podem considerar que la restricció de metionina ha reduït la síntesi proteica, i es correlaciona amb els resultats obtinguts amb 4EBP1.

Altrament, també s'hauria d'estudiar aquesta proteïna en estat fosforilat, ja que corroboraria els resultats obtinguts.

6.2.3.eEF2

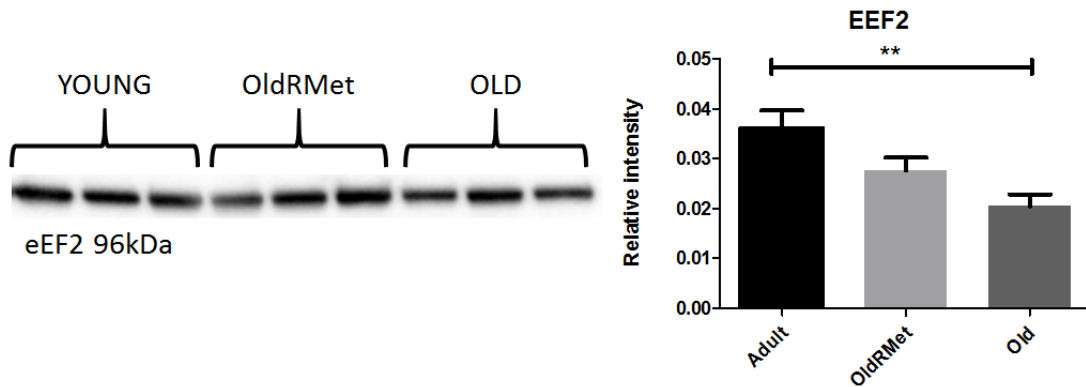


Figura 35. Quantificació de l'expressió proteica de eEF2 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm de 6 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*. ** $P < 0,01$.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de eEF2, representats en la figura 35, mostren una diferència bastant significativa entre el grup adult i el grup vell. La quantitat màxima d'expressió l'han tingut els individus adults i la menor els vells, mentre que els vells de restricció es localitzen en un terme entremig. Si recordem, eEF2 promouia la síntesi proteica en el seu estat no fosforilat, la proteïna eEF2K inhibia eEF2 per fosforilació i S6K1 inhibia eEF2K també per fosforilació [99],[101]. Curiosament, la reducció de la ingesta de metionina ha provocat un tendència d'augment de l'expressió de eEF2, sense arribar a cap diferència significativa, en el grup vell de restricció respecte del grup vell, i és un fenomen una mica estrany, ja que es contradia amb els resultats obtinguts en S6K1, en els quals es pot observar perfectament un increment d'aquesta proteïna en el grup vell de restricció, fet que redueix, en teoria, la síntesi de proteïnes. Per acabar de desxifrar aquest puzzle necessitem els valors de eEF2 fosforilada.

Després d'haver estudiat les tres proteïnes involucrades en la síntesi proteica, deduïm que aquest procés anabòlic sí que ha mostrat mantenir diferències significatives entre els tres grups i, a més, s'ha reduït en el grup vell de restricció respecte del grup vell. D'acord amb això, considerem que la intervenció nutricional ha estat responsable d'aquesta reducció i que, durant èpoques en què la ingesta d'aminoàcids, com la metionina, els components bàsics de les proteïnes, disminueix, la síntesi proteica també ho fa mitjançant la inhibició de la via de mTOR, concretament del complex mTORC1. És possible que la MetR reverteixi els efectes de l'envelliment mitjançant la inhibició d'aquest procés anabòlic. D'altra banda, els resultats de les proteïnes fosforilades haguessin corroborat aquest fet i, potser, haguessin aclarit millor el funcionament d'aquesta via durant una restricció de metionina, en l'àmbit de la síntesi proteica.

6.3. Autofàgia

6.3.1. ATG13

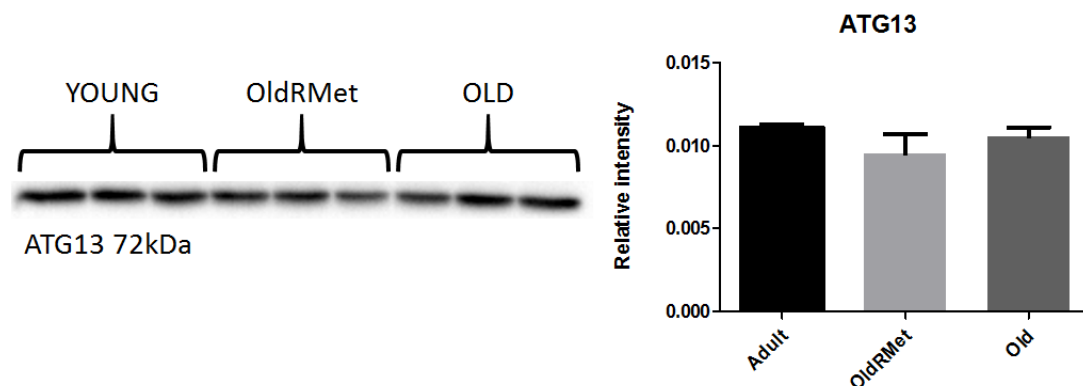


Figura 36. Quantificació de l'expressió proteica de ATG13 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

Els resultats de ATG13 (Figura 36) no mostren cap diferència significativa entre els diversos grups, ni un error molt alt, per conseqüència, podem considerar que la restricció dietètica no ha tingut cap efecte considerable en l'expressió d'aquesta proteïna. De fet, l'autofàgia es regula positivament per proteïnes com ATG13, sobretot durant una depravació nutricional, atès que es necessiten obtenir diversos suplementes a les deficiències de nutrients[102]. En aquest cas però, sembla ser que la intervenció nutricional no ha provocat cap canvi significatiu en l'autofàgia, a diferència dels resultats obtinguts en un experiment, també de restricció de metionina, que avaluava l'autofàgia en el llevat [104].

