



Universitat de Lleida

## Vulnerabilitat neuronal selectiva associada a l'envelliment fisiològic del Sistema Nerviós Central Humà

Rosanna Cabré Cucó

<http://hdl.handle.net/10803/353623>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

**Vulnerabilitat neuronal selectiva associada a  
l'envelliment fisiològic del Sistema Nerviós  
Central Humà**

**Rosanna Cabré Cucó**

Lleida, Desembre de 2015





**Universitat de Lleida**

## **Tesi Doctoral**

# **Vulnerabilitat neuronal selectiva associada a l'envelliment fisiològic del Sistema Nerviós Central Humà**

Memòria per optar al grau de Doctor  
per la Universitat de Lleida, presentada per

**Rosanna Cabré Cucó**

Directors de la Tesi

Dr. Reinald Pamplona Gras

Dra. Victòria Ayala Jové

Lleida, Desembre de 2015



“Penso  
que res no és en va;  
que res d'allò que dic  
ni d'allò que faig  
no es perd,  
si en el joc hi arrisco  
tot el que tinc,  
sense temor de perdre.”

*Miquel Martí i Pol*



Infinites hores he estat davant d'aquest valuós document i per fi a arribat el moment de concloure'l. En aquest moment em sento orgullosa dels objectius complerts, de l'esforç invertit, del coneixement adquirit i de tot l'après en aquesta experiència que espero no oblidar en el temps. No obstant, he de dir que tot això no hagués estat possible sense l'ajuda de moltes persones a les quals m'agradaria agrair.

En primer lloc agrair als màxims responsables del grup de Fisiopatologia Metabòlica, el Reinald Pamplona i el Manel Portero, que m'han brindat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral. D'una banda, el Reinald ha estat un director pròxim, ple de grans coneixements que m'ha anat transmetent al llarg d'aquests anys. D'altra banda, el Manel sempre ha estat disposat a explicar-me qualsevol dubte, des de coneixements bàsics fins a quelcom abstracte i que semblava incompressible. Gràcies doncs, per l'acollida al vostre laboratori i fer d'aquesta etapa de quatre anys un període de temps en el que ha predominat la il·lusió i l'esperit de superació.

Agrair especialment a l'Alba, ja fa 5 anys del meu primer dia al laboratori com a estudiant de màster i des del primer dia que ha estat guiant-me, ajudant-me i animant-me. Gràcies per totes les hores i moments que hem compartit, per la paciència, pels dubtes resolts, per escoltar-me i ajudar-me a superar els moments més difícils. La tesi no és únicament cosa d'una persona sinó de moltes i tu has estat de les més importants.

Agrair també a tots els companys del laboratori. Sense ells no hauria estat el mateix. A la Mariona per estar sempre disposada a ajudar-me en tot el que he necessitat, a dedicar-me el temps que ha fet falta per resoldre els meus dubtes i pels ànims de què tot és possible. Al David per ensenyar-me la base del laboratori, per les idees de bomber que sempre funcionen i pel teu positivisme que desperta cada matí el laboratori. Als companys nutricionistes del laboratori José, Anna i Meri, per ajudar-me amb tot el que he necessitat, sempre animant i transmetent els vostres coneixements. Gràcies per escoltar-me i animar-me en els moments més difícils. A l'Ana per mostrar-me la seva manera de treballar, pels seus ànims i pel positivisme que m'ha transmès en tot aquest anys. A l'Omar perquè tot i molestar-nos mútuament sempre hi han hagut somriures pel mig. Gràcies pels moments compartits, i per estar sempre disposat a ajudar-me. A l'Hugo per ensenyar-me a relativitzar les coses i per mostrar-me indirectament que amb esforç i constància els objectius si que es poden aconseguir. Gràcies per haver-me fet feliç en dies imperfectes. A la Núria, perquè ha estat en els moments més crítics, i els ànims i els



bons consells han ajudat a què la tesi ja sigui un fet. Gràcies per ajudar-me a veure les coses des d'una altra perspectiva. A la Hélèn, perquè els pocs mesos de pràctiques que va estar grup van ser suficients per encomanar l'alegria. Als nous estudiants de doctorat: Natàlia, Lara, Rebeca, Pascual i Irene, per la vostra frescor i motivació. Natàlia, gràcies per comptar en mi quan no era necessari i per compartir estones amb el programa R, amb el teu ajut la desesperació pels acabats perfectes no ha estat tal. A l'Èlia i la Rosa. Gràcies Èlia per tota la teva ajuda i suport en qualsevol moment i per a qualsevol cosa. Gràcies Rosa, pels teus ànims i ajuda en la zona de treball de cromatografia.

Agrair també a la resta de persones del grup: M<sup>a</sup> Josep, Joan Prat, Jordi i Victòria. En definitiva, gràcies a totes les persones que han passat pel Grup de Fisiopatologia Metabòlica durant aquest període de 5 anys.

Agrair també, a la família, perquè no tot són moments bons i els que no són bons es passen a casa. Amb vosaltres mai m'ha faltat recolzament. L'energia i l'alegria de les rialles del Genís, la Xènia i la Paula han fet que els dies i les setmanes hagin estat més portadores. Gràcies per acompanyar-me en aquest camí, sense vosaltres això no hagués estat possible.

Agrair als amics, per ajudar-me a desconnectar, per l'interès mostrat, per gaudir i riure plegats i per compartir amb vosaltres moments molt especials.

I finalment, el meu profund agraïment al Gerard, per la seva paciència, la seva ajuda, els seus ànims i els seus consells. Gràcies per tots els moments que em compartit en aquesta etapa, sempre has estat al meu costat.





## RESUM

El procés d'envelliment causa nombrosos canvis a l'organisme a tots els nivells d'organització biològica (molecular, cel·lular, orgànica i sistèmica), redueix les capacitats funcionals màximes i l'homeòstasi, i augmenta la probabilitat de desenvolupar malalties degeneratives. Tots aquests canvis tenen probablement el seu origen en un nombre petit de causes, que operen contínuament al llarg de tota la vida i que a dia d'avui encara no es coneixen al 100 %, però sembla que l'estrès oxidatiu hi juga un paper molt important. Les pèrdues cognitives i psicomotores són manifestacions comuns del procés d'envelliment del sistema nerviós, no obstant això, l'inici i severitat d'aquestes pèrdues semblen ser relativament independents una de l'altra, suggerint que diferents regions del sistema nerviós envelleixen a diferents graus possiblement degut a l'existència d'una vulnerabilitat neuronal regió-dependent.

En aquest sentit, la present tesi s'ha dissenyat amb l'objectiu de: i) definir les bases moleculars de la vulnerabilitat neuronal selectiva a l'estrès oxidatiu en regions específiques del sistema nerviós central (SNC) humà; ii) determinar l'efecte de l'envelliment del SNC humà; i iii) avaluar el mecanisme d'acció de la restricció de metionina en el SNC de rata, com a intervenció nutricional que redueix l'estrès oxidatiu i el grau d'envelliment. Per això s'han realitzat diferents estudis d'avaluació de: a) la vulnerabilitat estructural a l'estrès oxidatiu mitjançant una anàlisi de la susceptibilitat a la lesió oxidativa i el grau de lesió dels components estructurals que es tradueix en l'anàlisi d'àcids grassos de membrana, l'anàlisi de l'estat basal de la lesió oxidativa, glico- i lipoxidativa de proteïnes i l'anàlisi metabòlic del metabolisme bioenergètic, del metabolisme de la serina, glicina i treonina i del metabolisme d'un carboni; b) la vulnerabilitat funcional a l'estrès oxidatiu mitjançant l'anàlisi de factors associats a la funció mitocondrial i a factors de resistència a estrès i supervivència cel·lular; i c) la resposta adaptativa a nivell cerebral induïda per la restricció en metionina en rates envellides.

Els resultats obtinguts mostren l'existència d'una vulnerabilitat neuronal selectiva en les diferents regions del SNC humà. Dins d'aquestes característiques regió-específiques, en línies generals, s'observa que l'escorça frontal és la regió que presenta un perfil metabòlic i molecular més diferencial a la resta de regions que conformen el SNC humà. Així mateix, el seu procés d'envelliment induïx un augment de la lesió oxidativa amb l'edat, especialment a partir dels 60 anys, així com una resposta adaptativa dirigida a mantenir la supervivència neuronal. En aquest sentit hem observat que la restricció de metionina reverteix parcialment el canvi induït per l'envelliment en un model animal experimental.



## RESUMEN

El proceso de envejecimiento causa numerosos cambios en el organismo a todos los niveles de organización biológica (molecular, celular, orgánica y sistémica), reduce las capacidades funcionales máximas y la homeostasis, y aumenta la probabilidad de desarrollar enfermedades degenerativas. Todos estos cambios tienen probablemente su origen en un número pequeño de causas, que operan continuamente a lo largo de toda la vida y que a día de hoy todavía no se conocen al 100 %, pero parece que el estrés oxidativo juega un papel muy importante. Pérdidas cognitivas y psicomotoras son manifestaciones comunes del proceso de envejecimiento del sistema nervioso, sin embargo, el inicio y la severidad de tales pérdidas parecen ser relativamente independientes una de la otra, sugiriendo que diferentes regiones del sistema nervioso envejecen a diferentes grados posiblemente debido a la existencia de una vulnerabilidad neuronal región-dependiente.

En este sentido, la presente tesis se ha diseñado con el objetivo de: i) definir las bases moleculares de la vulnerabilidad neuronal selectiva al estrés oxidativo en regiones específicas del sistema nervioso central (SNC) humano; ii) determinar el efecto del envejecimiento del SNC humano; y iii) evaluar el mecanismo de acción de la restricción de metionina en el SNC de rata, como intervención nutricional que reduce el estrés oxidativo y la tasa de envejecimiento. Para ello se han realizado diferentes estudios de evaluación de: a) la vulnerabilidad estructural al estrés oxidativo mediante un análisis de la susceptibilidad a la lesión oxidativa y el grado de lesión de los componentes estructurales que se traduce en el análisis de ácidos grasos de membrana, el análisis del estado basal de la lesión oxidativa, glico- y lipoxidativa de proteínas y el análisis metabolómico del metabolismo bioenergético, del metabolismo de la serina, glicina y treonina y del metabolismo de un carbono; b) la vulnerabilidad funcional al estrés oxidativo mediante el análisis de factores asociados a la función mitocondrial y factores de resistencia a estrés y supervivencia celular; y c) la respuesta adaptativa a nivel cerebral inducida por la restricción de metionina en ratas envejecidas.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de una vulnerabilidad neuronal selectiva en las diferentes regiones del SNC humano. Dentro de estas características región-específicas, en líneas generales, se observa que la corteza frontal es la región que presenta un perfil metabolómico y molecular más diferencial al resto de regiones que conforman el SNC humano. Así mismo, su proceso de envejecimiento induce un aumento de la lesión oxidativa con la edad, especialmente a partir de los 60 años, así como una respuesta adaptativa dirigida a mantener la supervivencia neuronal. En este sentido hemos observado que la restricción de metionina revierte parcialmente el cambio inducido por el envejecimiento en un modelo animal experimental.



## ABSTRACT

The aging process causes numerous changes in the organism at all levels of biological organization (molecular, cellular, organic and systemic), reduced the maximum functional capabilities and homeostasis, and increases the probability of developing degenerative diseases. All these changes are likely to originate from a small number of causes, operating continuously throughout life span and without knowing all mechanism, however it seems that oxidative stress plays an important role. Losses in cognition and psychomotor functions are common manifestations in mammals, however, the onset and severity of such casualties seem to be relatively independent of each other, suggesting that different regions of the nervous system may undergo aging at different rates likely due to the existence of a region-dependent selective neuronal vulnerability.

In this sense, this thesis has been designed with the aim of: i) provide insights into the molecular basis of the selective neuronal vulnerability to oxidative stress in specific regions of the human central nervous system (CNS); ii) to determine the effect of aging in the human CNS; and iii) to evaluate the mechanism of action of methionine restriction in rat CNS, as nutritional intervention that decreases oxidative stress and aging rate. Thus, it will be evaluated: a) the structural vulnerability to oxidative stress by analysing the susceptibility and the degree of oxidative damage of the structural components through the lipidomic analysis of membrane fatty acids, the steady-state levels of protein oxidative, glyco- and lipoxidative damage, and the metabolomic analysis of intermediates from energy metabolism, serine, threonine and glycine metabolism and one-carbon metabolism; b) the functional vulnerability to oxidative stress by the analysis of the mitochondrial function-associated factor and stress resistance and cell survival factors; c) the brain adaptive response to a methionine restriction in aged rats.

The results show the existence of a selective neuronal vulnerability in different regions of the human CNS. In general, it is observed that the frontal cortex, within these region-specific features, is the region that has specific metabolomic and molecular hallmark comparing to all the other regions that comprise the human CNS. Furthermore, their intrinsic aging process leads to increased oxidative damage with age, especially after 60 years, as well as an adaptive response aimed at maintaining neuronal survival. Methionine restriction partially reversed the change induced due to aging in an experimental animal model.





## ÍNDEX



<b>ÍNDEX</b>	<b>17</b>
<b>Índex de taules</b>	<b>23</b>
<b>Índex de figures</b>	<b>25</b>
<b>ABREVIACIONS</b>	<b>31</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>37</b>
<b>2. METABOLISME ENERGÈTIC I ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Espècies reactives de primera i segona generació</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Sistemes de protecció cel·lular</b>	<b>45</b>
2.2.1. Resistència dels components estructurals al dany oxidatiu.	46
2.2.2. Aparició de mecanismes reguladors de la generació d'espècies reactives.	46
2.2.3. Diversitat d'antioxidants com a expressió de la varietat d'espècies reactives i les seves conseqüències moleculars.	47
2.2.4. Vies de transducció de senyals mitjançant l'activació de vies de supervivència	48
<b>2.3. Integració del metabolisme energètic i les defenses antioxidants a nivell neuronal</b>	<b>49</b>
<b>3. LÍPIDS EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Definició de lípids i classificació</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Composició lipídica del SNC Humà</b>	<b>53</b>
<b>3.3. Propietats funcionals dels lípids al cervell humà</b>	<b>57</b>
3.3.1. Integritat estructural i funcional de les membranes cel·lulars neuronals i gials	58
3.3.2. Senyalització lipídica en el cervell humà	63
3.3.3. Reactivitat química dels àcids grassos	68
<b>4. ESTRÈS OXIDATIU I ENVELLIMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Vulnerabilitat neuronal selectiva</b>	<b>73</b>
<b>5. RESTRICCIÓ DIETÀRIA I ENVELLIMENT</b>	<b>75</b>
<b>5.1. Restricció calòrica</b>	<b>75</b>
<b>5.2. Restricció Proteica i de metionina</b>	<b>77</b>
5.2.1. Importància de la metionina	79
5.2.2. Metabolisme de la metionina	79
<b>6. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>85</b>
<b>6.1. Hipòtesi de partida</b>	<b>85</b>
<b>6.2. Objectius</b>	<b>86</b>
6.2.1. Objectiu 1: Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà	86
6.2.2. Objectiu 2: Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà	86
6.2.3. Objectiu 3: Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà	86
6.2.4. Objectiu 4: Efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental	86

<b>7. DISSENY EXPERIMENTAL</b>	<b>89</b>
<b>7.1. Mostres <i>post-mortem</i> del sistema nerviós central humà</b>	<b>89</b>
7.1.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà	90
7.1.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà	90
7.1.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà	90
<b>7.2. Estudi en models animals: Efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental</b>	<b>93</b>
7.2.1. Animals	93
7.2.2. Dietes	94
<b>8. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>96</b>
<b>8.1. Anàlisi plasmàtic</b>	<b>96</b>
<b>8.2. Processament previ de la mostra</b>	<b>97</b>
8.2.1. Homogeneïtzació dels teixits	97
8.2.2. Quantificació de proteïnes	97
<b>8.3. Composició lipídica</b>	<b>98</b>
8.3.1. Preparació de la mostra	98
8.3.2. Sistema cromatogràfic	98
8.3.3. Condicions cromatogràfiques	99
8.3.4. Quantificació dels analits	99
8.3.5. Índexs calculats	100
<b>8.4. Quantificació del dany oxidatiu</b>	<b>101</b>
8.4.1. Preparació de la mostra	101
8.4.2. Sistema cromatogràfic	102
8.4.3. Condicions cromatogràfiques	102
8.4.4. Quantificació dels analits	103
8.4.5. Control de qualitat intern	103
<b>8.5. Immunodetecció per Western Blot</b>	<b>104</b>
8.5.1. Preparació de la mostra	104
8.5.2. Electroforesi	104
8.5.3. Electrotransferència	105
8.5.4. Bloqueig de la membrana	105
8.5.5. Immunodetecció	105
8.5.6. Revelat i anàlisi de dades	106
<b>8.6. Immunohistoquímica</b>	<b>107</b>
<b>8.7. PCR en temps real o Q-PCR</b>	<b>108</b>
8.7.1. Extracció total de l'àcid ribonucleic (RNA)	108
8.7.2. Purificació del RNA	108
8.7.3. Quantificació de la concentració d'àcids nucleics	109
8.7.4. Transcripció inversa de l'àcid ribonucleic	109
8.7.5. PCR a temps real	111
<b>8.8. Anàlisi metabolòmic</b>	<b>112</b>
8.8.1. Preparació de la mostra	113
8.8.2. Anàlisi de metabolòmica dirigida	113
8.8.3. Anàlisi de metabolòmica no dirigida	114
<b>8.9. MÈTODES ESTADÍSTICS</b>	<b>118</b>

<b>9. RESULTATS</b>	<b>123</b>
<b>9.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà</b>	<b>123</b>
9.1.1. Anàlisi composicional dels àcids grassos	123
9.1.2. Dany oxidatiu	130
9.1.4. Immunohistoquímica	134
<b>9.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà</b>	<b>137</b>
9.2.1. Estudi metabolòmic dirigit	137
9.2.2. Immunodetecció per Western Blot	141
9.2.3. Metabolòmica no dirigida	143
<b>9.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà</b>	<b>146</b>
9.3.1. Estudi lipídic	146
9.3.1.4. Expressió del RNA missatger	153
9.3.2. Estudi del dany oxidatiu	155
<b>9.4. Estudi de l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental</b>	<b>162</b>
9.4.1. Animals	162
9.4.2. Anàlisi composicionals dels àcids grassos	163
9.4.2. Dany oxidatiu	168
<b>10. DISCUSSIÓ</b>	<b>175</b>
<b>10.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà</b>	<b>175</b>
<b>10.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà</b>	<b>181</b>
<b>10.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà</b>	<b>185</b>
<b>10.4. Estudi de l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental</b>	<b>192</b>
<b>11. CONCLUSIONS</b>	<b>199</b>
<b>12. REFERÈNCIES</b>	<b>203</b>
<b>13. ANNEX</b>	<b>227</b>
13.1. ANNEX 1	227
13.2. ANNEX 2	230
13.3. ANNEX 3	233
13.4. ANNEX 4	234
13.5. ANNEX 5	260
<b>ARTICLES</b>	<b>227</b>



## Índex de taules

Taula 1. Contingut i composició en àcids grassos dels principals glicerofosfolípids en cervell humà. _	56
Taula 2. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi de la vulnerabilitat neuronal selectiva del SNC humà. _____	91
Taula 3. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi metabòlic del SNC humà. _____	92
Taula 4. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi de l'envelliment en el SNC humà. ____	92
Taula 5. Composició de les dietes ingerides pels tres grups experimentals en la intervenció nutricional de restricció de metionina (RMet) del 80 %. _____	95
Taula 6. FAMEs identificats en un cromatograma per GC-FID. _____	99
Taula 7. Ions (m/z) dels analits mesurats mitjançant GC/MS. _____	103
Taula 8. Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència. _____	106
Taula 9. Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència. _____	107
Taula 10. Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunohistoquímica. _____	108
Taula 11. Característiques dels casos utilitzats en l'estudi de l'expressió del RNA missatger. _____	110
Taula 12. Components 2X RT Master Mix. _____	110
Taula 13. Sondes TaqMan® (Applied Biosystems) per a l'anàlisi PCR en temps real. _____	111
Taula 14. Característiques cromatogràfiques dels analits detectats en l'estudi metabòlic del SNC humà. _____	116
Taula 15. Perfil composicional en àcids grassos de 12 regions del SNC humà adult. _____	124
Taula 16. Índexs derivats de la composició en àcids grassos en 12 regions del SNC humà adult. ____	124
Taula 17. Estimació de l'activitat desaturasa en 12 regions del SNC humà adult. _____	129
Taula 18. Estimació de l'activitat elongasa en 12 regions del SNC humà adult. _____	129
Taula 19. Estimació de l'activitat $\beta$ -oxidació Peroxisomal en 12 regions del SNC humà adult. ____	129
Taula 20. Marcadors de dany oxidatiu en 12 regions del SNC humà adult: una aproximació comparada interregional. _____	129
Taula 21. Composició en àcids grassos dels lípids de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	147
Taula 22. Estimació de l'activitat desaturasa de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. ____	150
Taula 23. Estimació de l'activitat elongasa de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. ____	150
Taula 24. Estimació de l'activitat de la $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	150
Taula 25. Pes corporal, anàlisi bioquímica dels nivells de proteïna total, albúmina, triglicèrids, colesterol, glucosa i les hormones leptina i adiponectina en plasma de rates adultes control, velles control i velles RMet. _____	162





## Índex de figures

Figura 1. Esquema de la cadena de transport electrònic. _____	40
Figura 2. Estructures químiques dels productes intermediaris de segona generació detectats en cervell humà _____	42
Figura 3. Esquema dels marcadors de dany oxidatiu estudiats en la present tesi. _____	44
Figura 4. Potencials efectes de la modificació d'aminofosfolípids mitjançant reaccions carbonil-amina en les membranes biològiques. _____	45
Figura 5. Esquema de la modulació de la producció de ROS vehiculada per proteïnes desacobladores (UCPs). _____	47
Figura 6. Esquema de l'activitat del factor de transcripció Nrf2. _____	48
Figura 7. Esquema simplificat de la via de senyalització PI3K/PKB que regula mTOR. _____	49
Figura 8. Esquema representatiu del metabolisme de la glucosa, incloent la glucòlisi citoplasmàtica, la via de les pentoses fosfat, el cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons. _____	50
Figura 9. A) Unitats lipídiques bàsiques: grups cetoacils i grups isoprens. B) Principals lípids cerebrals en humans adults: 1) àcids grassos que contenen un grup carboxílic unit a una cadena alifàtica. _____	54
Figura 10. Biosíntesis d'àcids grassos de cadena llarga i molt llarga en mamífers. _____	60
Figura 11. Esquema de la maquinària de la $\beta$ -oxidació peroxisomal. _____	61
Figura 12. Esquema del moviment de l'àcid docosahexaenoic (DHA) (22:6 n-3) a través de la unitat neurovascular i la seva disposició dins de les neurones i els astròcits. _____	63
Figura 13. Mediadors lipídics representatius de glicerofosfolípids, fosfolípids i derivats del colesterol, i el seu paper en el cervell humà. _____	64
Figura 14. Esquema del metabolisme de l'àcid araquidònic que mostra diferents metabòlits formats a partir d'ella. _____	66
Figura 15. Biosíntesi de mediadors lipídics derivats del metabolisme de: l'àcid linoleic (verd), l'àcid dihomogamma-linolènic (vermell), l'àcid araquidònic (blau), l'àcid eicosapentaenoic (taronja), l'àcid docosahexaenoic (groc), i l'àcid $\alpha$ -linolènic (lila) a través dels enzims lipoxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX), i citocrom P450 (CYP450). _____	67
Figura 16. Esquema de les reaccions principals que es produeixen durant la peroxidació lipídica. ____	69
Figura 17. Esquema del cicle desacilació i reacilació. _____	70
Figura 18. Esquema del metabolisme de la metionina. _____	80
Figura 19. Tall sagital del sistema nerviós central de rata. _____	95
Figura 20. Programa del termociclador per a l'obtenció de cDNA mitjançant la retrotranscripció. __	110
Figura 21. Estructura química de la fenilalanina marcada isotòpicament amb un $^{13}\text{C}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya). _____	113
Figura 22. Longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos analitzats en 12 regions del SNC humà adult. _____	125
Figura 23. Contingut d'àcids grassos saturats (AGS) en 12 regions del SNC humà adult. _____	125
Figura 24. Contingut d'àcids grassos insaturats (AGI) en 12 regions del SNC humà adult. _____	126
Figura 25. Contingut d'àcids grassos monoinsaturats (AGMI) en 12 regions del SNC humà adult. _	126

Figura 26. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) en 12 regions del SNC humà adult.	126
Figura 27. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) en 12 regions del SNC humà adult.	127
Figura 28. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) en 12 regions del SNC humà adult.	127
Figura 29. Índex de dobles enllaços (IDE) en 12 regions del SNC humà adult.	128
Figura 30. Índex de peroxidabilitat (IP) en 12 regions del SNC humà adult.	128
Figura 31. Nivell del marcador N <sup>ε</sup> -malondialdehid-lisina (MDAL) en 12 regions del SNC humà adult.	130
Figura 32. Nivell del marcador N <sup>ε</sup> -carboximetil-lisina (CML) en 12 regions del SNC humà adult.	131
Figura 33. Nivells del marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC) en 12 regions del SNC humà adult.	132
Figura 34. Expressió dels enzims desaturases i elongases implicades en la desaturació i allargament dels àcids grassos de 4 regions del SNC humà adult.	133
Figura 35. Expressió de les proteïnes implicades en la β-oxidació peroxisomal, involucrades en el metabolisme dels àcids grassos i la seva síntesis, de 4 regions del SNC humà adult.	133
Figura 36. Expressió de la proteïna FADS2 de 9 regions del SNC humà adult.	134
Figura 37. Expressió de la proteïna ACAA1 de 9 regions del SNC humà adult.	135
Figura 38. Expressió del factor NRF2 de 9 regions del SNC humà adult.	136
Figura 39. Contingut de neurones i cèl·lules de la glia de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	137
Figura 40. Concentracions tissulars de metabòlits implicats en el metabolisme bioenergètic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	138
Figura 41. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme serina, glicina i treonina de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	139
Figura 42. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme de la metionina, incloent el cicle de la metionina i la via de transsulfuració, de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	140
Figura 43. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme de les purines de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	141
Figura 44. Expressió de dos factors de transcripció de resistència a estrès oxidatiu de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	142
Figura 45. Expressió de les proteïnes catalitzadores de la descomposició del peròxid d'hidrogen (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) i el superòxid (O <sup>2-</sup> ) de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	142
Figura 46. Expressió d'una proteïna implicada en la supervivència cel·lular de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	143
Figura 47. Perfil metabolòmic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.	144
Figura 48. Perfil metabolòmic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Representació tridimensional dels anàlisis PCA i PLS-DA.	145
Figura 49. Relació de la longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos de l'escorça frontal humana amb l'edat.	147

Figura 50. Contingut d'àcids grassos saturats (AGS) i contingut d'àcids grassos insaturats (AGI) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. _____	148
Figura 51. Contingut d'àcids grassos monoinsaturats (AGMI) i contingut d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. _____	148
Figura 52. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) i contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. _____	149
Figura 53. Índex de dobles enllaços (IDE) i índex de peroxidabilitat (IP) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. _____	149
Figura 54. Relació del marcador N <sup>e</sup> -malondialdehid-lisina (MDAL) de l'escorça frontal humana amb l'edat. _____	151
Figura 55. Expressió de les proteïnes desaturases i elongases implicades en la dessaturació i allargament dels àcids grassos de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	152
Figura 56. Expressió de les proteïnes implicades en la $\beta$ -oxidació peroxisomal, involucrades en el metabolisme dels àcids grassos poliinsaturats i la seva síntesis, de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	152
Figura 57. Expressió de proteïnes de caràcter antiinflamatori de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les proteïnes detectades són la lipoxigenasa 15 i el citocrom p450 2J2. _____	153
Figura 58. Expressió de proteïnes de caràcter proinflamatori participes del metabolisme de l'àcid araquidònic de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	153
Figura 59. Expressió relativa del mRNA dels gens FADS1, FADS2 i ELOVL2 de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	154
Figura 60. Expressió relativa del mRNA dels gens Lipoxigenasa 15, Citocrom p450 2J2 i NF- $\kappa$ B de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	154
Figura 61. Relació dels marcadors semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA) de l'escorça frontal humana amb l'edat. _____	155
Figura 62. Relació del marcador N <sup>e</sup> -Carboxietil-lisina (CEL) de l'escorça frontal humana amb l'edat. _____	156
Figura 63. Relació dels marcadors S-carboximetil-cisteïna (CMC) i N <sup>e</sup> -carboximetil-lisina (CML) de l'escorça frontal humana amb l'edat. _____	156
Figura 64. Relació del marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC) de l'escorça frontal humana amb l'edat. _____	157
Figura 65. Expressió dels diferents complexos de la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa (I, II, III, IV, ATPasa), i AIF presents en l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	158
Figura 66. Expressió del factor de resistència a l'estrès oxidatiu i supervivència cel·lular de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les proteïnes detectades són REST, Akt i mTOR P/T. _____	159
Figura 67. Relació entre l'estat basal dels marcadors específics de dany oxidatiu a proteïnes –SAG i SAAA- i l'expressió del factor de resistència a l'estrès oxidatiu –REST-. _____	159
Figura 68. Expressió relativa del mRNA dels gens NDUFA9 i ATP5B de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	160
Figura 69. Expressió relativa del mRNA dels gens REST, AKT i mTOR de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	160
Figura 70. Expressió de proteïnes implicades en la producció de radicals lliures, inflamació, resistència i supervivència a l'estrès en teixit d'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. _____	161

Figura 71. Longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos en 13 regions del SNC de rata. _	163
Figura 72. Contingut en àcids grassos saturats (AGS) en 13 regions del SNC de rata. _____	164
Figura 73. Contingut en àcids grassos insaturats (AGI) en 13 regions del SNC de rata. _____	164
Figura 74. Contingut en àcids grassos monoinsaturats (AGMI) en 13 regions del SNC de rata. _____	165
Figura 75. Contingut en àcids grassos poliinsaturats (AGPI) en 13 regions del SNC de rata. _____	165
Figura 76. Contingut en àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) en 13 regions del SNC de rata. _____	166
Figura 77. Contingut en àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) en 13 regions del SNC de rata. _____	166
Figura 78. Índex de dobles enllaços (IDE) en 13 regions del SNC de rata.. _____	167
Figura 79. Índex de peroxidabilitat lipídica (IP) en 13 regions del SNC de rata. _____	167
Figura 80. Nivells de Semialdehid Glutàmic en 13 regions del SNC de rata. _____	168
Figura 81. Nivells de N <sup>è</sup> -Carboxietil-lisina en 13 regions del SNC de rata. _____	169
Figura 82. Nivells de N <sup>è</sup> -Malondialdehid-lisina en 13 regions del SNC de rata. _____	169
Figura 83. Nivells de N <sup>è</sup> -Carboximetil-lisina en 13 regions del SNC de rata. _____	170
Figura 84. Nivells de S-(2-succinil)-L-cisteïna en 13 regions del SNC de rata. _____	171

## **ABREVIACIONES**



## ABREVIACIONS

<b>8-oxodG</b>	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
<b>AA</b>	Àcid araquidònic
<b>ACAA</b>	De l'anglès, <i>acetyl-CoA C-acyltransferase</i>
<b>ACOX</b>	De l'anglès, <i>acyl-CoA oxidase</i>
<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>AGE</b>	Productes finals de glicoxidació avançada; de l'anglès, <i>advanced glycoxidation end-products</i>
<b>AGI</b>	Àcids grassos insaturats
<b>AGMI</b>	Àcids grassos monoinsaturats
<b>AGS</b>	Àcids grassos saturats
<b>AGPI</b>	Àcids grassos poliinsaturats
<b>AHAV</b>	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric
<b>AHAC</b>	Àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic
<b>AIF</b>	Factor inductor d'apoptosis; de l'anglès, <i>apoptosis inducing factor</i>
<b>AKT</b>	Protein kinase B
<b>ALEs</b>	Productes finals de lipoxidació avançada; de l'anglès, <i>advanced lipoxidation end-products</i>
<b>ANOVA</b>	Anàlisi de variància; de l'anglès, <i>analysis of variance</i>
<b>ATP</b>	Trifosfat d'adenosina; de l'anglès, <i>adenosine triphosphate</i>
<b>BDNF</b>	De l'anglès, <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BHMT</b>	De l'anglès, <i>betaine-homocysteine methyltransferase</i>
<b>BHT</b>	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina; de l'anglès, <i>bovine serum albumin</i>
<b>cDNA</b>	Àcid desoxiribonucleic complementari; de l'anglès, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
<b>CEL</b>	N <sup>ε</sup> -(carboxietil)-D,L-lisina
<b>CL</b>	Cardiolipina
<b>CMC</b>	S-(carboximetil)-cisteïna
<b>CML</b>	N <sup>ε</sup> -(carboximetil)-lisina
<b>CMR<sub>glc</sub></b>	De l'anglès, <i>cerebral metabolic rate of glucose</i>
<b>COX</b>	Ciclooxigenases
<b>CYP450</b>	Citocrom P450
<b>DBP</b>	De l'anglès, <i>D-bifunctional protein</i>
<b>DHA</b>	Àcid docosahexaenoic; de l'anglès, <i>docosahexaenoic acid</i>
<b>DMS</b>	Diferència mínima significativa
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic; de l'anglès, <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DTPAC</b>	Àcid dietilenetriaminopentaacètic; de l'anglès, <i>dethyl-triamine-penta acetic acid</i>
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiamintetraacètic; de l'anglès, <i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>



<b>ELOVL</b>	De l'anglès, <i>elongation of very-long-chain fatty acids</i>
<b>EETs</b>	Epoxigenases; de l'anglès, <i>epoxyeicosatrienoic acids</i>
<b>EPA</b>	Àcid eicosapentaenoic; de l'anglès, <i>eicosapentanoic acid</i>
<b>ESI</b>	De l'anglès, <i>electrospray ionization</i>
<b>FAD/FADH<sub>2</sub></b>	Flavina adenina dinucleòtid
<b>FADS</b>	De l'anglès, <i>fatty acid desaturation</i>
<b>FAME</b>	De l'anglès, <i>fatty acid methyl esters</i>
<b>FAS</b>	Àcid gras sintetasa; de l'anglès, <i>fatty acid synthase</i>
<b>FoxO</b>	De l'anglès, <i>forkhead Box Protein O</i>
<b>GAM</b>	Model additiu generalitzat; de l'anglès, <i>generalized additive model</i>
<b>GC/MS</b>	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses; de l'anglès, <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
<b>GFAP</b>	De l'anglès, <i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GPx</b>	Glutació peroxidasa
<b>GPx4</b>	De l'anglès, <i>phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase</i>
<b>GSH</b>	Glutació
<b>HETEs</b>	Hidroieicosatrienoics; de l'anglès, <i>hydroxyeicosatetraenoic acids</i>
<b>HHE</b>	4-hidroxi-2-hexenal
<b>HMDB</b>	Base de dades del metaboloma humà; de l'anglès, <i>the Human Metabolome Database</i>
<b>HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>IDE</b>	Índex de dobles enllaços
<b>IGF-1</b>	De l'anglès, <i>insulin-like growth factor-1</i>
<b>IP</b>	Índex de peroxidabilitat
<b>IUPAC-IUBMB</b>	De l'anglès, <i>the international union of pure and applied chemists and the international union of biochemistry and molecular biology</i>
<b>LC ESI-QQQ MS/MS</b>	Cromatografia líquida amb ionització per electroesprai acoblada a un triple quadrupol amb detecció per espectrometria de masses; de l'anglès, <i>liquid chromatography with electrospray ionization coupled to triple quadrupole mass spectrometry</i>
<b>LC ESI-QTOF MS/MS</b>	Cromatografia líquida amb ionització per electroesprai acoblada a un quadrupol de temps de vol amb detecció per espectrometria de masses; de l'anglès, <i>liquid chromatography with electrospray ionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
<b>lm</b>	Model lineal; de l'anglès, <i>lineal model</i>
<b>LMC</b>	Longitud mitjana de la cadena
<b>LOX</b>	Lipoxigenases
<b>LTB</b>	Leucotriens B
<b>LXA</b>	Lipoxines; de l'anglès, <i>lipoxin</i>
<b>m/z</b>	massa/càrrega
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>MDAL</b>	N <sup>ε</sup> -malondialdehid-lisina

<b>MOPS</b>	De l'anglès, <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
<b>MRM</b>	De l'anglès, <i>multiple reaction monitoring</i>
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucleic missatger; de l'anglès, <i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>mTOR</b>	De l'anglès, <i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidasa
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear (ND-E2); de l'anglès, <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
<b>ONE</b>	4-oxo-2-nonenal
<b>PC</b>	De l'anglès, <i>phosphatidylcholine</i>
<b>PCA</b>	De l'anglès, <i>principal component analysis</i>
<b>PCR</b>	De l'anglès, <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PE</b>	De l'anglès, <i>phosphatidylethanolamine</i>
<b>PET</b>	De l'anglès, <i>positron emission tomography</i>
<b>PG</b>	Prostaglandines
<b>PGC-1 <math>\alpha</math></b>	De l'anglès, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandines pro-inflamatòries E <sub>2</sub>
<b>PI</b>	De l'anglès, <i>phosphatidylinositol</i>
<b>PI3K/PKB</b>	De l'anglès, <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase and protein kinase B</i>
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> ; de l'anglès, <i>phospholipase A2</i>
<b>PLS-DA</b>	De l'anglès, <i>partial-least-square discriminant analyses</i>
<b>PPARs</b>	De l'anglès, <i>peroxisome proliferator activated receptors</i>
<b>PS</b>	De l'anglès, <i>phosphatidylserine</i>
<b>RC</b>	Restricció calòrica
<b>RCS</b>	Espècies carboníliques; de l'anglès, <i>reactive carbonyl species</i>
<b>REST</b>	De l'anglès, <i>RE1 silencing transcription factor</i>
<b>RIN</b>	De l'anglès, <i>RNA integrity number</i>
<b>RMet</b>	Restricció de metionina
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic; de l'anglès, <i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen; de l'anglès, <i>reactive oxygen species</i>
<b>RP</b>	Restricció proteica
<b>RT</b>	Retrotranscripció; de l'anglès, <i>reverse transcriptase</i>
<b>SAAA</b>	Semialdehid amino-adípic
<b>SAG</b>	Semialdehid glutàmic
<b>SAH</b>	S-adenosil-homocisteïna
<b>SAM</b>	S-adenosil-metionina
<b>SCP</b>	De l'anglès, <i>sterol carrier protein</i>
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfat de sodi; de l'anglès, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SIM</b>	Monotorització de ions específics seleccionats; de l'anglès, <i>selected ion monitoring</i>

<b>SIRT1</b>	Sirtuína-1 deacetilasa dependent de NAD
<b>SNC</b>	Sistema nerviós central
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>SREBP</b>	De l'anglès, <i>sterol regulatory element-binding protein</i>
<b>TFAME</b>	Trifluoroacètic metil esters; de l'anglès, <i>trifluoroacetyl methyl ester</i>
<b>THF</b>	Tetrahidrofolat
<b>TR</b>	Temps de retenció
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometà
<b>TXB</b>	Tromboxans B
<b>UCPs</b>	Proteïna desacopladora; de l'anglès, <i>uncoupling protein</i>
<b>UPLC</b>	Cromatografia líquida d'ultra alta resolució; de l'anglès, <i>ultra performance liquid chromatography</i>
<b>VLCFA</b>	De l'anglès, <i>very long chain fatty acids</i>

## **INTRODUCCIÓ**



## 1. INTRODUCCIÓ

L'envelliment de la població mundial - en els països desenvolupats i en vies de desenvolupament - és un indicador de la millora en la salut en el món. Les projeccions demogràfiques dibuixen un escenari pel 2050 en el món amb més de 2.000 milions de persones de més de 60 anys i una expectativa de vida en el moment del naixement de més de 80 anys (Harper, 2014). Aquest èxit de la societat és deu molt especialment als avenços de la medicina, no obstant això, aquest fet és un repte sociosanitari, ja que amb l'edat augmenta la freqüència de malalties metabòliques i degeneratives.