6.3.2. LC3B

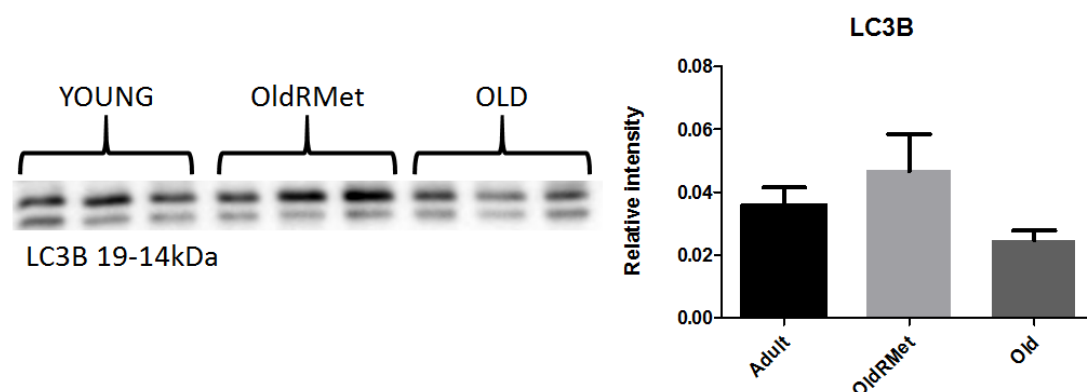


Figura 37. Quantificació de l'expressió proteica de LC3B obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 6 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de LC3B, representats en la figura 37, mostren diferències entre els diversos grups, però no arriben a ser significatives. La quantitat més alta de LC3B correspon al grup vell de restricció, la més baixa al grup vell i el valor entremig al grup adult. Com que LC3B es correlaciona amb el nombre d'autofagosomes i, per conseqüència, actua com un marcador de l'autofàgia [106], podríem especular que la restricció de metionina ha pogut incentivar l'autofàgia d'acord amb el gràfic de la intensitat relativa de LC3B. Aquest fenomen no es relaciona amb els resultats obtinguts de ATG13, encara que el marge d'error comès i la variabilitat de les mostres podria justificar-ho. D'acord amb això, un estudi experimental va demostrar que l'autofàgia, quantificada amb LC3B, es veia incentivada en diversos tipus de teixits, incloent el fetge, davant d'una depravació nutricional en ratolins transgènics [102].

6.3.3.p62

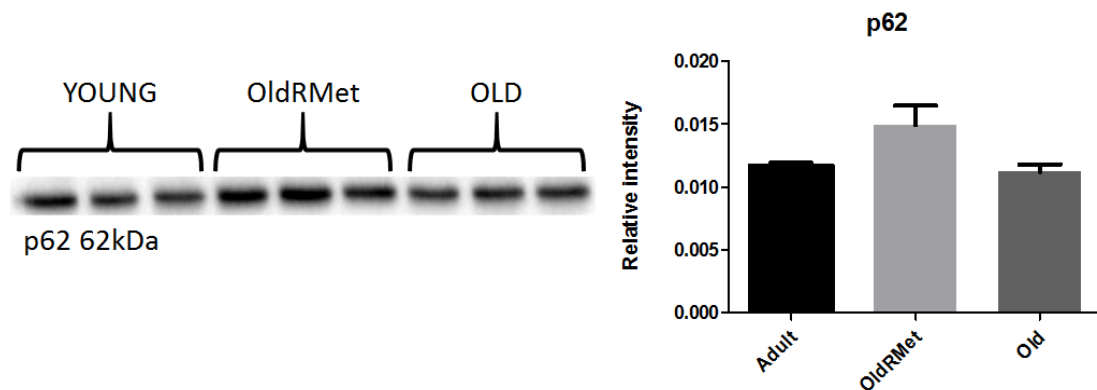


Figura 38. Quantificació de l'expressió proteica de p62 obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

En la figura 38 es mostren els resultats obtinguts en l'anàlisi de p62. D'una manera similar que les dues proteïnes anteriors, p62 no ha mostrat tenir cap diferència significativa entre els tres grups de l'experiment, i l'expressió ha estat similar entre els diversos individus de cada grup. Podem deduir que, tenint en compte que p62 també actua com un marcador de l'autofàgia, igual que LC3B, però de forma negativa, és a dir, que la quantitat de p62 es correlaciona negativament amb l'autofàgia, atès que és degradada durant el procés, com han demostrat Bjorkoy i col·legues [109],[110], la restricció de metionina no ha produït cap canvi en l'autofàgia, o que l'ha reduït lleugerament, fenomen que té relació amb els resultats obtinguts en la quantificació de ATG13, però no de LC3B.

6.3.4. Ubiquitina

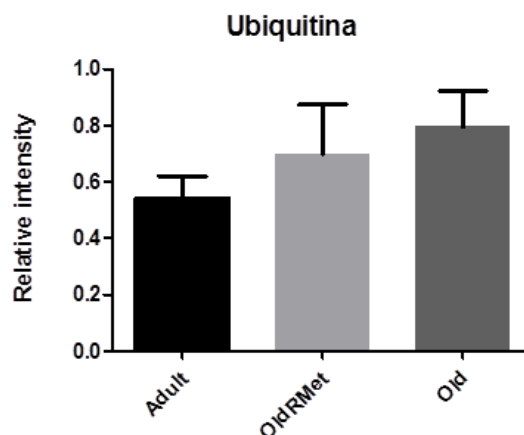


Figura 39. Quantificació de l'expressió proteica d'ubiquitina obtinguda per Western Blot. Les dades representades són la mitjana \pm SEM de 3 individus i els valors de la proteïna s'han normalitzat amb els valors de la proteïna total mitjançant la tinció amb el colorant *coomassie*.