Tot i que el procés d'envelliment ha intrigat als científics i ciutadans durant segles i mil·lennis, no ha estat fins fa relativament poc que s'ha convertit en una qüestió científica de primera magnitud, amb la idea d'aconseguir viure, sinó més, sí amb la millor qualitat de vida possible. El procés d'envelliment causa nombrosos canvis a l'organisme a tots els nivells d'organització biològica (molecular, cel·lular, orgànica i sistèmica), redueix les capacitats funcionals màximes i l'homeòstasi, i augmenta la probabilitat de desenvolupar malalties degeneratives i finalment la mort. Tots aquests canvis tenen probablement el seu origen en un nombre petit de causes, que operen contínuament al llarg de tota la vida i que a dia d'avui encara no es coneixen al 100 %, però sembla que l'estrès oxidatiu hi juga un paper molt important.

Un dels sistemes més afectats en l'envelliment és el Sistema Nerviós Central (SNC). Aquest envelliment cerebral és el principal factor de risc de diverses malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat que en aquests darrers anys han pres una rellevància molt important degut al seu creixement exponencial. Una de les malalties d'afectació cerebral amb més incidència en l'actualitat és l'Alzheimer. Aquesta malaltia afecta a dia d'avui a 44 milions de persones a tot el món, i s'espera el seu creixement fins a 135 milions de persones al 2050 (Prince et al., 2013), fet que la convertirà en una de les malalties més importants del segle XXI.

El SNC humà, constituït per l'encèfal i la medul·la espinal, engloba al voltant de 100 mil milions de neurones encarregades de realitzar una àmplia gamma de funcions motores, sensorials, reguladores, conductuals i cognitives. Totes aquestes funcions són producte d'activitats moleculars que succeeixen en les cèl·lules nervioses, i que depenen de la complexa organització de grups de poblacions neuronals compostes, al seu torn, d'una diversitat de cèl·lules no neuronals.

Les neurones del SNC es diferencien morfològicament en grandària, nombre de dendrites, complexitat de l'arbre dendrític, nombre i tipus de connexions sinàptiques, longitud axonal, i el grau de mielinització axonal entre altres característiques cel·lulars i subcel·lulars. A més, des d'un punt de vista fisiològic, la

diversitat neuronal és significativament expressada per l'especificitat química que confereixen els neurotransmissors utilitzats per a la transmissió química i la neuromodulació, així com per les propietats elèctriques. Aquesta diversitat estructural i funcional suggereix que, tot i que totes les neurones tenen un codi genètic idèntic, cada tipus neuronal té el seu propi perfil d'expressió genòmica.

De fet, dels 20.000 gens estudiats en l'*Allen Brain Atlas project*, aproximadament el 80 % d'aquests gens mostren alguna expressió cel·lular en el cervell, amb la majoria dels gens expressats en un nombre relativament petit de cèl·lules. Específicament, el 70,5 % dels gens s'expressen en menys d'un 20 % de les cèl·lules totals. D'altra banda, els gens que s'expressen en un major nombre de cèl·lules són els relacionats amb el metabolisme cel·lular (Hawrylycz et al., 2012; Lein et al., 2007). El perfil genòmic neuronal configura un patró transcriptòmic i proteòmic que, al seu torn, s'expressa i es tradueix en un perfil metabolòmic específic de neurona. Conseqüentment, el perfil de metabòlits pot ser utilitzat no solament com una font de potencials marcadors en la pràctica clínica, sinó també com una aproximació generadora d'hipòtesis que podrien ajudar a entendre l'envelliment i la neurodegeneració (Jové et al., 2014; Naudí et al., 2015; Patti et al., 2012).

En aquest escenari de diversitat cel·lular emergeix el concepte de vulnerabilitat neuronal selectiva que es refereix a la diferent sensibilitat de les poblacions neuronals en el SNC enfront als factors que causen dany o mort cel·lular i condueixen a l'envelliment i la neurodegeneració (Jové et al., 2014; Mattson and Magnus, 2006; Wang and Michaelis, 2010). El fet que regions específiques del sistema nerviós mostrin vulnerabilitats diferencials a diferents malalties neurodegeneratives és un reflex de l'especificitat tant de l'etiologia de cada malaltia com de la heterogeneïtat de les respostes neuronals en processos de dany cel·lular associats a cada malaltia (Martínez et al., 2010). És a dir, l'aparició del concepte de vulnerabilitat neuronal selectiva no es limita a les diferències regionals del SNC, sinó que la vulnerabilitat neuronal selectiva també es manifesta com a diferències internes de les regions, les quals tenen diferents sensibilitats a l'estrès i a les malalties (Jové et al., 2014; Martínez et al., 2010; Naudí et al., 2015; Wang and Michaelis, 2010).

Així doncs, l'objectiu d'aquesta tesis doctoral és investigar el laberint de les bases moleculars que caracteritzen la vulnerabilitat neuronal selectiva en el SNC, els seus canvis dependents de l'edat i la possibilitat de modular-los, ja que pot ser clau per endarrerir aquest procés i reduir significativament la incidència de les malalties neurodegeneratives.

## 2. METABOLISME ENERGÈTIC I ESTRÈS OXIDATIU

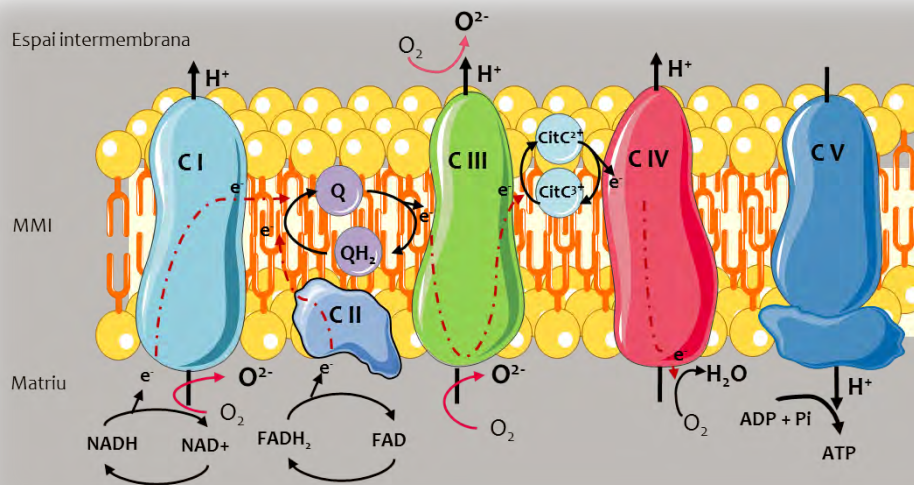
L'evolució en l'ús de l'oxigen per a una producció energètica més eficient va representar una innovació evolutiva transcendental, i una força motriu per a l'evolució dels organismes complexos que exigien canvis adaptatius en els sistemes estructurals i funcionals (Dowling and Simmons, 2009; Embley and Martin, 2006; Lane, 2002; McCord, 2000; Pamplona and Costantini, 2011). Les reaccions de tipus redox vinculades amb l'ús de l'oxigen són les responsables de la producció d'espècies reactives, que poden actuar com a segons missatgers en les xarxes de transduccions de senyals. Aquestes espècies reactives tenen funcions claus en condicions fisiològiques. Tanmateix, les espècies reactives també poden tenir efectes perjudicials causats per la modificació química de components cel·lulars (Dowling and Simmons, 2009; Halliwell and Gutteridge, 2007; Pamplona and Costantini, 2011). Com a conseqüència, la vida aeròbica ha requerit l'aparició i selecció de sistemes de defensa antioxidants (Halliwell, 1999), i consegüentment s'han seleccionat i incorporat a nivell cel·lular una gran diversitat de defenses antioxidants estructurals i moleculars (Pamplona and Costantini, 2011). En aquest sentit, totes les evidències indiquen que l'aparició i l'evolució del SNC són paral·leles a l'evolució fisiològica.

L'evolució humana es caracteritza per la ràpida expansió de la grandària del cervell i un elevat augment de les capacitats cognitives, fet que ha donat lloc a les úniques i complexes habilitats cognitives dels éssers humans. Aquesta evolució sempre s'ha relacionat amb els canvis en el metabolisme del cervell, particularment vinculats a un increment de la demanda energètica (Fu et al., 2011; Somel et al., 2013). De fet, els cervells grans, amb referència a l'esperat per la mida corporal de l'animal, són un dels òrgans metabòlicament més costosos integrats per les cèl·lules amb més demanda energètica -les neurones-. En els humans, aproximadament el 20 % de l'energia total és utilitzada en el cervell, mentre que si ho comparem amb el consum cerebral energètic dels simis (de l'11 al 13 %) i d'altres espècies de mamífers (del 2 al 8 %), s'observa la sorprenent evolució humana en la complexitat del SNC (Aiello and Wheeler, 1995; Mink et al., 1981). Aquest augment de la demanda metabòlica està associada a una elevada expressió de gens implicats en les funcions neuronals i en el metabolisme energètic, fet que porta a perfils metabòlics específics (Fu et al., 2011; Somel et al., 2013). Així doncs, tot i que les vies metabòliques imprescindibles per al funcionament cerebral (per exemple, metabolisme energètic, síntesis i degradació de neurotransmissors i biosíntesis de proteïnes i lípids) són altament conservades a través de diversos tàxons, algunes troballes suggereixen que el metabolisme cerebral pot haver experimentat canvis adaptatius (Jové et al., 2014).

Una conseqüència d'això és la vulnerabilitat de les neurones als canvis en l'homeòstasi energètica i a l'estrès oxidatiu. En les neurones, aproximadament entre el 85 i el 90 % de l'oxigen cel·lular és consumit per les mitocondries per tal de produir energia mitjançant la fosforilació oxidativa. La



utilització d'equivalents metabòlics com la nicotinamida adenina dinucleòtid (NADH) i la flavina adenina dinucleòtid (FADH<sub>2</sub>), produïts en el cicle de Krebs, en la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos i en el catabolisme d'aminoàcids com a substrats per a diferents components de la cadena de transport electrònic, permeten la transferència electrònica i la posterior obtenció de molècules d'adenosina trifosfat (ATP; de l'anglès, *adenosine triphosphate*) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de la cadena de transport electrònic.** Està formada principalment per quatre complexos amb diferents subunitats: I (NADH deshidrogenasa), II (Succinat deshidrogenasa), III (Ubiquinol-citocrom c oxidoreductasa) i IV (Citocrom c oxidasa). Dos transportadors electrònics: coenzim Q, transporta electrons des del complex I i II al III, i el citocrom c els transporta del complex III al IV, on els electrons es combinen amb l'oxigen per formar aigua. L'energia alliberada pel transport d'electrons s'utilitza per bombar protons, creant així un gradient de protons que possibilita la generació d'ATP pel complex V (ATP sintasa) (Lenaz, 2012). MMI: Membrana mitocondrial interna; C: Complex respiratori; Q: Coenzim Q; QH<sub>2</sub>: ubiquinol; CitC: Citocrom C.

Un important efecte secundari de la producció d'ATP és la formació de les espècies reactives. I és que les espècies reactives –radicals lliures i substàncies electròfiles– amb capacitat per modificar els constituents cel·lulars –proteïnes, àcids nucleics, lípids i carbohidrats– són generades contínuament durant els processos metabòlics normals. En molts casos, les espècies reactives generades inicialment converteixen determinats constituents cel·lulars en espècies reactives de segona generació també amb capacitat per induir dany, expandint i amplificant la lesió inicial (Naudí et al., 2009).

## 2.1. Espècies reactives de primera i segona generació

La majoria de les espècies reactives denominades radicals lliures, o de primera generació, són produïdes inevitablement com a conseqüència de la nostra existència en un ambient aeròbic. Un radical lliure és un àtom o molècula amb existència independent i efímera que conté un o més electrons desaparellats

en el seu orbital més extern, fet que li confereix una gran inestabilitat, reactivitat i capacitat potencial per modificar químicament qualsevol macromolècula biològica. Així doncs, la utilització de l'oxigen per a la producció d'energia ens col·loca en situació de risc a causa de la generació d'oxidants reactius que són productes derivats de la reducció de l'oxigen. Entre ells destaquen tres espècies reactives de l'oxigen (ROS; de l'anglès, *reactive oxygen species*): el radical superòxid, el radical hidroxil altament reactiu i el no-radical peròxid d'hidrogen. Altres ROS, rellevants en termes biològics i especialment a nivell del SNC són el radical peroxil, l'òxid nítric i derivats (per exemple, peroxinitrit) i l'oxigen singlet (Halliwell and Gutteridge, 2007). Els ROS poden generar-se en llocs i condicions diverses com a resultat de l'activitat de múltiples sistemes enzimàtics. No obstant això, en condicions fisiològiques la majoria dels ROS tenen com a principal font de producció els complexos I i III de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Barja, 2004, 1999; Pamplona and Barja, 2006). Especialment, el complex I és el generador més determinant de ROS en les mitocondries de cèl·lules sanes i sembla ser que, dins de la mitocondria, els llocs d'unió per a NADH i per a la quinona són els principals llocs de producció de radicals (Barja, 2013; Hirst et al., 2008).

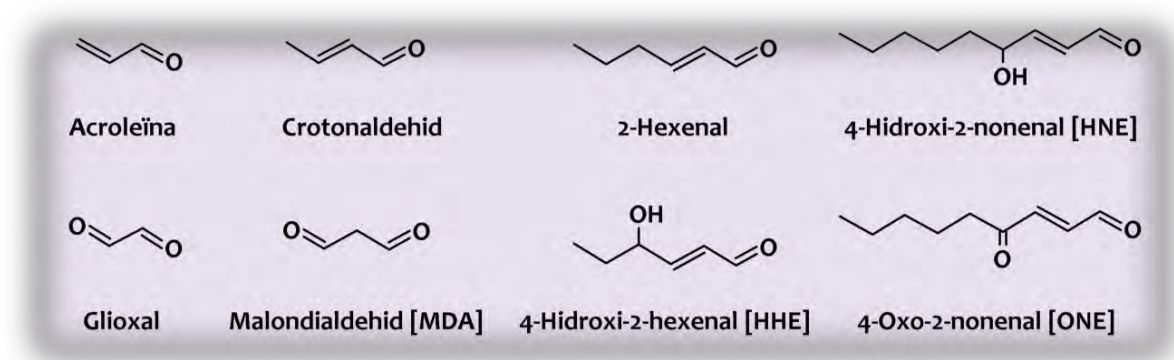
Existeixen però, diferents mecanismes fisiològics que poden influir en la major o menor producció mitocondrial de ROS. El grau de reducció electrònic dels portadors de la cadena de transport, la pressió parcial de l'oxigen en la mitocondria, la regulació de les proteïnes UCPs (de l'anglès, *uncoupling protein*) i les modificacions postraduccionals en són un exemple (Pamplona and Costantini, 2011). En una situació d'alt consum d'oxigen, la cadena de transport funciona ràpid, els portadors electrònics no es troben molt temps en estat reduït i la reducció de l'oxigen és ràpida i en abundància, fet que fa que sigui baixa la concentració d'oxigen molecular en la mitocondria i el grau de reducció dels portadors. Així doncs, aquests fets no afavoreixen la producció del radical superòxid i per tant, hi ha una major eficiència i una menor producció de ROS (Barja, 2013, 2007).

Tot i que el consum d'oxigen mitocondrial i la producció de ROS es modulen de forma independent (Barja, 2013, 2007), les mitocondries cerebrals mostren una taxa més elevada de producció de ROS en comparació amb altres teixits -almenys en rosegadors- (Mink et al., 1981). En aquest sentit, cal destacar l'existència d'altres fonts de ROS en el SNC com són la deshidrogenasa cetoglutarat, vies de ciclooxidació i lipoxidació, monoamina oxidasa mitocondrial, autooxidació de catecolamines, i en la membrana plasmàtica es produeix la reducció de la nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidasa (NADP<sup>+</sup>), entre altres (Halliwell and Gutteridge, 2007).

En situació d'estrès oxidatiu, és a dir, en un desajustament entre la producció excessiva de ROS i els mecanismes de defensa, els ROS donen lloc a dany cel·lular principalment de dos maneres: i) per modificació directa de macromolècules cel·lulars i extracel·lulars -proteïnes, àcids nucleics, lípids i

carbohidrats- (Dean et al., 1997; Naudí et al., 2013a; Pamplona, 2011; Thorpe and Baynes, 2003; West and Marnett, 2006), en què el semialdehíd glutàmic (SAG), juntament amb el semialdehíd aminoadípíic (SAAA) i la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) són els marcadors més caracteritzats i ben estudiats per a la quantificació de l'oxidació directa a proteïnes i a l'àcid desoxiribonucleic (ADN), respectivament; i ii) per alteracions en l'estat redox de factors implicats en la transducció de senyals, donant lloc a una major o menor regulació d'algunes rutes de senyalització capaces d'alterar la seva acció fisiològica (Lenaz, 2012).

A més dels ROS, l'oxidació de carbohidrats, lípids i aminoàcids dona lloc a una nova generació d'espècies reactives anomenades espècies carboníliques (RCS; de l'anglès, *reactive carbonyl species*), capaces de reaccionar amb grups nucleofílics de macromolècules com proteïnes, àcids nucleics i aminofosfolípids, produint modificacions irreversibles (Dean et al. 1997; Thorpe & Baynes 2003; West & Marnett 2006; Pamplona 2011; Naudí et al. 2013). En aquest sentit les cèl·lules neuronals no en són una excepció. Les RCS més reactives són: acroleïna, crotonaldehid, 2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), glioxal, malondialdehid (MDA), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) i 4-oxo-2-nonenal (ONE) (Catalá, 2009; Esterbauer et al., 1991; Fritz and Petersen, 2013; Martínez et al., 2010; Pamplona, 2008; Zimniak, 2011) (Figura 2).



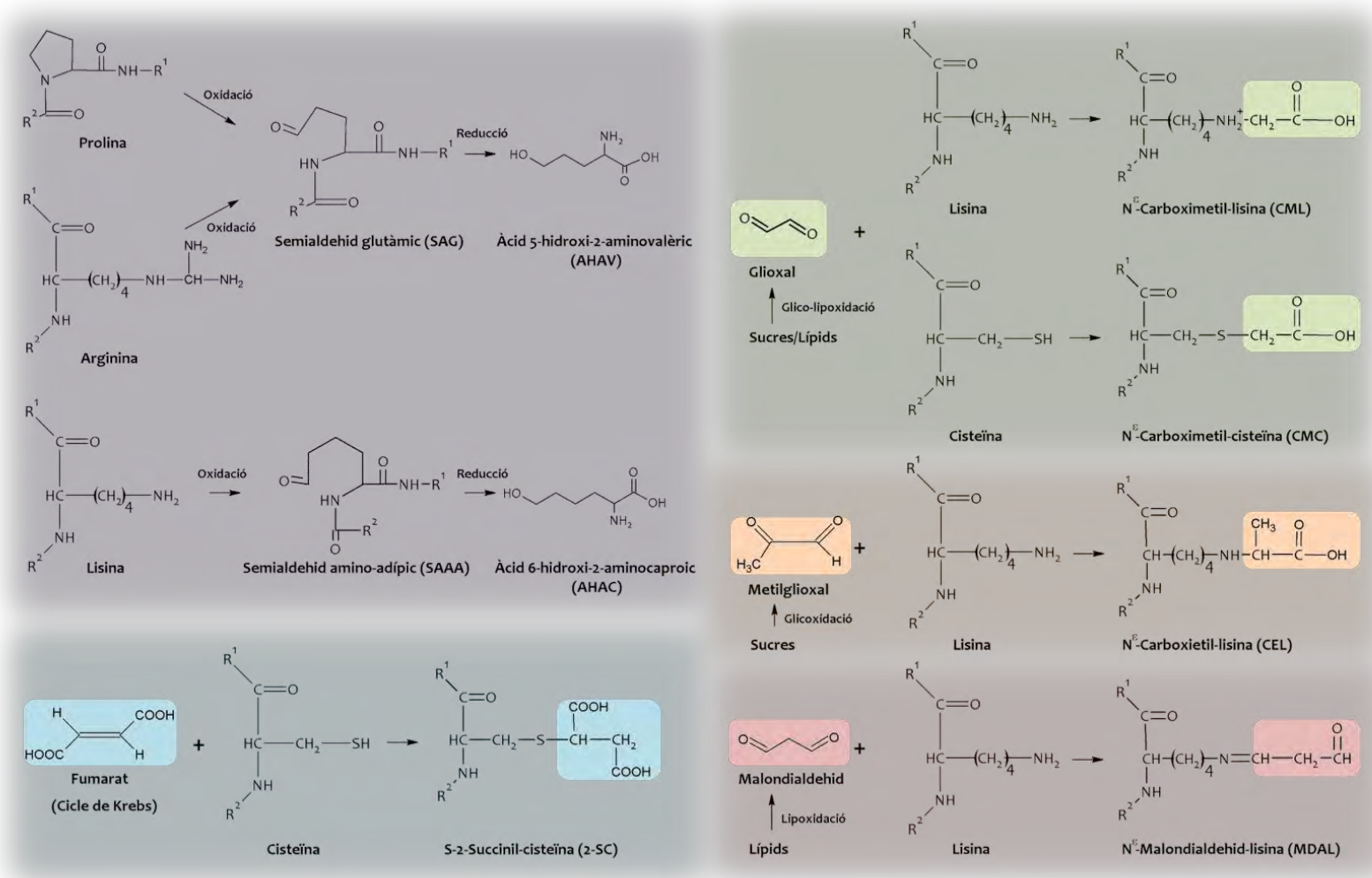
**Figura 2. Estructures químiques dels productes intermediaris de segona generació detectats en cervell humà.** Espècies carboníliques capaces de reaccionar amb grups nucleofílics de macromolècules i que donen lloc a la formació de productes de glicació i lipoxidació avançada.

Aquestes espècies carboníliques, que majoritàriament presenten un grup carbonil lliure o més d'un, tenen propietats úniques si els contrastem amb els radicals lliures (Pamplona, 2008). Per exemple, comparant amb els ROS o amb les espècies reactives de nitrogen, aquests aldehids reactius tenen una vida mitja molt més llarga -de minuts, en lloc de micro o nanosegons com succeeix amb els radicals lliures-. A més, aquests compostos carbonílics no tenen càrrega, fet que els permet migrar amb relativa facilitat a través de les membranes hidrofòbiques i dels medis hidrofílics, i per tant, poden arribar a migrar a molta distància del

seu lloc de producció. En base aquestes característiques, les espècies carboníliques poden ser molt més destructives que els propis radicals lliures i tenir efectes perjudicials a distància sobre dianes ubicades dins i fora de les cèl·lules. Els compostos carbonílics derivats de l'oxidació de carbohidrats i lípids reaccionen amb grups nucleofílics de macromolècules com les proteïnes i l'ADN -i, altres molècules com aminofosfolípids- provocant modificacions químiques no enzimàtiques, majoritàriament de caràcter irreversible, que formen varietat d'adductes i entrecreuaments que es coneixen amb el nom de productes finals de lipoxidació avançada (ALE; de l'anglès, *advanced lipoxidation end-products*) i productes finals de glicació avançada (AGE; de l'anglès, *advanced glycation end-products*) (Martínez et al., 2010; Pamplona, 2011; Pamplona et al., 2005a, 2004; Requena et al., 2001; Thorpe and Baynes, 2003).

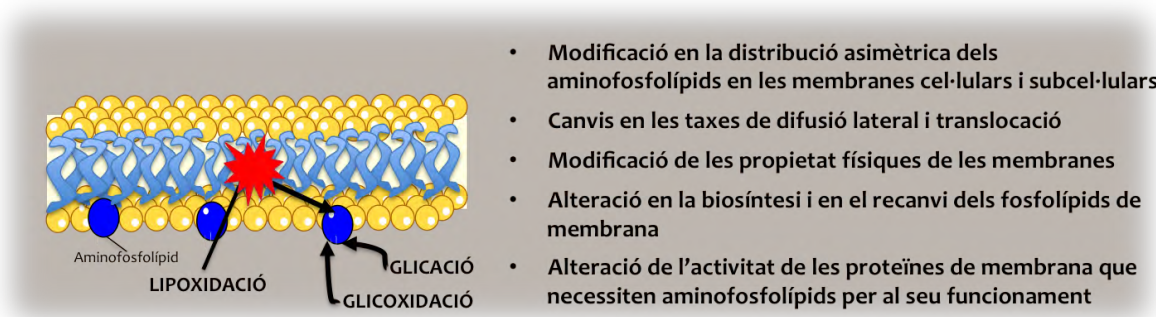
**Formació de productes ALEs.** Els compostos carbonílics derivats de l'oxidació de lípids tenen alta afinitat de reacció amb els llocs nucleofílics de les proteïnes (concretament amb els aminoàcids cisteïna, lisina, arginina i histidina). Aquesta reactivitat genera adductes com per exemple N<sup>ε</sup>-MDA-Lisina (MDAL), Lisina-HNE, FDP-lisina i S-carboximetil-cisteïna (CMC) (Figura 3); i entrecreuaments com dímers glioxal-lisina i lisina-MDA-lisina, entre altres. L'acumulació d'adductes de MDA en proteïnes també està implicada en la formació de lipofuscina, un pigment groc-marró no degradable ja descrit en neurones humanes per Hannover el 1842 i revisat per Ottis i col·laboradors el 2012 (Hannover, 1843; Ottis et al., 2012). Tanmateix, els productes ALEs també poden formar-se a partir de la reacció dels compostos carbonílics derivats de l'oxidació lipídica amb residus nucleòfils de l'ADN (West and Marnett, 2006). La guanina és la base de l'ADN més comunament modificada per ser altament nucleofílica (Bjelland and Seeberg, 2003).

**Formació de productes AGEs.** A més dels compostos carbonílics derivats de la peroxidació lipídica, els sucres reductors i compostos carbonílics derivats de l'oxidació de carbohidrats també reaccionen amb grups amino primaris de macromolècules com són les proteïnes i l'ADN, seguint els principis de la reacció de Maillard (Thorpe and Baynes, 2003). El primer estadi de la reacció de Maillard clàssica és la formació d'una base de Schiff i un producte d'Amadori entre sucres reductors i grups amino lliures en les proteïnes (reacció de glicació). Posteriorment, es sotmeten lentament a una sèrie de reordenaments intramoleculars, deshidratació, i reaccions d'oxidació-reducció per produir productes terminals anomenats AGE (Baynes and Monnier, 1989; Portero-Otín and Pamplona, 2006). Entre els AGEs caracteritzats i millor descrits destaquen la carboximetil-lisina (CML) i la carboxietil-lisina (CEL) formats a partir del glioxal i metilglioxal, respectivament (Cantero et al., 2007) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema dels marcadors de dany oxidatiu estudiats en la present tesi.** Mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS) s’han estudiat set marcadors de dany oxidatiu, representatius de les tres principals modificacions oxidatives a proteïnes: derivades d’oxidació directa a proteïnes [Semialdehid glutàmic (SAG) i Semialdehid amino-adípic (SAAA)], derivades d’oxidació a fumarat [S-(2-succinil)-cisteïna (2SC)], derivades de glico i lipoxidació [N<sup>ε</sup>- carboximetil- lisina (CML) i S-(carboximetil)-cisteïna (CMC)], derivades de glicoxidació [N<sup>ε</sup>-carboxietil- lisina (CEL)] i derivades de lipoxidació [N<sup>ε</sup>-malondialdehid- lisina (MDAL)].

Les principals conseqüències derivades d'aquestes modificacions no enzimàtiques són la pèrdua de funció i d'integritat estructural de les biomolècules modificades amb un ampli ventall de conseqüències funcionals com són la inducció de la disfunció cel·lular i lesió tissular. Així, aquestes reaccions no enzimàtiques induïxen canvis estructurals i funcionals en les proteïnes, com són: i) alteracions en les propietats fisicoquímiques (per exemple, conformació, càrrega, hidrofobicitat, elasticitat, solubilitat i mobilitat electroforètica, entre altres); ii) disminució o inhibició en l'activitat d'enzims i factors de creixement; iii) alteració de la degradació proteica; iv) alteració en el tràfic i processament de proteïnes; i v) formació d'agregats i entrecruament proteics intra i inter-moleculars. El dany oxidatiu a l'ADN és mutagènic, carcinògen i amb un potent efecte en les vies de transducció de senyals. Tanmateix, el grup amino dels aminofosfolípids poden també reaccionar amb compostos carbonílics i iniciar així algunes de les reaccions que tenen lloc a les proteïnes. Així doncs, els processos biològics en els que estan involucrats els aminofosfolípids poden ser potencialment afectats (Naudí et al., 2013b; Pamplona, 2008; Pamplona et al., 2000, 1998) (Figura 4).



**Figura 4. Potencials efectes de la modificació d'aminofosfolípids mitjançant reaccions carbonil-amina en les membranes biològiques.** Figura adaptada de (Naudí et al., 2013b).

En aquest sentit, cal remarcar que malgrat la importància d'aquestes modificacions són poques les dades existents fins al moment sobre aquests marcadors específics en els sistemes biològics i en el seu comportament durant l'envelliment.

## 2.2. Sistemes de protecció cel·lular

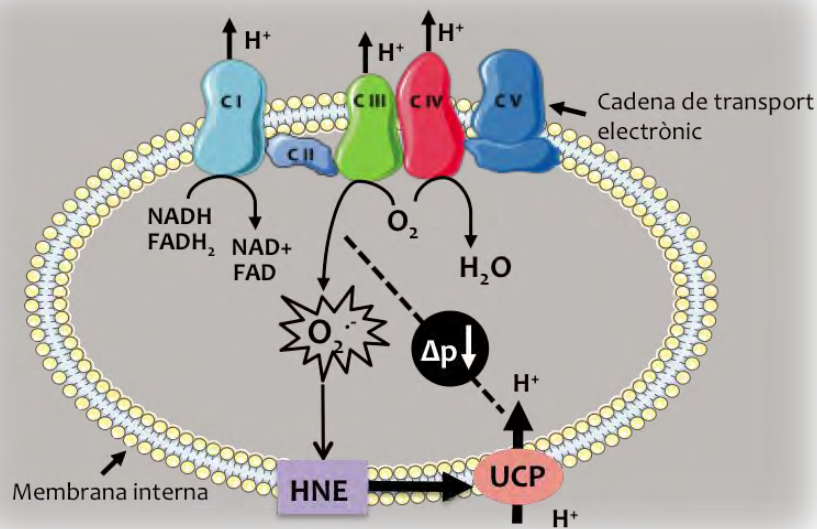
La protecció neuronal contra la lesió oxidativa és essencial per a la funció del SNC, i una sèrie d'adaptacions metabòliques han estat incorporades a l'arsenal cel·lular per aquest control (Pamplona and Costantini, 2011). Aquestes inclouen:

### **2.2.1. Resistència dels components estructurals al dany oxidatiu.**

La línia de defensa bàsica ve determinada per la pròpia susceptibilitat de les molècules biològiques a la lesió oxidativa (Pamplona and Barja, 2011, 2007). Aquesta susceptibilitat, que es defineix com la facilitat amb què les macromolècules sofreixen el dany oxidatiu, està intrínsecament lligada a l'estructura específica o a la composició química dels carbohidrats, lípids, àcids nucleics i proteïnes. En termes d'evolució biomolecular, la vida aeròbica s'ha desenvolupat reduint l'abundància relativa d'aquells components estructurals altament susceptibles a la lesió oxidativa, però sense renunciar a ells (Pamplona and Barja, 2011, 2007). Entre ells destaquen l'aminoàcid metionina, la nucleobase guanina, els àcids grassos poliinsaturats, i els intermediaris glucolítics (Pamplona and Barja, 2011, 2007). En aquest escenari, el SNC és particularment susceptible a la formació d'espècies carboníliques a partir de carbohidrats i d'àcids grassos poliinsaturats com a conseqüència de l'alt contingut d'aquests substrats en comparació amb altres teixits (Naudí et al., 2011a, 2011b).

### **2.2.2. Aparició de mecanismes reguladors de la generació d'espècies reactives.**

Des d'una perspectiva evolutiva, caldria esperar que la selecció hagués incorporat i optimitzat uns mecanismes que regulin la producció d'espècies reactives. Aquests mecanismes fisiològics poden agrupar-se en 'interns' i 'externs'. Els interns es refereixen a aquells amb els que regula la pròpia generació de ROS i que s'expressen en: i) capacitat d'adaptar el contingut absolut dels diferents complexos de la cadena respiratòria (Pamplona et al., 2005b), probablement a través de la regulació de la biogènesis mitocondrial vehiculada per la via SIRT1/PGC-1 $\alpha$  i la flavoproteïna AIF (de l'anglès, *apoptosis-inducing factor*) (Caro et al., 2009a; Naudí et al., 2007); ii) capacitat de regular l'estat de reducció del complex I, un dels principals generadors de ROS (Barja, 2007; Kushnareva et al., 2002); iii) modulació de la producció de ROS vehiculada per proteïnes desacobladores (UCPs) (Brand et al., 2004, 2002; Echtay et al., 2003) (Figura 5); i iv) modulació via modificacions postraduccionals (per exemple, acetilació, S-nitrosació, i glutationilació). Les característiques de l'ambient de la membrana mitocondrial (per exemple, concentració local d'oxigen i composició dels lípids de membrana, on els complexos estan ubicats) on té lloc l'activitat dels complexos de la cadena de transport electrònic mitocondrial es podrien considerar com a factors externs capaços de modificar la generació de radicals lliures i, consegüentment, podrien ser considerats com a potencials mecanismes reguladors de l'estat oxidatiu (Pamplona and Costantini, 2011).



**Figura 5. Esquema de la modulació de la producció de ROS vehiculada per proteïnes desacobladors (UCPs).** Durant l'oxidació de substrats en els complexos de la cadena de transport electrònic mitocondrial, l'oxigen és reduït a aigua, i els protons són bombejats cap a l'espai intermembrana formant una força motriu de protons ( $\Delta p$ ). No obstant això, alguns electrons en els complexos reduïts també reaccionen amb l'oxigen per produir l'anió superòxid. L'anió superòxid pot peroxidar fosfolípids de membrana, formant l'hidroxinonenal (HNE), que indueix el transport de protons a través de la proteïna UCP. En aquest model, les UCPs responen a la sobreproducció de superòxid en la matriu catalitzant un desacoblament suau, el que redueix la força protó-motriu i disminueix la producció de superòxid per la cadena de transport d'electrons.

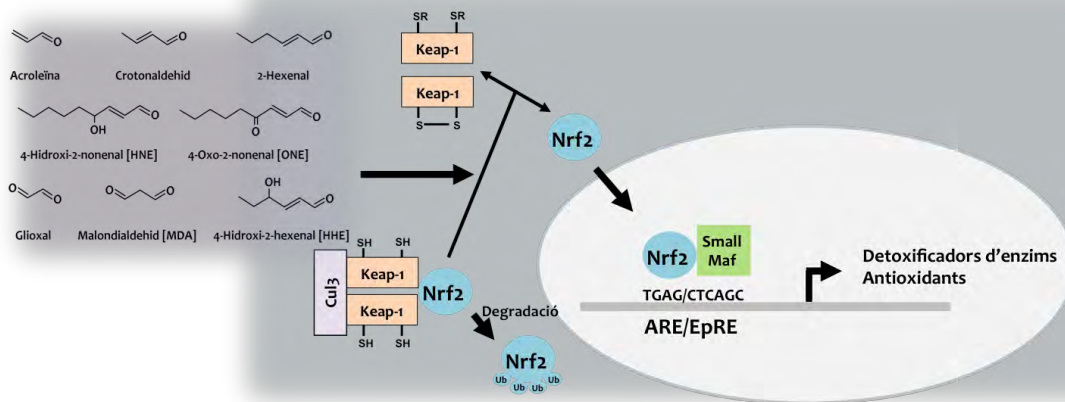
### 2.2.3. Diversitat d'antioxidants com a expressió de la varietat d'espècies reactives i les seves conseqüències moleculars.

Una àmplia bateria de defenses antioxidants, tant de tipus enzimàtic com no-enzimàtic, han emergit i s'han conservat durant l'evolució, constituint una línia de defensa que contribueix a mantenir l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu cel·lular (Halliwell and Gutteridge, 2007). Aquestes defenses antioxidants poden agrupar-se en dos grans categories: i) protecció cel·lular per antioxidants enzimàtics i no enzimàtics; i ii) protecció cel·lular per sistemes antioxidants detoxificadors o de reparació-recanvi. Dins de la primera categoria destaquen: a) la superòxid dismutasa (SOD); b) la glutatió peroxidasa (GPx); c) la catalasa i el glutatió (GSH), entre altres (revisat a (Pamplona and Costantini, 2011)). Tot i aquest conjunt de sistemes de defensa, la lesió molecular vehiculada per radicals té lloc *in vivo*. En aquest context, els sistemes biològics han incorporat defenses capaces de fer front a les molècules lesionades. Entre aquestes defenses destaquen: els enzims que reparen aminoàcids sulfurats oxidats (per exemple, metionina sulfòxid reductasa); sistemes enzimàtics que degraden proteïnes modificades (per exemple, proteasoma); enzims que reparen l'ADN lesionat (per exemple, ADN polimerases); sistemes que recanvien els lípids de membrana i sistemes enzimàtics detoxificadors de les espècies carboníliques (Pamplona and Costantini, 2011).



### 2.2.4. Vies de transducció de senyals mitjançant l'activació de vies de supervivència

Altres mecanismes que estan involucrats en l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu són més complexes atès que impliquen a vies de senyalització intracel·lulars. Un mecanisme d'adaptació neuronal que sembla jugar un paper molt rellevant és l'element de resposta antioxidant/vies de senyalització Nrf2 (Calabrese et al., 2010; Calkins et al., 2009). La cascada de senyalització de les espècies reactives culmina amb la translocació nuclear i transactivació del factor de transcripció Nrf2 (Copples et al., 2008) (Figura 6). Aquest factor és crític per a la protecció enfront de les substàncies electròfiles, inflammatòries i de toxicitat química, com són les espècies carboníliques, ja que ofereix la possibilitat que aquest pugui connectar la biogènesis mitocondrial amb les defenses antioxidants (Maher and Yamamoto, 2010; Pamplona, 2011; Piantadosi et al., 2008).



**Figura 6. Esquema de l'activitat del factor de transcripció Nrf2.** L'activitat del factor Nrf2 és troba constitutivament reprimida com a conseqüència de la seva unió amb la proteïna citoplasmàtica Keap1 i al citoesquelet. Aquesta unió és homodímera i té la capacitat de promoure la degradació constant del factor Nrf2 a través de la ubiquitinització depenent de Cul3. Un cop ubiquitinitzada, Nrf2 és transportada al proteosoma i posteriorment degradada. No obstant, en situació d'estrès oxidatiu i per tant, en presència d'agents oxidants i electròfils, els grups sulfhidrils de les cisteïnes de Keap1 són oxidats, fet que promou la dissociació del complex Nrf2-Keap1 i permet la translocació nuclear del factor Nrf2. Una vegada Nrf2 ja és al nucli aquest requereix la heterodimerització amb les proteïnes petites Maf de manera obligatòria per tal de poder unir-se específicament a les seqüències específiques ARE/EpRE (de l'anglès, *antioxidant/electrophile response element*) de l'ADN, i consegüentment activar la transcripció de gens antioxidants i detoxificadors d'enzims. Figura adaptada de (Pamplona and Costantini, 2011).