Si ens fixem en el gràfic (Figura 39), podem observar una lleugera disminució de l'expressió d'ubiquitina en el grup de restricció respecte del grup vell, però amb un error considerable entre les mostres de cada grup. La major expressió es localitza en el grup vell, la menor en l'adult i el valor entremig en el grup de restricció. Com sabem, la ubiquitina és una proteïna que participa en l'autofàgia selectiva [112] i, de fet, es localitza en molècules i estructures cel·lulars que s'han de degradar, per conseqüència, també podríem considerar-la un marcador positiu de l'autofàgia. D'acord amb això, podem deduir que la restricció de metionina ha estat responsable d'una reducció de l'autofàgia o, que, simplement, no hi ha tingut cap mena de rellevància.

Contràriament a les nostres suposicions, ha semblat ser que l'autofàgia no ha estat afectada per la restricció de metionina de manera significativa, és a dir, els resultats del grup vell són molt similars als del grup vell de restricció, però amb una tendència a l'alça d'aquest últim. A més, l'autofàgia predomina més en el grup adult que en els altres dos. D'acord amb això, podem considerar que l'expressió de les proteïnes relacionades amb l'autofàgia ha seguit una direcció molt propera al grup adult i, així, és molt possible que si s'hagués allargat el període d'intervenció nutricional o si s'haguessin escollit individus una mica més joves, els individus de restricció haguessin pogut esdevenir fenotípicament similars, a nivell d'autofàgia, als individus adults.

CONCLUSIONS

7. Conclusions

7.1. Conclusions científiques

1. L'expressió de les proteïnes del complex mTORC1 ha demostrat ser bastant específica de cada individu, i sembla no estar relacionada amb l'edat ni la dieta. S'haurien d'avaluar les proteïnes en el seu estat fosforilat.
2. Una restricció de metionina aplicada a rates envellides disminueix la síntesi proteica respecte del grup vell, alimentat amb una dieta control. L'obtenció de l'estat fosforilat d'aquestes proteïnes és necessari per poder afirmar aquest fet.
3. La restricció de metionina en el nostre grup experimental no ha mostrat provocar cap canvi en l'autofàgia en avaluar l'expressió de les proteïnes ATG13, LC3B, p62 i ubiquitina.
4. Per descobrir si una restricció de metionina és capaç de revertir els efectes de l'envelliment hauríem de continuar amb la investigació d'aquesta via de senyalització, en tots els tres àmbits desenvolupats anteriorment.

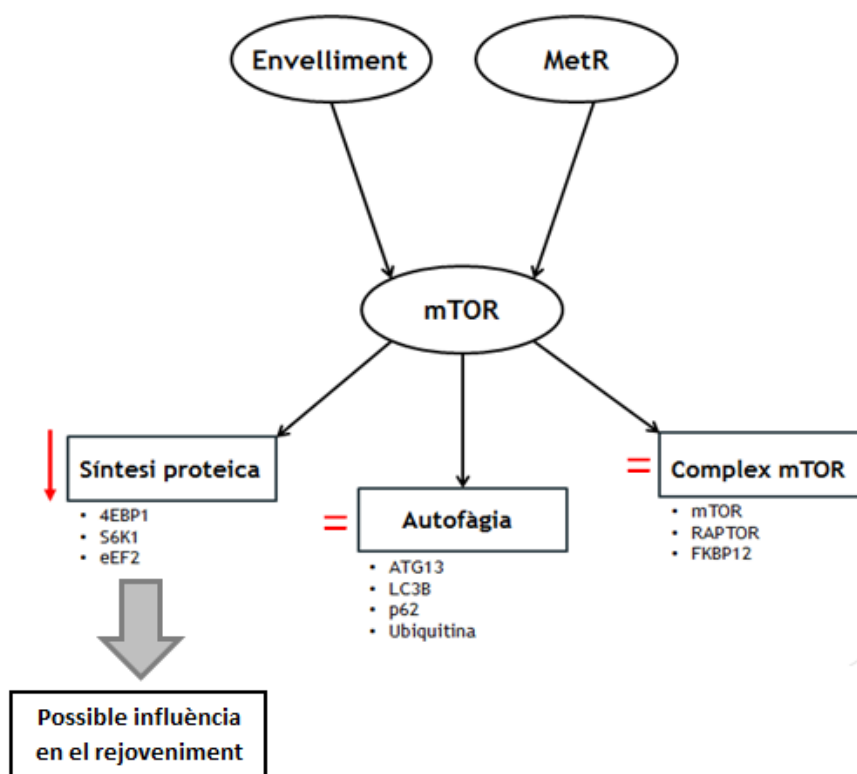


Figura 40. Esquema de les funcions de la via de mTOR amb els resultats obtinguts i les conclusions. Com es pot observar, les expressions de les proteïnes involucrades en l'autofàgia i el complex mTOR no han sofert cap canvi significatiu per la MetR. No obstant, en la síntesi de proteïnes sí que s'han determinat una sèrie de canvis, i és possible que és a través de la disminució d'aquest procés, en la via de mTOR, que s'incentiva el rejuveniment dels individus, encara que és necessari més investigació en aquest àmbit per estar-ne segurs d'aquesta afirmació.