Tanmateix, estudis recents col·loquen en primer pla un altre potencial mecanisme mediat per mTOR. La proteïna mTOR (de l'anglès, *mammalian target of rapamycin*) és una serina/treonina quinasa, present amb nivells molt elevats en les neurones i les cèl·lules gials, i un component essencial de complexes molt conservats evolutivament que regulen una gran varietat de processos com el creixement, supervivència, senyalització, mortalitat, entre altres (Abelaira et al., 2014; Perluigi et al., 2015). Aquesta proteïna es troba integrada en la part inferior del receptor d'insulina (IGF-1; de l'anglès, *insulin-like growth factor-1*) -i de la via PI3K/PKB- que juntament amb l'entrada d'aminoàcids i un estat d'energia suficient, transduïx senyals de

supervivència mitjançant l'activació d'una sèrie de respostes anabòliques com la síntesis de proteïnes i lípids, biogènesis mitocondrial mitjançant la regulació activa de PGC1- $\alpha$  (Cunningham et al., 2007), metabolisme mitocondrial accelerat, creixement cel·lular i mitogènesis (Pani, 2015) (Figura 7). Evidències genètiques i farmacològiques en mamífers indiquen que la inhibició de la senyalització de mTOR sintetitza la resposta fisiològica a la restricció de nutrients donant lloc a resposta a l'estrès mitjançant: i) l'autofàgia (Dazert and Hall, 2011; Efeyan et al., 2015); i ii) l'activació de factors de transcripció de resposta a estrès com el factor FoxO (de l'anglès, *Forkhead box-O class*) (Wullschleger et al., 2006). La seva regulació en les neurones post-mitòtiques té un impacte funcional significatiu en plasticitat sinàptica, polaritat neuronal, neurotransmissió, proteostasis, control metabòlic i respostes a l'estrès, incloent la reparació de l'ADN (O' Neill, 2013). Així doncs, una desregulació de la senyalització mTOR condueix a un envelliment accelerat, el qual es manifesta amb l'increment del reticle endoplasmàtic, augment de la generació mitocondrial de ROS, inhibició de l'autofàgia/mitofàgia, resistència a la insulina i inflamació (Dazert and Hall, 2011; Efeyan et al., 2015; Pani, 2015).

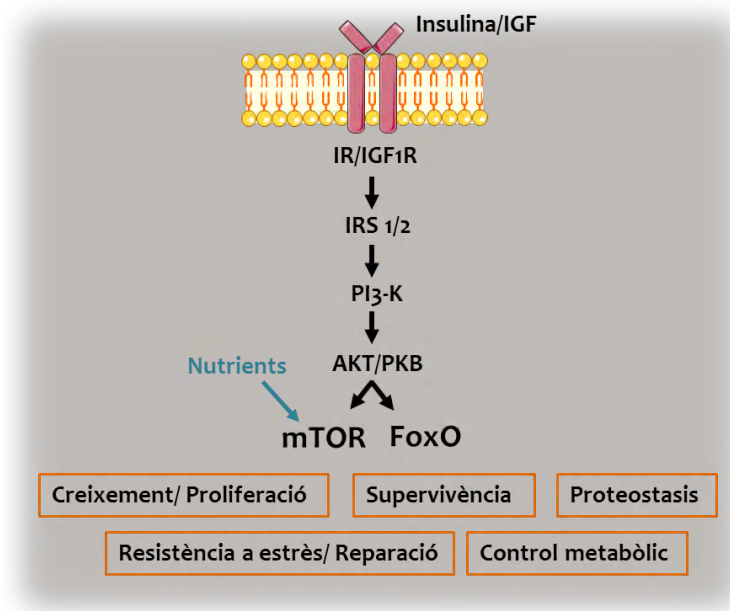
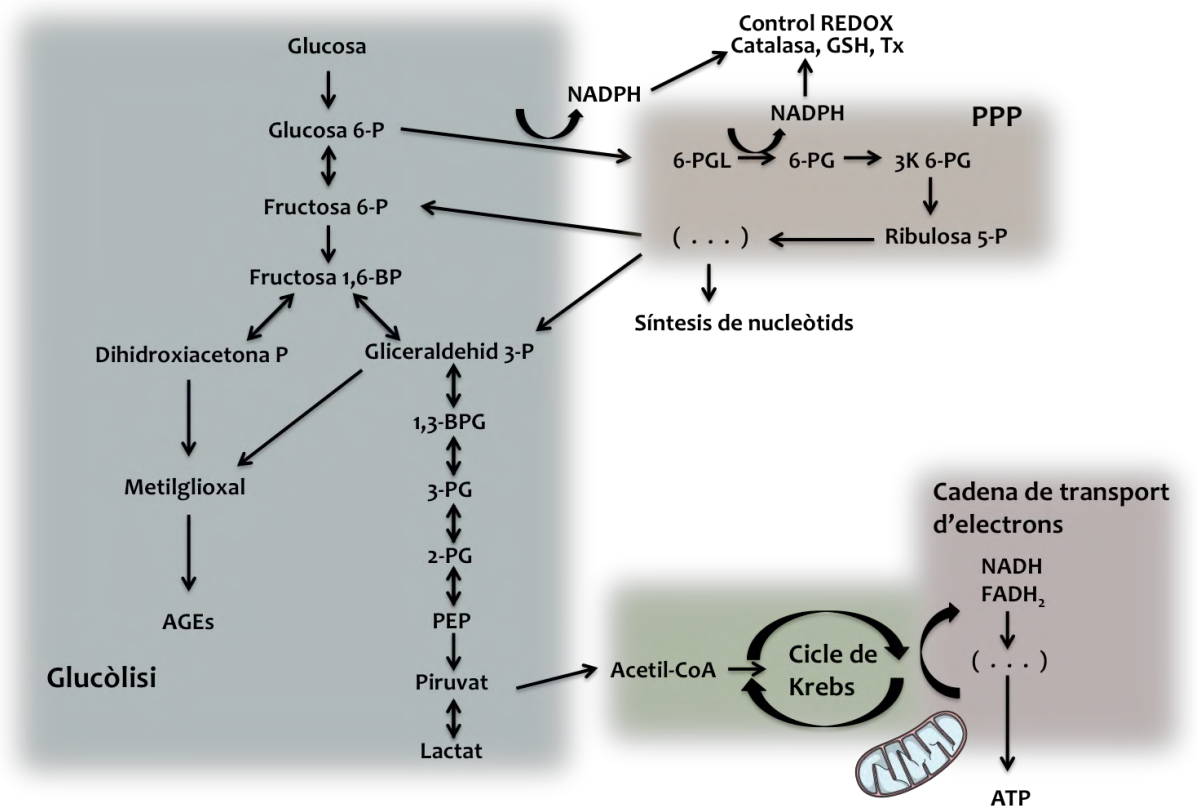


Figura 7. Esquema simplificat de la via de senyalització PI3K/PKB que regula mTOR. Figura adaptada de (O' Neill, 2013).

### 2.3. Integració del metabolisme energètic i les defenses antioxidants a nivell neuronal

Tots aquests factors condueixen a proposar que l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu és la major força conductora en determinar la vulnerabilitat diferencial de les cèl·lules cerebrals a l'envelliment i a les malalties neurodegeneratives. La rellevància de l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu per a la supervivència

neuronal explica com les neurones estan intrínsecament equipades amb un mecanisme bioquímic que aparella el metabolisme de la glucosa cap a la defensa antioxidant (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Així, les neurones estan programades per metabolitzar la glucosa activament a través de la via de les pentoses fosfat. Aquesta ruta metabòlica genera equivalents reductors en forma del cofactor NADH (H<sup>+</sup>), que manté l'antioxidant glutatió en els seu estat reduït (Currais, 2015) (Figura 8). El glutatió és el tiol no proteic més abundant per amortitzar l'estrès oxidatiu a nivell cerebral, i és crucial per mantenir l'estat antioxidant total. Aquest desplaçament de la glucosa cap a la via de les pentoses fosfat es produeix a expenses d'una ràtio glicolítica baixa per a la posterior generació d'energia en les mitocòndries. Curiosament, aquestes vies metabòliques són les fonts de substrat que generen espècies reactives de carboni amb efectes perjudicials (Baynes and Monnier, 1989).



**Figura 8. Esquema representatiu del metabolisme de la glucosa, incloent la glucòlisi citoplasmàtica, la via de les pentoses fosfat, el cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons.** Abreviacions: Glucosa 6-P, glucosa 6-fosfat; fructosa 6-P, fructosa 6-fosfat; fructosa 1,6-BP, fructosa 1,6-bifosfat; gliceralehid 3-P, gliceralehid 3-fosfat; 1,3-BPG, 1,3-bifosfoglicerat; 3-PG, 3-fosfoglicerat; 2-PG, 2-fosfoglicerat; PEP, fosfoenolpiruvat; dihidroxiacetona P, dihidroxiacetona fosfat; AGE, productes finals de glicosilació avançada; PPP, via de les pentoses fosfat; 6-PLG, 6-fosfogluconat-lactona; 6-PG, fosfogluconat; 3K6PG, 3-ceto 6-fosfogluconat; ribulosa 5-P, ribulosa 5-fosfat; NADPH, nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat; NADH, nicotinamida adenina dinucleòtid; FADH<sub>2</sub>, dinucleòtid de flavina i adenina; ATP, adenosina-5'-trifosfat. Figura adaptada de (Currais, 2015).

Atès que les condicions ambientals a través d'un ventall de condicions fisiològiques i patològiques poden estar associades amb risc d'estrès oxidatiu -com ho són les fases del cicle de la vida-, les neurones estan contínuament sota pressió. Per tant, les neurones poden estar exposades a costos

fisiològics que s'expressen principalment en el dany oxidatiu i el consum d'energia necessària per mantenir les defenses antioxidants sobre-regulades i per activar els sistemes de reparació. La necessitat d'adaptació continua, la presència de la susceptibilitat inherent, i la vulnerabilitat neuronal selectiva poden ser els factors que modulen l'envelliment neuronal en un context fisiològic i que desencadena el desenvolupament de malalties neurodegeneratives.

### **3. LÍPIDS EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

Les funcions específiques de cada cèl·lula i les interaccions entre diferents cèl·lules estan sota estricte control molecular i componen un programa metabòlic estrictament regulat que proporciona una homeòstasi general. La xarxa global de seqüències de reaccions interconnectades que intercanvien metabòlits cel·lulars constitueix el metabolisme cel·lular. En vista de la multiplicitat de les cèl·lules i de les funcions cel·lulars en el SNC, la complexitat del metabolisme dels teixits sobrepassa l'aritmètica dels metabòlits cel·lulars. El metabolisme és optimitzat per aconseguir l'equilibri i l'estalvi, i per tant el metabolisme és específic de cada tipus cel·lular, de cada tipus de teixit i és específic d'espècie.

S'estima que el metaboloma humà conté aproximadament 41.993 metabòlits (HMDB: base de dades del metaboloma humà; <http://www.hmdb.ca>) (Wishart et al., 2013, 2009, 2007). Els metabòlits cerebrals inclouen totes les petites molècules presents en el cervell i per tant, representen tots els components que intervenen en les funcions cerebrals, tals com substrats bioenergètics, lípids de membrana, blocs de proteïnes i polisacàrids, neurotransmissors, compostos biològicament actius, antioxidants, i productes intermediaris de reaccions catabòliques i anabòliques. Tot i que es necessiten estudis que permetin definir un atlas metabolòmic del SNC humà, recentment, s'ha estimat que les neurones tenen un metaboloma format per aproximadament 7.000 metabòlits (Jové et al., 2014). Entre aquests metabòlits, els lípids juguen un paper molt important en el SNC.

Entre els teixits del cos humà, el teixit nerviós és un dels més rics en contingut lipídic. És ben establert que els lípids representen aproximadament el 10-12 % del pes humit i la meitat de la matèria seca del cervell (Sastry, 1985). A part de la seva importància quantitativa, els lípids del sistema nerviós mostren una gran diversitat estructural i funcional. Totes les classes de lípids estan representades en les cèl·lules neuronals, de manera similar a altres tipus de cèl·lules, i els amplis espectres d'espècies moleculars dels lípids són una expressió de les diferents necessitats i funcions atribuïdes a ells.

#### **3.1. Definició de lípids i classificació**

Els lípids són un grup divers i omnipresent de compostos que tenen un paper clau en la fisiologia cel·lular i patològica. La diversitat en la funció dels lípids és reflectida per una enorme variació en les

estructures de les molècules dels lípids. En contrast amb el cas dels gens i proteïnes, que es componen principalment de combinacions lineals de 4 àcids nucleics i 20 aminoàcids, respectivament, les estructures lipídiques són més complexes a causa del nombre de diferents transformacions bioquímiques que es produeixen durant la seva biosíntesi (Fahy et al., 2011). Els lípids exhibeixen una notable diversitat estructural, determinada per factors com la longitud variable de cadena, i transformacions bioquímiques com oxidacions, reduccions, substitucions, transformacions, així com modificacions amb residus de sucres i altres grups funcionals de diferents orígens biosintètics. Actualment no hi han estimacions fiables del nombre de compostos lipídics en la natura, a causa de les dificultats tècniques de dilucidar estructures químiques, però en base a modificacions de les cadenes acil/alquil i els sucres en glicerolípid, glicerofosfolípids i esfingolípid, el nombre d'espècies moleculars de lípids pot ser estimat al voltant de 200.000 (Yetukuri et al., 2008). En aquesta línia, existeix una base de dades (LIPID MAPS) que participa activament en la cerca de metabòlits lipídics amb un enfocament integrat en relació amb els gens i proteïnes a nivell de la biologia de sistemes (Fahy et al., 2011; Subramaniam et al., 2011). Malgrat això, encara es necessita molta informació per tal de completar la composició lipídica del cervell. Tanmateix, és més que probable que el nombre d'espècies lipídiques en el cervell sigui molt reduïda possiblement a causa del procés de selecció molecular de lípids específics durant l'evolució de les espècies d'acord a les necessitats estructurals i funcionals de les cèl·lules neuronals.

El concepte "lípid" tradicionalment s'ha aplicat a tots aquells compostos orgànics que són insolubles en aigua però solubles en dissolvents orgànics (Smith, 2000). Actualment, els lípids són definits en termes químics com petites molècules hidrofòbiques o amfifíliques que s'originen, ja sigui totalment o en part, a partir de dos tipus diferents d'unitats bàsiques: grups cetoacil i grups isoprens (Fahy et al., 2011, 2009, 2005) (Figura 9A). Pel que fa a la classificació dels lípids, algunes aproximacions separen els lípids en grups "simples" i "complexos", entenen els lípids simples com aquells que produeixen dos productes diferents en la seva hidròlisi (per exemple, acilglicerols: àcid grassos i glicerol) i lípids complexos, aquells que produeixen tres o més productes en la seva hidròlisi (per exemple, glicerofosfolípids: àcid grassos, glicerol, i un grup fosfat). A més, la base de dades japonesa LipidBank (<http://lipidbank.jp/>) defineix un tercer grup important anomenat 'derivats' lipídics (alcohols i àcids grassos derivats per la hidròlisi de lípids simples), la qual inclou 26 categories de nivell superior en el seu esquema de classificació, que integra una àmplia varietat de fonts animals i vegetals. L'any 2005, el Comitè internacional de classificació i nomenclatura dels lípids, en base a la iniciativa del consorci LIPID MAPS, va desenvolupar i establir un sistema de classificació global per als lípids basat en principis químics i bioquímics ben definits i utilitzant un marc dissenyat per ser extensible, flexible, escalable i compatible amb la tecnologia informàtica moderna (per a més detalls sobre la classificació dels lípids i la

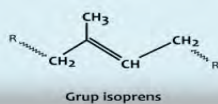
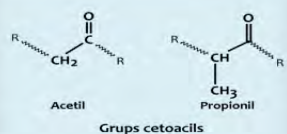
nomenclatura, les estructures de lípids, i les eines bioinformàtiques per a l'anàlisi lipídomic veure (Fahy et al., 2011, 2009, 2005; Subramaniam et al., 2011)). La nomenclatura adoptada pel consorci LIPID MAPS segueix acuradament les directrius de IUPAC-IUBMB (de l'anglès, *the International Union of Pure and Applied Chemists and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). En base aquest sistema de classificació, els lípids han estat dividits en vuit categories: àcids grassos; glicerolípid; glicerofosfolípids; esfingolípid; sacarolípid i policètid (derivats de la condensació de subunitats cetoacil); esterols i els lípids prenol (derivats de la condensació de subunitats isoprè). La Figura 9B mostra l'estructura de les principals espècies moleculars de lípids presents en cervell humà adult.

### 3.2. Composició lipídica del SNC Humà

El cervell humà adult conté una gran quantitat i diversitat de lípids. A nivell del contingut global de lípids, el cervell és únicament superat pel teixit adipós (Han, 2007). Tanmateix, en comparació amb altres òrgans o sistemes, el cervell conté la major diversitat de classes lipídiques i d'espècies moleculars lipídiques. A més de la presència de les diferents classes de fosfolípids, en què les fosfatidilcolines (PC), fosfatidiletanolamines (PE), fosfatidilserines (PS), fosfatidilinositols (PI) i les cardiolipines (CL) constitueixen les principals famílies de fosfolípids (Vance and Vance, 1996; Yeagle, 1993), el cervell també conté un gran nombre de classes d'esfingolípid. Milers d'espècies moleculars d'esfingolípid són presents a l'esfingolipidoma (Merrill et al., 2005) i la majoria d'aquestes espècies moleculars són presents en el cervell. El colesterol i els metabòlits del colesterol són també molt importants i abundants en el cervell humà. De fet, tot i que el cervell només representa el 2 % del pes total del cos, aquest conté el 25 % del colesterol total (Dietschy and Turley, 2001). La importància del colesterol al cervell també es reflecteix amb l'estreta regulació dels seus nivells, que és independent del colesterol circulant i de les seves fluctuacions (Dietschy and Turley, 2001).

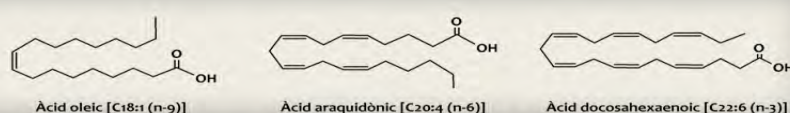
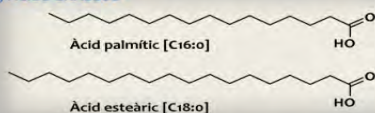
Els fosfoglicèrids són els principals components dels fosfolípids que de manera ubiqua es troben en les membranes cel·lulars i, per tant, també es troben en abundància en les membranes de les cèl·lules neuronals (revisat a (Sastry, 1985)). En el cervell humà, els fosfolípids constitueixen al voltant del 4,5 al 5,4 % del pes humit en tot el cervell i al voltant del 4,2 % en la substància gris. La substància blanca té una major concentració de fosfolípids que ascendeixen aproximadament al 7 % del pes humit en els éssers humans. L'àcid fosfatídic, el més simple entre els fosfoglicèrids, i intermediari central en les rutes biosintètiques tan de fosfoglicèrids com de lípids neutres, és produït a baixa concentració en el cervell (aproximadament el 2 % dels fosfolípids totals).

A. UNITATS LIPÍDIQUES BÀSIQUES

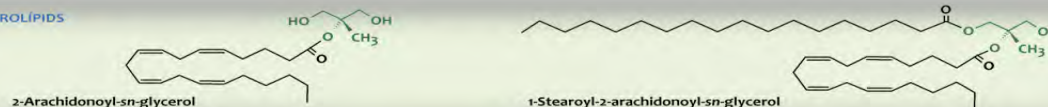


B. PRINCIPALS LÍPIDS CEREBRALS EN HUMANS ADULTS

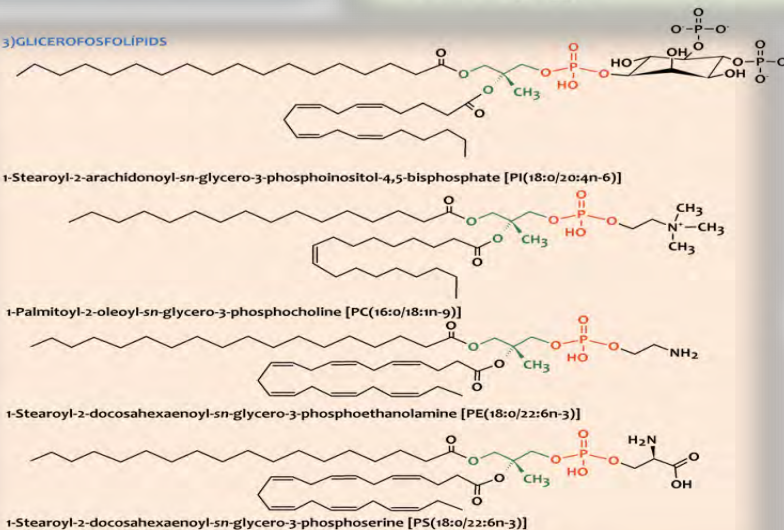
1) ÀCIDS GRASSOS



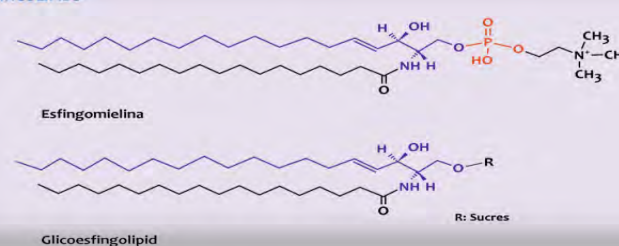
2) GLICEROLÍPIDS



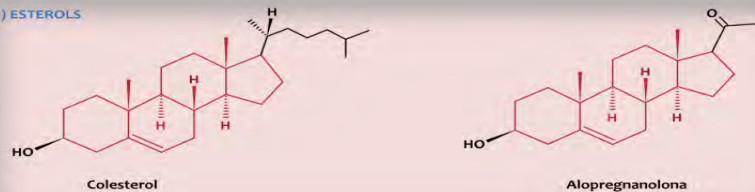
3) GLICEROFOSFOLÍPIDS



4) ESFINGOLÍPIDS



5) ESTEROLS



**Figura 9. A) Unitats lipídiques bàsiques: grups cetoacils i grups isoprens. B) Principals lípids cerebrals en humans adults: 1) àcids grassos que contenen un grup carboxílic unit a una cadena alifàtica.** Els àcids grassos saturats (AGS) no contenen dobles enllaços, mentre que els àcids grassos monoinsaturats (AGMI) i poliinsaturats (AGPI) contenen un o més dobles enllaços cis. Hi ha dos tipus d'AGPI: omega-6 (per exemple, l'àcid araquidònic, 20:4n-6) i omega-3 (per exemple, l'àcid docosahexaenoic, 22:6n-3), que es nomenen d'acord a la posició del primer doble enllaç a la cadena de carboni, començant des de l'extrem metil de la molècula. Els àcids grassos que es mostren representen al voltant del 80-90% del perfil total d'àcids grassos del cervell humà (Naudí et al., 2013a, 2012); **2) glicerolípid**s són èsters d'àcids grassos de glicerol i el cervell humà són principalment mono- i di- acilglicerols; **3) glicerofosfolípid**s contenen àcid fosfòric en forma d'èster amb un glicerolípid. Es subdivideixen en diferents classes en funció de la naturalesa del grup polar lligat al fosfat en la posició sn-3 de l'esquelet del glicerol. La fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) i fosfatidilinositol (PI) són els principals fosfolípids presents en el cervell humà (Sastry, 1985); **4) esfingolípid**s contenen una part comuna a la base d'esfingoide. Aquests són acilats per formar ceramides, les quals són modificades per generar fosfoesfingolípid (per exemple, esfingomièlina) i glicoesfingolípid, i **5) lípids esterols** contenen un nucli de quatre anells fusionats i comprenen colesterol i els seus derivats esteroides. Figura adaptada de (Naudí et al., 2015).

La forma predominant dels fosfoglicèrids de colina en el cervell humà és la fosfatidilcolina (PC) (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina; 32,8 %), que juntament amb la PC (16:0/18:1) són les principals espècies moleculars (O'Brien and Sampson, 1965; Rouser and Yamamoto, 1968; Rouser et al., 1965). No obstant això, també hi ha presència del plasmalogen de colina (1-alk-1'-enil, 2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina) i l'anàleg alquil (1- alquil, 2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina) que representen al voltant del 2 % de les fosfatidilcolines totals en el cervell. Els fosfoglicèrids d'etanolamina són quantitativament el principal fosfolípid en el cervell humà (35,6 %) (O'Brien and Sampson, 1965; Panganamala et al., 1971) i la forma predominant és el plasmalogen d'etanolamina (PPE; 1-ALK-1'-enil-2-acil-sn-glicero-3 fosfoetanolamina), que representa el 50-60 % de la classe fosfoglicèrid d'etanolamina dels lípids en tot el cervell humà. El contingut de l'anàleg alquilacil és relativament baix (el 3-7 % de la classe fosfoglicèrid d'etanolamina), mentre que la fosfatidiletanolamina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) compensa la quantitat restant de fosfoglicèrids d'etanolamina. La seva composició total d'àcids grassos indica un gran contingut en àcids grassos poliinsaturats, i la distribució posicional dels àcids grassos en les fosfatidiletanolamines del cervell humà mostren que la posició 1 del sn-glicerol està ocupada principalment per l'àcid palmític (16:0), l'àcid esteàric (18:0), i l'àcid oleic (18:1 n-9), tant en la substància blanca com en la gris. D'altra banda, la posició-2 del sn-glicerol consta d'àcids grassos poliinsaturats i aquests són més nombrosos en la substància gris que en la substància blanca. La concentració de fosfoglicèrids de serina en el cervell humà és d'aproximadament el 16,6 % (O'Brien and Sampson, 1965; Panganamala et al., 1971) dels fosfolípids totals. Aquests es produeixen com 1,2-diacil-sn-glicero-3 fosfoserina (més del 90 %) i també com a plasmalogen de serina. Pel que fa al perfil d'àcids grassos, aquests contenen principalment 18:0, 18:1 n-9 i l'àcid docosahexaenoic (DHA, 22:6 n-3). Les fosfatidilserines de la substància gris són particularment riques en 22:6 n-3. Els fosfoglicèrids d'inositol representen aproximadament el 2,6 % dels fosfolípids totals en cervell humà (Norton et al., 1966; Rouser and Yamamoto, 1968). El fosfatidilinositol i la trifosfoinositida són les principals formes ja que el difosfoinositida únicament hi és present en baixa quantitat. El cervell conté les majors concentracions de fosfoinositides entre els teixits animals. Els components principals d'àcids grassos dels fosfoglicèrids d'inositol són l'àcid esteàric (18:0) i l'àcid araquidònic (20:4 n-6). Finalment, Kahma i col·laboradors (Kahma et al., 1976) van descriure el 0,2 % dels fosfolípids com difosfatidilglicerol i el 0,1 % com a bis (glicerol monoacil) fosfat en el cervell humà. El difosfatidilglicerol es troba principalment localitzat en les mitocondries cerebrals tot i que, petites quantitats també són presents en la fracció nuclear i sinaptosomal. Els principals àcids grassos que s'inclouen en aquesta fracció de fosfolípids són l'àcid palmític (16:0), l'àcid palmitoleic (16:1 n-7), l'àcid esteàric (18:0), l'àcid oleic (18:1 n-9), l'àcid linoleic (18:2 n-6), l'àcid linolènic (18:3 n-3), i l'àcid araquidònic (AA, 20:4 n-6). La Taula 1 mostra la composició d'àcids grassos i el contingut dels principals fosfolípids del cervell humà adult.



**Taula 1. Contingut i composició en àcids grassos dels principals glicerofosfolípids en cervell humà.** Taula adaptada de (Naudí et al., 2015).

Teixit	Contingut lipídic %	Composició d'àcids grassos (mol %)										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:1	20:4 +22:1	22:5 n-6	22:5 n-3	22:6
PC cervell	32.8	-	47.6	3.1	12.1	40.3	-	-	-	-	-	-
PC Substància gris	38.9	2.9	45.0	1.0	9.3	31.4	0.4	0.7	4.1	-	-	3.1
PC substància blanca	30.2	1.3	34.3	-	13.4	45.2	0.4	1.1	1.3	-	-	0.1
PE cervell	35.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PE substància gris	42.2	-	6.7	-	26.0	11.9	-	1.5	13.8	14.3	-	24.3
PE substància blanca	34.1	-	6.7	-	9.0	42.4	-	7.9	6.4	13.7	0.5	3.4
PS cervell	16.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS substància gris	12.6	-	2.3	-	25.4	21.5	-	1.0	1.6	5.0	3.3	36.6
PS substància blanca	15.7	-	1.7	-	35.8	39.7	0.3	5.3	2.0	4.8	0.9	5.6

Abreviacions: PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina.

D'altra banda, els esfingolípids són un grup de lípids complexos, derivats de N-acilesfingosina (ceramida), que es produeixen particularment en grans concentracions en el cervell humà (Maceyka and Spiegel, 2014; Sastry, 1985). Aquest grup de lípids consta d'esfingomielina, cerebròsids, sulfàtids i gangliòsids. L'esfingomielina (N-acilesfingosina-1-fosfocolina) representa al voltant del 14,8 % del contingut de lípids en el cervell humà (O'Brien and Sampson, 1965; Rouser et al., 1965). Les concentracions més altes d'esfingomielina es troben principalment en els nervis perifèrics (aproximadament 25 %) i en la substància blanca (20 %), a causa que és un dels principals lípids de la membrana de mielina. Els àcids grassos de l'esfingomielina comprenen principalment l'àcid esteàric (18:0), l'àcid lignocèric (24:0) i l'àcid nervònic (24:1 n-9). Els cerebròsids són derivats de ceramides en què un grup d'hidrats de carboni està unit a l'hidroxil primari de l'esfingosina amb un enllaç  $\beta$ -glicosídic. En el cervell humà, els cerebròsids representen el 15,8 % dels lípids totals (Rouser et al., 1965). Sent un component molt important de la mielina, la concentració de cerebròsids en la substància blanca és d'aproximadament 10 vegades més que en la substància gris. La major part dels cerebròsids en el cervell és la galactosilceramida. Els components d'àcids grassos dels cerebròsids cerebrals humans característicament contenen àcids grassos hidroxils i aquests representen més del 50 % dels àcids grassos totals. Entre els àcids grassos no hidroxils, l'àcid lignocèric (24:0) i l'àcid nervònic (24:1 n-9) són els principals components, mentre que l'àcid cerebrònic (24h:0) i l'àcid hidroxinervònic (24h:1) són els àcids grassos hidroxils més abundants en el cervell humà. Els sulfàtids són èsters de sulfat de galactocerebròsids en què el grup sulfat es troba al C-3 de la fracció galactopiranòsid. El sulfàtid és l'únic sulfosfingolípids present en el cervell. En el cervell humà, els sulfàtids s'associen principalment amb la mielina i el seu contingut representa aproximadament el 6,2 % del total dels lípids del cervell (Rouser et al., 1965). La composició d'àcids grassos dels sulfàtids és similar a la dels cerebròsids. Els gangliòsids, glicoesfingolípids que contenen àcids siàlics, es produeixen de manera ubíqua en les

membranes plasmàtiques de les cèl·lules i són particularment abundants en el cervell (Sastry, 1985; Sonnino and Chigorno, 2000). En el cervell humà es produeixen en concentracions substancialment majors en la substància gris en comparació amb la substància blanca i la medul·la espinal (Ando et al., 1978; Ueno et al., 1978). Els gangliòsids consisteixen en una fracció lipídica enllaçada a una família molt gran d'estructures d'oligosacàrids que difereixen en la posició de lligament glicosídic, configuració de sucre, sucre neutre i contingut d'àcid siàlic. Els principals gangliòsids del cervell pertanyen a la sèrie gangli, una sèrie caracteritzada pel tetrasacàrid  $\beta$ -Gal (1-3) - $\beta$ -GalNAc- (1-4) -  $\beta$ -Gal (1-4) - $\beta$ -Glc al qual els residus d'àcid siàlic són enllaçats  $\alpha$ -cetosidicalment. L'àcid siàlic es refereix a tots els derivats de l'àcid neuramínic, àcid *5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosonic*. En el cervell humà l'estructura més representada és la de l'àcid N-acetil-neuramínic, seguida per la de l'àcid N-acetil-9-O-acetilneuramínic (Ghidoni et al., 1980; Haverkamp et al., 1977; Sonnino and Chigorno, 2000). El gangliòsid-lactona, en el qual un àcid siàlic esterifica un grup hidroxil primari, s'ha trobat que es produeix en el cervell humà. La fracció lipídica dels gangliòsids, és a dir la ceramida, és compon d'un amino alcohol de cadena llarga enllaçat a un àcid gras mitjançant un enllaç amida. Les estructures amb 18 i 20 àtoms de carboni que contenen un doble enllaç trans en la posició 4-5 són els components amino de cadena llarga més abundants dels gangliòsids cerebrals; aquests comunament reben el nom d'esfingosina. Els amino alcohols de cadena llarga que no contenen un doble enllaç en la posició 4-5 generalment s'anomenen esfinganina. L'àcid esteàric (18:0) és l'àcid gras principal dels gangliòsids de cervell humà i forma al voltant del 80 % del contingut total d'àcids grassos dels gangliòsids (Sonnino and Chigorno, 2000).

Tot i la precisa informació relatada del contingut lipídic en el cervell humà és necessiten més estudis per tal de completar l'atles lipídomic del cervell. L'enorme complexitat del cervell humà adult es pot expressar amb l'observació que es pot discernir al voltant de 900 subdivisions neuroanatòmiques. Anàlogament a l'observació que hi ha un perfil de transcriptòmica-regió específica, es pot especular que el lipidoma de cada estructura cerebral o regió és diferent en termes de la realització de funcions diferents.

### 3.3. Propietats funcionals dels lípids al cervell humà

Les propietats funcionals dels lípids al cervell poden atribuir-se a: la integritat estructural i funcional de les membranes cel·lulars neuronals i glials, la generació de mediadors lipídics, i la reactivitat química de les cadenes d'acil.

### 3.3.1. Integritat estructural i funcional de les membranes cel·lulars neuronals i gials

La propensió inherent de les cadenes acil no polars dels lípids a l'autoassemblatge en aigua és la base física per a la formació espontània de membranes, i fa que les membranes siguin pràcticament impermeables als soluts polars. Mentre que una sola espècie de lípids ha de ser suficient per generar una barrera, una membrana cel·lular requereix una major complexitat i diversitat en els seus components lipídics per cobrir totes les necessitats estructurals i funcionals exigides d'una membrana cel·lular. Aquesta diversitat estructural té implicacions profundes, influint en la química general i en els paràmetres físics de membrana com la geometria, la curvatura, la fluïdesa, el gruix, la densitat d'empaquetament dels lípids i la càrrega superficial. Aquestes propietats dels lípids de membrana tenen papers crucials en la fisiologia de les cèl·lules neuronals i gials, determinant la regulació dels canals i receptors iònics, així com la fisiologia de la transmissió sinàptica, i fins i tot propietats elèctriques (Piomelli et al., 2007).

L'ampli ventall de processos en els quals els fosfolípids estan específicament implicats explica la necessitat de la diversitat en la seva estructura i composició en àcids grassos (Dowhan, 1997; Hermansson et al., 2011). Aquesta diversitat exigeix la participació de vies metabòliques complexes i de regulació (Vance and Vance, 1996; Yeagle, 1993). De fet, per exemple, les cèl·lules eucariotes inverteixen al voltant d'un 5 % dels seus gens per sintetitzar tots aquests lípids (van Meer et al., 2008). La composició fosfolipídica d'una membrana cel·lular és mantinguda principalment per mecanismes de retroalimentació de la biosíntesis de fosfolípids. Observacions recents semblen implicar el factor de transcripció SREBP (de l'anglès, *sterol regulatory element-binding protein*) (Dobrosotskaya et al., 2002) i el receptor nuclear PPARs (de l'anglès, *peroxisome proliferator activated receptors*) (Rakhshandehroo et al., 2009) com a factors clau que regulen la composició de membrana i regulen la síntesis de lípids d'acord a les necessitats.

Els fosfolípids constitueixen el gruix de la matriu lipídica de la membrana. Un factor important que determina la forma de fosfolípids és la naturalesa de la seva cua hidrofòbica i els residus d'àcids grassos lligats al grup hidroxil sn-1 i sn-2 de l'esquelet del glicerol. A temperatures fisiològiques, la longitud d'una molècula de fosfolípid és directament proporcional al nombre d'àtoms de carboni i inversament proporcional al nombre d'enllaços dobles presents en les seves cadenes d'àcids grassos. Les cadenes acils dels fosfolípids són cadenes hidrocarbonades saturades (AGS), monoinsaturades (AGMI) o poliinsaturades (AGPI) que normalment varien entre 14 i 22 àtoms de carboni de longitud (Wallis et al., 2002). En les cèl·lules eucariotes dels vertebrats, la mitjana de la longitud de cadena d'una membrana biològica es manté de forma estricta al voltant de 18 àtoms de carboni, i la distribució relativa entre àcids grassos saturats i insaturats segueix una ràtio de 40:60, respectivament (Pamplona, 2008). Els

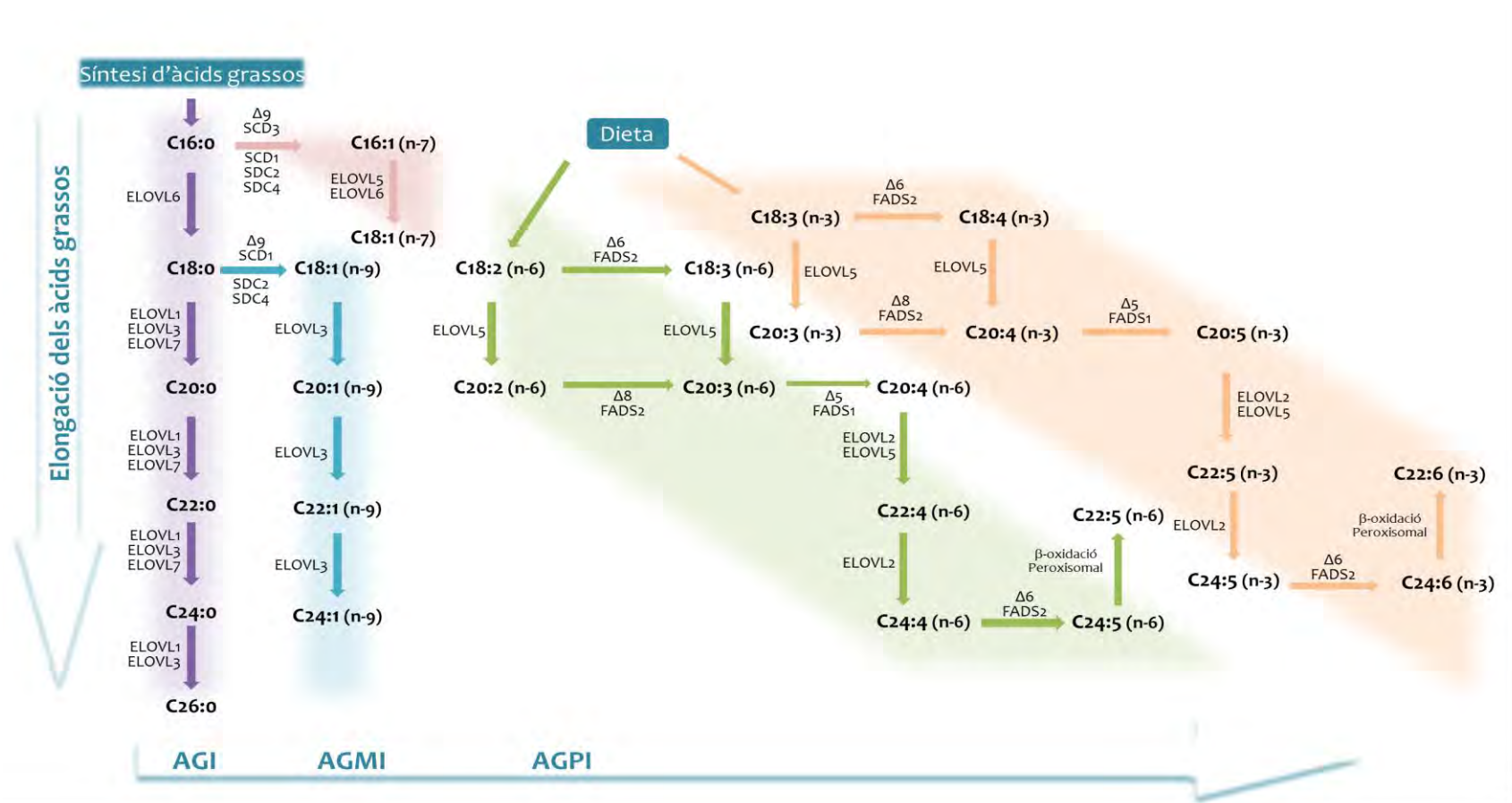
AGPI són components essencials de les membranes cel·lulars que afecten emfàticament a la seva fluïdesa, flexibilitat i permeabilitat selectiva. Addicionalment, també estan implicats en nombrosos processos fisiològics i cel·lulars que inclouen, per exemple, la modulació de transportadors i canals iònics, activitats d'enzims associades a la membrana, regulació de l'expressió gènica, endocitosis/exocitosis, adaptacions al fred i supervivència, i defensa enfront a patògens (Wallis et al., 2002).

### 3.3.1.1. Biosíntesis dels àcids grassos

Com a components estructurals de les membranes i com a font d'energia, els àcids grassos són essencials per a la vida. A més, juguen papers crucials en el manteniment de la funció neurològica normal. Així, el manteniment de les característiques dels lípids com pot ser la longitud i el patró de saturació-dessaturació de la cadena alifàtica dels àcids grassos són essencials per a les seves funcions. En conseqüència, una adequada elongació i dessaturació dels àcids grassos és essencial per al manteniment i l'homeòstasi dels lípids, i la interrupció d'aquests processos poden tenir conseqüències devastadores (Guillou et al., 2010).

En cèl·lules eucariotes, tant els àcids grassos sintetitzats en el citosol per l'enzim àcid gras sintetasa (FAS; de l'anglès, *fatty acid synthase*), com els derivats de la dieta poden ser sotmesos a processos de dessaturació i elongació per donar lloc a àcids grassos de cadena llarga (de 16 i 18 carbonis) i de cadena molt llarga ( $\geq 20$  carbonis) amb diferents saturacions per l'acció d'enzims específics localitzats en el reticle endoplasmàtic. Específicament, els AGS de cadena llarga i els AGMI de les series n-10, n-7 i n-9 poden sintetitzar-se a partir de l'àcid palmític (C16:0) mitjançant l'enzim FAS. En canvi, els AGPI de cadena llarga de les series n-6 i n-3 únicament poden ser sintetitzats a partir dels precursors essencials obtinguts de la dieta, com són l'àcid linolènic (18:3n-3) i l'àcid linoleic (18:2n-6) (Naudí et al., 2011a).

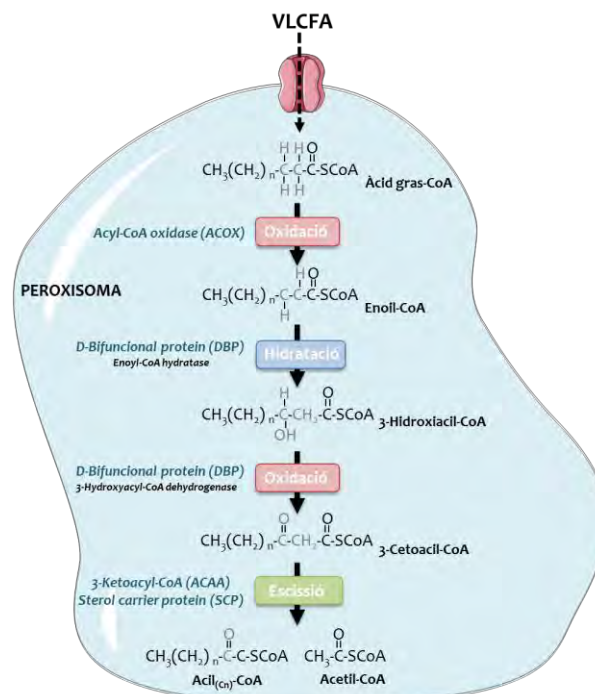
En aquest procés de síntesis els enzims desaturases, que estan conservats a través de tot el regne animal, insereixen dobles enllaços en posicions específiques de la cadena de l'àcid gras, i el sistema d'elongació dels àcids grassos, mitjançant les elongases, permeten incrementar en unitats de 2 àtoms de carboni la cadena de l'àcid gras (Guillou et al., 2010). En base a la localització del primer doble enllaç del carboni des de l'extrem metil de la cadena, la nomenclatura es divideix principalment en dos classes: els omega-3 (n-3) i els omega-6 (n-6). L'equilibri dels àcids grassos omega-3 i omega-6 és important per a l'homeòstasi normal i el desenvolupament en tot el cicle de vida en tots els teixits, però especialment en el cervell. Una descripció detallada del mecanisme d'acció i la funció específica de cada un d'aquests enzims es troba en revisions com (Guillou et al., 2010; Leonard et al., 2004) (Figura 10).



**Figura 10. Biosíntesi d'àcids grassos de cadena llarga i molt llarga en mamífers.** Els àcids grassos saturats de cadena llarga i els àcids grassos insaturats de les sèries n-10, n-7 i n-9 poden sintetitzar-se a partir de l'àcid palmític (16:0) produït per l'enzim àcid gras sintetasa. Els àcids grassos de cadena llarga de les sèries n-6 i n-3 únicament poden sintetitzar-se a partir de precursors obtinguts de la dieta. Dos són els enzims necessaris per aquest procés: i) Desaturases: les desaturases dels àcids grassos (FADS; de l'anglès, *fatty acid desaturation*) són els enzims encarregats de treure dos àtoms d'hidrogen de l'àcid gras, creant així un doble enllaç en una posició específica de la cadena dels àcids grassos. Aquest procés es veu influenciat per les propietats biològiques de cada àcid gras o del lípid que el conté. En mamífers s'expressen les activitats desaturases  $\Delta_9$ ,  $\Delta_6$  i  $\Delta_5$  en funció de la posició on s'introdueix el doble enllaç. Particularment, la desaturasa  $\Delta_9$  actua en la síntesi d'àcids grassos monoinsaturats i les desaturases  $\Delta_6$  i  $\Delta_5$  actuen en la formació d'àcids grassos poliinsaturats; i ii) Elongases: per al procés d'elongació es requereixen quatre reaccions enzimàtiques: condensació d'una molècula d'àcid gras-CoA amb una de malonil-CoA; reducció del 3-cetoacil-CoA format; deshidratació i, finalment, reducció per formar el nou acil-CoA elongat. La primera d'aquestes quatre reaccions, és la limitant en el procés, i és catalitzada pels enzims elongases (ELOVL; de l'anglès, *elongation of very-long-chain fatty acids*). Actualment s'han descrit set proteïnes, identificades com a ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 i ELOVL7, que prefereixen àcids grassos saturats i monoinsaturats com a substrats, i ELOVL2, ELOVL4 i ELOVL5 que són selectives per àcids grassos poliinsaturats (Guillou et al., 2010; Moon et al., 2001).

L'alta concentració de l'àcid gras docosahexaenoic (DHA, 22:6 n-3) a nivell cerebral fa que tingui especial interès la seva síntesis. Aquesta no obstant, no és produïda al reticle endoplasmàtic com la resta d'àcids grassos (Ferdinandusse et al., 2001). Com s'observa a l'esquema anterior, la síntesis d'AGPI de 22 carbonis amb 5 o 6 insaturacions no són sintetitzats directament per l'elongació i saturació dels seus precursors. La formació d'aquests AGPI necessiten de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal. A partir dels àcids grassos 24:5 n-6 i 24:6 n-3, aquests són transferits del reticle endoplasmàtic cap al peroxisoma, on un únic cicle de  $\beta$ -oxidació produeix l'àcid gras 22:5 n-6 i el DHA respectivament (Voss et al., 1991). Posteriorment, els àcids 24:5 n-6 i DHA són transportats cap al reticle endoplasmàtic on són esterificats dins de les diferents espècies lipídiques (Chen and Bazinet, 2015; Luthria et al., 1996).

Així doncs, l'obtenció tan del 24:5 n-6 com del DHA, especialment en el cervell, comparteixen la via del catabolisme dels àcids grassos de cadena molt llarga que es produeix en el peroxisoma (Ferdinandusse et al., 2001; Trompier et al., 2014). La  $\beta$ -oxidació peroxisomal consisteix en 4 passos enzimàtics: oxidació, hidratació, oxidació i l'escissió tiolítica amb el consegüent alliberament d'un àcid gras escurçat i acetil-CoA (Wanders and Waterham, 2006). Els enzims implicats en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal són: ACOX (de l'anglès, *acyl-CoA oxidase*), DBP (de l'anglès, *D-bifunctional protein*), ACAA (de l'anglès, *acetyl-CoA C-acyltransferase*) i SCP (de l'anglès, *sterol carrier protein*) (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de la maquinària de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal.** Els àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFA; de l'anglès, *very long chain fatty acids*) són catabolitzats en el peroxisoma per mitjà de 4 passos enzimàtics: oxidació, hidratació, oxidació i l'escissió tiolítica amb el consegüent alliberament d'un àcid gras escurçat i acetil-CoA. Tanmateix, la síntesis d'AGPI de 22 carbonis necessiten d'un cicle de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal.

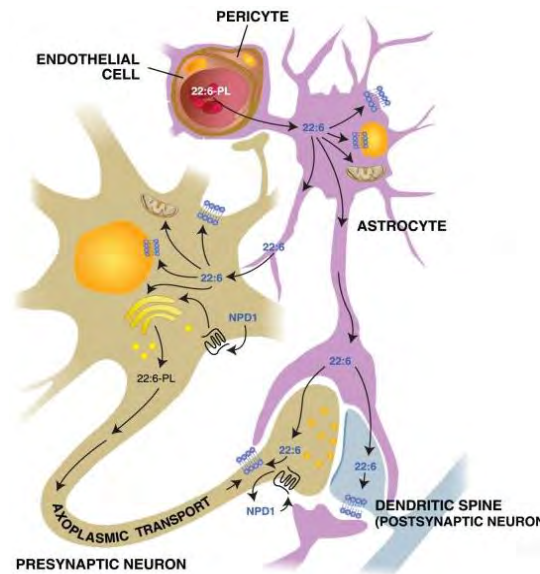
### 3.3.1.2. Síntesis d'AGPI en el SNC

El cervell és un dels òrgans més enriquits en àcids grassos de cadena llarga i insaturats, especialment amb el DHA (Igarashi et al., 2007; Lauritzen et al., 2001; Naudí et al., 2013a). No obstant això, les neurones i la glia semblen no tenir els mecanismes necessaris per participar activament en la dessaturació dels àcids grassos, els quals són imprescindibles per a la biosíntesis de DHA i altres AGPI a partir dels seus precursors.

Les evidències disponibles suggereixen que les seves provisions procedeixen del fetge, de les cèl·lules endotelials i dels astròcits (Bazan et al., 2011). La concentració cerebral d'AGPI depèn en gran mesura de l'aportació dietètica i de la síntesis perifèrica en el fetge a partir de precursors dels àcids grassos essencials. Tot i l'elevada síntesis en el fetge, els nivells de DHA en aquest òrgan es mantenen aparentment menors que en el teixit cerebral, fet que suggereix que el DHA sintetitzat en el fetge és transportat, mitjançant les lipoproteïnes del plasma, pel torrent sanguini al cervell, per mantenir els nivells de DHA cerebral (Rapoport et al., 2007).

D'altra banda, les cèl·lules endotelials microvasculars tenen la capacitat de proporcionar al cervell una quantitat substancial de productes d'elongació i dessaturació de 18 àtoms de carboni a les neurones. A més, també produeixen i subministren productes de 20 àtoms de carboni, com són el 20:4 n-6 i el 20:5 n-3 a partir dels seus precursors corresponents, als astròcits i aquests són els encarregats de completar la conversió a àcids de 22 carbonis, l'àcid docosapentaenoic (22:5 n-6) i el DHA, respectivament (Zhang et al., 2011). Per tant, els astròcits són proveïdors de DHA en el cervell, gràcies a les cèl·lules endotelials proveïdores dels precursors necessaris per a la conversió dels AGPI precursors (18:3 n-3 i 18:2 n-6) a DHA. Així doncs, l'àcid DHA i l'AA són transferits pels astròcits cap a les neurones, capaces d'assimilar i d'incorporar-les en els fosfolípids de la membrana (Moore, 1993) (Figura 12).

Tanmateix, alguns autors com Kaduce i col·laboradors (Kaduce et al., 2008) també han suggerit la possibilitat que les neurones disposin de la maquinària de la biosíntesis dels AGPI, atès que els requeriments de DHA per part de la neurona no estiguin condicionats a fluctuacions en el seu aport extern i perquè així s'autoregula el seu contingut en base a les seves necessitats funcionals.



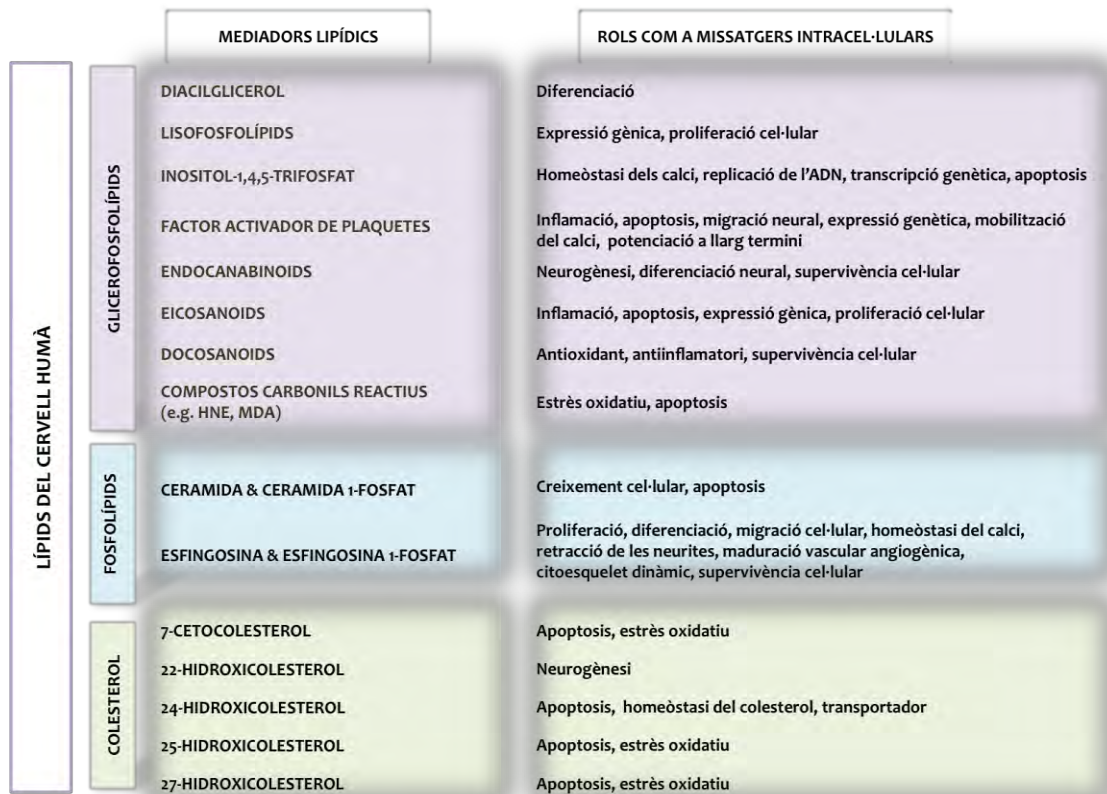
**Figura 12.** Esquema del moviment de l'acid docosahexaenoic (DHA) (22:6 n-3) a través de la unitat neurovascular i la seva disposició dins de les neurones i els astròcits. Els fosfolípids 22:6 n-3 (22:6-PLS) són absorbits per les cèl·lules endotelials de la circulació i posteriorment són transferits als astròcits en el SNC; des d'allà, el 22:6n-3 s'incorpora als astròcits o bé és transferit a les neurones. Figura de (Bazan et al., 2011).

### 3.3.2. Senyalització lipídica en el cervell humà

Una altra propietat funcional dels lípids a nivell cerebral és la generació de mediadors lipídics. Els lípids són molècules portadores d'informació en el cervell humà (Farooqui, 2009; Piomelli, 2005; Piomelli et al., 2007). Els lípids de les membranes neuronals poden ser ràpidament convertits en mediadors lipídics o en missatgers secundaris, els quals són molècules lipofíliques que faciliten els processos de transducció de senyals, regulen la comunicació cèl·lula-cèl·lula, i controlen els esdeveniments moleculars i cel·lulars en el cervell. Els mediadors lipídics són importants reguladors endògens derivats de la degradació enzimàtica de glicerolfosfolípids, esfingolípids i colesterol mitjançant les fosfolipases, esfingomielinases, i hidroxilases del citocrom P450, respectivament. En les cèl·lules neuronals, els mediadors lipídics estan associats amb proliferació, diferenciació, estrès oxidatiu, inflamació i apoptosi. Un grup important de mediadors lipídics, que s'originen en l'oxidació enzimàtica de l'AA i l'àcid eicosapentaenoic (EPA; de l'anglès, *eicosapentanoic acid*) són els icosanoides. Aquest grup està format per prostaglandines, leucotriens, tromboxans i lipoxines que s'uneixen a receptors específics acoblats a proteïnes G i vies de senyalització intracel·lular que vehiculen la vasodilatació, pressió sanguínia, dolor, febre i inflamació, entre altres. D'altra banda, els corresponents mediadors lipídics del metabolisme de l'àcid docosahexaenoic són els docosanoides, els quals inclouen resolvines, protectines (neuroprotectines) i maresins. Els docosanoides produeixen efectes antioxidants, antiinflamatoris, i anti-apoptòtics en el teixit cerebral. Altres mediadors lipídics derivats de glicerolfosfolípids són els diacilglicerols, fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfat, factor activador de plaquetes, àcid lisofosfatídic i endocannabinoides. La degradació dels esfingolípids també resulta en la generació de mediadors lipídics



derivats d'esfingolípid, com ara la ceramida, ceramida 1-fosfat, esfingosina, i l'esfingosina 1-fosfat. Aquests mediadors estan implicats en diferenciació, creixement, migració cel·lular, i apoptosi. De la mateixa manera, mediadors lipídics derivats del colesterol, incloent, 24 i 25-hidroxicolesterol, produeixen apoptosi. El metabolisme anormal de mediadors lipídics pot estar estretament associat amb la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer (Naudí et al., 2015). La Figura 13 mostra mediadors lipídics representatius de glicerofosfolípids, fosfolípids i colesterol i el seu paper en el cervell humà.



**Figura 13. Mediadors lipídics representatius de glicerofosfolípids, fosfolípids i derivats del colesterol, i el seu paper en el cervell humà.** Figura adaptada de (Naudí et al., 2015).

Els mediadors lipídics tenen una peculiaritat: mentre que els neurotransmissors hidròfils i els missatgers secundaris tenen un accés limitat al nucli hidrofòbic de la membrana, els lípids són compostos amfipàtics que es generen dins de la bicapa i tenen l'opció d'intervenir dins o bé fora dels seus límits. En altres paraules, per aquesta classe de biomolècules la membrana és un conducte i no una barrera (Piomelli et al., 2007). D'altra banda, podem distingir quatre característiques clau de senyalització vehiculada pels lípids al cervell (Naudí et al., 2015; Piomelli et al., 2007). En primer lloc, la composició lipídica de la membrana confereix propietats biofísiques específiques a les seves pròpies membranes, però també es converteix en un dipòsit que pot ser utilitzat per generar una sèrie de missatgers intracel·lulars i transcel·lulars segons la demanda, d'una manera semblant a la biosíntesi de l'hormona esteroide. En segon lloc, aquests missatgers es produeixen gairebé invariablement a través d'un procés

de "cascada" en què una sola ruta bioquímica no produeix un, sinó una seqüència de senyals funcionalment diferents. En tercer lloc, els senyals dels lípids poden aconseguir fàcilment receptors nuclears i d'òrgans en virtut de les seves propietats químiques. Finalment, el sistema està dissenyat per generar redundància com diferents mecanismes bioquímics poden ser utilitzats per generar els mateixos mediadors lipídics. La multiplicitat de molècules informacionals necessita ser coordinada mitjançant vies probablement derivades de la partició temporal i espacial de la senyalització de lípids dins de la distribució heterogènia de la bicapa de membrana (Piomelli et al., 2007).

### 3.3.2.1. Mediadors lipídics a partir de l'àcid araquidònic

Com s'ha dit anteriorment, l'AA és un precursor dels eicosanoides, incloent prostaglandines (PG) i tromboxans, que juguen un paper important en moltes funcions fisiològiques i patològiques. La biosíntesi d'aquests metabòlits de l'AA es produeix principalment per l'activació de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>; de l'anglès, *Phospholipase A2*) en resposta a una àmplia varietat d'estímuls. PLA<sub>2</sub> catalitza la hidròlisi de la posició sn-2 dels glicerofosfolípids de membrana per alliberar l'AA lliure i lisofosfolípids (Murakami et al., 2011). Les cèl·lules dels mamífers tenen estructuralment diverses formes de PLA<sub>2</sub> incloent PLA<sub>2</sub> secretora, Ca<sup>2+</sup> + PLA<sub>2</sub> -independent i PLA<sub>2</sub> citosòlica (cPLA<sub>2</sub>). Entre ells, el grup IVA PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>α) és altament selectiu per glicerofosfolípids que contenen AA (Nakamura and Murayama, 2014). L'AA alliberat és metabolitzat a través de l'oxidació enzimàtica per les ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX), i citocrom P450 (CYP450) per produir múltiples metabòlits bioactius icosanoides, incloent prostaglandines pro-inflamatòries E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tromboxans B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), leucotriens (LTB<sub>4</sub>), lipoxines (LXA<sub>4</sub>), hidroxilases (19-HETE) i epoxigenases (11,12-EET) (Figura 14). No obstant això, l'AA també pot ser metabolitzat dins la mitocòndria mitjançant la β-oxidació (Rapoport, 2014).

Com s'observa a la Figura 14 hi ha dos enzims ciclooxigenasa, la COX-1 es expressada constitutivament i la COX-2 és l'enzim induïble. Diferents tipus de prostaglandines i tromboxans, de caràcter pro-inflamatori, són els que es generen a través de l'oxidació inicial dels enzims COX. (Funk, 2001). Els leucotriens, igualment implicats en la senyalització pro-inflamatòria es generen a través de les vies de LOX (Funk and Cyrus, 2001). En cèl·lules de mamífers, existeixen tres famílies hidroperòxidases LOX, 5-LOX, 15-LOX, i 12-LOX, de les quals 5-LOX genera leucotriens. L'activitat de les 15-LOX i 12-LOX genera lipoxines, de caràcter antiinflamatori com a derivats de l'AA (Chen and Bazinet, 2015; Das, 2013; Rapoport, 2014; Strassburg et al., 2012). L'oxidació enzimàtica de l'AA a través del citocrom p450 genera epòxids (EET) i diols de caràcter antiinflamatori, i hidroxieicosatetraenoics (HETE) de caràcter pro-inflamatori (Iloff et al., 2010; Strassburg et al., 2012; Xu et al., 2013).

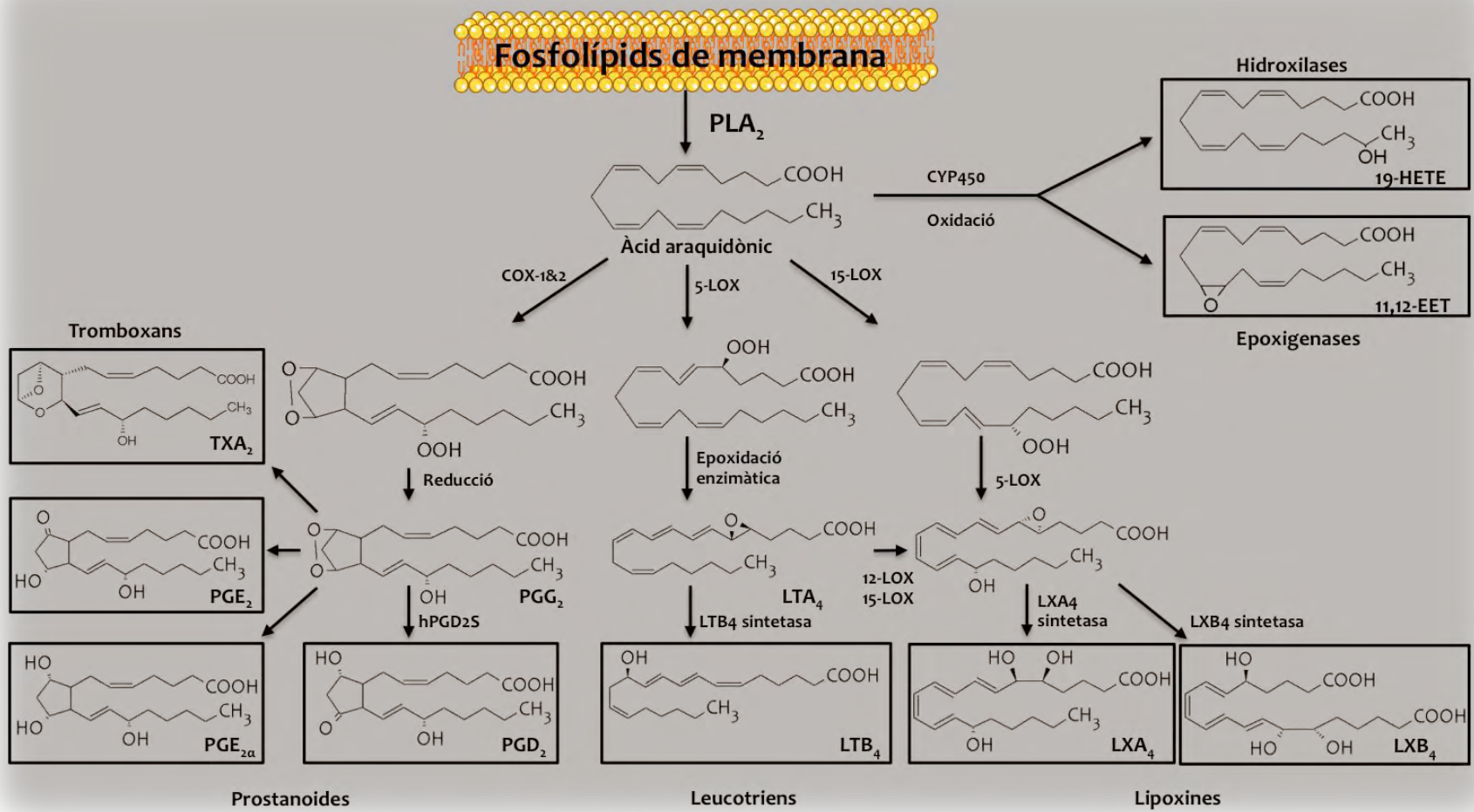


Figura 14. Esquema del metabolisme de l'àcid araquidònic que mostra diferents metabòlits formats a partir d'ella.

Part dels enzims que actuen en el metabolisme de l'AA, també actuen en el metabolisme d'altres AGPI com l'àcid linoleic, l'àcid eicosapentaenoic, l'àcid docosahexaenoic, l'àcid dihomog-linolènic i l'àcid  $\alpha$ -linolènic, tot i que els diferents substrats generen diferents productes (Figura 15).

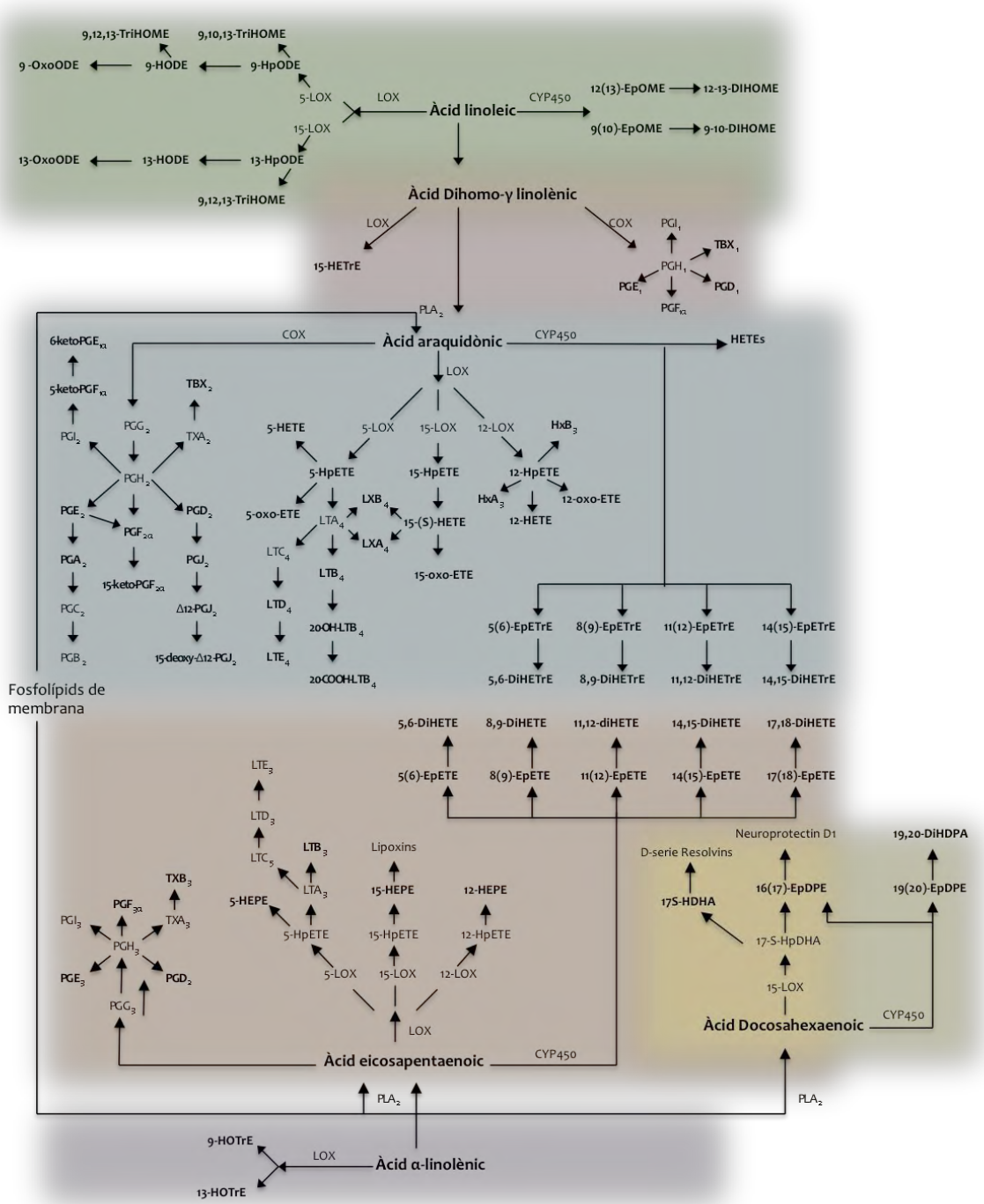


Figura 15. Biosíntesi de mediadors lipídics derivats del metabolisme de: l'àcid linoleic (verd), l'àcid dihomog-linolènic (vermell), l'àcid araquidònic (blau), l'àcid eicosapentaenoic (taronja), l'àcid docosahexaenoic (groc), i l'àcid  $\alpha$ -linolènic (lila) a través dels enzims lipoxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX), i citocrom P450 (CYP450). Figura adaptada de (Strassburg et al., 2012).

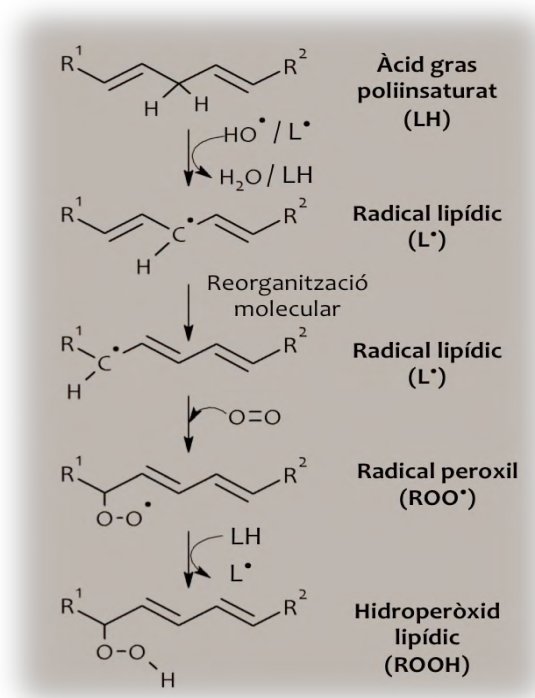
### 3.3.3. Reactivitat química dels àcids grassos

La susceptibilitat dels lípids de membrana enfront a les alteracions oxidatives és deguda a dos característiques inherents, les propietats fisicoquímiques de la membrana i la reactivitat química dels àcids grassos que la componen (Hulbert et al., 2007; Pamplona, 2008; Pamplona et al., 2002a). La primera propietat està relacionada amb el fet que l'oxigen i els radicals lliures són més solubles en el medi de la bicapa lipídica que en solució aquosa (Gamiel et al., 2008; Möller et al., 2005). Així doncs, les membranes contenen una fase orgànica interior en la qual l'oxigen tendeix a concentrar-se. Per això, aquestes diferències en solubilitat són importants quan es considera la disponibilitat de l'oxigen/radicals lliures per a reaccions químiques dins dels sistemes vius: les regions orgàniques contenen més radicals lliures que les regions aquoses i, consegüentment les membranes lipídiques es tornen dianes principals de lesió oxidativa. La segona propietat està relacionada amb el fet que els AGPI són extremadament sensibles a l'oxidació (Bielski et al., 1983; Holman, 1954). Així, cada un dels fosfolípids de la membrana conté un àcid gras insaturat esterificat en la posició 2 de l'esquelet del glicerol. La majoria d'aquests són poliinsaturats i la presència d'un grup metil entre dos dobles enllaços fa que l'àcid gras sigui més sensible a la lesió induïda pels radicals lliures, augmentant exponencialment la seva sensibilitat a l'oxidació en funció del número de dobles enllaços per molècula d'àcids gras (Bielski et al., 1983; Holman, 1954). Així doncs, els AGPI amb dos o més dobles enllaços són atacats més fàcilment per les espècies reactives que els AGS (sense dobles enllaços) o AGMI (un doble enllaç) presents en les cadenes laterals dels fosfolípids.

En aquest escenari, per a una membrana amb un determinat perfil en àcids grassos és possible calcular el seu índex de peroxidabilitat (IP) combinant la seva composició amb la susceptibilitat relativa dels àcids grassos individuals a la peroxidació. Així doncs, l'IP és una aproximació a la susceptibilitat relativa d'una membrana biològica amb un perfil determinat d'àcids grassos a la lesió lipoperoxidativa. A major número de dobles enllaços més susceptible, a menor IP, més resistent a la peroxidació lipídica és una membrana (Pamplona, 2008). L'elevada concentració d'AGPI en els fosfolípids de les membranes cel·lulars neuronals i glials no solament els converteix en els principals objectius de les reaccions amb agents oxidants sinó que també possibiliten el fet de participar en reaccions en cadena vehiculades pels radicals lliures, generant hidroperòxids lipídics (Halliwell and Gutteridge, 2007; Spiteller, 2001) (Figura 16).

Els hidroperòxids lipídics són més hidrofílics que els àcids grassos no peroxidats, i intenten migrar cap a la superfície de la membrana per interaccionar amb l'aigua, fent que l'estructura, la fluïdesa i altres propietats de la membrana es vegin afectades. Els hidroperòxids que es generen durant la peroxidació lipídica, així com altres modificacions oxidatives anomenades endoperòxids, poden progressar cap a

estats finals irreversibles que impliquen la fragmentació dels AGPI i la generació d'un ampli ventall d'espècies aldehydiques amb 3-9 àtoms de carboni de longitud, anomenats RCS tal i com s'ha explicat en l'apartat 2.1. Els 2-hidroxihexanal i 4-hidroxihexenal són productes aldehydics generats en la peroxidació lipídica d'AGPI. A més de la formació d'aldehyds, radicals hidroperoxils de lípids es sotmeten a endociclitzacions per produir èsters d'àcids grassos; dos classes d'aquests àcids grassos ciclats són els isoprostans i els neuroprostans (Sultana et al., 2013). Tots aquests compostos s'han detectat, caracteritzat i localitzat (per espectrometria de masses i immunohistoquímica) en el cervell humà.



**Figura 16. Esquema de les reaccions principals que es produeixen durant la peroxidació lipídica.**

Aquests compostos tenen funcions fisiològiques específiques de senyalització que indueixen respostes d'adaptació per disminuir el dany oxidatiu i millorar les defenses antioxidants (Higdon et al., 2012; Pamplona, 2011, 2008). A nivell antioxidant, tot i els mecanismes anteriorment nombrats, cal una menció especial al paper protector del DHA mitjançant la regulació dels nivells de GPx4 (de l'anglès, *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*) (Casañas-Sánchez et al., 2015). GPx4 és capaç de restaurar estats reduïts dels àcids grassos dels fosfolípids de membrana, garantint la seva homeòstasi (Brigelius-Flohé, 2006; Conrad et al., 2007; Imai and Nakagawa, 2003).

Tanmateix, les membranes de cèl·lules neuronals i gials són entitats dinàmiques, heterogènies i asimètriques que requereixen ajustos continus en l'estructura química i la forma molecular dels seus constituents lipídics, en particular dels fosfolípids i dels esfingolípids. Així doncs, els lípids de

membrana es sotmeten contínuament a cicles molt ràpids de desacilació i reacilació -és a dir, els àcids grassos de fosfolípids estan sent retirats i substituïts tant en el carbonil sn-1 com en el sn-2 de la cadena principal de glicerol del lípid contínuament-. Aquest procés es descriu com "la remodelació de la membrana" i és la raó fonamental per la qual les membranes poden respondre molt ràpidament als canvis interns i externs (Figura 17), així com per al control de qualitat de la composició de lípids de membrana.