7.2. Conclusions personals

Des que vaig realitzar la primera reunió amb el meu cotutor de l'IRB, vaig adonar-me del terreny en què m'havia ficat: el tema era molt complex, d'un nivell extremadament superior al del batxillerat, i rebaixar-lo no va ser senzill. A més, la informació era molt específica i la majoria estava en anglès.

No obstant, he de reconèixer que he après moltíssim, no només sobre nutrició i envelliment, sinó també el llenguatge científic, en anglès i en català, i com dur a terme una investigació científica i redactar-ne un article, que sigui publicable en una revista científica de prestigi.

Per altra banda, seria important destacar que no he acabat totalment satisfet amb el treball, ja que esperava obtenir unes conclusions científiques més clares, és a dir, amb les quals haguéssim pogut confirmar amb més seguretat les hipòtesis plantejades. Aquesta decepció m'ha permès entendre la infinitat de processos que intervenen en l'envelliment, la immensa quantitat de paciència i de temps que es requereix per demostrar quelcom, i també el nombre de línies d'investigació que encara no han estat avaluades.

BIBLIOGRAFIA

8. Bibliografia

- [1] D. Harman, "Free Radical theory of aging: role of free radical reactions in the origination and evolution of life, aging and disease processes.," *Mod. Trends Aging Res.*, vol. 147, no. 77–83, 1986.
- [2] B. L. Strehler, "Time, cells, and aging.," *Academic Press, New York.*, pp. 1–456, 1962.
- [3] J. Miquel, A. C. Economos, J. Fleming, and J. E. Johnson, "Mitochondrial role in cell aging," *Exp Gerontol*, vol. 15, pp. 575–591, 1980.
- [4] L. Hayflick and P. S. Moorhead, "The serial cultivation of human diploid cell strains," *Exp. Cell Res.*, vol. 25, pp. 585–621, 1961.
- [5] van J. M. Deursen, "The role of senescent cells in ageing," *Nat.* 509, vol. 7501, pp. 439–446, 2014.
- [6] D. Harman, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.," *J Gerontol*, vol. 11, pp. 298–300, 1956.
- [7] P. Caro Martín, "Restricción de metionina y de dieta en relación con el estrés oxidativo en mamíferos de laboratorio.," 2010.
- [8] D. Harman, "The biologic clock: the mitochondria?," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 20, pp. 145–147, 1972.
- [9] T. R. Golden and S. Melov, "Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging.," *Mech Ageing Dev*, vol. 122, pp. 1577–1589, 2001.
- [10] R. Yui, Y. Ohno, and E. T. Matsuura, "Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*.,," *Genes Genet Syst*, vol. 78, pp. 245–251, 2003.
- [11] A. Bokov, A. Chaudhuri, and A. Richardson, "The role of oxidative damage and stress in aging.," *Mech Ageing Dev*, vol. 125, pp. 811–826, 2004.
- [12] S. Sengupta, T. R. Peterson, and D. M. Sabatini, "Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress.," *Mol. Cell*, vol. 40, pp. 310–322, 2010.
- [13] "Formació d'un radical lliure a partir d'un àtom normal d'oxigen." [Online]. Available: <http://vemmasogamoso.weebly.com/productos.html>. [Accessed: 03-Dec-2016].
- [14] "Peroxidació lipídica." [Online]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Peroxidaci%C3%B3n_lip%C3%ADdica. [Accessed: 03-Dec-2016].
- [15] "Mecanisme d'acció d'un antioxidant." [Online]. Available: <http://www.brunswicklabs.com/blog/antioxidants-mechanisms-of-action-and-effectiveness>. [Accessed: 03-Dec-2016].
- [16] M. López-Torres and G. Barja, "Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary

- restriction. Possible implications for humans.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1780, pp. 1337–1347, 2008.
- [17] A. J. Lambert, H. M. Boysen, J. A. Buckingham, T. Yang, A. Podlutzky, S. N. Austad, T. H. Kunz, R. Buffenstein, and M. D. Brand, "Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms.," *Aging Cell*, vol. 6, pp. 607–618, 2007.
- [18] G. Barja, S. Cadenas, C. Rojas, M. Lopez-Torres, and R. Perez-Campo, "A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals.," *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, vol. 108, pp. 501–512, 1994.
- [19] G. Barja and A. Herrero, "Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon.," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 30, pp. 235–243, 1998.
- [20] Y. Kushnareva, A. N. Murphy, and A. Andreyev, "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state.," *Biochem J*, vol. 368, pp. 545–553, 2002.
- [21] A. Herrero and G. Barja, "Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon.," *Mech Ageing Dev*, vol. 98, pp. 95–111, 1997.
- [22] A. Boveris, E. Cadenas, and A. O. Stoppani, "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide.," *Biochem J*, vol. 156, pp. 435–444, 1976.
- [23] A. J. Hulbert, R. Pamplona, R. Buffenstein, and W. A. Buttemer, "Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals.," *Physiol Rev*, vol. 87, pp. 1175–1213, 2007.
- [24] G. Loschen, L. Flohe, and B. Chance, "Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria.," *FEBS Lett*, vol. 18, pp. 261–264, 1971.
- [25] R. Gredilla, G. Barja, and M. López-Torres, "Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source.," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 33, pp. 279–287, 2001.
- [26] A. Dillin, A. L. Hsu, N. Arantes-Oliveira, J. Lehrer-Graiwer, H. Hsin, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, and C. Kenyon, "Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development.," *Science (80-.)*, vol. 298, pp. 2398–2401, 2002.
- [27] S. S. Lee, R. Y. Lee, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, and G. Ruvkun, "A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity.," *Nat. Genet.*, vol. 33, pp. 40–48, 2003.
- [28] T. Finkel, "The metabolic regulation of aging," *Nat. Med.*, vol. 21, pp. 1416–1423, 2015.
- [29] M. Ristow and K. Schmeisser, "Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS).," *Dose Response*, vol. 12, pp. 288–341, 2014.

- [30] J. Yun and T. Finkel, "Mitohormesis," *Cell Metab.*, vol. 19, pp. 757–766, 2014.
- [31] G. López-Lluch, N. Hunt, B. Jones, M. Zhu, H. Jamieson, S. Hilmer, M. V. Cascajo, J. Allard, D. K. Ingram, P. Navas, and R. de Cabo, "Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 103, pp. 1768–1773, 2006.
- [32] F. Madeo, A. Zimmermann, M. C. Maiuri, and G. Kroemer, "Essential role for autophagy in lifespan extension.," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, pp. 85–93, 2015.
- [33] K. A. Coughlan, R. J. Valentine, N. B. Ruderman, and A. K. Saha, "AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?," *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, vol. 7, pp. 241–253, 2014.
- [34] "L'exercici físic i la biogènesi mitocondrial." [Online]. Available: <http://www.hfsmedic.com/la-biogènesi-mitocondrial-el-quemador-de-grasa-por-excelencia-parte-1/>. [Accessed: 22-Dec-2016].
- [35] R. J. Colman, T. M. Beasley, J. W. Kemnitz, S. C. Johnson, R. Weindruch, and R. M. Anderson, "Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3557, 2014.
- [36] H. Lees, H. Walters, and S. L. Cox, "Animal and human models to understand ageing," *Maturitas*, vol. 93, pp. 18–27, 2016.
- [37] M. Kaerberlein, R. Powers W., K. Steffen K., E. Westman A., D. Hu, N. Dang, E. Kerr O., K. Kirkland T., and B. Kennedy K., "Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients," *Sci. 310*, vol. 5751, pp. 1193–1196, 2005.
- [38] "Saccharomyces cerevisiae." [Online]. Available: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm. [Accessed: 11-Dec-2016].
- [39] M. Klass R., "A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results," *Mech. Ageing Dev.* 22, vol. 3–4, pp. 279–286, 1983.
- [40] T. Johnson E. and D. Friedman B., "A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility," *Genet.* 118, vol. 1, pp. 75–86, 1988.
- [41] H. Tissenbaum A., "Using for aging research," *Invertebr. Reprod. Dev.* 59, vol. sup1, pp. 59–63, 2015.
- [42] "*Caenorhabditis elegans*." [Online]. Available: <http://www.deretilnature.com/id/caenorhabditis-elegans/>. [Accessed: 11-Dec-2016].
- [43] P. Kapachi, B. M. Zid, T. Harper, D. Koslover, V. Sapin, and S. Benzer, "Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway," *Curr. Biol.* 14, vol. 10, pp. 885–890, 2004.
- [44] I. Bjedov, J. M. Toivonen, F. Kerr, C. Slack, J. Jacobson, A. Foley, and L. Partridge, "Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila*

- melanogaster,” *Cell Metab.* 11, vol. 1, pp. 35–46, 2010.
- [45] L. E. Gimenez, P. Ghildyal, K. E. Fischer, H. Hu, W. W. Ja, B. A. Eaton, Y. Wu, S. N. Austad, and R. Ranjan, “Modulation of methuselah expression targeted to *Drosophila* insulin-producing cells extends life and enhances oxidative stress resistance,” *Aging Cell* 12, vol. 1, pp. 121–129, 2012.
- [46] “*Drosophila melanogaster*.” [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/taxonomy/7227>. [Accessed: 11-Dec-2016].
- [47] E. Cava and L. Fontana, “Will calorie restriction work in humans?,” *Aging (Albany, N.Y. Online)*, vol. 5, pp. 507–514, 2013.
- [48] E. M. Mercken, S. D. Crosby, D. W. Lamming, L. JeBailey, S. Krzysik-Walker, D. T. Villareal, M. Capri, C. Franceschi, Y. Zhang, and K. et al. Becker, “Calorie restriction in humans inhibits PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile,” *Aging Cell*, vol. 12, pp. 645–651, 2013.
- [49] C. G. Fairburn and P. J. Harrison, “Eating disorders,” *Lancet*, vol. 361, pp. 407–416, 2003.
- [50] “Població centenària de la Sicília Occidental.” [Online]. Available: <http://www.thelocal.it/20141003/the-sicilian-village-where-people-live-beyond-100>. [Accessed: 26-Dec-2016].
- [51] B. . Willcox, D. C. Willcox, H. Todoriki, A. Fujiyoshi, K. Yano, Q. He, J. D. Curb, and M. Suzuki, “Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging: the diet of the world’s longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span,” *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 1114, pp. 434–455, 2007.
- [52] “Individus centenaris d’Okinawa.” [Online]. Available: <http://www.elcorreodelsol.com/articulo/9-secretos-de-los-centenarios-de-okinawa>. [Accessed: 11-Dec-2016].
- [53] L. Fontana, B. K. Kennedy, V. D. Longo, D. Seals, and S. Melov, “Medicial research: treat ageing,” *Nature*, vol. 511, pp. 405–407, 2014.
- [54] D. P. Goldman, D. Cutler, J. W. Rowe, P. C. Michaud, J. Sullivan, D. Peneva, and S. J. Olshansky, “Substantial health and economic returns from delayed aging may warrant a new focus for medical research,” *Heal. Aff.*, vol. 32, pp. 1698–1705, 2013.
- [55] L. Partridge, “The new biology of ageing,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, vol. 365, pp. 147–154, 2010.
- [56] R. J. Speakman and E. S. Mitchell, “Caloric restriction,” *Mol. Asp. Med.*, vol. 32, pp. 159–221, 2011.
- [57] L. Partridge, M. D. Piper, and W. Mair, “Dietary restriction in *Drosophila*,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. Sep;126(9), pp. 938–950, 2005.
- [58] L. T. Kaerberlein, D. E. Smith, M. Tsuchiya, L. K. Welton, H. J. Thomas, S. Fields, K. B. Kennedy, and M. Kaerberlein, “Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food,” *Aging Cell*, vol. 5, pp. 505–514, 2006.
- [59] J. J. Ramsey, R. J. Colman, N. C. Binkley, J. D. Christensen, T. A. Gresl, J. W.