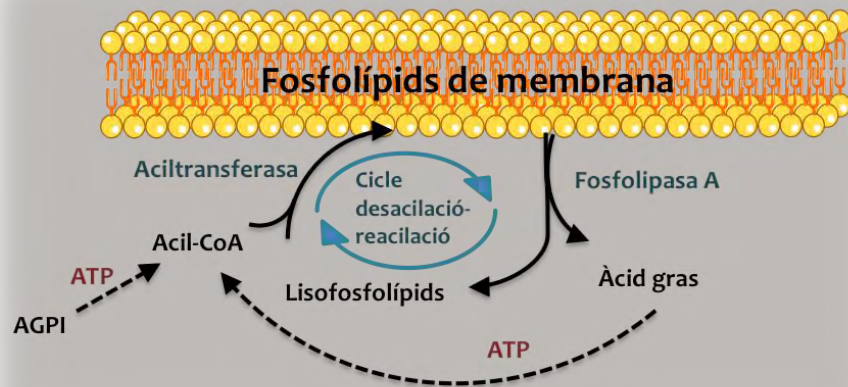


Figura 17. Esquema del cicle desacilació i reacilació. Figura adaptada de (Yamashita et al., 2014)

#### 4. ESTRÈS OXIDATIU I ENVELLIMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Una característica constant del cicle vital dels organismes multicel·lulars és que les etapes inicials de l'ontogènia, composta per l'embriogènesi, el creixement, i la maduració reproductiva, en la qual els paràmetres fisiològics arriben als seus nivells màxims, són seguides per una fase de declivi inexorable de la seva capacitat homeostàtica que té la seva última expressió en la mort de l'organisme. Aquest deteriorament funcional i progressiu en la fase post-reproductiva s'anomena convencionalment "procés d'envelliment" (Naudí et al., 2014).

Una teoria amb capacitat explicativa i predictiva del procés d'envelliment s'hauria d'ajustar a les característiques bàsiques del procés, exposades pel biogerontòleg Bernard Strehler (Strehler, 1962): l'envelliment és un procés progressiu, endogen i deleteri per l'individu. El caràcter progressiu de l'envelliment comporta que els mecanismes bàsics han d'estar presents durant tota la vida, tant en individus joves com en individus d'edat avançada. L'envelliment és un procés endogen; fet que expressa que els factors exògens -per exemple, la radiació ultraviolada i els oxidants de la dieta- no són la causa

del procés intrínsec d'envelliment, tot i que no exclou que puguin interaccionar amb les causes endògenes potenciant o reduint els seus efectes. El caràcter endogen de l'envelliment significa que la velocitat o taxa d'envelliment de les diferents espècies animals, i per tant, de la seva longevitat màxima, està genotípicament determinada -la longevitat màxima de l'espècie humana està entre 120-125 anys-. Aquest fet explica perquè diferents espècies animals envelleixen a velocitats molt diferents en ambients similars. Per contra, la longevitat mitja o expectativa/esperança de vida, calculada a partir del temps que viu cada individu, està modulada per l'ambient i en un menor grau pel genotip -l'expectativa de vida de l'espècie humana, en els països industrialitzats, és de 80 anys-. Aquesta és la raó de perquè molts factors ambientals compresos en l'estil de vida tals com els antioxidants, el contingut en grassa saturada de la dieta, i la vida sedentària, són tan importants per a la determinació de l'expectativa de vida. I a la inversa, independentment del que mengi per exemple un elefant, mai envellirà a la velocitat d'un ratolí sa, i cap dieta farà que un ratolí pugui sobreviure 85 anys. Així doncs, les diferències interindividuales en l'expectativa de vida dins d'una espècie donada, no s'hauria de confondre amb les variacions interespecíes en la longevitat màxima (Naudí et al., 2014; Pamplona and Barja, 2011).

Són moltes, però, les teories que al llarg de la història de la humanitat intenten explicar el procés de l'envelliment des de diferents punts de vista. Existeixen revisions, com la realitzada per Medvedev al 1990 (Medvedev, 1990) o Yin i Chen al 2005 (Yin and Chen, 2005), que enumeren i expliquen diferents teories proposades per diferents camps de la biologia i inclús d'altres ciències no matemàtiques. Entre totes aquestes teories, la que actualment té major suport per part de la comunitat científica i és confirmada per nombroses proves teòriques i experimentals que encaixen amb els principis de Strehler és la "Teoria Mitocondrial de l'Envelliment per Radicals lliures" (Harman, 1972), que proposa que l'acumulació de dany per l'acció dels radicals lliures produïts durant el metabolisme cel·lular són la causa de l'envelliment. Una descripció detallada dels estudis realitzats es troben en revisions com (Pamplona and Barja, 2011, 2007).

Totes les cèl·lules del SNC es troben afectades pel procés d'envelliment, com es pot constatar pel declivi amb el temps de les funcions sensorials, motores i cognitives (Mattson and Magnus, 2006). Aquest declivi és degut a multitud de canvis perjudicials, que disminueixen les capacitats funcionals màximes i l'homeòstasi, i incrementen la probabilitat d'experimentar processos degeneratius -com la malaltia d'Alzheimer o Parkinson, entre moltes altres-, que finalment porten a la mort. Tots aquests canvis probablement s'originen a partir d'un petit nombre de causes bàsiques que operen de forma contínua durant tota la vida i determinen la taxa d'envelliment, que és específica d'espècie, teixit i tipus cel·lular (Pamplona and Barja, 2011). Tot i el progrés en el coneixement de la biologia molecular i la fisiopatologia dels desordres neurodegeneratius, la naturalesa dels mecanismes que causen l'envelliment i els canvis que transcorren durant l'envelliment encara no estan clars.



L'envelliment cerebral és un procés molt complex que implica alteracions dels mecanismes moleculars, com la reducció de la funció mitocondrial, augment de l'estrès oxidatiu, autofàgia, acumulació d'agregats de proteïnes ubiquitinitzades, així com l'alteració de la senyalització de nombroses vies de neurotransmissors i factors neurotròfics (Bishop et al., 2010; Mattson and Magnus, 2006).

Les cèl·lules en el sistema nerviós es veuen afectades per i en resposta a l'edat molt més que les cèl·lules d'altres òrgans sistèmics, de manera que les cèl·lules en el cervell experimenten un progressiu augment de les conseqüències de l'estrès oxidatiu -alta oxidació a lípids, acumulació de proteïnes danyades i lesions en els seus àcids nucleics-, i una pertorbació en l'homeòstasi energètica (Ferrer, 2009a; Jové et al., 2014; Martínez et al., 2010; Naudí et al., 2015). El cervell és especialment vulnerable als efectes de la generació de ROS, tant a nivells normals com a nivells augmentats, a causa que el cervell: i) consumeix altes quantitats d'oxigen; ii) té quantitats relativament baixes dels sistemes generals de defensa antioxidants en comparació a altres tipus de teixits; iii) conté molts metalls de transició que poden ajudar al cicle redox; i iv) és molt ric en AGPI. Els AGPI en particular són diana dels ROS, i la seva oxidació condueix a la producció de productes neurotòxics de peroxidació de lípids com són el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) i el malondialdehid (MDA) (Naudí et al., 2015). Aquests efectes perjudicials són manifestats d'una manera més important en teixits post-mitòtics, com és el cas del SNC (Martínez et al., 2010), ja que les cèl·lules es troben lesionades irreversiblement o es perden al no poden ser reemplaçades mitjançant la mitosis de les cèl·lules que estan intactes. Tanmateix, aquests canvis durant l'envelliment normal es troben exacerbats en poblacions neuronals vulnerables en els desordres neurodegeneratius (Dalfó et al., 2005; Fourcade et al., 2008; Ilieva et al., 2011, 2007; Martínez et al., 2008; Muntané et al., 2006; Pamplona et al., 2008, 2005b).

L'augment progressiu de les modificacions oxidatives durant l'envelliment en les bases d'ADN, les proteïnes i els lípids, juntament amb l'alteració en l'activitat enzimàtica de proteases citosòliques, lisosomes i del proteasoma desencadenen una pèrdua de funció i integritat estructural de les molècules, fet que condueix a la disfunció cel·lular, dany tissular i finalment la mort (Mattson and Magnus, 2006). Les disminucions en la funció mitocondrial sovint han estat associades amb l'envelliment en general, i particularment amb l'envelliment del sistema nerviós (Ferrer, 2009a; Martínez et al., 2010). Les mesures de les activitats enzimàtiques mitocondrials en mostres de teixit cerebral han revelat disminucions significatives en l'activitat del complex piruvat deshidrogenasa, isocitrat deshidrogenasa i el complex  $\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa en pacients amb malaltia d'Alzheimer en comparació amb individus control (Ferrer, 2009a). L'activitat del complex I mitocondrial disminueix en el cervell durant l'envelliment normal, però molt més en la malaltia de Parkinson (Ferrer, 2009b). A més de les alteracions en les mitocòndries, les neurones també mostren alteració en la captació de glucosa durant l'envelliment normal, comproment encara més la seva capacitat per mantenir l'homeòstasi d'ions i altres processos

cel·lulars dependents d'energia. No obstant això, recentment s'ha descrit que el factor de transcripció REST (de l'anglès, *repressor element 1-silencing transcription factor*) és induït en l'envelliment del SNC i regula una xarxa de gens que intervenen en la mort cel·lular i en la resistència a l'estrès i a la malaltia d'Alzheimer (Lu et al., 2014).

#### 4.1. Vulnerabilitat neuronal selectiva

El deteriorament de l'estructura i funció del cervell humà adult durant l'envelliment no sembla ser uniforme en tot el cervell. Conseqüentment, l'envelliment del cervell humà es podria considerar com un procés heterogeni probablement subjecte a una vulnerabilitat neuronal selectiva específica de regió – i de cèl·lula- (Jové et al., 2014; Mattson and Magnus, 2006; Wang and Michaelis, 2010). Per definició, la vulnerabilitat neuronal selectiva es refereix al fet que certes poblacions neuronals són més vulnerables a les lesions o a la mort sota condicions adverses, mentre que altres neurones són relativament més resistents a les tensions de l'ambient. La vulnerabilitat selectiva d'algunes neurones es manifesta sovint en canvis en l'estructura i funcionament que poden o no, conduir a la mort cel·lular. Per exemple, les neurones vulnerables sovint pateixen una pèrdua de dendrites que condueixen a un deteriorament significatiu de la transmissió sinàptica, però les cèl·lules encara poden sobreviure durant un temps en aquest estat alterat. Per tant, la comprensió dels mecanismes subjacents de la vulnerabilitat neuronal selectiva és un pas essencial per desenvolupar estratègies per moderar l'impacte de l'envelliment en la qualitat de vida humana en general. En aquest marc, és plausible la hipòtesi que les diferències entre regions en l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu del cervell humà podrien ser responsables d'aquesta vulnerabilitat neuronal selectiva i, a al seu torn, conduir a diferents taxes d'envelliment.

L'envelliment del cervell humà no afecta totes les neurones per igual. Així, per exemple, en l'hipocamp, les neurones a la regió CA1 són vulnerables a l'envelliment cerebral, però les properes a la regió CA3 els danys a les neurones no són tant greus com a les neurones CA1 (Giannakopoulos et al., 1998; Mueller et al., 2007; O'Banion et al., 1994). A més, un perfil de pèrdua selectiva de sinapsis i neurones en certes regions del cervell s'ha descrit en el procés d'envelliment (Morrison et al., 1998; Morrison and Hof, 1997; Terry et al., 1987). Aquests estudis s'han realitzat, en la seva major part, a nivell histològic i s'han identificat relativament pocs canvis neuroquímics que correlacionen amb la vulnerabilitat neuronal o la resistència a lesions de l'edat o lesions o a la mort.

Mesuraments volumètriques del cervell (mitjançant tècniques no invasives com ara imatges estructurals del cervell i la ressonància magnètica funcional), així com la tomografia per emissió de positrons (PET; de l'anglès, *positron emission tomography*) i les mesures de la taxa metabòlica cerebral de la glucosa (CMRglc; de l'anglès, *cerebral metabolic rate of glucose*) reforcen la idea que l'envelliment afecta algunes

regions del cervell més que altres. A més dels canvis de volum en determinades regions del cervell durant l'envelliment [l'escorça cerebral, el nucli estriat, i el cerebel són les regions més vulnerables a la pèrdua de volum depenent de l'edat, mentre que les escorces sensorials primàries -com l'escorça visual-, l'escorça entorrinal, el paleostriatum, i la protuberància mostren molt menys encongiment (Raz and Rodrigue, 2006; Raz et al., 2007)] s'ha demostrat que l'escorça frontal és la regió amb la major disminució de CMRglc en comparació amb tota la resta de regions en l'escorça o en components subcorticals en l'envelliment cerebral (Loessner et al., 1995; Reiman et al., 2010). Aquests canvis en l'activitat metabòlica en certes àrees corticals durant l'envelliment són relacionats amb l'expressió neuronal alterada d'alguns enzims clau que controlen l'estat metabòlic global de les neurones i les cèl·lules gials associades, o bé són el resultat de l'activació alterada de la sinapsis o dels efectes perturbadors d'una anormal excitabilitat neuronal durant l'envelliment (Wang and Michaelis, 2010). L'anàlisi d'expressió de gens, en combinació amb els estudis de neuroimatge, així com investigacions histològiques detallades, estan proporcionant noves finestres en els canvis moleculars i cel·lulars que podrien explicar aquests patrons diferencials de susceptibilitat neuronal del procés d'envelliment (Wang and Michaelis, 2010). També s'ha de fer èmfasi que les pèrdues neuronals durant l'envelliment fins i tot en regions sensibles, són relativament modestes, mentre que les disminucions en el nombre de sinapsis en les mateixes regions semblen ser una característica més prominent de l'envelliment cerebral. Aquestes observacions han portat a l'afirmació que la major part del declivi funcional associat amb l'envelliment normal és causat per canvis relativament subtils, com la pèrdua de dendrites, reduccions en la densitat de la columna vertebral, morfologia alterada en la columna vertebral, o canvis en el perfil molecular de les sinapsis (Burke and Barnes, 2006; Mattson and Magnus, 2006; Morrison and Hof, 2002; West et al., 1994).

Per tal d'estudiar com les regions cerebrals dels humans responen diferencialment a les tensions associades amb l'augment de l'edat, alguns investigadors han utilitzat enfocaments genòmics funcionals (Berchtold et al., 2008; Evans et al., 2003; Khaitovich et al., 2004; Liang et al., 2007). Aquests estudis han proporcionat un major suport per al concepte d'heterogeneïtat regional pel que fa a les taxes diferencials dels canvis associats amb l'envelliment. D'altra banda, aquests treballs demostren que les categories ontològiques més prominents entre els gens expressats diferencialment són de senyalització intracel·lular, neurogènesi, transmissió sinàptica, regulació de factors de transcripció i regulació d'ions de calci [Ca<sup>2+</sup>]. Tanmateix, no disposem de dades que ens indiquin canvis lipídics associats amb l'envelliment, ni l'existència de diferències lipídiques entre regions.

## 5. RESTRICCIÓ DIETÀRIA I ENVELLIMENT

La restricció dietètica pot preservar la funció mitocondrial en l'envelliment, segons sembla, mitjançant la reducció de la producció de ROS i el dany oxidatiu molecular (Caro et al., 2008b; Pamplona and Barja, 2007, 2006; Pamplona, 2008; Portero-Otín and Pamplona, 2006; Sanz et al., 2006a, 2006d), i pot protegir a les neurones de ser lesionades per 'toxines endògenes' mitocondrials. Si els processos d'envelliment són centrals per a tots els trastorns neurodegeneratius, llavors seria d'esperar que una intervenció que retarda aquest procés també podria protegir contra trastorns neurodegeneratius. Els estudis sobre els efectes de la restricció dietètica d'una manipulació que poden retardar l'envelliment de processos en rosegadors, micos i éssers humans, indiquen que aquest podria ser el cas (Colman et al., 2009; Pamplona and Barja, 2006; Redman and Ravussin, 2011). Les dietes baixes en calories, la restricció de metionina i el dejuni intermitent retarden les manifestacions fisiològiques de l'envelliment i prolonguen l'esperança de vida mitjana i màxima de rosegadors fins a un 40 %, així com la vida útil dels primats, i també podria augmentar l'esperança de vida humana. Dèficits relacionats amb l'edat en la funció cognitiva i motora, i l'augment d'estrès oxidatiu i dany molecular, es redueixen en els animals mantinguts en la restricció dietètica en comparació amb les dietes *ad libitum*. A més de protegir les neurones contra la disfunció i la degeneració en models animals pertinents a la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, la malaltia de Huntington i en accidents cerebrovasculars, la restricció dietètica millora la producció de BDNF (de l'anglès, *brain-derived neurotrophic factor*) i la neurogènesi, que són processos que poden, en part, contrarestar la disfunció relacionada amb l'edat i la degeneració dels circuits neuronals (Del Arco et al., 2011)

### 5.1. Restricció calòrica

La restricció calòrica (RC, (McCay et al., 1935)), sense malnutrició, segueix sent la intervenció experimental no genètica més ben estudiada, capaç de disminuir la taxa d'envelliment i d'augmentar la longevitat màxima en espècies tant diferents com són els llevats, rotífers, dípters, aranyes, nematodes, peixos, rosegadors i primats (Colman et al., 2009; Mair and Dillin, 2008), i té efectes beneficiosos per a la salut, reduint l'aparició de malalties associades a l'edat tals com el càncer, obesitat, diabetis, sarcopenia i malalties autoimmunes, cardiovasculars i neurodegeneratives en ratolins, rates, així com en primats i humans (Jang et al., 2012; Martin et al., 2006; Mattson, 2002; Weindruch, 2003; Weindruch et al., 1988). Particularment a nivell cerebral s'ha demostrat que la RC és capaç d'atenuar els dèficits funcionals del cervell relacionats amb l'edat i és capaç de protegir de la disfunció i mort neuronal en models animals de malalties neurodegeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer (Bomfim et al., 2012; Martin et al., 2006).

En simis Macaco Rhesus s'ha observat que la RC del 30 % disminueix considerablement la mortalitat relacionada amb l'edat (des del 13 al 37 %), neoplàsies (50 %), malalties cardiovasculars (50 %), diabetis i atròfia cerebral associada a l'edat (estudi de Wisconsin, (Colman et al., 2009)). Particularment, la RC en els simis Macaco Rhesus ha posat de manifest una correlació entre la preservació del volum i la microestructura del cervell amb una menor acumulació de ferro (Kastman et al., 2010), amb menor quantitat de citocines proinflamatòries circulants (Willette et al., 2013), millora de sensibilitat a la insulina (Willette et al., 2012), i una reducció d'astroglíosis però no de la càrrega de plaques amiloides (Sridharan et al., 2013). No obstant això, un altre estudi de RC en simis Macaco Rhesus no mostra cap efecte en la seva longevitat (estudi NIA, (Mattison et al., 2012)). La raó de la discrepància entre els dos estudis de llarga durada amb primats (Colman et al., 2009; Mattison et al., 2012) radica principalment en el disseny experimental, ja que els grups controls de tots dos estudis van ser tractats de manera diferent: 1) els animals control de l'estudi de Wisconsin van ser alimentats *ad libitum* mentre que en l'estudi NIA van estar alimentats amb una quantitat fixa inferior a *ad libitum*; i 2) les dietes utilitzades en tots dos estudis van ser diferents. L'estudi de Wisconsin va utilitzar dietes semipurificades, evitant així la presència de substàncies desconegudes, mentre que l'estudi NIA no. D'altra banda, hi ha altres diferències en la composició de les dietes entre els dos estudis que poden haver afectat en els resultats finals. Per tant, tenint en compte totes aquestes consideracions, amb la informació disponible, sembla ser que la RC és beneficiosa sobre la mortalitat i les malalties degeneratives també en primats superiors, encara que són necessaris més estudis per resoldre quins són els efectes de la RC en primats i éssers humans.

En humans la RC també sembla tenir efectes beneficiosos similars als observats en animals (Fontana et al., 2010). Aquesta intervenció nutricional durant una mitjana de 6 anys en humans -de 3 a 15 anys del 32 % de RC- va evidenciar protecció contra la pèrdua de la capacitat d'aprenentatge i la memòria, l'obesitat, resistència a la insulina, hipertensió, inflamació, aterosclerosi i es va associar amb molts dels canvis hormonals implicats en la senyalització d'efectes antienvelliment de la RC en rosegadors (Fontana et al., 2010; Meyer et al., 2006). Altres estudis a curt termini mostren una disminució de la insulina en dejú, la temperatura corporal i el dany a l'ADN (Heilbronn et al., 2006), disminució dels factors de risc per a l'arteriosclerosi i diabetis (Holloszy and Fontana, 2007), disminució de malalties cardiovasculars i possibles càncers (Omodei and Fontana, 2011) i disminució de malalties neurodegeneratives (Barger et al., 2003).

Tot i que la RC i els seus efectes són objecte d'estudi des de fa molts anys, no es coneixen els mecanismes que provoquen l'increment de la longevitat. Les evidències ens demostren que la limitació a l'alimentació perllonga l'esperança de vida al llarg de l'escala evolutiva -des de llevats fins a primats- i sembla que la longevitat és determinada amb una mena de regulació metabòlica, a través d'un complex

conjunt de respostes de cèl·lules autònomes i de cèl·lules no autònomes, encara lluny de ser aclarides. Entre les hipòtesis proposades, les més rellevants, han estat la disminució en la producció mitocondrial de ROS (Barja, 1993; Gredilla and Barja, 2005; Pamplona and Barja, 2006) i canvis en les vies de senyalitzacions: Insulina/IGF-1, mTOR i sirtuïnes (Harrison et al., 2009; Mair and Dillin, 2008; Selman et al., 2008).

La primera d'aquestes hipòtesis es troba recolzada pels resultats obtinguts en estudis comparatius, en què es demostra que hi ha una relació causal entre la producció mitocondrial de ROS i la velocitat de l'envelliment. A més a més, els nivells de producció mitocondrial de ROS són menors en les espècies longeves i en rosegadors amb RC (Gredilla and Barja, 2005). A llarg termini, la RC del 40 % disminueix la producció mitocondrial de ROS en diferents teixits, com el cervell, cor i fetge en rata i ratolí (Gredilla and Barja, 2005; Hagopian et al., 2011; Sanz et al., 2005). No obstant això, després d'una intervenció a curt termini de RC (de 6 – 7 setmanes a 4 mesos), la disminució de la producció mitocondrial de ROS es produeix o no depenent del teixit estudiat (Gredilla and Barja, 2005; Gredilla et al., 2002). S'ha trobat que 6-7 setmanes de RC n'hi ha prou per disminuir la producció mitocondrial de ROS i el dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial en el cas de fetge de rata (Gredilla et al., 2001a), mentre que altres òrgans requereixen temps més llargs de RC per mostrar aquests efectes (Gredilla et al., 2002). Tanmateix, ni l'expressió (Weindruch et al., 2001), ni l'activitat (Jang et al., 2012; Sohal et al., 1994) dels enzims antioxidants SOD, catalasa o GSH peroxidasa varia d'una manera consistent en la RC, ni en els organismes genèticament manipulats longeus (Page et al., 2010). Tampoc s'han observat canvis acusats en la reparació de 8-oxodG en l'ADN mitocondrial (a través de la via de reparació per escissió de bases mitocondrials) (Stuart et al., 2004).

Tot i que el complex I i el complex III són els principals generadors de ROS, la RC només disminueix significativament la producció mitocondrial de ROS en el complex I mitjançant una reducció de la seva concentració i la fuga de radicals lliures (Gredilla and Barja, 2005). És a dir, el complex I d'aquests animals restringits és especialment eficaç evitant la producció de ROS i consegüentment es produeix menor dany oxidatiu a les diferents macromolècules, especialment a l'ADN mitocondrial, reduint-se el nombre de mutacions i la taxa d'envelliment (Lambert et al., 2004; Pamplona et al., 2002b). Aquests canvis es produeixen en les mitocòndries de cervell de rata, fetge i cor procedents d'animals amb RC (Gredilla et al., 2001a, 2001b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005).

## 5.2. Restricció Proteica i de metionina

Després de molts anys pensant que l'efecte de la RC, responsable d'augmentar la longevitat, venia donat exclusivament per la quantitat de calories ingerides, diversos estudis varen començar a qüestionar-ho

(Iwasaki et al., 1988; Lopez-Torres and Barja, 2008; Mair et al., 2005; Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Piper et al., 2011; Richie et al., 1994; Sun et al., 2009). Els resultats d'aquestes investigacions evidenciaven que part dels efectes de la RC en l'increment de la longevitat era degut a la disminució de certs components de la dieta (Pamplona and Barja, 2006). Mentre que la informació disponible no indica que la restricció de carbohidrats i la restricció lipídica augmenti la longevitat (Khorakova et al.; Ross, 1976; Shimokawa et al., 1996), la restricció proteica (RP) sí que induïx un increment de la longevitat en rosegadors (Horáková et al., 1988; Miller and Payne, 1968), un descens en la producció mitocondrial de ROS (Sanz et al., 2004), i millora els nivells de triglicèrids, d'insulina i la tolerància a la glucosa en rosegadors (Solon-Biet et al., 2015). No obstant això, la mitjana de l'increment de la longevitat (19,6 %) i la millora dels nivells és inferior a l'increment produït per una RC del 40 % (incrementa al voltant d'un 40 %). Així doncs, probablement la RP és la responsable de la meitat del efecte de la RC.

Aquest fet va fer pensar que l'efecte de la RP, en la disminució de la producció de ROS i la consegüent extensió de la longevitat, es podria deure a la restricció d'algun aminoàcid concret. De fet, s'ha demostrat que la restricció del 80 % en metionina (RMet), sense una restricció energètica, incrementa la longevitat en rates (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994) i en ratolins, inclús quan la intervenció s'inicia en edats avançades (12 mesos d'edat) (Sun et al., 2009), amb una extensió similar a la produïda en la RP (al voltant del 18 %).

La RMet isocalòrica (del 80 % i del 40 %), aplicada a rates joves durant 7 setmanes, s'ha observat que redueix la producció mitocondrial de ROS (principalment en el complex I), la fuita de radicals lliures, el contingut de complex I, dany a l'ADN mitocondrial, i els nivells de marcadors específics de modificacions oxidatives, glicoxidatives i lipoxidatives a proteïnes en les mitocòndries de cor de rata (RMet del 80 % (Sanchez-Roman et al., 2011; Sanz et al., 2006a)) i de fetge (RMet del 40 % i 80 % (Caro et al., 2008a)), de manera similar al que passa després de 7 setmanes de RMet al 40 % en mitocòndries de ronyó i cervell de rata (Caro et al., 2009b; Naudí et al., 2007). D'altra banda, estudis realitzats en el nostre grup han evidenciat que la RMet és capaç de modificar el metabolisme lipídic en dos regions del SNC medul·la espinal i escorça frontal- i el fetge, i consegüentment disminueix els marcadors de dany oxidatiu derivat de lipoxidació (Jové et al., 2013).

A més a més d'allargar la longevitat mitjana i màxima, la RMet del 80 % és capaç de reduir la incidència de malalties degeneratives associades amb l'edat i disminuir els nivells en sang de glucosa, insulina, IGF-1, triglicèrids, colesterol i leptina (Perrone et al., 2013). Tanmateix, la RMet atenua els canvis associats amb l'edat del sistema immunitari i disminueix el desenvolupament de cataractes i els nivells d'estrès

oxidatiu mitocondrial. D'altra banda, evidències recents han mostrat que la RMet pot ser una important estratègia per inhibir el creixement de determinats tumors (Sanchez-Roman and Barja, 2013).

Tanmateix, existeixen altres evidències que suggereixen que la metionina o els seus metabòlits poden estar involucrats en l'envelliment i la longevitat. En aquest context, en contra dels efectes beneficiosos de la restricció de metionina, les evidències mostren que una ingesta excessiva de metionina en la dieta suposa un dany en els òrgans vitals i incrementa l'estrès oxidatiu en els seus teixits (Gomez et al., 2011, 2009). De fet, estudis més recents a nivell cerebral mostren com la suplementació de metionina indueix l'augment dels nivells d'homocisteïna i conseqüentment causa una pèrdua de la cognició cerebral i sinaptotoxicitat (de Rezende and D'Almeida, 2014; Kalani et al., 2014).

### **5.2.1. Importància de la metionina**

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

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

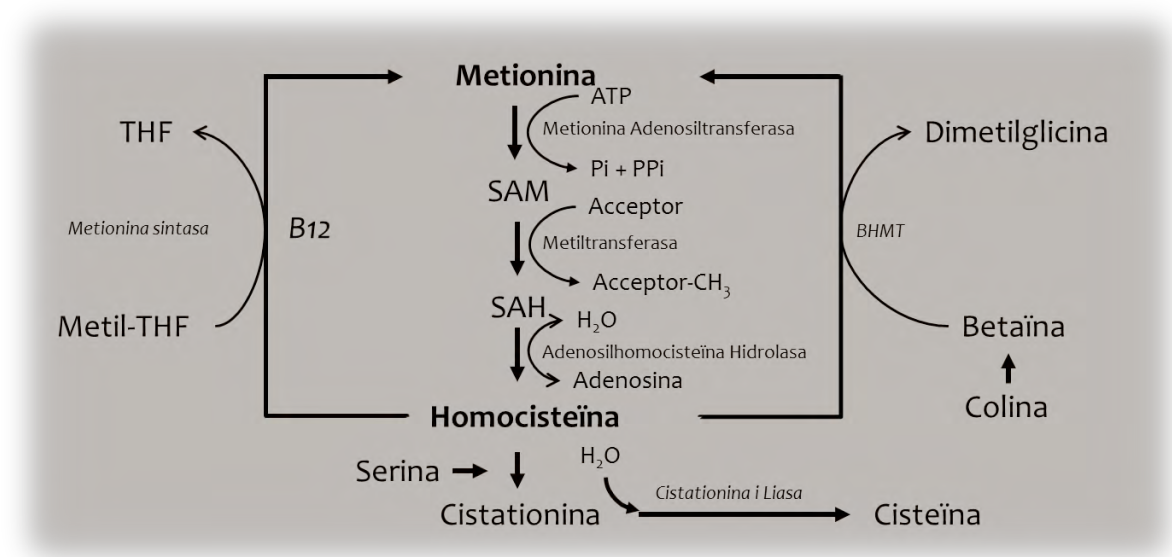
### **5.2.2. Metabolisme de la metionina**

A part dels seu paper estructural, la metionina juga un paper molt important en la síntesi proteica i com a precursora de la molècula portadora de grups metil. D'una banda, la metionina té un paper essencial com aminoàcid iniciador de la síntesi de proteïnes en organismes eucariotes. I d'altra banda, la metionina és metabolitzada mitjançant vies de transmetilació i transsulfuració (Figura 18). En la via de la transmetilació, la metionina té funcions metabòliques claus com a servidora, mitjançant la S-adenosil-metionina (SAM), de grups metil per a totes les reaccions biològiques de metilació conegudes, amb l'excepció de les reaccions de metilació de l'homocisteïna (Stipanuk, 2004). El metabòlit SAM és essencial degut a la seva funció de donador de grups metils ja que està involucrat en un gran nombre de



processos biològics. Posteriorment, SAM és hidrolitzat formant homocisteïna i adenosina. Les metilacions dependents de SAM són essencials per i) la biosíntesi de fosfolípids, particularment fosfatidilcolina, com també d'una varietat de components cel·lulars que inclouen la creatinina, epinefrina i la carnitina; ii) la modificació de macromolècules com les proteïnes, RNA i ADN com a mecanisme per establir i mantenir patrons d'expressió gènica específics de teixit; iii) la detoxificació de xenobiòtics; i iv) inactivació metabòlica de neurotransmissors (per exemple, les catecolamines, epinefrina, norepinefrina i dopamina).

La homocisteïna pot ser remetilada a metionina, gràcies al metil-tetrahidrofolat (Metil-THF) que prové del metabolisme de l'àcid fòlic, difusament mitjançant l'enzim metionina sintasa o bé específicament per l'enzim metiltransferasa d'homocisteïna betaïna (BHMT; de l'anglès, *betaine-homocysteine methyltransferase*), que catalitza la reacció d'homocisteïna utilitzant el metabòlit de colina –betaïna– com a donador de grups metil. L'homocisteïna que no és remetilada, s'uneix amb la serina per formar cistationina (Verhoef et al., 2004). Aquest pas permet la degradació de la metionina per la via de la transsulfuració. La cistationina s'uneix a l'àtom de sofre per formar cisteïna. D'aquesta forma, el sulfur procedent de la metionina o de la cisteïna acaba sent oxidat a través de les vies catabòliques de la cisteïna fins als productes finals de sulfat i taurina, que són excretats en l'orina.



**Figura 18. Esquema del metabolisme de la metionina.** Abreviacions: SAM, S-adenosil-metionina; SAH, S-adenosil-homocisteïna; ATP, adenosina-5'-trifosfat; Pi, fosfat inorgànic; PPI, pirifosfat inorgànic; THF, tetrahidrofolat; i Metil-THF, metil-tetrahidrofolat.

Aquest metabolisme de la metionina –integrat per les vies de transmetilació i transsulfuració– juntament amb el cicle de folat formen part del metabolisme d'un carboni. Una manera de conceptualitzar el paper del metabolisme d'un carboni en la fisiologia cel·lular és que funciona com un integrador metabòlic de

l'estat de nutrients. Per al metabolisme d'un carboni, la integració es duu a terme a través de la donació d'unitats de carboni a partir d'aminoàcids, incloent serina i glicina, glucosa i vitamines, i es distribueixen a través d'una sèrie de reaccions químiques per al seu ús en diversos processos cel·lulars que inclouen la biosíntesi cel·lular, la regulació de l'estat redox, la regulació de l'epigenètica a través de l'àcid nucleic i la metilació de proteïnes, i el manteniment del genoma a través de la regulació del conjunt de nucleòtids (Locasale, 2013).



## **HIPÒTESI I OBJECTIUS**



## 6. HIPÒTESI I OBJECTIUS

### 6.1. Hipòtesi de partida

El procés d'envelliment causa nombrosos canvis deleteris a tots els nivells d'organització biològica, reduint les capacitats funcionals màximes i l'homeòstasi, i augmentant la probabilitat de patir processos degeneratius, fins a conduir a la mort. Tots aquests canvis tenen provablement el seu origen en un petit número de causes bàsiques, com pot ser l'estrès oxidatiu, que contínuament operen al llarg de tota la vida i determinen la taxa d'envelliment, que és específica del tipus cel·lular, teixit i espècie. Atès que el SNC no és una excepció, les neurones també estan afectades per, i responen adaptativament a l'envelliment com ho fan les cèl·lules d'altres òrgans i sistemes. No obstant, malgrat que l'envelliment impacta sobre les funcions de la majoria de poblacions neuronals, no tots els grups neuronals estan afectats al mateix temps i en el mateix grau. De fet, es desconeixen les característiques de les diferents regions del SNC, i en aquest context postulem l'existència d'una vulnerabilitat neuronal selectiva diferencial a l'envelliment entre poblacions neuronals.

Totes les cèl·lules del SNC estan exposades a un elevat flux d'estrès oxidatiu i consegüentment durant l'envelliment, el SNC hauria de patir un augment de la lesió oxidativa i pèrdua de l'homeòstasi energètica. No obstant, es desconeix si aquests canvis durant l'envelliment són progressius, així com la pèrdua gradual del metabolisme energètic durant l'envelliment del SNC. En aquest sentit, caldria esperar que aquelles intervencions nutricionals com la restricció dietària (calòrica, proteica i de metionina) que indueixen un augment de la longevitat mitja i màxima en diferents espècies animals, protegissin i alhora alentissin el procés d'envelliment i el desenvolupament de malalties neurodegeneratives. Dèficits relacionats amb l'edat en funcions motores i cognitives, defectes en el metabolisme energètic, i augments de l'estrès oxidatiu i la consegüent lesió a proteïnes i ADN semblen estar reduïts en animals mantinguts en restricció comparats amb els mantinguts *ad libitum*.

És per això que és un fet determinant trobar les bases moleculars que caracteritzen la vulnerabilitat neuronal selectiva en el SNC, els seus canvis dependents de l'augment de l'edat i si existeix la possibilitat de modular-los, per tal d'endarrerir aquest procés i reduir significativament la incidència de les malalties neurodegeneratives.

### 6.2. Objectius

Per assolir aquesta fita hem dividit l'estudi en quatre objectius:

#### 6.2.1. Objectiu 1: Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

L'objectiu es centra en fer una **comparació interregional del sistema nerviós central humà** en el perfil dels lípids de membrana i en la lesió oxidativa i lipoxidativa de proteïnes; així com avaluar si els possibles canvis del perfil en àcids grassos s'adscriuen a canvis específics dels components de les vies de biosíntesis dels mateixos a nivell neuronal. Per assolir aquest objectiu, s'analitzaran 12 regions diferents del SNC d'humans adults sans.

#### 6.2.2. Objectiu 2: Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà

L'objectiu es **demostrar l'existència de firmes metabolòmiques, vies i xarxes funcionals que determinen una especificitat regional en el cervell humà** en condicions fisiològiques mitjançant una aproximació "òmica". L'atenció d'aquest estudi es centra en 3 regions claus per al procés d'envelliment fisiològic, que són: l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal.

#### 6.2.3. Objectiu 3: Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

L'objectiu es centra en **avaluar l'efecte de l'envelliment en el sistema nerviós central humà** sobre el perfil dels lípids de membrana, així com les vies de biosíntesi, la lesió oxidativa i lipoxidativa de proteïnes, i diferents mecanismes de regulació i de respostes adaptatives. Per assolir aquest objectiu, s'analitzaran mostres d'escorça frontal humana d'individus sans amb edats compreses entre 40 i 89 anys.

#### 6.2.4. Objectiu 4: Efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental

L'objectiu es centra en **avaluar l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central de rata** sobre el perfil dels lípids de membrana i la lesió oxidativa i lipoxidativa de proteïnes en un total de 13 regions diferents provinents d'un grup de rates adultes, rates velles i rates velles amb una restricció de metionina durant 7 setmanes.

## **MATERIALS I MÈTODES**





## 7. DISSENY EXPERIMENTAL

### 7.1. Mostres *post-mortem* del sistema nerviós central humà

La selecció de casos que s'han examinat en la present tesi corresponen a una sèrie consecutiva de donacions que s'han obtingut del banc de teixits de l'Institut de Neuropatologia de l'Hospital de Bellvitge i de la Universitat de Barcelona/Hospital Clínic, d'acord amb les normes ètiques del Comitè d'Experimentació Humana de la institució, de l'Associació Mèdica Mundial, de la declaració de Helsinki (Declaration of Helsinki, 2013), i d'acord amb els criteris de qualitat de la mostra (Ferrer, 2015).

Tots els casos estudiats tenien en comú i) absència de símptomes i signes neurològics; ii) absència de dèficits funcionals renals o hepàtics; i iii) absència d'evidències d'estat agònic perllongat. En el moment de l'autòpsia, un dels hemisferis s'ha tallat en seccions coronals, d'1 cm de gruix, i les àrees seleccionades de l'encèfal han estat ràpidament dissecades, congelades en plates metàl·liques sobre gel sec, col·locades en bosses de plàstic hermètiques i individuals, numerades i emmagatzemades a -80 °C fins al seu ús en els estudis bioquímics. L'altra meitat de l'hemisferi ha estat fixada mitjançant la seva immersió en una solució de formol al 4 % durant tres setmanes per al seu posterior estudi morfològic de diagnòstic, amb l'objectiu de descartar processos neuropatològics.