- Kemnitz, and R. Weindruch, "Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study.," *Exp Gerontol*, vol. Dec;35(9-1), pp. 1131-1149, 2000.
- [60] K. M. Huffman, "Caloric restriction alters the metabolic response to a mixed-meal: results from a randomized, controlled trial.," *PLoS One*, vol. 7, p. e28190, 2012.
- [61] K. Iwasaki, C. A. Gleiser, E. J. Masoro, C. A. McMahan, E. J. Seo, and B. P. Yu, "Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component.," *J. Gerontol.*, vol. 43, pp. B13-B21, 1988.
- [62] I. Shimokawa, Y. Higami, B. P. Yu, E. J. Masoro, and T. Takeda, "Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats.," *Aging Clin. Exp. Res.*, vol. 8, pp. 254-262, 1996.
- [63] M. Khorakova, Z. Deil, D. Khausman, and K. Matsek, "Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fisher 344 male rats.," *Fiziol. Z.*, vol. 36, pp. 16-21, 1990.
- [64] A. Sanz, P. Caro, and G. Barja, "Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver.," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 36, pp. 545-552, 2004.
- [65] A. Sanz, P. Caro, J. Gómez, and G. Barja, "Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage.," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 1067, pp. 200-209, 2006.
- [66] A. Sanz, J. Gómez, P. Caro, and G. Barja, "Carbohydrate restriction does not change free radical generation and oxidative DNA damage.," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 38, pp. 327-333, 2006.
- [67] S. Q. Doi, S. Rasiaiah, I. Tack, J. Mysore, J. J. Kopchick, J. Moore, P. Hirszel, L. J. Striker, and G. E. Striker, "Low-protein diet suppresses serum insulin-like growth factor-1 and decelerates the progression of growth hormone-induced glomerulosclerosis.," *Am. J. Nephrol.*, vol. 21, pp. 331-339, 2001.
- [68] S. R. Splinder, "Caloric restriction: from soup to nuts.," *Ageing Res. Rev.*, vol. 9, pp. 324-353, 2009.
- [69] H. Mirzaei, A. J. Suarez, and D. V. Longo, "Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, pp. 558-566, 2014.
- [70] B. C. Lee, A. Kaya, S. Ma, G. Kim, V. M. Gerashchenko, H. S. Yim, Z. Hu, G. L. Harshman, and N. V. Gladyshev, "Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status.," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3592, 2014.
- [71] A. Sanz, P. Caro, V. Ayala, M. Portero-Otín, R. Pamplona, and G. Barja, "Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins.," *FASEB J.*, vol. 8, pp. 1064-1073, 2006.
- [72] D. V. Longo, A. Antebi, A. Bartke, N. Barzilai, M. H. Brown-Borg, C. Caruso, J. T.

- Curiel, R. De Cabo, C. Franceschi, D. Gems, K. D. Ingram, E. T. Johnson, K. B. Kennedy, C. Kenyon, S. Klein, J. J. Kopchick, G. Lepperdinger, F. Madeo, G. M. Mirisola, R. J. Mitchell, G. Passarino, L. K. Rudolph, M. J. Sedivy, S. G. Shadel, A. D. Sinclair, R. S. Splinder, Y. Suh, J. Vijg, M. Vinciguerra, and L. Fontana, "Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready?," *Aging Cell*, vol. 14, pp. 497–510, 2015.
- [73] A. Efeyan, R. Zoncu, and M. D. Sabatini, "Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease.," *Trends Mol Med.*, vol. 9, pp. 524–533, 2012.
- [74] R. Cabré Cucó, "Vulnerabilitat neuronal selectiva associada a l'envelliment fisiològic del Sistema Nerviós Central Humà.," 2015.
- [75] "Fórmula molecular de la metionina." [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Metionina>. [Accessed: 27-Nov-2016].
- [76] T. Ninomiya, Y. Kiyohara, M. Kubo, Y. Tanizaki, K. Tanak, K. Okubo, H. Nakamura, J. Hata, Y. Oishi, I. Kato, H. Hirakata, and M. Lida, "Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: the Hisayama study.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 44, pp. 437–445, 2004.
- [77] P. Durand, M. Prost, N. Loreau, S. Lussier-Cacan, and D. Blacke, "Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease," *Lab. Invest.*, vol. 81, pp. 645–672, 2001.
- [78] N. Hidiroglou, G. Sarwar, L. Long, X. Zhao, R. Madere, K. Cockell, B. Belonge, N. M. W. Ratnayake, and R. Peace, "The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 15, pp. 730–740, 2004.
- [79] P. Liu, H. Cheng, T. M. Roberts, and J. J. Zhao, "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer.," *Nat Rev Drug Discov.*, vol. 8, pp. 627–644, 2009.
- [80] S. Wullschleger, R. Loewith, and M. N. Hall, "TOR signaling in growth and metabolism," *Cell*, vol. 124, pp. 471–484, 2006.
- [81] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR signaling at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 122, pp. 3589–3594, 2009.
- [82] D. A. Guertin and D. M. Sabatini, "Defining the Role of mTOR in Cancer," *Cancer Cell*, vol. 12, pp. 9–22, 2007.
- [83] T. R. Peterson, M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray, and D. M. Sabatini, "DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival," *Cell*, vol. 137, pp. 873–886, 2009.
- [84] Y. Sancak, C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr, and D. M. Sabatini, "PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase," *Mol. Cell*, vol. 25, pp. 903–915, 2007.
- [85] E. Vander Haar, S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin, and D. H. Kim, "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, pp. 316–323, 2007.

- [86] L. Wang, T. E. Harris, R. A. Roth, and J. . Lawrence, "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 20036–20044, 2007.
- [87] C. C. Dibble and B. D. Manning, "Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, pp. 555–564, 2013.
- [88] N. Oshiro, R. Takahashi, K. Yoshino, K. Tanimura, A. Nakashima, S. Eguchi, T. Miyamoto, K. Hara, K. Takehana, J. Avruch, U. Kikkawa, and K. Yonezawa, "The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 28, pp. 20329–20339, 2007.
- [89] C. H. Jung, C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D. H. Kim, "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery," *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, pp. 1992–2003, 2009.
- [90] K. Hara, Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch, and K. Yonezawa, "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action.," *Cell*, vol. 110, pp. 29–177, 2002.
- [91] D. M. Gwinn, D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk, and R. J. Shaw, "AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint.," *Mol. Cell*, vol. 30, pp. 214–226, 2008.
- [92] N. Oshiro, K.-I. Yoshino, S. Hidayat, C. Tokunaga, K. Hara, S. Eguchi, J. Avruch, and K. Yonezawa, "Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function.," *Genes Cells*, vol. 9, pp. 359–366, 2004.
- [93] C. A. Hoeffler, W. Tang, H. Wong, A. Santillan, R. J. Patterson, L. A. Martinez, M. V. Tejada-Simon, R. Paylor, S. L. Hamilton, and E. Klann, "Removal of FKBP12 Enhances mTOR-Raptor Interactions, LTP, Memory, and Perseverative/Repetitive Behavior.," *Neuron*, vol. 60, pp. 832–845, 2008.
- [94] J. D. Richter and N. Sonenberg, "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins," *Nature*, vol. 433, pp. 477–480, 2005.
- [95] X. M. Ma and J. Blenis, "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, pp. 307–318, 2009.
- [96] A. Pause, N. Méthot, Y. Svitkin, W. C. Merrick, and N. Sonenberg, "Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation.," *EMBO J.*, vol. 13, pp. 1205–1215, 1994.
- [97] A. K. Sikalidis, K. M. Mazor, M. Kang, H. Liu, and M. H. Stipanuk, "Total 4EBP1 Is Elevated in Liver of Rats in Response to Low Sulfur Amino Acid Intake.," *J. Amino Acids*, vol. 2013, p. 11, 2013.
- [98] R. J. Dowling, I. Topisirovic, T. Alain, M. Bidinosti, B. D. Fonseca, E. Petroulakis, X. Wang, O. Larsson, A. Selvaraj, Y. Liu, S. C. Kozma, G. Thomas, and N. Sonenberg, "mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs.," *Science (80-.)*, vol. 328, pp. 1172–1176, 2010.

- [99] X. Wang, W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi, and C. G. Proud, "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90 (RSK1) and p70 S6 kinase.," *EMBO J.*, vol. 20, pp. 4370–4379, 2001.
- [100] S. Li, W. Ogawa, A. Emi, K. Hayashi, Y. Senga, K. Nomura, K. Hara, D. Yu, and M. Kasuga, "Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver.," *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 412, pp. 197–202, 2011.
- [101] A. G. Ryazanov, "Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives.," *FEBS Lett.*, vol. 514, pp. 26–29, 2002.
- [102] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, "In Vivo Analysis in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, pp. 1101–1111, 2004.
- [103] P. Codogno and A. J. Meijer, "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death," *Cell Death Differ*, vol. 12 Suppl.2, pp. 1509–1518, 2005.
- [104] C. Ruckenstuhl, C. Netzberger, I. Entfellner, D. Carmona-Gutierrez, T. Kickenweiz, S. Stekovic, C. Gleixner, C. Schmid, L. Klug, A. G. Sorgo, T. Eisenberg, S. Büttner, G. Mariño, R. Koziel, P. Jansen-Dürr, K. U. Fröhlich, G. Kroemer, and F. Madeo, "Lifespan Extension by Methionine Restriction Requires Autophagy-Dependent Vacuolar Acidification.," *PLOS Genet.*, vol. 10, 2014.
- [105] N. Hosokawa, T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, and E. Al., "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy," *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, pp. 1981–1991, 2009.
- [106] N. Mizushima and T. Yoshimori, "How to interpret LC3 immunoblotting," *Autophagy*, vol. 3, pp. 542–545, 2007.
- [107] J. Y. Choi, M. W. Jo, E. Y. Lee, and D. S. Choi, "AKT is involved in granulosa cell autophagy via mTOR signaling during rat follicular development and atresia.," *Reproduction*, vol. 147, pp. 73–80, 2013.
- [108] A. Duran, R. Amanchy, J. F. Linares, J. Joshi, S. Abu-Baker, A. Porollo, M. Hansen, J. Moscat, and M. T. Diaz-Meco, "p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway.," *Mol. Cell*, vol. 44, pp. 134–146, 2011.
- [109] S. Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, and T. Johansen, "p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 24131–24145, 2007.
- [110] G. Bjorkoy, T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, and T. Johansen, "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death," *J. Cell Biol.*, vol. 171, p. 603, 2005.
- [111] V. Kirkin and I. Dikic, "Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, pp. 199–205, 2007.
- [112] V. Kirkin, D. G. McEwan, I. Novak, and I. Dikic, "A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy," *Mol. Cell*, vol. 34, pp. 259–269, 2009.