L'estudi neuropatològic s'ha dut a terme a l'Institut de Neuropatologia de l'Hospital de Bellvitge (Dr. Isidre Ferrer) i s'ha realitzat en seccions de les escorces: frontal (àrea 8), motora primària, sensorial primària, parietal, temporal superior, temporal inferior, cingular anterior, insular anterior, visual primària i associativa; escorça entorrinal i hipocamp; caudat, putamen i pàl·lid; tàlem medial i posterior; subtàlem; nucli de Meynert; amígdala; mesencèfal (dos nivells), protuberància i bulb raquidi; i escorça cerebel·losa i nucli dentat. El teixit s'ha submergit en parafina. Posteriorment, seccions de 5 µm de gruix han estat tenyides amb hematoxilina i eosina, i amb Klüver-Barrera, o processades per a immunohistoquímica seguint el mètode d'estreptavidina LSAB (Dako, Barcelona, Espanya). Després de la incubació amb metanol i sèrum normal, les seccions han estat incubades amb un dels anticossos primaris a 4 °C tota la nit. Els anticossos utilitzats han estat: contra 'proteïna àcida fibril·lar de la glia' (Dako, dilució 1:250), contra 'βA4-amiloide' (Boehringer, Ingelheim, Germany; dilució 1:50), contra 'ubiquitina' (Dako; dilució 1:200), contra 'α-synuclein' (Dako; dilució 1:100) i els anticossos policlonals fosfo-específics per a Tau Thr181, Ser199, Ser202, Ser214, Ser231, Ser262, Ser396 i Ser422 (tots ells de Calbiochem, La Jolla, CA, USA; a una dilució 1:250 per a Tau Thr181, i 1:100 per a la resta). La reacció peroxidasa s'ha visualitzat amb 0,05 % diaminobenzidina i 0,01 % de peròxid d'hidrogen. Els casos amb absència de lesions neuropatològiques, vasculars, hipòxiques, inflamatòries i degeneratives han estat considerades com a mostres d'individus sans.

A continuació, es detallen els 3 estudis realitzats amb aquests casos.

### **7.1.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà**

El present estudi s'ha dut a terme en diferents regions del SNC d'individus adults sans ( $n = 30$ ), del sexe masculí i femení, i amb una mitjana d'edat de  $58,5 \pm 8,2$  anys. En tots els casos l'interval de temps entre la mort i el processament del teixit ha estat entre 3 i 18 hores. Les diferents regions del SNC humà estudiades han estat les següents: medul·la espinal, bulb raquidi, cerebel, substància negra, tàlem, amígdala, estriat, escorça entorrinal, hipocamp, escorça temporal, escorça occipital i escorça frontal. La Taula 2 recull les característiques dels casos estudiats. L'elecció de les diferents regions estudiades es basa en la representació de les principals subdivisions del SNC dels vertebrats.

### **7.1.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà**

L'estudi s'ha dut a terme en tres regions del SNC humà d'individus adults sans ( $n = 20$ ), del sexe masculí i femení, i amb una mitjana d'edat de  $55,3 \pm 6,4$  anys. En tots els casos l'interval de temps entre la mort i el processament del teixit ha estat entre 3 i 20 hores. Les tres regions del SNC humà estudiades han estat l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal. La Taula 3 recull les característiques dels casos. La transcendència d'aquestes regions recau en la seva importància en l'envelliment i en malalties neurodegeneratives com és la malaltia d'Alzheimer. En aquest sentit cal recordar que l'escorça frontal és l'última regió del cervell que ha sorgit durant l'evolució dels primats i està implicada en complexes funcions associatives, incloent el raonament, la planificació, el comportament social i la intel·ligència general; mentre que les regions de l'escorça entorrinal i hipocamp funcionen com un centre d'operacions en una àmplia xarxa per a la memòria.

### **7.1.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà**

L'estudi de l'envelliment del SNC humà s'ha dut a terme en escorces frontals d'individus adults sans ( $n = 58$ ), del sexe masculí i femení, amb edats compreses entre els 40 i els 90 anys. En tots els casos l'interval de temps entre la mort i el processament del teixit ha estat entre 3 i 20 hores. La Taula 4 recull les característiques dels casos. L'elecció de l'escorça frontal es basa en el fet que és l'última regió del cervell que ha sorgit durant l'evolució dels primats i està implicada en complexes funcions associatives, incloent el raonament, la planificació, el comportament social i la intel·ligència general.

Taula 2. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi de la vulnerabilitat neuronal selectiva del SNC humà.

Cas	Edat	Gènere	Temps Post-Mortem	Medul·la	Bulb raquídi	Cerebel	Substància Negra	Tàlem	Amígdala	Estriat	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Temporal	Escorça Occipital	Escorça Frontal
1	43	MASCULÍ	5h 55 min	x	x		x							x	x
2	46	FEMENÍ	9h 35 min		x									x	x
3	46	MASCULÍ	15h	x	x		x		x					x	x
4	48	MASCULÍ	4h								x				
5	50	MASCULÍ	17h 15 min								x				
6	52	FEMENÍ	5h 45 min								x				
7	52	MASCULÍ	4h 04 min								x				
8	53	MASCULÍ	3h		x	x	x	x	x	x			x	x	x
9	53	MASCULÍ	7h 25 min				x	x	x						
10	54	MASCULÍ	3h			x		x		x			x	x	
11	55	MASCULÍ	5h 40 min		x	x		x		x			x		
12	56	FEMENÍ	9h									x			
13	56	MASCULÍ	3h 45 min								x	x			
14	57	FEMENÍ	5h 02 min								x				
15	58	FEMENÍ	4h												x
16	58	MASCULÍ	4h												x
17	59	MASCULÍ	6h 25 min			x	x	x	x	x			x		
18	59	MASCULÍ	7h 05 min				x	x	x	x					
19	61	MASCULÍ	3h 55 min								x	x			
20	63	MASCULÍ	17h									x			
21	65	FEMENÍ	4h			x				x			x	x	
22	65	MASCULÍ	5h 15 min	x			x		x						
23	65	MASCULÍ	16h												x
24	66	FEMENÍ	4h 15 min								x	x			
25	66	FEMENÍ	8h		x	x		x		x			x		
26	66	MASCULÍ	4h 20 min	x											
27	67	FEMENÍ	5h 20 min												x
28	68	MASCULÍ	10h 55 min	x											
29	71	FEMENÍ	8h 30 min								x	x			
30	79	FEMENÍ	4h 45 min						x						

Taula 3. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi metabòlic del SNC humà.

Cas	Edat	Gènere	Temps Post- Mortem	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Frontal
1	43	MASCULÍ	4h 35 min			x
2	43	MASCULÍ	5h 55 min			x
3	47	MASCULÍ	4h 55 min			x
4	48	FEMENÍ	4h			x
5	50	MASCULÍ	17h 15 min	x		
6	52	MASCULÍ	4h 04 min	x		
7	52	MASCULÍ	4h 40 min			x
8	53	MASCULÍ	7h 25 min			x
9	54	FEMENÍ	14h 25 min	x	x	
10	54	MASCULÍ	10h 35 min	x	x	
11	56	MASCULÍ	3h 45 min	x	x	x
12	56	MASCULÍ	8h 50 min	x	x	
13	57	MASCULÍ	20h 30 min	x	x	
14	58	MASCULÍ	3h 10 min	x	x	
15	58	MASCULÍ	4h			x
16	58	MASCULÍ	8h 05 min	x	x	
17	59	MASCULÍ	4h 15 min	x	x	
18	61	MASCULÍ	3h 55 min		x	x
19	64	FEMENÍ	5 h			x
20	66	FEMENÍ	4h 15 min	x		x

Taula 4. Característiques de les mostres utilitzades en l'estudi de l'envelliment en el SNC humà.

Cas	Edat	Gènere	Temps Post- Mortem
1	43	MASCULÍ	4h 35 min
2	43	MASCULÍ	5h 55 min
3	46	FEMENÍ	9h 35 min
4	46	MASCULÍ	15h
5	47	MASCULÍ	4h 55 min
6	48	FEMENÍ	4h
7	50	FEMENÍ	14h 30 min
8	50	MASCULÍ	17h 15 min
9	52	FEMENÍ	5h 45 min
10	52	MASCULÍ	4h
11	52	MASCULÍ	4h 40 min
12	53	MASCULÍ	3h
13	53	MASCULÍ	7h 25 min
14	56	MASCULÍ	3h 45 min
15	58	FEMENÍ	4h
16	58	MASCULÍ	4h
17	61	MASCULÍ	3h 55 min
18	64	FEMENÍ	5h
19	64	MASCULÍ	8h 35 min
20	65	FEMENÍ	3h
21	65	FEMENÍ	4h
22	65	MASCULÍ	16h
23	66	FEMENÍ	4h 15 min
24	67	FEMENÍ	5h 20 min
25	68	MASCULÍ	10h 55 min

Cas	Edat	Gènere	Temps Post- Mortem
26	70	MASCULÍ	2h
27	70	MASCULÍ	6h
28	70	MASCULÍ	13h
29	71	FEMENÍ	6h
30	71	FEMENÍ	8h 30 min
31	71	MASCULÍ	3h
32	72	FEMENÍ	3h
33	72	MASCULÍ	3h 35 min
34	73	FEMENÍ	4h 30 min
35	73	FEMENÍ	5h 30 min
36	73	FEMENÍ	7h
37	73	FEMENÍ	10h
38	73	FEMENÍ	12h
39	73	MASCULÍ	9h
40	75	FEMENÍ	3h 25 min
41	75	MASCULÍ	6h
42	75	MASCULÍ	6h 30 min
43	76	MASCULÍ	4h 15 min
44	76	MASCULÍ	6h
45	76	MASCULÍ	6h 30 min
46	79	FEMENÍ	3h 35 min
47	79	FEMENÍ	5h
48	80	FEMENÍ	3h 50 min
49	81	FEMENÍ	4h
50	82	FEMENÍ	3h 05 min
51	82	FEMENÍ	11h
52	83	MASCULÍ	3h 03 min
53	83	MASCULÍ	4h 30 min
54	86	FEMENÍ	4h 15 min
55	86	FEMENÍ	15h
56	86	FEMENÍ	19h 30 min
57	86	MASCULÍ	5h 35 min
58	86	MASCULÍ	18h

## 7.2. Estudi en models animals: Efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental

### 7.2.1. Animals

S'han utilitzat un total de 30 rates Wistar mascles provinents de Iffa-Creddo (Lyon, França). L'experiment s'ha iniciat amb 10 rates de 8 mesos d'edat amb un pes corporal de  $468,9 \pm 37,8$  g (grup adultes control) i 20 rates de 26 mesos d'edat amb un pes corporal de  $595,4 \pm 69,9$  g. 10 rates d'aquest últim grup han estat controls (grup velles control) i les 10 restants han estat restringides en metionina (grup velles amb RMet). Totes elles han estat engabiades individualment i s'han mantingut a  $22 \pm 2$  °C amb una humitat relativa del  $50 \pm 10$  % i amb un cicle de llum:fosc de 12:12 h durant el primer més d'adaptació a l'estabulari i el posterior període experimental de restricció en metionina.

### 7.2.2. Dietes

Per estudiar l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment, s'han utilitzat dietes elaborades en el propi laboratori. Aquestes dietes semipurificades han estat preparades en base a criteris de la dieta AIN 93, de l'Institut de Nutrició dels Estats Units d'Amèrica (Reeves et al., 1993), però amb modificacions relacionades amb la composició d'aminoàcids. La composició dels dos tipus de dieta es detallen a la Taula 5.

Els animals controls han estat alimentats amb una dieta basada en la composició AIN-93G. La dieta que s'ha proporcionat als animals restringits en metionina ha estat una modificació de l'anterior, reduint únicament el seu contingut en L-metionina en un 80 % (el contingut de L-metionina de la dieta control és del 0,86 %). Aquesta disminució de metionina s'ha compensat amb l'increment de la resta de components en proporció directa a la seva abundància en la dieta. Com que la disminució de L-metionina ha estat petita, les quantitats ingerides per dia de tots els components de la dieta, excepte la metionina, han estat pràcticament idèntics en els animals controls i els experimentals. La ingesta s'ha controlat diàriament i els animals controls han rebut cada dia la mateixa quantitat d'aliment que els animals restringits en metionina havien ingerit com a mitjana la setmana anterior (*pair feeding*), considerant que existeixen evidències que demostren que els rosegadors sotmesos a restricció de metionina tendeixen a menjar una mica menys de l'habitual (Caro et al., 2009b; Sanchez-Roman et al., 2012). Aquest procediment assegura que tots els grups experimentals consumeixin la mateixa quantitat de calories, i ajuda a minimitzar el potencial efecte d'una possible restricció calòrica (Martin et al., 2010).

La intervenció nutricional ha estat de 7 setmanes, ja que en treballs previs de restricció calòrica s'ha demostrat que aquest termini d'intervenció nutricional és suficient per veure canvis fisiològics, com per exemple, la reducció de producció de radicals lliures (Gredilla et al., 2001a). Posteriorment a les 7 setmanes, els animals s'han sacrificat per dislocació cervical. La sang s'ha recollit per mitjà de tubs heparinitzats per a la posterior obtenció de plasma, el qual s'ha emmagatzemat a -20 °C fins al seu ús. Seguidament s'ha extret el fetge i s'ha disseccionat el SNC amb l'obtenció de les següents regions: medul·la lumbar, toràtica i cervical, bulb raquidi i protuberància, cerebel, tàlem, hipotàlem, estriat i hipocamp, escorça occipital, temporal i frontal (Figura 19). Totes les mostres han estat congelades immediatament amb nitrogen líquid i emmagatzemades a -80 °C fins a la seva anàlisi. Tots els procediments amb els animals han seguit els protocols aprovats pel Comitè Institucional de Cura i Ús d'Animals i els experiments han estat aprovats pel Comitè d'Ètica de la Universitat de Lleida (CEEA 18-01/12).

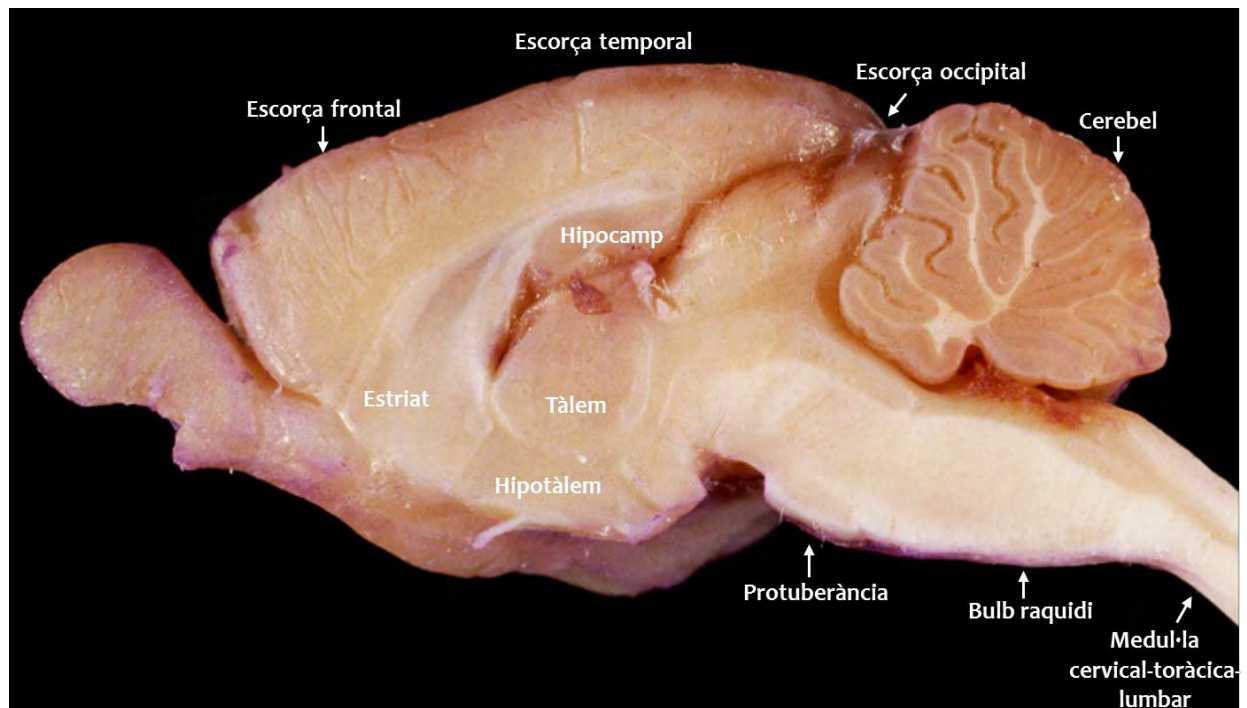


Figura 19. Tall sagital del sistema nerviós central de rata.

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

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
<b>L-Metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>0,17</b>
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



## 8. MATERIALS I MÈTODES

### 8.1. Anàlisi plasmàtic

#### 8.1.1. Paràmetres de bioquímica plasmàtica relacionats amb el metabolisme

Per determinar els paràmetres bioquímics de proteïna total, albúmina, triglicèrids, colesterol total i glucosa en plasma, s'han utilitzat kits d'anàlisi proporcionats per Spinreact (ref. 1001291, 1001020, 1001310, 1001091 i 1001190 respectivament; Girona, Espanya). La concentració de cada paràmetre en el plasma de les mostres s'ha analitzat per la interpolació de les dades obtingudes a partir de les seves corresponents rectes patró, realitzades amb concentracions conegudes de proteïna total i albúmina (rang de 0 a 7 g/dL) i de triglicèrids, colesterol total i glucosa (rang de 0 a 250 mg/dL).

A les solucions patró de triglicèrids, colesterol total i glucosa, així com a les mostres, s'ha afegit el reactiu corresponent i s'han sotmès a agitació. Posteriorment, s'han incubat les mostres a temperatura ambient durant 10 min. Finalment, s'ha determinat l'absorbància de cada mostra per espectrofotometria mitjançant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem), a una longitud d'ona de 530 nm en el cas de la proteïna total, colesterol total i glucosa, 630 nm en l'albúmina i 492 nm en el cas dels triglicèrids, en plaques de 96 pous.

#### 8.1.2. Quantificació de la concentració de leptina i adiponectina

Les concentracions de leptina i adiponectina en plasma s'han determinat mitjançant la tècnica ELISA amb Kits d'anàlisi proporcionats per Millipore (ref. EZRL-83K i EZRADP-62K respectivament; Madrid, Espanya). A continuació es detalla el protocol utilitzat seguint les directrius del fabricant.

En primer lloc, s'ha realitzat 3 rentats a cada pou d'una placa de 96 pous amb el buffer de neteja proporcionat pel fabricant. A continuació s'ha afegit per duplicat cada mostra, estàndards, control positiu i negatiu als corresponents pous de la placa de 96, juntament amb el buffer d'assaig corresponent a cada kit. Seguidament, s'ha cobert la placa i incubat a temperatura ambient durant 2 h. Transcorregut aquest temps s'ha realitzat 3 rentats amb el buffer de neteja i s'ha afegit 100 µL de detecció d'anticòs, proporcionat pel fabricant, seguit d'una incubació de la reacció a temperatura ambient durant 1 h amb agitació constant. A continuació, s'ha netejat la placa tres cops amb el buffer de neteja i s'ha afegit 100 µL de la solució d'enzim, proporcionat pel fabricant, seguit d'una incubació de la reacció a temperatura ambient durant 30 min amb agitació constant.

Finalment, s'ha realitzat 3 rentats amb el buffer de neteja previ a l'addició de 100 µL de substrat proporcionat pel fabricant i s'ha incubat la reacció a temperatura ambient durant 15 min, protegit en tot

moment de la llum. Transcorregut aquest temps s'ha parat la reacció amb 100 µl de la solució stop i, s'ha determinat l'absorbància de cada mostra per espectrofotometria mitjançant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem), a una longitud d'ona de 450 nm. Els valors de la concentració de cada una de les mostres s'han calculat per interpolació de les dades obtingudes a partir de les seves corresponents rectes patró, realitzades amb concentracions conegudes de leptina (rang de 0 a 30 ng/mL) i adiponectina (rang de 0 a 200 ng/mL).

## 8.2. Processament prèvi de la mostra

### 8.2.1. Homogeneïtzació dels teixits

S'ha utilitzat entre 50-150 mg de teixit per a la homogeneïtzació en una solució tampó. La solució tampó 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, *dethyl-triamine-penta acetic acid*) i 1 µM de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), ajustat a un pH 7,4. La presència de BHT, juntament amb la resta de components, és imprescindible per tal d'evitar els quelants de metalls i l'oxidació artefactual dels lípids 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 d'inhibidors de fosfatases (ortovanadat de sodi 1 mM i fluorur de sodi 1 mM). L'homogeneïtzació s'ha dut a terme amb un Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemanya). Posteriorment, la mostra s'ha centrifugat a 750 x g a 4 °C durant 1 min per tal d'eliminar restes tissulars. Els sobrenedants obtinguts són els que s'han utilitzat per als diferents experiments, posteriorment a la quantificació i igualació de proteïnes.

### 8.2.2. Quantificació de proteïnes

Per tal de determinar la quantitat de proteïna dels teixits homogeneïtzats s'ha utilitzat el mètode Bradford (Bradford 1976). La concentració proteica de les mostres s'ha analitzat per la interpolació de les dades obtingudes a partir d'una recta patró realitzada amb concentracions conegudes de BSA (de l'anglès, *bovine serum albumine*) (rang de 0 a 0,025 µg/µL).

A les solucions patró de BSA, així com a les mostres, s'ha afegit el reactiu de Bradford (Protein Assay #500-0006 Bio-Rad, Munich, Alemanya) i s'han sotmès a agitació. Posteriorment, s'han incubat les mostres a temperatura ambient durant 10 min. Finalment, s'ha determinat 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 en plaques de 96 pous.

### 8.3. Composició lipídica

Mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització amb flama (GC-FID) s'han detectat, identificat i quantificat fins a 25 diferents èsters metílics dels àcids grassos, representatius de la composició dels àcids grassos del teixit a estudiar. Els procediments duts a terme per a la seva identificació es detallen a continuació.

#### 8.3.1. Preparació de la mostra

El contingut d'àcid grassos dels lípids de membrana s'ha analitzat a partir de la fracció lipídica extreta amb cloroform:metanol (2:1, v/v) (Folch et al., 1957) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total en 500 µL de tampó d'homogeneïtzació, en presència del BHT al 0,01 % en la preparació de la mostra, per tal d'evitar l'oxidació artefactual dels lípids durant el processament de la mostra. La fase de cloroform, la qual conté la fracció lipídica, s'ha obtingut a partir de dos extraccions quan el teixit a analitzar ha estat el fetge i tres quan s'ha tractat del sistema nerviós, i s'ha evaporat sota flux de nitrogen en un evaporador (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Els àcids grassos s'han transesterificat incubant-los amb 2 mL de metanol-àcid clorhídric al 5 % a 75 °C durant 90 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). La preparació de la solució metanol-àcid clorhídric s'ha realitzat sota campana, a causa que l'addició del 6,5 % de clorur d'acetil sobre el metanol provoca una reacció exotèrmica perillosa i que genera àcid clorhídric anhidre. Els èsters metílics dels àcids grassos resultants (FAMES; de l'anglès, *Fatty acid methyl esters*) s'han extret afegint, primerament 1 mL de solució saturada de clorur de sodi i posteriorment 2 mL de n-pentà, i tot seguit s'ha agitat en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya) i s'ha centrifugat a 4400 rpm a 4 °C durant 15 min. La fase de n-pentà s'ha separat i s'ha evaporat sota flux de nitrogen. Finalment, el residu resultant constituït per FAMES s'ha redissolt en 80 µl de disulfur de carboni com a vehicle per al seu posterior anàlisi mitjançant cromatografia de gasos amb detecció d'ionització amb flama (GC-FID).

#### 8.3.2. Sistema cromatogràfic

La separació dels èsters metílics s'ha dut a terme mitjançant un cromatògraf de gasos model 7890A d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) amb un detector d'ionització amb flama (FID; de l'anglès, *Flame Ionization Detector*) i equipat amb una columna capil·lar DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) i amb un injector automàtic model 7683B Series d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya).

### 8.3.3. Condicions cromatogràfiques

El mètode utilitzat per a la separació dels diferents èsters metílics dels àcids grassos ha estat per gradient de temperatura. El port d'injecció s'ha mantingut a 220 °C i el detector a 250 °C. El programa de temperatura ha consistit en mantenir durant els primers 5 min una temperatura de 145 °C; a continuació, s'ha incrementat 2 °C/min fins a 245 °C mantenint-se en aquesta temperatura durant 10 min. Posteriorment, l'equip s'ha mantingut a 250 °C en un període de 10 min en l'etapa post-run. La velocitat del flux d'heli (99,9 %), com a gas portador, s'ha mantingut a una velocitat constant de 1,2 mL/min. En cada cursa cromatogràfica s'ha injectat 2 µL de mostra.

### 8.3.4. Quantificació dels analits

La identificació dels èsters metílics dels àcids grassos s'ha realitzat per comparació amb els temps de retenció i les dades dels patrons de fragmentació dels corresponents estàndards obtingudes mitjançant l'anàlisi per GC/MS en un estudi previ en el propi laboratori. Els estàndards utilitzats, obtinguts a Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden), ens han permès identificar i quantificar la major part dels pics obtinguts en el cromatograma (Taula 6). Els resultats, expressats de manera semiquantitativa, s'han calculat mitjançant el % que suposa l'àrea de cada àcid gras en relació al total de la mostra. Finalment, els resultats finals s'han expressat com a mols en %.

Taula 6. FAMES identificats en un cromatograma per GC-FID.

Nom químic	Nom comú	Nom lipídic
Àcid Tetradecanoic	Àcid mirístic	f14:0
Àcid Hexadecanoic	Àcid palmític	f16:0
Àcid (Z)-9-hexadecenoic	Àcid palmítolèic	f16:1n-7
Àcid Octadecanoic	Àcid esteàric	f18:0
Àcid (Z)-9-octadecenoic	Àcid oleic-elàidic	f18:1n-9 cis/trans
Àcid tot-cis-9,12-octadecadienoic	Àcid linoleic	f18:2n-6
Àcid tot-cis-6,9,12-octadecatrenoic	Àcid α-linolènic	f18:3n-3
Àcid tot-cis-9,12,15-octadecatrenoic	Àcid γ-linolènic	f18:3n-6
Àcid tot-cis-6,9,12,15-octadecatetraenoic	Àcid estearidònic	f18:4n-3
Àcid eicosanoic	Àcid araquídic	f20:0
Àcid (Z)-11-eicosenoic	Àcid gondoic	f20:1n-9
Àcid tot-cis-11,14-eicosadienoic	Àcid eicosadienoic	f20:2n-6
Àcid tot-cis-8,11,14-eicosatrienoic	Àcid eicosatrienoic	f20:3n-6
Àcid tot-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic	Àcid araquidònic	f20:4n-6
Àcid tot-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	Àcid eicosapentaenoic	f20:5n-3
Àcid docosanoic	Àcid behènic	f22:0
Àcid (Z)-13-docosenoic	Àcid erúic	f22:1n-9
Àcid tot-cis-7,10,13,16-docosatetraenoic	Àcid adrènic	f22:4n-6
Àcid tot-cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoic	Àcid osbond	f22:5n-6
Àcid tot-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic	Àcid clupanodonic	f22:5n-3
Àcid tot-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	Àcid cervònic	f22:6n-3
Àcid tetracosanoic	Àcid lignocèric	f24:0
Àcid (Z)-15-tetracosenoic	Àcid nervònic	f24:1
Àcid tot-cis-6,9,12,15,18-tetracosapentaenoic	Àcid tetracosapentaenoic	f24:5n-3
Àcid tot-cis-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic	Àcid nisínic	f24:6n-3

### 8.3.5. Índexs calculats

A partir de la composició en àcids grassos s'ha calculat els següents índexs:

· Longitud mitjana de la cadena (**LMC**)

$$\text{LMC} = [(\sum \% \text{mol total C14} \times 14) + (\sum \% \text{mol total C16} \times 16) + (\sum \% \text{mol total C18} \times 18) + (\sum \% \text{mol total C20} \times 20) + (\sum \% \text{mol total C22} \times 22) + (\sum \% \text{mol total C24} \times 24)]/100$$

· Àcids grassos saturats (**AGS**)

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

· Àcids grassos insaturats (**AGI**)

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

· Àcids grassos monoinsaturats (**AGMI**)

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

· Àcids grassos poliinsaturats (**AGPI**)

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

· Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (**AGPI n-6**)

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

· Àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (**AGPI n-3**)

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

· Índex de dobles enllaços (**IDE**):

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

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

Amb la combinació de les diferents susceptibilitats dels diferents àcids grassos i la composició dels mateixos en les membranes lipídiques, és possible calcular l'índex de peroxidabilitat (IP), com a mesura de la susceptibilitat a la peroxidació per a qualsevol tipus de membrana lipídica. Aquest índex, però, és diferent a l'índex de dobles enllaços (IDE), en el que és mesura el nombre de dobles enllaços per cada 100 molècules d'àcid gras, és a dir, mesura la densitat dels dobles enllaços (Hulbert et al., 2007).

· Índex de peroxidabilitat lipídica (IP):

$$\text{IP} = [(\sum \% \text{mol àcids monoenoics} \times 0,025) + (\sum \% \text{mol àcids dienoics} \times 1) + (\sum \% \text{mol àcids trienoics} \times 2) + (\sum \% \text{mol àcids tetraenoics} \times 4) + (\sum \% \text{mol àcids pentaenoics} \times 6) + (\sum \% \text{mol àcids hexaenoics} \times 8)]$$

Les activitats desaturases i elongases han estat estimades mitjançant ràtios del producte específic versus el seu substrat (Guillou et al., 2010).  $\Delta 9(n-7) = 16:1 \text{ n-9}/16:0$ ;  $\Delta 9(n-9) = 18:1 \text{ n-9}/18:0$ ;  $\Delta 8(n-6) = 20:3 \text{ n-6}/20:2 \text{ n-6}$ ;  $\Delta 5(n-6) = 20:4 \text{ n-6}/20:3 \text{ n-6}$ ;  $\Delta 6(n-3) = 24:6 \text{ n-3}/24:5 \text{ n-3}$ ;  $\Delta 6(n-3) = 18:4 \text{ n-3}/18:3 \text{ n-3}$ ;  $\text{Elovl3}(n-9) = 20:1 \text{ n-9}/18:1 \text{ n-9}$ ;  $\text{Elovl6} = 18:0/16:0$ ;  $\text{Elovl1-3-7}^a = 20:0/18:0$ ;  $\text{Elovl1-3-7}^b = 22:0/20:0$ ;  $\text{Elovl1-3-7}^c = 24:0/22:0$ ;  $\text{Elovl5}(n-6) = 20:2 \text{ n-6}/18:2 \text{ n-6}$ ;  $\text{Elovl2-5}(n-6) = 22:4 \text{ n-6}/20:4 \text{ n-6}$ ;  $\text{Elovl2-5}(n-3) = 22:5 \text{ n-3}/20:5 \text{ n-3}$ , i  $\text{Elovl2}(n-3) = 24:5 \text{ n-3}/22:5 \text{ n-3}$ . Finalment, la via n-6, la via n-3 i la via de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal s'han estimat mitjançant les ràtios  $22:5 \text{ n-6}/18:2 \text{ n-6}$ ;  $22:6 \text{ n-3}/18:3 \text{ n-3}$  i  $22:6 \text{ n-3}/24:6 \text{ n-3}$ , respectivament.

## 8.4. Quantificació del dany oxidatiu

Mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS) s'han detectat i quantificat set marcadors de dany oxidatiu, representatius de les tres principals modificacions oxidatives a proteïnes: derivades d'oxidació directa a proteïnes [Semialdehid glutàmic (SAG) i Semialdehid amino-adípic (SAAA)], derivades de glicoxidació [ $\text{N}^\epsilon$ -carboxietil-lisina (CEL)], derivades de lipoxidació [ $\text{N}^\epsilon$ -malondialdehid-lisina (MDAL)], derivades de glico- i lipoxidació [ $\text{N}^\epsilon$ -carboximetil-lisina (CML) i S-(carboximetil)-cisteïna (CMC)] i derivades d'oxidació a fumarat [S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC)]. A continuació es detallen els procediments que s'han dut a terme per a la seva identificació.

### 8.4.1. Preparació de la mostra

El dany oxidatiu proteic s'ha analitzat a partir de la fracció metanol:tampó d'homogenització obtinguda en les extraccions cloroform:metanol (2:1, v/v) (Folch et al., 1957) prèviament descrites. Les proteïnes s'han precipitat afegint àcid tricloroacètic al 10 % de concentració final i s'ha centrifugat a 4400 rpm a 4 °C durant 15 min. Seguidament, les proteïnes s'han reduït incubant-les tota la nit amb una solució reductora [1 mL de borohidruir sòdic 500 mM dissolt en un tampó d'àcid bòric 0,2 M a pH 9,2]. En

aquesta solució se li ha afegit una gota d'hexanol, com a agent antiescumejant. El dia següent, les proteïnes reduïdes s'han reprecipitat afegint 1 mL d'àcid tricloroacètic al 10 % de concentració final i s'han centrifugat de nou. Aquest pas s'ha repetit dues vegades per tal d'eliminar els cristalls formats. A les mostres reduïdes se'ls hi ha afegit els estàndards interns deuterats marcats isotòpicament [ $^2\text{H}_8$ ]Lisina (12 nmols), [ $^2\text{H}_5$ ]AHAV (72 pmols), [ $^2\text{H}_4$ ]AHAC (17,5 pmols), [ $^2\text{H}_4$ ]CEL (144,1 pmols), [ $^2\text{H}_8$ ]MDA-Lisina (20,6 pmols), [ $^2\text{H}_2$ ]CML (162,2 pmols), [ $^{13}\text{H}_2$ ]CMC (112,4 pmols) i 2- $^2\text{H}_2$ ]SC (71,06 pmols). Seguidament, s'ha afegit 1 mL d'àcid clorhídric 6 N i s'ha incubat a 155 °C durant 30 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya), hidrolitzant així els enllaços peptídics. Un cop hidrolitzats, s'han evaporat al buit (SPD121P Speed Vac Savant, Barcelona, Espanya). Els derivats N,O-trifluoroacetil dels èsters metàlics (TFAME; de l'angles, *trifluoroacetyl methyl ester*) de l'hidrolitzat de proteïnes s'han obtingut de la següent manera: i) incubació de l'hidrolitzat amb 1 mL de la solució metanol-àcid clorhídric al 5 % a 65 °C durant 30 min seguit d'evaporació sota flux de nitrogen (Nevap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) per obtenir els èsters metàlics. La solució de metanol-àcid clorhídric s'ha preparat mitjançant l'addició del 6,5 % de clorur d'acetil sobre el metanol (per a 20 mL de solució: 1,3 mL clorur d'acetil i 18,7 mL de metanol), amb l'objectiu de produir àcid clorhídric anhidre; ii) incubació dels èsters metàlics de l'hidrolitzat amb 1 mL d'àcid trifluoroacètic anhidre durant 1 h i seguit també d'evaporació sota flux de nitrogen (Nevap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) i així, obtenir els derivats N,O-trifluoroacetil metàlics èsters dels diferents aminoàcids de l'hidrolitzat. Per últim, les mostres s'han redissolt amb 80 µL de diclorometà com a vehicle per al seu posterior anàlisi mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS).

#### 8.4.2. Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS; de l'angles, *Gas chromatography-mass spectrometry*). El cromatògraf de gasos utilitzat ha estat el model 6890 d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) equipat amb una columna capil·lar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), acoblat a un injector automàtic model 7683 Series d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) i a un espectròmetre de masses selectiu model 5973A d'Agilent Technologies (Barcelona, Espanya) en el mode d'impacte iònic.

#### 8.4.3. Condicions cromatogràfiques

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

#### 8.4.4. Quantificació dels analits

La quantificació s'ha realitzat mitjançant una estandardització externa utilitzant corbes patró construïdes a partir de la mescla d'estàndards interns deuterats i no deuterats: Lisina; [ $^2\text{H}_8$ ]Lisina; AHAV; [ $^2\text{H}_5$ ]AHAV; AHAC; [ $^2\text{H}_4$ ]AHAC; CEL; [ $^2\text{H}_4$ ]CEL; MDA-Lisina; [ $^2\text{H}_8$ ]MDA-Lisina; CML; [ $^2\text{H}_2$ ]CML; CMC; [ $^{13}\text{C}_2$ ]CMC; 2-SC i [ $^2\text{H}_2$ ]SC. Aquests estàndards interns utilitzats han estat comprats a PolyPeptide Group (Strasbourg, França), a excepció dels estàndards Lisina, [ $^2\text{H}_8$ ]Lisina i CMC, obtinguts a Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya), i AHAV, [ $^2\text{H}_5$ ]AHAV, AHAC i [ $^2\text{H}_4$ ]AHAC, proporcionats pel Dr. Requena. Les anàlisis s'han realitzat mitjançant la monitorització de ions específics seleccionats prèviament (SIM; de l'anglès, *Selected ion monitoring*). Així doncs, els analits s'han detectat per SIM-GC/MS. Els ions utilitzats i la seva descripció química es presenten a la Taula 7. Les concentracions finals s'han expressat com  $\mu\text{mols}$  de SAG, SAAA, CML, CEL, MDAL, CMC o SC/mol de lisina.

Taula 7. Ions (m/z) dels analits mesurats mitjançant GC/MS.

Estàndard	Nomenclatura química del compost	Ió (m/z)
Lisina	Lisina	180
[ $^2\text{H}_8$ ]Lisina	$\text{d}_8$ -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	187
AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric	280
[ $^2\text{H}_5$ ]AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-amino- $\text{d}_5$ -2,3,3,4,4-valèric	285
AHAC*	Àcid 6-hidroxi-2-aminocaproic	294
[ $^2\text{H}_4$ ]AHAC*	Àcid 6-hidroxi-2-amino- $\text{d}_4$ -4,4,5,5-caproic	298
CEL	$\text{N}^\epsilon$ - carboxietil-lisina	379
[ $^2\text{H}_4$ ]CEL	$\text{N}^\epsilon$ - carboxietil- $\text{d}_4$ -4,4,5,5-D,L-lisina	383
MDA-Lisina	$\text{N}^\epsilon$ - malondialdehid-lisina	474
[ $^2\text{H}_8$ ]MDA-Lisina	$\text{N}^\epsilon$ - malondialdehid-lisina- $\text{d}_8$ -3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	482
CML	$\text{N}^\epsilon$ - carboximetil- lisina	392
[ $^2\text{H}_2$ ]CML	$\text{N}^\epsilon$ - carboximetil- $\text{d}_4$ -4,4,5,5-D,L-lisina	394
CMC	S-caboximetil-cisteïna	271
$^{13}\text{C}_2$ -CMC	S- $^{13}\text{C}_2$ -caboximetil-L-cisteïna	273
2-SC	S-(2-succinil)-L-cisteïna	284
2-[ $^2\text{H}_2$ ]SC	S-(2 succinil)-L- $^2\text{H}_2$ -cisteïna	286

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

#### 8.4.5. Control de qualitat intern

L'habitual anàlisi d'aquests marcadors en el propi grup ha necessitat d'un control de qualitat intern en el processament per tal de garantir i agilitzar el procés de quantificació dels analits. És per aquest motiu que, a partir d'una mostra control anomenada GOLD, amb la qual s'han realitzat estudis previs per



conèixer els valors dels marcadors oxidatius, és preparada i processada amb el conjunt de les mostres a analitzar com a control intern del processament. A partir dels valors dels marcadors oxidatius en les mostres GOLD obtinguts a cada tanda de mostres, juntament amb els valors de les rectes patrons dels estàndards, s'obté la quantificació final dels marcadors oxidatius de cada mostra.