- [113] B. Levine and G. Kroemer, "Autophagy in the Pathogenesis of Disease," *Cell*, vol. 132, pp. 27–42, 2008.
- [114] S. Shaid, C. H. Brandts, H. Serve, and I. Dikic, "Ubiquitination and selective autophagy," *Cell Death Differ.*, vol. 20, pp. 21–30, 2013.
- [115] J. T. Cunningham, J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha, and P. Puigserver, "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex," *Nature*, vol. 450, pp. 736–740, 2007.
- [116] S. M. Schieke, D. Phillips, J. P. McCoy, A. M. Aponte, R. F. Shen, R. S. Balaban, and T. Finkel, "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, pp. 27643–27652, 2006.
- [117] C. F. Bentzinger, K. Romanino, D. Cloetta, S. Lin, J. B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C. F. Costa, M. Brink, and E. Al., "Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy," *Cell Metab.*, vol. 8, pp. 411–424, 2008.
- [118] P. Nicklin, P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, and E. Al., "Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy," *Cell*, vol. 136, pp. 521–534, 2009.
- [119] E. Kim, P. Goraksha-Hicks, L. Li, T. P. Neufeld, and K. L. Guan, "Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, pp. 935–945, 2008.
- [120] Y. Sancak, T. R. Peterson, Y. D. Shaul, R. A. Lindquist, C. C. Thoreen, I. Bar-Peled, and D. M. Sabatini, "The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1," *Science (80-.)*, vol. 320, pp. 1496–1501, 2008.
- [121] P. G. Reeves, F. H. Nielsen, and G. C. Fahey, "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet," *J. Nutr.*, vol. 123, pp. 1939–1951, 1993.
- [122] "Esquema de muntatge de la cubeta de l'electroforesi." [Online]. Available: http://www.aesociety.org/areas/one_de.php. [Accessed: 25-Sep-2016].
- [123] "Muntatge de l'electrotransferència." [Online]. Available: <https://proteomeplus.wordpress.com/2012/01/20/una-de-western/>. [Accessed: 25-Sep-2016].

ANNEX

9. Annex

9.1. Annex 1

Durant la realització de les pràctiques i del treball en general, m'he adonat que hi ha diverses diferències en la manera d'elaborar un treball pròpiament científic i un treball de l'institut, és a dir, tal i com ho hagués fet estant a l'institut. En aquest sentit, m'ha semblat interessant plasmar alguns dels aspectes en què difereixen:

-L'apartat de coneixements previs, que és característic dels treballs que fem al batxillerat, es coneix amb el nom de "Estado del Arte", o investigació prèvia que s'ha dut a terme en el teu àmbit. Acostuma a posar-se com una introducció a la recerca, en aquest sentit diferiria de com organitzem la informació a l'institut, atès que en la introducció, en els nostres treballs, es centra el tema i la seva rellevància i es fa un resum del treball, ometent, també, les conclusions.

-Normalment, no és necessari explicar el material que hem fet servir, és a dir, l'utilatge (pipetes, per exemple), ja que entre la comunitat científica ja se sobreentén. No obstant, els reactius sí s'han d'esmentar, sobretot la casa comercial de què provenen, amb l'objectiu que es pugui tornar a reproduir de la manera més exacta possible per algun altre investigador.

-De la mateixa manera que en el cas anterior, el procediment tampoc no es sol desenvolupar gaire en un article científic, només és necessari destacar la tècnica que s'ha dut a terme.

-Les conclusions són purament "científiques" i, generalment, no hi apareix cap conclusió personal. Tot i això, aquí sí que s'ha reservat un apartat per aquesta informació.

-La bibliografia de qualsevol font no científica, és a dir, una pàgina web, per exemple, no es sol escriure al peu de les figures, sinó que s'escriu al final, juntament amb els articles científics, com s'ha realitzat en aquest treball.

9.2. Annex 2

Després d'haver realitzat aquest treball he après una immensa quantitat de processos metabòlics lligats a l'envelliment que m'han servit per a plantejar-me diverses opcions que potser seguiria en la meva vida futura.

Òbviament, l'alimentació del dia a dia té una repercussió considerable en la nostra salut, i és molt més important del que la majoria de gent pensa. En aquest sentit, una alimentació variada, amb tot tipus d'aliments (carn, peix, productes làctics, fruita, verdura, entre d'altres), i saludable, pot recompensar l'individu, però també pot passar a l'inrevés si es segueix una alimentació deficient, ja que podria haver una falta de certs nutrients específics. Fer esport també té efectes beneficiosos que es complementarien perfectament amb un estil de vida saludable, com s'ha explicat aquí.

D'altra banda, ja és ben conegut que realitzar restriccions dietètiques té efectes beneficiosos en la salut i l'envelliment, de fet des de fa segles. No obstant això, no s'ha de confondre mai la paraula "restricció" amb "depravació", que és l'abstenció completa de menjar, i la metionina, encara que la seva restricció té efectes beneficiosos, és un aminoàcid essencial i, per conseqüència, s'ha de consumir. Personalment, no sé si és gaire recomanable seguir algun tipus de restricció dietètica de les explicades en aquest treball, ja que, per fer-ho "correctament", seria necessari aplicar-hi un esforç diari i diversos canvis en la nostra vida quotidiana.

Aquest tema és molt complex i es podria deliberar d'ell durant hores i hores; la meva conclusió i recomanació final és que hem de menjar menys si volem viure més, i, si és possible, menys carn i proteïnes d'origen animal.