## 8.5. Immunodetecció per Western Blot

La tècnica d'immunodetecció per western-blot ha estat utilitzada per avaluar proteïnes involucrades en diferents vies en el teixit nerviós humà. Les vies i els marcadors avaluats han estat: i) subunitats dels complexos mitocondrials i biogènesis mitocondrial (CI, CII, CIII, CIV, ATPasa i AIF); ii) defenses antioxidants i factors de transcripció de resistència a estrès (CAT, SOD1, REST i FoxO1); iii) vies de la biosíntesis dels àcids grassos (FADS1, FADS2, ELOVL2, ACOX1, DBP-1, ACAA1 i SCP2); i iv) vies de resposta inflammatòria i de supervivència cel·lular (COX2, 15-LOX, 5-LOX, CYP450, AKT, NF- $\kappa$ B, i mTOR). A continuació es detallen els procediments que s'han dut a terme per realitzar la tècnica del western blot.

### 8.5.1. Preparació de la mostra

A partir de la quantificació proteica dels homogenats, aquests s'han igualat en concentració (35-50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) i normalitzat amb la solució Tris(hidroximetil)aminometà-àcid clorhídric (TRIS-HCl) 62,5 mM pH 6,8, SDS (de l'anglès, *sodium dodecyl sulfate*) al 2 % (p/v), glicerol al 10 % (v/v), 2- $\beta$ -mercaptoetanol al 20 % (v/v) i Blau de Bromofenol 0,02 % (p/v). A continuació, s'ha realitzat la desnaturalització proteica escalfant a 95 °C durant 3 min en un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya).

### 8.5.2. Electroforesi

Per a la separació de les proteïnes per pes molecular presents en les mostres s'han utilitzat gels d'acrilamida en presència del detergent SDS. El detergent aniònic SDS actua solubilitzant i desnaturalitzant la major part de les proteïnes de la mostra. A més, permet que la separació de les proteïnes es realitzi segons el seu pes molecular. Un cop es sotmet el gel amb la mostra a un camp elèctric, les proteïnes migren cap a l'ànode amb més o menys velocitat depenent de la seva mida.

Com a suport físic s'han utilitzat gels separadors al 10 % i 7,5 % partint d'una solució comercial d'acrilamida-bisacrilamida, adequats al pes molecular de la proteïna a detectar, utilitzant un gruix de 1,0 o 1,5 mm depenent de la quantitat necessària de proteïna per poder detectar-la en cada cas, i amb gels apiladors del 5 % d'acrilamida-bisacrilamida que s'ha forçat, al igual que la fase separadora, a polimeritzar amb l'aplicació dels catalitzadors persulfat amònic al 10 % i 0,03 % de TEMED (de

l'anglès, *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*). Seguidament, com a mesura de control i d'identificació s'ha utilitzat 2,5 µL/gel del marcador de pesos moleculars [MagicMark XP Western Protein Standard]. La separació electroforètica s'ha realitzat en cubetes d'electroforesis tipus Mini-PROTEAN II (ref. 165-2940 de BioRad, Barcelona, Espanya) cobertes amb una solució tampó [TRIS 25 mM, glicerol 192 mM, SDS 0,1 % (p/v), pH 8,3] i amb un amperatge de 15 mA/gel.

### 8.5.3. Electrotransferència

Un cop les proteïnes han estat separades en funció del seu pes molecular, s'han transferit a membranes de PVDF (ref. IPVH00010 Immobilon-P de Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) prèviament activades durant 5 min amb metanol 99,9 %, i equilibrades amb solució tampó de transferència [TRIS 25 mM, glicerol 192 mM, metanol 20 % (v/v)]. S'ha col·locat el gel en contacte directe amb la membrana mitjançant un sistema de sandvitxeres (en sentit ànode-càtode) damunt del suport per a la transferència en submarí utilitzant els Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad, Munich, Alemanya). El voltatge aplicat per a la transferència ha estat de 100 V constants durant 90 min.

### 8.5.4. Bloqueig de la membrana

Un cop acabada la transferència de les proteïnes separades en el gel a la membrana, en aquesta se li ha realitzat un bloqueig amb agitació suau, per tal de bloquejar les posicions de la membrana on no s'han enganxat les proteïnes de la mostra i així evitar falsos positius. La incubació s'ha realitzat a temperatura ambient durant 1 h amb una solució de bloqueig específica [I-Block, Tween-20 0,1 %, clorur de sodi 68 mM, hidrogenfosfat de sodi 58 mM i dihidrogenfosfat de sodi 17 mM] o [BSA-TBS-T 0,1 % [BSA 5%-TRIS 2 M, clorur de sodi 2,5 M, Tween-20 0,1 %]] depenent de si les proteïnes a detectar es troben o no fosforilades. Després del bloqueig s'ha realitzat un rentat de 5 min amb solució TBS-T 0,05 % [TRIS 2 M, clorur de sodi 2,5 M, Tween-20 0,05 %] amb l'objectiu de retirar l'excés de bloquejant.

### 8.5.5. Immunodetecció

Les membranes s'han incubat amb l'anticòs primari, la Taula 8 recull tots els anticossos utilitzats, dissolts en la mateixa solució de TBS-T 0,05 % o bé amb BSA-TBS-T 0,1 %, a 4 °C durant 16 h i en agitació suau. Després de la incubació de l'anticòs primari s'han realitzat 3 rentats de 5 min amb solució tampó TBS-T 0,05 % i seguidament s'han incubat amb l'anticòs secundari adequat (Taula 9), els quals estan acoblats a peroxidasa. En tots els casos, aquest s'ha dissolt en la mateixa solució de rentats i la incubació sempre s'ha realitzat a temperatura ambient durant 1 h i en agitació suau. A continuació s'han realitzat 3 rentats de 5 min amb TBS-T 0,05 % i 2 amb TBS amb agitació ràpida.

### 8.5.6. Revelat i anàlisi de dades

Per al revelat s'han incubat les membranes a temperatura ambient durant 5 min, amb el substrat quimioluminescent [luminol™ Western Chemiluminescent HRP de Millipore Corporation, Billerica MA, EE.UU]. La capacitat d'emetre luminescència s'ha detectat amb l'equip ChemiDoc™ MP imaging System (BioRad, Munich, Alemanya) i analitzat amb el programa Image Lab software v4.0 (Bio-Rad, Hèrcules, CA, EE.UU.). La quantitat de luminescència és proporcional a la quantitat de proteïna. En aquest cas, la senyal sempre s'ha relativitzat amb un anticòs utilitzat com a marcador de càrrega, aplicat a la mateixa membrana després d'aplicar-li una neteja. Els marcadors de càrrega total han estat la porina, l'actina i la tubulina segons el teixit i el pes molecular de la proteïna a detectar. Posteriorment, s'ha fet una tinció de Gallyas, per tal de poder quantificar el contingut de proteïna a detectar, i així tenir un valor més ajustat de la càrrega.

**Taula 8. Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.**

ANTICOSSOS PRIMÀRIS							
Anticòs	Descripció	Referència	P.M. (kDa) <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	µg <sup>3</sup>	Dilució <sup>4</sup>	Anticòs zri <sup>5</sup>
5-LOX	Lipoxigenasa 5	ab169755-Abcam	78	10	35	1:1000	Anti-mouse
15-LOX	Lipoxigenasa 15	ab119774-Abcam	75	10	35	1:500	Anti-mouse
ACAA1	Acetyl-CoA acyltransferase 1	ab84635-Abcam	44	10	35	1:1000	Anti-rabbit
ACOX1	Peroxisomal Acyl-CoA Oxidase1	ab59964-Abcam	74	10	35	1:100	Anti-rabbit
Actina	Monoclonal anti-β-Actina	A5441 Sigma	42	10	35	1:5000	Anti-mouse
AIF	Apoptosis Inducing Factor	A7549-Sigma	57	10	20	1:1000	Anti-rabbit
ATPasa	ATP sintasa	ab109867-Abcam	56	10	20	1:1000	Anti-mouse
AKT	Protein Kinase B	44-609G-Invitrogen	60	10	35	1:1000	Anti-rabbit
AKT-P	AKT-P (Ser473)	9271-Invitrogen	60	10	35	1:1000	Anti-rabbit
CI	Subunitat NDUFS3 del complex I	459130-Invitrogen	30	10	20	1:1000	Anti-mouse
CII	Subunitat Flavoprotein del complex II	459200-Invitrogen	70	10	20	1:500	Anti-mouse
CIII	Subunitat CORE 2 del complex III	459220-Invitrogen	48	10	20	1:1000	Anti-mouse
CIV	Subunitat COXI del complex IV	459600-Invitrogen	57*	10	20	1:1000	Anti-mouse
Catalasa	Catalasa	ab16731-Abcam	60	10	35	1:1000	Anti-rabbit
COX2	Ciclooxygenasa 2	ab52237-Abcam	69	10	35	1:300	Anti-rabbit
CYP4502J2	Citocrom p450 2J2	ab139160-Abcam	58	10	35	1:500	Anti-mouse
DBP-1	D-Bifunctional protein	NBP1-85296-Novus	36	10	35	1:300	Anti-rabbit
ELOVL2	Elongation of very-long-chain fatty acids 2	NBP1-80719-Novus	28	10	35	1:300	Anti-rabbit
FADS1	Fatty Acid Desaturase 1	ab124363-Abcam	52	10	35	1:300	Anti-mouse
FADS2	Fatty Acid Desaturase 2	ab72189-Abcam	45	10	35	1:500	Anti-rabbit
FoxO1	Forkhead Box Protein O 1	2880-Cell Signaling	78	10	35	1:1000	Anti-rabbit

ANTICOSSOS PRIMÀRIS							
Anticòs	Descripció	Referència	P.M. (kDa) <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	µg <sup>3</sup>	Dilució <sup>4</sup>	Anticòs 2ri <sup>5</sup>
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	ab7260-Abcam	55	10	35	1:1000	Anti-rabbit
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	2972-Cell Signaling	289	7.5	35	1:1000	Anti-rabbit
mTOR-P	Phospho-mTOR (Ser2448)	2971-Cell Signaling	289	7.5	35	1:1000	Anti-rabbit
NF-κβp65	Nuclear Factor kappa-β -RelA	ab32536-Abcam	65	10	35	1:1000	Anti-rabbit
Porina	Porina	A31855- Molecular Probes	31	10	35	1:5000	Anti-mouse
REST	RE1 Silencing Transcription Factor	ab21635-Abcam	121	10	35	1:1000	Anti-rabbit
SCP2	Sterol Carrier Protein 2	ab82382-Abcam	58	10	35	1:200	Anti-rabbit
SOD1	Superoxide Dismutasa 1	ab52950-Abcam	16	10	35	1:5000	Anti-rabbit
Tubulina	Tubulina	ab7291-Abcam	52	10	35	1:5000	Anti-mouse

<sup>1</sup>Pes Molecular de la proteïna <sup>2</sup>% d'acrilamida de la part separadora del gel <sup>3</sup>Quantitat (en µg) de proteïna utilitzat <sup>4</sup>Dilució de l'anticòs utilitzada <sup>5</sup>Anticòs secundari utilitzat. \*Pes aparent en la imatge de la immunotransferència és 35 kDa

**Taula 9. Condicions experimentals i referència dels anticossos secundaris utilitzats en la tècnica d'immunotransferència.**

ANTICOSSOS SECUNDÀRIS			
Anticòs	Descripció	Referència	Dilució utilitzada
Anti-mouse	ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep)	NA931 GE-Healthcare	1:50000
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG, H&L, Horseradish Peroxidase-Linked species (from goat)	31460 Pierce	1:100000

## 8.6. Immunohistoquímica

Les mostres de teixit s'han submergit en parafina, i posteriorment, mitjançant un micròtom de lliscament s'han obtingut seccions coronals de 5 µm de gruix. Posteriorment a la desparafinació, les seccions de 5 µm de gruix s'han bloquejat les peroxidases endògenes mitjançant la incubació en una solució del 10 % metanol i 1 % de peròxid d'hidrogen a temperatura ambient durant 15 min, seguit d'una incubació amb sèrum de cavall normal al 3 % durant 1 h. Posteriorment, les seccions s'han incubat amb un dels anticossos primaris, indicats en la Taula 10, a 4 °C durant tota la nit. Posteriorment, les seccions s'han esbandit i s'han incubat amb un anticòs secundari biotinitat (Dako, Glostrup, Dinamarca), seguit del sistema peroxidasa EnVison+ (Dako), i finalment s'han revelat mitjançant una solució de diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen. A continuació, les seccions han estat lleugerament contratenyides amb hematoxilina. Algunes seccions s'han incubat sense anticòs primari; cap immunotinció s'ha detectat en aquestes seccions. Després de la tinció, les seccions s'han deshidratat i s'han muntat en el porta objecte per a l'avaluació microscòpica. Les imatges s'han adquirit amb un microscopi Olympus BX51 (UPlan FL N 20 × /0,50 Ph1) (Olympus Corporation, Tòquio, Japó) connectat a una càmera Olympus DP71 i al programa Cell ^ B (Olympus Corporation).

Taula 10. Condicions experimentals detallades dels anticossos primaris utilitzats en la tècnica d'immunohistoquímica.

ANTICOSSOS PRIMÀRIS				
Anticòs	Descripció	Referència	Dilució	Anticòs 2ri
ACAA1	Acetyl-CoA acyltransferase 1	ab84635-Abcam	1:100	Anti-rabbit
AKT	Protein Kinase B	44-609G-Invitrogen	1:100	Anti-rabbit
CI	Subunitat NDUFS3 del complex I	459130-Invitrogen	1:100	Anti-mouse
FADS2	Fatty Acid Desaturase 2	ab72189-Abcam	1:50	Anti-rabbit
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	2972-Cell Signaling	1:100	Anti-rabbit
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	sc-722-Santa Cruz	1:200	Anti-rabbit
REST	RE1 Silencing Transcription Factor	ab21635-Abcam	1:100	Anti-rabbit

## 8.7. PCR en temps real o Q-PCR

La PCR en temps real és una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR; de l'anglès, *Polymerase Chain Reaction*) utilitzada per amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte de l'amplificació de l'àcid desoxiribonucleic (ADN).

### 8.7.1. Extracció total de l'àcid ribonucleic (RNA)

Atès que les molècules de RNA són fàcilment degradables, s'ha treballat sota condicions que disminueixen la seva degradació: 1) polvorització de la zona, de l'equip i del material de treball amb etanol 70 % i amb un inhibidor de ribonucleasa (RNasa) RNase Zap (ref. R2020 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), 2) utilització d'ependorfs RNasa free, 3) utilització de puntes amb filtre i 4) treballar sota campana de flux laminar.

### 8.7.2. Purificació del RNA

La purificació del RNA s'ha obtingut mitjançant el RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) seguint el protocol descrit a continuació. Per realitzar l'extracció de RNA s'ha utilitzat aproximadament 100 mg de teixit, el qual s'ha mantingut congelat a -80 °C fins a realitzar l'extracció. La mostra s'ha cobert amb 300 µL de QIAzol Lysis Reagent per a la seva homogeneïtzació utilitzant un "micropistille" (Eppendorf, Hamburg, Alemanya) per mostra. Posteriorment s'ha afegit els 700 µL restants de QIAzol mesclant amb la pròpia pipeta, i s'ha incubat l'homogenat a temperatura ambient durant 5 min. A continuació, s'ha afegit 200 µL de cloroform i s'ha agitat amb intensitat durant 15 segons, i s'ha incubat a temperatura ambient durant 3 min. S'ha centrifugat a 12.000 rpm a 4 °C durant 30 min. La fase aquosa s'ha passat a un nou eppendorf RNasa free, afegint un volum d'etanol 70 % i tot seguit, s'ha agitat en un vibrador de braç oscil·lant (Vibromatic #384 Selecta, Barcelona, Espanya). A continuació, la mostra s'ha transferit a una RNeasy Mini spin column amb un eppendorf RNasa free de 2 mL i s'ha centrifugat a 8.000 x g a temperatura ambient durant 15 segons per descartar el residu.

Posteriorment, per aconseguir una major eficiència de la RT-PCR s'ha optat per realitzar una digestió de DNA mitjançant el kit RNasa-Free DNase Set de Qiagen (ref. 79254). Primerament, s'ha netejat la columna amb 350 µL de tampó RW1\* i s'ha centrifugat a 8.000 x g a temperatura ambient durant 15 segons. Seguidament, s'ha afegit 80 µL per columna d'una solució composta de 10 µL DNase I i 70 µL de tampó RDD\*, deixant-ho incubar a temperatura ambient durant 15 min. Per últim, s'ha netejat les columnes amb 350 µL de tampó RW1 i s'ha centrifugat a 8.000 x g a temperatura ambient durant 15 segons. Per continuar amb l'extracció de RNA s'ha afegit 500 µL de tampó RPE\* i s'ha centrifugat a 8.000 x g a temperatura ambient durant 15 segons. Aquest últim pas s'ha repetit dos cops més, però amb 2 min de centrifugació. Finalment, les columnes s'han col·locat en eppendorfs RNase free per a la seva centrifugació a 8.000 x g a temperatura ambient durant 1 min, per tal d'obtenir el RNA en 50 µL d'aigua RNase free. El RNA obtingut s'ha preservat a -80 °C fins a la seva posterior utilització. \* No s'especifica la composició dels tampons RW1, RDD i RPE degut a la propietat i confidencialitat dels productes de la marca Qiagen (GmbH, Hilden, Germany).

### 8.7.3. Quantificació de la concentració d'àcids nucleics

La concentració de cada mostra s'ha mesurat a 340 nm utilitzant l'equip NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Per realitzar la lectura, primer s'han realitzat 2 rentats del lector amb 1 µL d'aigua lliure de RNase per eliminar possibles impureses que poden interferir en la lectura. Amb 1 µL d'aquest mateix tipus d'aigua s'ha realitzat el blanc i seguidament s'ha començat amb la quantificació de la concentració proteica de les mostres. Juntament a les dades de concentració s'han anotat els valors de les ràtios 260/280 i 260/230, que aporten informació de la puresa de la mostra.

Mitjançant aquesta quantificació s'ha pogut determinar la concentració de RNA i el grau de contaminació. No obstant això, les dades no són rellevants en relació amb la integritat de la molècula. Per determinar la integritat del RNA s'ha mesurat mitjançant el valor RIN (de l'anglès, *RNA Integrity Number*) (Taula 11), utilitzant l'equip Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) (Schroeder et al., 2006). Un valor igual o superior a 6 ha determinat la integritat de la mostra (Ferrer et al., 2008).

### 8.7.4. Transcripció inversa de l'àcid ribonucleic

La retrotranscripció (RT; de l'anglès, *Reverse Transcriptase*) s'ha realitzat mitjançant el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguint el protocol proporcionat pel fabricant. Breument, les mostres s'han normalitzat en vials lliures de RNase a una concentració final d'1 µg de mostra RNA en 10 µL d'aigua lliure de RNase per sintetitzar 1 µg de cDNA. Posteriorment, s'ha

afegit 10 µL de la preparació 2X RT Master Mix (Taula 12) per realitzar la reacció de retrotranscripció de les mostres. Finalment, s'ha utilitzat el termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hèrcules, CA, EE.UU.) seguint el programa de temperatura indicat en el protocol del fabricant (Figura 20). Paral·lelament a la reacció, s'han processat mostres de RNA en absència de l'enzim retrotranscriptasa per tal de descartar la contaminació del DNA.

Taula 11. Característiques dels casos utilitzats en l'estudi de l'expressió del RNA missatger.

Cas	Edat	Gènere	Temps Post- Mortem	Valor RIN
1	43	MASCULÍ	4h 35 min	7,3
2	43	MASCULÍ	5h 55 min	7,5
3	46	FEMENÍ	9h 35 min	6,9
4	46	MASCULÍ	15h	7,5
9	52	FEMENÍ	5h 45 min	6,6
11	52	MASCULÍ	4h 40 min	7,1
14	56	MASCULÍ	3h 45 min	7,1
16	58	MASCULÍ	4h	7,3
17	61	MASCULÍ	3h 55 min	7,4
22	65	MASCULÍ	16h	6,1
23	66	FEMENÍ	4h 15min	7,1
24	67	FEMENÍ	5h 20 min	5,8
26	70	MASCULÍ	2h	7,3
29	71	FEMENÍ	6h	6,7
30	71	FEMENÍ	8h 30 min	6,7
33	72	MASCULÍ	3h 35 min	7,5
50	82	FEMENÍ	3h 05 min	6,9
52	83	MASCULÍ	3h 03 min	7
53	83	MASCULÍ	4h 30 min	7,3
57	86	MASCULÍ	5h 35 min	6

Taula 12. Components 2X RT Master Mix.

Component	Volum (µL)/Reacció del Kit
10X RT Buffer	2,0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primers	2,0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µL
Aigua lliure de RNAsa	4,2 µL

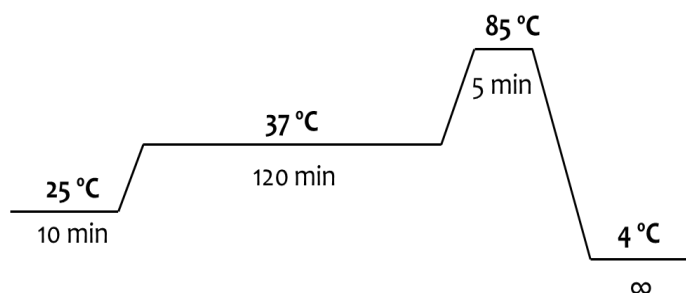


Figura 20. Programa del termociclador per a l'obtenció de cDNA mitjançant la retrotranscripció.

### 8.7.5. PCR a temps real

La PCR a temps real s'ha realitzat a partir del cDNA obtingut en el pas anterior. Per realitzar aquesta tècnica s'ha utilitzat unes sondes específiques que inclouen dos encebadors o *primers* i una sonda marcada amb un fluoròfor i un extintor (*quencher*) per a cada cDNA a analitzar. Aquestes sondes hibriden amb el cDNA de la mostra i la polimerasa amplifica el fragment limitat pels dos encebadors, alliberant l'extintor i permetent que el fluoròfor emeti llum en ésser excitat. Les sondes utilitzades en l'estudi són de TaqMan® (Applied Biosystems) i es mostren a la Taula 13. Prèviament a l'estudi, s'ha validat l'eficiència de cada una de les sondes TaqMan® de l'estudi mitjançant rectes patró a diferents concentracions.

Taula 13. Sondes TaqMan® (Applied Biosystems) per a l'anàlisi PCR en temps real.

Símbol del Gen	Nom del Gen	Codi
ACTB	β-Actina	Hs99999903_m1; gen de referència
AKT1	Protein Kinase B	Hs00178289_m1
ALOX15	Lipoxigenasa 15	Hs00993765_g1
ATP5B	ATP sintasa	Hs00969569_m1
CYP2J2	Citocrom p450 2J2	Hs00951113_m1
ELOVL2	Elongation of very-long-chain fatty acids 2	Hs00214936_m1
FADS1	Fatty Acid Desaturase 1	Hs00203685_m1
FADS2	Fatty Acid Desaturase 2	Hs00927433_m1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	Hs00234508_m1
NDUFA9	Subunitat NDUFA9 del complex I	Hs00245308_m1
RELA	Nuclear Factor kappa-β-RelA	Hs00153294_m1
REST	RE1 Silencing Transcription Factor	Hs00958503_m1

Per a la realització d'aquest protocol s'ha necessitat 50 ng per mostra del cDNA obtingut en el pas anterior. Atès que les mostres han estat conservades a 100 ng/μL s'han diluït amb l'objectiu de partir d'un volum d'1 μL. A aquest volum se li ha afegit 3,5 μL d'aigua lliure de RNasa, 5 μL de la master mix *Taqman® Universal PCR Expression Master Mix* (Applied Biosystems®) i 0,5 μL de la sonda específica del gen d'interès en cada cas. Aquesta reacció s'ha preparat per cada mostra i gen per triplicat. Simultàniament a cada placa s'han realitzat reaccions de PCR amb una mateixa mostra i el gen de referència, com a *internal run calibration*, amb l'objectiu de minimitzar els errors entre plaques.

Un cop incorporats tots els reactius a les plaques de 96 pous (Hard-Shell PCR plates-96- Well WHT/CLR de Bio-Rad) i afegits els films adhesius (Microseal® 'B' Adhesive Seals de Bio-Rad), s'han introduït al termociclador (Real-Time PCR Detection System CFX96 de Bio-Rad). La reacció ha tingut lloc seguint els següents paràmetres: 50 °C durant 2 min, 95 °C durant 10 min, i 40 cicles a 95 °C durant 15 segons i 1 min a 60 °C. Finalment, les dades s'han obtingut i analitzat amb el software CFX Manager™ versió 3.1 (Bio-Rad, Barcelona, Espanya).



Els resultats s'han obtingut en forma de nombre de Ct (de l'anglès, *cycle threshold*) que és el cicle de PCR en què comença el creixement exponencial de la fluorescència, i per tant del producte de la PCR. És a dir, com més cDNA es tingui de partida, més aviat creuarà el llindar de detecció de fluorescència i menor serà el Ct. Per calcular la quantitat relativa de mRNA s'ha tingut en compte les eficiències (E) de cada una de les sondes TaqMan® obtingudes prèviament. El mètode  $\Delta\Delta Ct$  no s'ha utilitzat a causa que l'eficiència de la sonda corresponent al gen REST no compleix els requisits per utilitzar aquest mètode. Així doncs, l'expressió relativa ha estat el resultat d'aplicar la fórmula  $(E_{\text{gen diana}}^{\Delta Ct_{\text{diana}}(\text{control-mostra})}) / (E_{\text{gen de referència}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-mostra})})$ . El gen ACTB s'ha utilitzat com a gen de referència.

## 8.8. Anàlisi metabolòmic

La metabolòmica es descriu com el conjunt complet de metabòlits, és a dir, com el conjunt de molècules intermediàries de baix pes molecular. Aquestes molècules intermediàries són dependents del context i varien d'acord amb la fisiologia, l'estat de desenvolupament, l'estat patològic de la cèl·lula, el teixit, l'òrgan o l'organisme (Raamsdonk et al., 2001). Per analitzar les diferències metabòliques existents entre diferents parts del SNC humà s'han utilitzat dues aproximacions diferents. Per una banda, basant-nos en els antecedents del propi grup, s'ha aplicat metabolòmica dirigida mitjançant un mètode altament sensible i robust per mesurar i definir si vies metabòliques concretes estan regulades de manera diferent depenent de la regió del SNC. Específicament, ens hem centrat en metabòlits implicats en les següents vies: i) metabolisme bioenergètic; ii) metabolisme de la serina, glicina i treonina; iii) metabolisme de la metionina; iv) metabolisme de les purines. Per altra banda, hem aplicat metabolòmica no dirigida amb l'objectiu de determinar els perfils metabolòmics diferencials. Aquest enfocament no directe o global ens permet mesurar i comparar, indiscriminadament, el major nombre de metabòlits entre mostres possibles (Patti et al., 2012).

Una preocupació tècnica important ha estat la rellevància dels mesuraments metabòlics fets en el teixit cerebral *post-mortem* respecte les concentracions dels metabòlits *in vivo*. En aquest sentit, els criteris aplicats per a la selecció dels casos garanteix la qualitat de les mostres i la preservació de la concentració *in vivo* dels metabòlits mesurats. Reforç d'això és que estudis previs demostren que la concentració de molts metabòlits, com ara mioinositol, creatina, glutamina, glutamat, N-acetil aspartat, i taurina es mantenen estables en el teixit cerebral *post-mortem* durant intervals de temps llargs (Michaelis et al., 1996; Opstad et al., 2010; Perry et al., 1981; Petroff et al., 1988). De la mateixa manera, la quantificació *post-mortem* de poliamines cerebrals, com ara espermina, espermidina i putrescina, en cervell humà mitjançant GC-MS no va mostrar una relació significativa entre les concentracions dels metabòlits i l'interval *post-mortem* (Chen et al., 2009). Així doncs, ja que la majoria dels metabòlits analitzats pertanyen a rutes metabòliques associades al metabolisme d'un carboni, entenem que els metabòlits analitzats

tenen estabilitat a llarg termini i no hi ha indicació de canvi de concentració induïda pel *temps post-mortem* i, en conseqüència, podem excloure el temps *post-mortem* com a factor de confusió.

### 8.8.1. Preparació de la mostra

Els metabòlits s'han extret de les mostres de teixit (conservades a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) utilitzant metanol segons està descrit en la literatura per Ansoleaga i col·laboradors (Ansoleaga et al., 2015). Breument, s'ha afegit 20 volums de metanol fred (que conté  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  de fenilalanina marcada isotòpicament amb un  $^{13}\text{C}$  (Figura 21), com a estàndard intern i  $1\text{ }\mu\text{M}$  de BHT com antioxidant) a  $50\text{ mg}$  de teixit, aproximadament. Seguidament, s'ha homogeneïtzat mitjançant un Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemanya) i s'ha incubat a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 1 h. Posteriorment, s'ha centrifugat a  $12,000\text{ x g}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 3 min, precipitant d'aquesta manera la proteïna. Els sobrenedants, extracte metanòlic on trobem els metabòlits, s'han filtrat mitjançant eppendorfs UltraFree amb  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  de mida de porus (UFC3LTK00, Millipore, Bedford, MA, EUA) per a la seva posterior anàlisi.

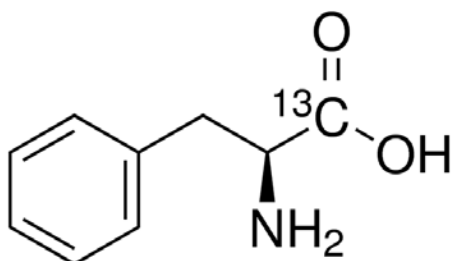


Figura 21. Estructura química de la fenilalanina marcada isotòpicament amb un  $^{13}\text{C}$  (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya).

### 8.8.2. Anàlisi de metabolòmica dirigida

#### 8.8.2.1. Sistema cromatogràfic

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses amb una font d'ionització d'electrosprai (ESI; de l'anglès, *Electrospray ionization*) i un analitzador de masses triple quadrupol (LC-ESI-QQQ-MS/MS). La cromatografia líquida d'ultra alta resolució (UPLC; de l'anglès, *Ultra performance liquid chromatography*) utilitzada ha estat un UPLC model 1290 (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) acoblat a un ESI-QQQ MS/MS model 6420 (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya).

#### 8.8.2.2. Condicions cromatogràfiques

Per a l'anàlisi metabolòmic s'ha injectat  $6\text{ }\mu\text{L}$  de l'extracte metanòlic a una columna C18 de fase reversa (Zorbax SB-Aq  $1,8\text{ }\mu\text{m} \times 2,1 \times 50\text{ mm}$ ; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya), utilitzant una velocitat de flux de  $0,2\text{ mL/min}$  durant 19 min amb un gradient de (0-5 min 0 % B, 5-8 min de 0 % de

B a 30 % B, 8-9 min des de 30 % de B a 100 % de B, 8-12 min 100 % de B, 12-13 min de 100 % a B a 0 %, 13-19 min 0 % B) format per la fase mòbil A, aigua-àcid fòrmic al 0,1 %, i la fase mòbil B, acetonitril-àcid fòrmic al 0,1 %. Cada 5 mostres s'ha injectat estàndards interns i externs com un control de qualitat, juntament a la prèvia descodificació de les mostres i una assignació a l'atzar abans de la injecció de les mostres.

La ionització per electrosprai s'ha dut a terme tant en mode d'ió positiu com en negatiu, depenent del metabòlit buscat, utilitzant N<sub>2</sub> a una pressió de 50 psi per al nebulitzador amb un flux de 12 L/min i una temperatura de 325 °C.

### **8.8.2.3. Característiques cromatogràfiques**

Per detectar els metabòlits individuals s'ha utilitzat el mètode de monitoratge de reacció múltiple (MRM; de l'anglès, *multiple reaction monitoring*) tant en mode d'ió positiu com en negatiu. Les característiques d'aquest mètode han estat optimitzades individualment mitjançant la injecció d'estàndards purs proporcionats per Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya) i l'aplicació del processador MassHunter Optimizer (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). No obstant, alguns dels metabòlits han necessitat d'una optimització manual mitjançant el processador MassHunter Qualitative Analyses (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). Posteriorment, tots els resultats obtinguts en l'optimització individual pel mètode MRM s'han comparat amb la bibliografia disponible. Els metabòlits identificats i les característiques cromatogràfiques utilitzades es presenten a la Taula 14.

### **8.8.2.4. Quantificació dels metabòlits**

La quantificació final de l'estudi de metabolòmica dirigida s'ha realitzat mitjançant el processador d'anàlisi quantitatiu Mass Hunter Quantitative Analyses (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) que permet la integració i extracció de les intensitats dels pics d'una manera ràpida i automatitzada utilitzant el pic de fenilalanina <sup>13</sup>C de Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya) com estàndard intern. Les concentracions finals s'han expressat com MS Counts de tots els metabòlits estudiats referenciats a MS Counts de fenilalanina <sup>13</sup>C.

## **8.8.3. Anàlisi de metabolòmica no dirigida**

### **8.8.3.1. Sistema cromatogràfic**

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses amb una font d'ionització d'electrosprai (ESI; de l'anglès, *electrospray ionization*) i un analitzador de masses híbrid quadrupol-temps de vol (LC-ESI-QTOF-MS/MS). La cromatografia líquida d'ultra alta resolució

utilitzada ha estat un UPLC model 1290 (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) acoblat a un ESI-Q-TOF MS/MS model 6520 (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya).

### 8.8.3.2. Condicions cromatogràfiques

Per a l'anàlisi metabòlic s'ha injectat 2 µL de l'extracte metanòlic de cada mostra a una columna C18 de fase reversa (Zorbax SB-Aq 1,8 µm x 2,1 x 50 mm; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) a una temperatura de 60 °C i equipada amb una precolumna (Zorbax SB-C8 Rapid Resolution Cartridge 3,5 µm x 2,1 x 30 mm; Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). La velocitat de flux ha estat constant a 0,6 mL/min i amb un gradient inicial del 2 % de fase mòbil B. Seguidament, s'ha arribat al 98 % de fase B en el minut 13 i s'ha mantingut a aquest percentatge durant 6 min. Finalment, els sistema s'ha reequilibrat durant 5 min al 2 % de fase B. S'ha utilitzat aigua al 0,2 % d'àcid acètic com a fase mòbil A i metanol al 0,2 % àcid acètic com a fase mòbil B.

Les dades s'han recollit en mode positiu i negatiu operant en mode TOF de rastreig des de 100 fins a 3000 m/z. El voltatge capil·lar ha estat de 3500 V i la velocitat d'escaneig ha estat d'1 escaneig. S'ha utilitzat N<sub>2</sub> com a gas del nebulitzador amb un flux de 5 L/min i una temperatura de 350 °C. Paral·lelament, la font ESI utilitza un nebulitzador independent amb un flux de 10 L/min, el qual introdueix contínuament masses de compostos de referència: 121.050873, 922.009798 (en mode ió positiu) i 119.036320, 966.000725 (en mode ió negatiu) per al calibratge continuo de masses.

### 8.8.3.3. Anàlisi de les dades

Per a l'obtenció de les dades s'utilitza el processador MassHunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) i el processador MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya) per extreure les característiques moleculars de les mostres. Finalment, per a la comparació i anàlisi estadística entre grups de les característiques extretes s'utilitza el processador MassHunter Profiler Professional (Agilent Technologies, Barcelona, Espanya). S'han seleccionat només aquelles característiques moleculars amb una abundància absoluta mínima de 5000 *counts* i amb un mínim de 2 ions. Posteriorment, les característiques moleculars presents en les mostres s'han alineat utilitzant una finestra de temps de retenció (TR) de 0,1 % ± 0,15 min i una finestra de masses de 5,0 ppm ± 2,0 mDA. Finalment, per evitar soroll de fons, s'han seleccionat només aquelles característiques moleculars que es troben en almenys el 75 % de les mostres del mateix grup i s'ha aplicat estadística multivariant no supervisada (Hierarchical clustering i anàlisi de components principals (PCA; de l'anglès, *principal component analysis*)) i supervisada (PLS-DA; de l'anglès, *partial-least-square discriminant analyses*).

Taula 14. Característiques cromatogràfiques dels analits detectats en l'estudi metabòlic del SNC humà.

Dinàmic MRM									
	Component	Ió Precursor	Ió Producte	RT (min)	Delta RT	Fragmentador	Energia de col·lisió	Accelerador cèl·lula voltatge	Polaritat
Metabolisme energètic	3-fosfoglicerat (*)	185	97	0,82	1	75	12	7	Negativa
	Àcid cis-aconitat	175,03	129	1,5	1	65	4	7	Positiva
	Àcid glutàmic	146	102,1	0,8	1	75	12	7	Negativa
	Fosfoenolpiruvat (*)	166,97	79	0,84	1	55	8	7	Negativa
	Fumarat	115	71	1,8	1	60	4	7	Negativa
	Gliceraldehid 3P	168,99	97	0,8	1	119	4	7	Negativa
	Glutamina	147,1	84	0,79	1	70	16	7	Positiva
	L-Carnitina	162,1	60,1	0,81	1	107	16	7	Positiva
	NADH (*)	666	136,7	2,4	1	124	44	7	Positiva
	NADPH (*)	746,1	302	1,57	1	129	36	7	Positiva
	Piruvat (*)	87	43,1	1,4	1	35	4	7	Negativa
	Prolina	116,07	70,1	0,81	1	75	16	7	Positiva
	Succinat	117	73,1	2,2	1	65	8	7	Negativa
	Triptòfan	205,1	188,1	9,8	1	70	4	7	Positiva
Metabolisme de la glicina, serina i treonina	Betaïna	118,09	58,1	0,82	1	107	28	7	Positiva
	Colina	105,12	61,1	0,78	1	92	16	7	Positiva
	Glicina	76	48,1	0,78	1	35	0	7	Positiva
	L-Serina	106,05	60,1	0,79	1	60	8	7	Positiva
	Sarcosina	90,06	44,1	0,8	1	40	16	7	Positiva
	Treonina	120,1	74,1	0,8	1	65	4	7	Positiva
Metabolisme de la Metionina	5-Metil-THF (*)	460,2	313,3	13,3	2	104	12	7	Positiva
	Àcid fòlic (*)	442,15	295,1	9,35	2	92	8	7	Positiva
	Cisteïna	122,03	59	0,85	1	129	24	7	Positiva
	Cistationina	223,08	88	0,8	1	77	24	7	Positiva
	Espermidina	146,2	72,1	0,71	1	75	12	7	Positiva
	Glutatió	308,09	84	1,6	1	97	28	7	Positiva
	Glutatió oxidat (*)	613,16	355	1,4	1	161	16	7	Positiva
	Homocisteïna	136,2	90	0,88	1	65	4	7	Positiva
	Metionina	150,06	56,1	1,4	1	70	12	7	Positiva
	PLP (*)	248	94,2	1,6	1	110	28	7	Positiva
	Piridoxal	168,1	150	1,6	1	70	8	7	Positiva
	Piridoxamina	169,1	150,2	0,82	1	70	12	7	Positiva
	SAH(*)	385,13	136	4,39	1	97	12	7	Positiva
	SAM	399,15	250	0,8	1	100	8	7	Positiva
Taurina	124	80	0,8	1	102	20	7	Negativa	

	Component	Ió Precursor	Ió Producte	Temps Ret (min)	Temps Delta Ret	Fragmentor	Energia de col·lisió	Voltatge Cell Accelerator	Polaritat
<b>Metabolisme de les Purines</b>	Adenosina	268,1	136	6	1	92	12	7	Positiva
	ADP	426,02	158,9	1,33	1	134	20	7	Negativa
	AMP	348,07	136	1,8	1	102	16	7	Positiva
	Desoxiguanosina (*)	268,1	110	9,3	1	168	44	7	Positiva
	Desoxiguanosina 5MP (*)	348,07	152	3,58	1	85	8	7	Positiva
	Guanina (*)	152,1	135	1,46	1	107	16	7	Positiva
	Guanosina 5MP	364	152	0,86	1	87	8	7	Positiva
	Hipoxantina	137,05	55,1	2	1	109	32	7	Positiva
	Inosina	269,09	137	7,3	1	70	4	7	Positiva
	Inosina 5MP	349,06	137	2,08	1	72	4	7	Positiva
	Inosina 5DP (*)	427	158,9	1,2	2	119	24	7	Negativa
	Ribosa 5P	151,06	68,9	0,67	1	40	16	7	Positiva
	Xantina	153	110	2,54	1	92	16	7	Positiva
	Xantosina	285,1	153	7,6	2	65	4	7	Positiva
	L-Carnosina (*)	227,1	110,2	0,8	1	92	20	7	Positiva
<b>Marcadors cel·lulars</b>	Mioinositol	179,05	87	0,75	1	102	16	7	Negativa
	N-Acetil-Asp-Glut	305,1	148	2,9	1	70	4	7	Positiva
	Àcid N-Acetil-Asp (*)	174	88	1,49	1	75	12	7	Positiva
	Fenilalanina- <sup>13</sup> C (estàndard)	167,09	120,1	5,9	2	70	8	7	Positiva

(\*) Metabòlits que tot i ser optimitzats per a la seva detecció han estat exclosos a causa de la seva no detecció en el teixit d'estudi seguint el mètode d'extracció descrit.

## 8.9. MÈTODES ESTADÍSTICS

A fi d'extreure la màxima informació de cada anàlisi i per tant, d'assolir els 4 objectius proposats, s'han realitzat diferents anàlisis estadístiques. A continuació es desglossen els mètodes estadístics utilitzats en cada un d'ells.

Cal tenir en compte, però, que en totes les anàlisis el nivell mínim de significació estadística ha estat de 0,05 en totes les comparacions. El grau de significació obtingut s'ha representat a totes les gràfiques com: \* en el cas que  $p < 0,05$ , \*\* en el cas que  $p < 0,01$  o \*\*\* en el cas que  $p < 0,001$ .

### 8.9.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

L'anàlisi es va du a terme en dues fases. En primer lloc, com a prova estadística per valorar les diferències entre les mitjanes de les regions del SNC humà estudiades en diversos experiments s'ha utilitzat una anàlisi de variància (ANOVA; de l'anglès, *analysis of variance*) d'un factor seguit d'un test de comparacions dos a dos "a posteriori", específicament la prova DMS (Diferència mínima significativa). L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa SPSS statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EUA), i la representació gràfica de les densitometries dels Westerns blots ha estat creada amb el programa Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

En segon lloc, per avaluar les associacions entre les diferents regions del SNC estudiades en les variables dels índexs globals dels àcids grassos i dels marcadors de dany oxidatiu, s'ha utilitzat el coeficient de correlació de *Spearman*. En aquest sentit, el coeficient de *Spearman  $\rho$*  (rho) és una mesura no paramètrica de la correlació (associació o interdependència) entre dues variables aleatòries contínues u ordinals, que avalua el grau de relació lineal ja sigui positiva o negativa. En aquest cas les diferents regions del SNC humà no són variables contínues però les hem convertit en variables ordinals mitjançant l'enumeració ordenada de les regions, de caudal a cranial, tenint en compte la seva posició anatòmica. Prèviament a aquesta anàlisi, però, s'ha obtingut un histograma de les variables per tal d'observar si les dades tenen una distribució simètrica (dades no mostrades). L'anàlisi estadística i la representació gràfica s'ha realitzat utilitzant la llibreria "ggplot2" del programa estadístic R (versió 3.1.1).

### 8.9.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà

Com a prova estadística per valorar les diferències entre les mitjanes de les tres regions del SNC humà estudiades, tant en l'anàlisi metabolòmica com en l'estimació proteica, s'ha utilitzat una anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor seguit d'un test de comparacions dos a dos "a posteriori", específicament la prova DMS. L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa SPSS statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EUA), i les representacions gràfiques han estat creades amb el programa Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

### 8.9.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

L'anàlisi es va du a terme en tres fases. En primer lloc, com a prova estadística per valorar les diferències entre les mitjanes dels diferents grups d'edat de l'escorça frontal humana estudiades en diversos experiments s'ha utilitzat una anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor seguit d'un test de comparacions dos a dos "a posteriori", específicament la prova DMS. L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa SPSS statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EUA), i la representació gràfica de les densitometries dels Westerns blots i l'expressió del mRNA han estat creades amb el programa Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). D'altra banda, les anàlisis de regressió no lineal de la Figura 68 s'han realitzat a partir d'una estimació curvilínia amb el programa SPSS statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EUA).

En segon lloc, com a prova per traçar la progressió de l'escorça frontal d'individus de diferents edats en les variables dels índexs globals dels àcids grassos i dels marcadors de dany oxidatiu, s'ha utilitzat un model additiu generalitzat (GAM; de l'anglès, *generalized additive model*). GAM, presentat per Hastie i Tibshirani el 1990 (Hastie and Tibshirani, 1990), és una expansió dels models tradicionals de regressió lineal per a l'anàlisi de dades, que incorpora la no linealitat i la regressió no paramètrica. El model és constitueix per la suma de funcions suaus (polinomis) de les variables predictores, podent ser aquestes variables contínues o categòriques. En aquest cas, en una primera anàlisi és va tenir en compte les variables edat, sexe i temps *post-mortem*. No obstant, les variables sexe i temps *post-mortem* no van ser estadísticament significatives fet que va propiciar la no utilització d'aquestes variables en l'anàlisi estadística final. Així doncs, les variables dels índexs globals dels àcids grassos i dels marcadors de dany oxidatiu s'han representat en funció de la variable edat. Aquesta representació no lineal ens permet fer associacions d'aquestes variables amb l'augment de l'edat. La significació d'aquest model es basa en el valor  $p < 0,05$ . Prèviament a aquesta anàlisi, però, en aquest cas també s'han obtingut histogrames de les variables per tal d'observar si les dades tenen una distribució simètrica (dades no mostrades). L'anàlisi estadística i la corresponent gràfica s'ha realitzat utilitzant la llibreria "mgcv" del programa estadístic R (versió 3.1.1).

En tercer lloc, com a prova per determinar l'edat aproximada en la qual les variables dels índexs globals dels àcids grassos i dels marcadors de dany oxidatiu mostren un punt d'inflexió *-break point-* dels nivells presents en l'escorça frontal humana, s'ha utilitzat un model lineal amb segmentació (lm; de l'anglès, *lineal model*). És a dir, dins d'un model lineal aquesta funció no allisa les dades sinó que ajusta diferents rectes amb punts de canvis seleccionats automàticament per optimitzar l'ajust a les dades. L'avaluació d'aquest model es basa en el valor del coeficient de determinació R quadrat ajustat, de manera que valors més pròxims a 1 indicaran un millor ajust i per tant, el model serà més explicatiu. En aquest cas l'anàlisi estadística i la corresponent representació gràfica s'ha realitzat utilitzant la llibreria "segmented" del programa estadístic R (versió 3.1.1).



#### **8.9.4. Efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental**

Per aquest últim experiment, l'anàlisi es va du a terme en dues fases. En primer lloc, com a prova estadística per valorar les diferències entre les mitjanes del pes corporal i dels paràmetres bioquímics mesurats en plasma dels tres grups experimentals estudiats s'ha utilitzat una anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor seguit d'un test de comparacions dos a dos "a posteriori", específicament la prova DMS. L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa SPSS statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EUA).

En segon lloc, com a prova per analitzar els possibles canvis entre els tres grups experimentals en cada una de les regions del SNC de rata estudiades en les variables dels índexs globals dels àcids grassos i dels marcadors de dany oxidatiu, s'ha realitzat una anàlisi estadística estratificat. L'anàlisi estratificat correspon a una representació descriptiva de les dades de cada regió. Posteriorment, mitjançant una anàlisi de variància (ANOVA) d'una via, seguit d'un test post-hoc: Bonferroni, s'ha analitzat les diferències entre les mitjanes dels tres grups experimentals en cada regió. Prèviament a aquesta anàlisi, però, en aquest capítol també s'han obtingut histogrames de les variables per tal d'observar si les dades tenen una distribució simètrica (dades no mostrades). L'anàlisi estadística i la representació gràfica s'ha realitzat utilitzant la llibreria "ggplot2" del programa estadístic R (versió 3.1.1).

## **RESULTATS**



## 9. RESULTATS

### 9.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

Per tal d'abordar els objectius plantejats en aquest estudi s'ha iniciat amb la detecció, identificació i quantificació de la composició en àcids grassos totals, associant que es tracta majoritàriament de lípids de membrana, de diferents regions del SNC humà adult -medul·la espinal, bulb raquidi, cerebel, substància negra, tàlem, amígdala, estriat, escorça entorrinal, hipocamp, escorça temporal, escorça occipital i escorça frontal-, i la detecció i quantificació de marcadors de dany proteic derivat de lipoxidació i d'estrès oxidatiu, prèviament descrits. Seguidament, s'han analitzat els diferents sistemes que determinen i modulen la composició en àcids grassos d'una membrana biològica, el seu grau d'insaturació i els nivells de reguladors antioxidants enfront de productes derivats de peroxidació lipídica.

#### 9.1.1. Anàlisi composicional dels àcids grassos

L'anàlisi de la composició en àcids grassos en les diferents regions del SNC humà adult, per tal de determinar si existeixen diferències en la susceptibilitat a l'estrès oxidatiu en les diferents regions del cervell humà, mostra diferències significatives interregionals. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en la composició percentual dels àcids grassos de les membranes lipídiques i els índexs que en deriven. Finalment, s'ha calculat el coeficient de correlació de *Spearman* per tal d'identificar si existeix una associació entre les diferents variables analitzades i les regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial.

##### 9.1.1.1. Perfil composicional en àcids grassos dels lípids cerebrals

En la Taula 15 es mostra el perfil composicional dels àcids grassos totals de diferents regions del SNC humà d'individus adults sans. Els resultats obtinguts mostren diferències significatives interregionals en la major part dels diferents àcids grassos estudiats. Els àcids grassos que no varien significativament entre regions són el 16:1 n-7, 20:2 n-6 i 20:3 n-6.

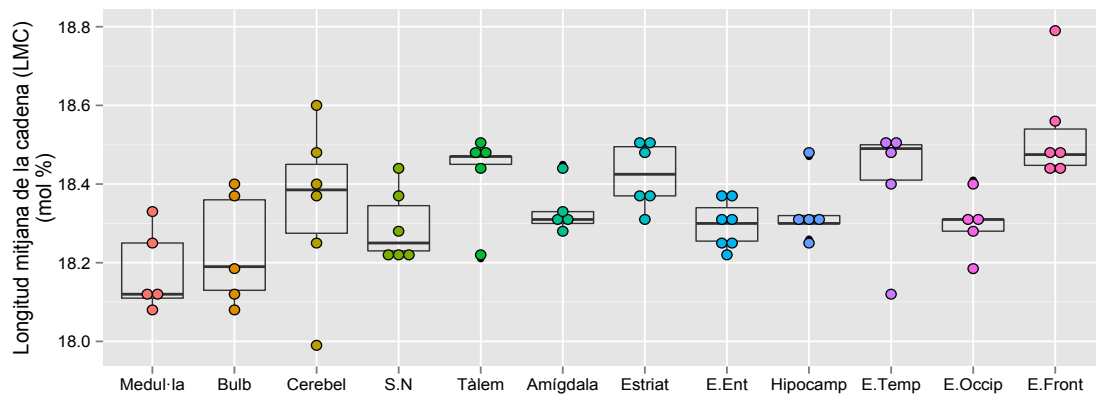
##### 9.1.1.2. Índexs derivats de la composició en àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global (Taula 16). Els resultats obtinguts mostren l'existència de diferències estadísticament significatives entre els índexs calculats i les diferents regions del SNC humà adult. Així doncs, tot i que les diferents regions analitzades del SNC humà adult constaten que els seus lípids mantenen uns nivells de LMC de 18 àtoms de carboni, així com una relació molt similar d'AGS i AGI (ràtio 40:60), les diferències són estadísticament significatives entre tots els índexs estudiats i les diferents regions del SNC humà adult.



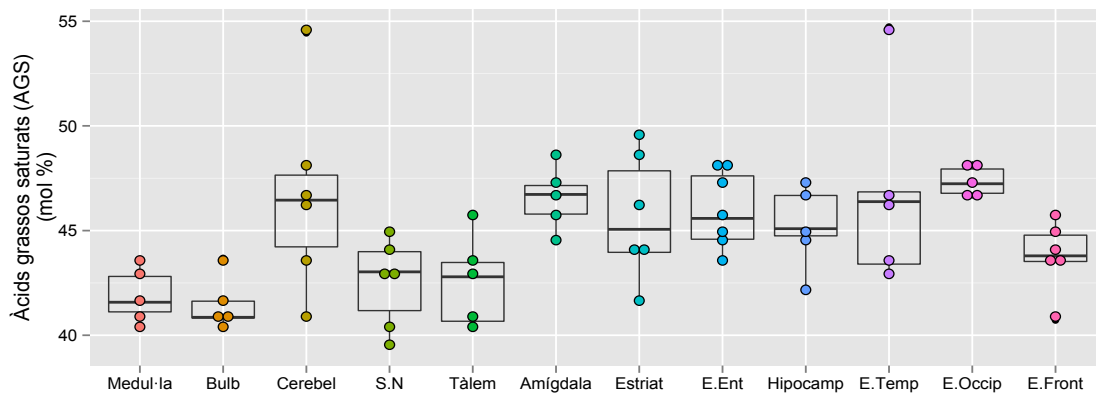
### 9.1.1.2.1. Relació entre els índex derivats de la composició en àcids grassos i la seva distribució en el SNC

A partir dels valors dels índexs de cada regió, que ens indiquen els canvis composicionals de forma global, s'ha calculat el coeficient de correlació de *Spearman* per tal d'identificar si les variables estudiades segueixen una correlació amb les regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial. En la Figura 22 es mostren els valors de la LMC dels àcids grassos analitzats en cada regió. Els resultats obtinguts en aquest índex mostren l'existència d'una associació significativa interregional. És a dir, en les regions més cranials s'observa una LMC superior a la de les regions més caudals. No obstant això, aquest paràmetre es manté en un valor mitjà de 18 àtoms de carbonis.

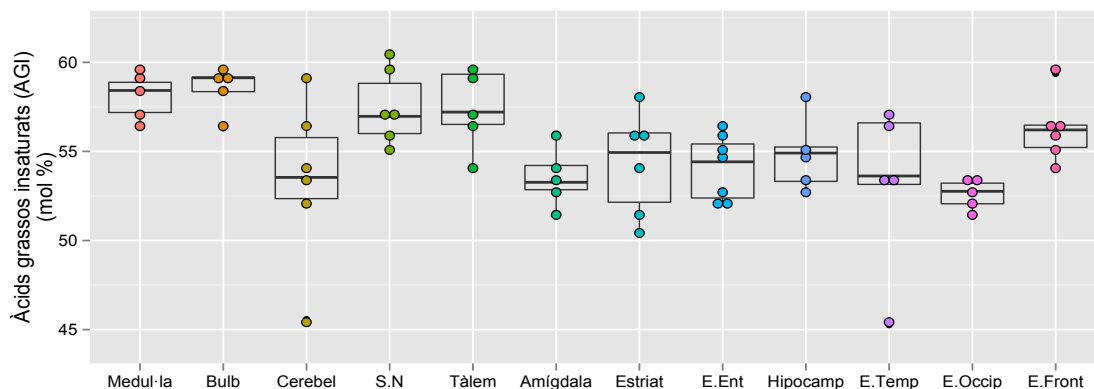


**Figura 22. Longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos analitzats en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre la LMC i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de *Spearman*  $r = 0,368$ ,  $p < 0,01$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

En la Figura 23 i la Figura 24 es mostren els valors del contingut d'AGS i d'AGI, respectivament. Els resultats mostren que tot i mantenir una relació de saturat:insaturat al voltant de (40:60) en totes les regions, existeix una correlació entre el contingut d'AGS i d'AGI, i les regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial. Així, seguint l'eix caudo-cranial s'observa un augment dels AGS i una disminució dels AGI.

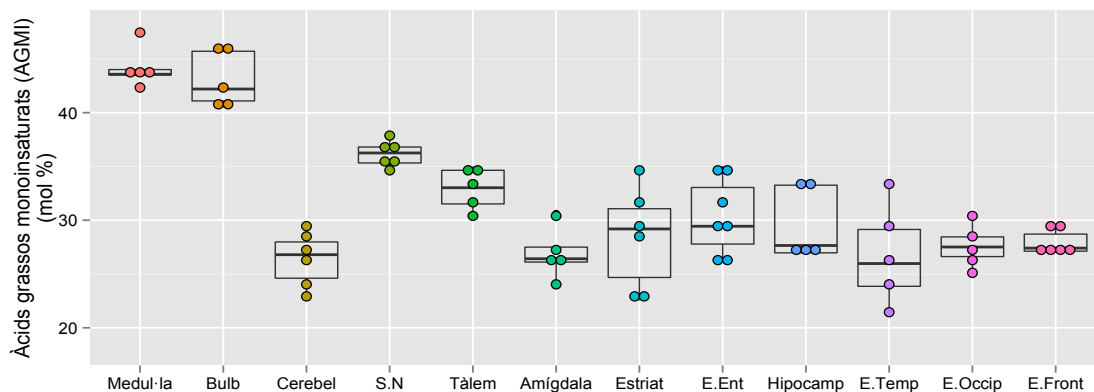


**Figura 23. Contingut d'àcids grassos saturats (AGS) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre el contingut d'AGS i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de *Spearman*  $r = 0,412$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

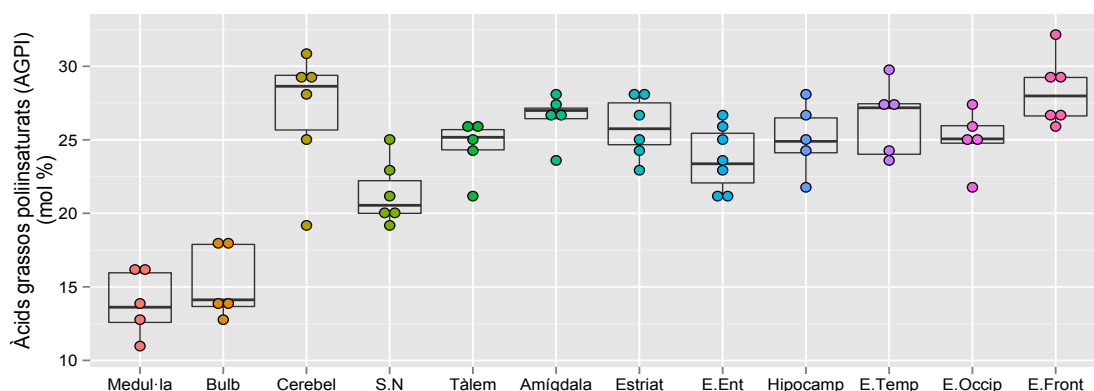


**Figura 24. Contingut d'àcids grassos insaturats (AGI) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació inversa entre el contingut d'AGI i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = -0,407$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

Dins dels AGI diferenciem entre els que contenen un doble enllaç o els que en tenen més d'un. Per tant, hem analitzat el contingut d'AGMI (Figura 25), i el contingut d'AGPI (Figura 26).



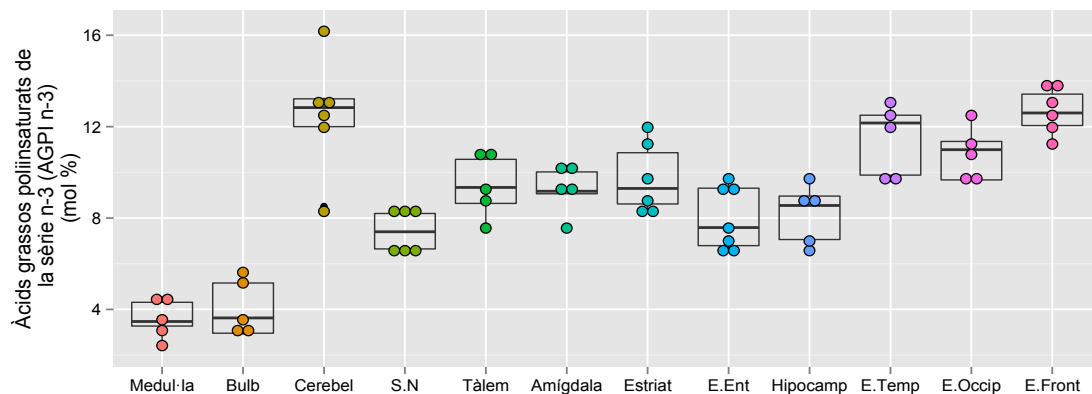
**Figura 25. Contingut d'àcids grassos monoinsaturats (AGMI) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació inversa entre el contingut d'AGMI i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = -0,537$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.



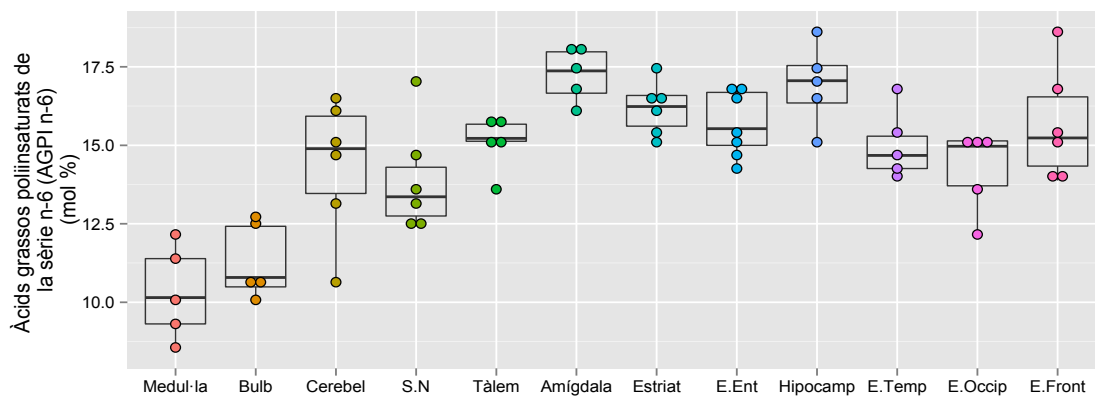
**Figura 26. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre el contingut d'AGPI i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman;  $r = 0,517$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

Els resultats mostren una correlació inversa significativa entre el contingut d'AGMI i les regions ordenades seguint l'eix caudo-cranial. Per contra, el contingut d'AGPI presenta una correlació significativa seguint l'eix caudo-cranial. És a dir, les regions més caudals tenen un contingut més elevat en AGMI i les regions més cranials tenen un contingut més elevat en AGPI. Tanmateix, tant en el contingut d'AGMI com en el dels AGPI el cerebel presenta un comportament diferencial, i té característiques més properes a l'escorça frontal que a la medul·la.

Dins dels AGPI diferenciem dos tipus de poliinsaturació, els de la sèrie n-3 (Figura 27) i els de la sèrie n-6 (Figura 28). Els resultats mostren l'existència d'una correlació significativa seguint l'eix caudo-cranial tant del contingut d'AGPI de la sèrie n-3 com de la sèrie n-6.



**Figura 27. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre el contingut d'AGPI n-3 i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = 0,548$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.



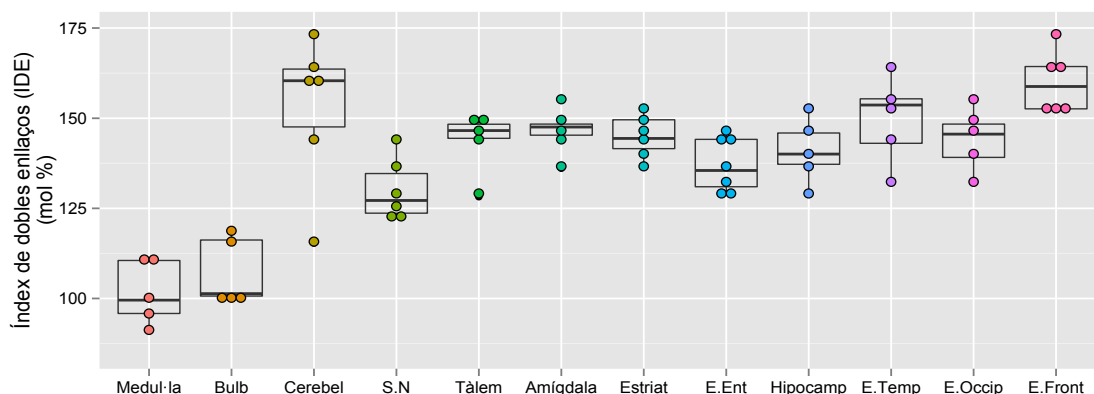
**Figura 28. Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre el contingut d'AGPI n-6 i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = 0,445$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

#### 9.1.1.2.2. Relació interregional en el grau d'insaturació de les membranes lipídiques

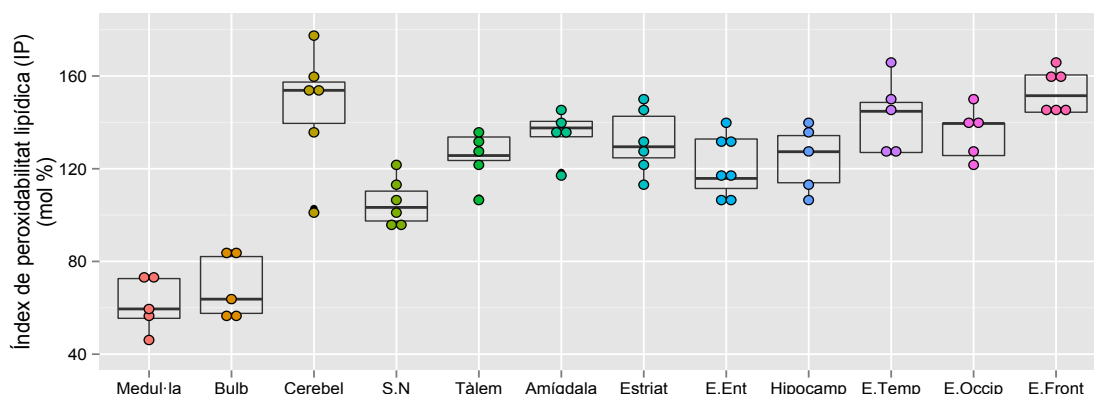
Els dos paràmetres calculats que ens indiquen el grau d'insaturació de la membrana i la susceptibilitat d'aquesta a ser oxidada són l'IDE (Figura 29) i l'IP (Figura 30). L'IDE ens indica el nombre d'insaturacions que hi ha per cada 100 molècules d'àcid gras i l'IP ens indica la susceptibilitat dels àcids grassos a ser oxidats.



Els resultats mostren l'existència d'una correlació significativa entre l'IDE i l'IP, i les regions del SNC humà adult ordenades seguint l'eix caudo-cranial. És a dir, les regions més cranials tenen major nombre d'insaturacions i major susceptibilitat a ser oxidats respecte les regions més caudals.



**Figura 29. Índex de dobles enllaços (IDE) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre els valors de l'índex IDE i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = 0,529$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.



**Figura 30. Índex de peroxidabilitat (IP) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació entre els valors de l'índex IP i les diferents regions del SNC humà adult, estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = 0,559$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-7 individus de cada regió.

### 9.1.1.3. Estimació de les activitats desaturases i elongases

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han estimat les activitats desaturases (Taula 17), elongases (Taula 18) i la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (Taula 19) de les 12 regions del SNC humà adult estudiades. Els resultats obtinguts mostren diferències significatives interregionals en totes les activitats estimades, tant en les activitats desaturases i elongases estudiades com en l'estimació de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal.

Taula 17. Estimació de l'activitat desaturasa en 12 regions del SNC humà adult. Les dades estan expressades com a mitjana ± SEM de 5-7 individus de cada regió.

		Medul·la	Bulb raquídi	Cerebel	Substància Negra	Tàlem	Amígdala	Estriat	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Temporal	Escorça Occipital	Escorça Frontal	p < valor
Δ9 (n-7)	16:1/16:0	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,015
Δ9 (n-9)	18:1/18:0	1,92 ± 0,09	2,04 ± 0,07	1,35 ± 0,08	1,70 ± 0,05	1,60 ± 0,04	1,28 ± 0,05	1,26 ± 0,11	1,26 ± 0,07	1,39 ± 0,17	1,22 ± 0,12	1,18 ± 0,06	1,21 ± 0,03	0,001
Δ5 (n-6)	20:4/20:3	2,84 ± 0,15	3,26 ± 0,25	4,90 ± 0,59	4,93 ± 0,32	4,78 ± 0,24	6,88 ± 0,48	6,88 ± 0,77	7,52 ± 0,38	6,56 ± 0,70	5,18 ± 0,97	5,13 ± 0,75	6,45 ± 0,61	0,001
Δ6 (n-3)	24:6/24:5	1,74 ± 0,19	2,55 ± 0,48	1,36 ± 0,04	1,48 ± 0,22	1,50 ± 0,15	2,21 ± 0,20	1,77 ± 0,14	0,57 ± 0,05	0,62 ± 0,10	1,59 ± 0,10	1,90 ± 0,21	0,70 ± 0,09	0,001
Δ6 (n-3)	18:4/18:3	0,75 ± 0,14	0,73 ± 0,12	2,48 ± 0,35	1,16 ± 0,20	1,23 ± 0,06	1,89 ± 0,49	0,93 ± 0,09	0,73 ± 0,08	1,13 ± 0,12	1,67 ± 0,25	0,93 ± 0,12	1,78 ± 0,58	0,001

Taula 18. Estimació de l'activitat elongasa en 12 regions del SNC humà adult. Les dades estan expressades com a mitjana ± SEM de 5-7 individus de cada regió.

		Medul·la	Bulb raquídi	Cerebel	Substància Negra	Tàlem	Amígdala	Estriat	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Temporal	Escorça Occipital	Escorça Frontal	p < valor
Elovl 3 (n-9)		0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,001
Elovl 6		1,06 ± 0,07	1,00 ± 0,07	0,71 ± 0,02	0,94 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,96 ± 0,03	1,03 ± 0,01	0,92 ± 0,09	0,88 ± 0,05	0,90 ± 0,05	1,03 ± 0,04	0,001
Elovl 1-3-7		0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,001
Elovl 1-3-7		1,06 ± 0,12	1,08 ± 0,15	0,78 ± 0,07	1,62 ± 0,22	1,17 ± 0,11	0,91 ± 0,10	0,97 ± 0,17	0,76 ± 0,02	1,53 ± 0,44	0,68 ± 0,06	0,88 ± 0,07	0,96 ± 0,06	0,002
Elovl 1-3-7		2,16 ± 0,15	3,50 ± 0,54	1,43 ± 0,13	1,30 ± 0,14	1,69 ± 0,10	2,36 ± 0,59	1,66 ± 0,16	2,10 ± 0,16	1,51 ± 0,49	1,62 ± 0,15	1,51 ± 0,26	1,80 ± 0,18	0,001
Elovl 5 (n-6)		0,86 ± 0,06	0,57 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,48 ± 0,05	0,51 ± 0,08	0,61 ± 0,10	0,55 ± 0,14	0,40 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,27 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,001
Elovl 2-5 (n-6)		0,86 ± 0,05	0,87 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,72 ± 0,03	0,77 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,71 ± 0,07	0,64 ± 0,03	0,73 ± 0,07	0,74 ± 0,09	0,59 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,001
Elovl2-5 (n-3)		0,99 ± 0,05	1,24 ± 0,07	1,33 ± 0,25	1,48 ± 0,07	1,22 ± 0,05	1,66 ± 0,25	1,30 ± 0,24	1,79 ± 0,15	1,43 ± 0,15	1,12 ± 0,16	1,44 ± 0,19	1,75 ± 0,16	0,027
Elovl2 (n-3)		0,85 ± 0,04	0,59 ± 0,06	0,40 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,45 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,51 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,34 ± 0,07	0,35 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,48 ± 0,11	0,001

Taula 19. Estimació de l'activitat β-oxidació Peroxisomal en 12 regions del SNC humà adult. Les dades estan expressades com a mitjana ± SEM de 5-7 individus de cada regió.

		Medul·la	Bulb raquídi	Cerebel	Substància Negra	Tàlem	Amígdala	Estriat	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Temporal	Escorça Occipital	Escorça Frontal	p < valor
β-oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	4,13 ± 0,74	4,91 ± 0,89	35,48 ± 5,50	13,22 ± 1,07	16,34 ± 1,65	33,66 ± 3,32	15,80 ± 1,18	204,69 ± 38,66	74,51 ± 4,68	39,34 ± 6,81	40,55 ± 4,72	63,82 ± 7,48	0,001

Taula 20. Marcadors de dany oxidatiu en 12 regions del SNC humà adult: una aproximació comparada interregional. Les dades estan expressades com a mitjana ± SEM de 5-7 individus de cada regió.

		Medul·la	Bulb raquídi	Cerebel	Substància Negra	Tàlem	Amígdala	Estriat	Escorça Entorrinal	Hipocamp	Escorça Temporal	Escorça Occipital	Escorça Frontal	p < valor
MDAL		352,88 ± 11,77	340,15 ± 19,41	203,85 ± 20,19	590,76 ± 29,76	481,89 ± 42,21	431,53 ± 32,02	450,84 ± 52,50	283,98 ± 28,30	221,01 ± 25,11	164,69 ± 9,87	219,03 ± 16,19	185,28 ± 12,48	0,001
CML		1299,71 ± 28,96	1110,50 ± 58,44	778,93 ± 40,22	1471,34 ± 71,85	1099,86 ± 59,64	1007,75 ± 127,89	970,43 ± 23,34	1074,50 ± 52,37	1110,71 ± 48,95	855,95 ± 55,79	811,55 ± 28,46	940,34 ± 54,52	0,001
2-SC		101,76 ± 8,04	112,86 ± 7,01	60,05 ± 5,97	115,30 ± 4,30	84,22 ± 3,15	86,56 ± 10,47	80,20 ± 4,05	75,91 ± 7,19	62,72 ± 6,38	44,21 ± 2,63	46,23 ± 4,52	58,73 ± 3,81	0,001

MDAL: N<sup>ε</sup>-Malondialdehid-lisina; CML: N<sup>ε</sup>- carboximetil-lisina; 2-SC: S-(2-succinil)-L-cisteïna.

### 9.1.2. Dany oxidatiu

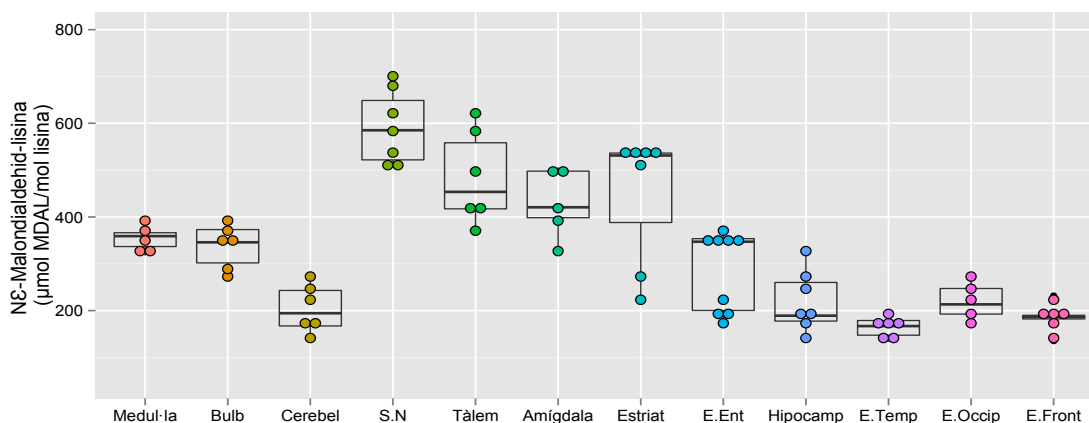
Posteriorment a l'anàlisi del perfil en àcids grassos de les membranes lipídiques s'ha realitzat l'anàlisi del dany proteic derivat de lipoxidació i d'estrès mitocondrial en les diferents regions del SNC humà adult, per tal de determinar si també existeixen diferències en l'afectació de les diferents regions del SNC humà adult, i de fet, els resultats mostren diferències interregionals. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en els diferents marcadors de dany proteic. Finalment, en aquest cas també s'ha calculat el coeficient de correlació de *Spearman* per tal d'identificar si existeix una associació entre els diferents marcadors de dany proteic analitzats i les regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial.

#### 9.1.2.1. Dany proteic derivat de lipoxidació i d'estrès mitocondrial

A la Taula 20 es representen les dades obtingudes en la quantificació dels diferents marcadors de dany proteic derivat de lipoxidació i d'estrès mitocondrial en les diferents regions estudiades en el SNC humà adult. Els resultats obtinguts mostren diferències significatives interregionals en tots els marcadors estudiats.

##### 9.1.2.1.1. Relació entre el dany proteic derivat de lipoxidació i la seva distribució en el SNC

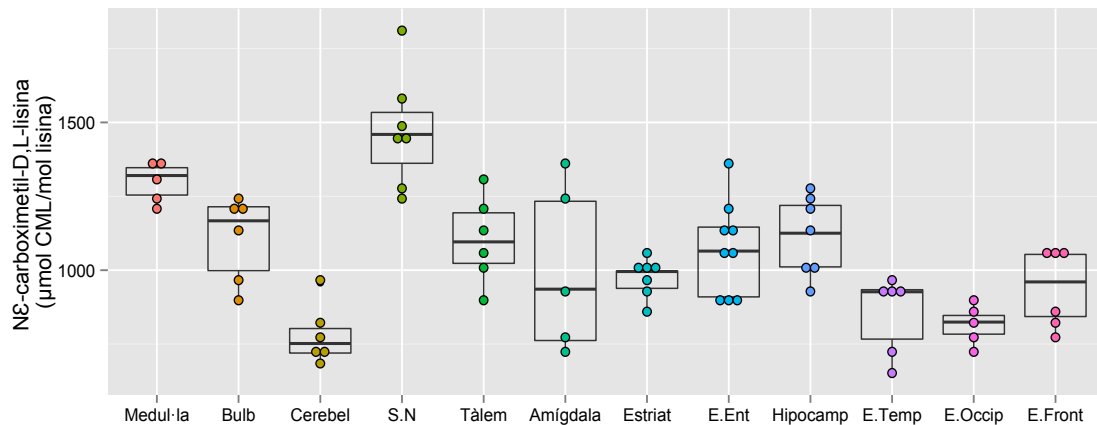
En la Figura 31 es mostren els resultats del dany proteic derivat de l'oxidació dels lípids que s'ha quantificat mesurant el marcador N<sup>ε</sup>-malondialdehid-lisina (MDAL). Amb els valors obtinguts d'aquest marcador en cada regió del SNC humà s'ha calculat el coeficient de correlació de *Spearman* per tal d'identificar si existeix una associació significativa amb les regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial. Els resultats obtinguts mostren una correlació inversa significativa entre els nivells del marcador MDAL i les diferents regions del SNC humà adult estudiades. És a dir, el dany proteic derivat de lipoxidació disminueix seguint l'eix caudo-cranial. Tanmateix, el cerebel té una acumulació del dany proteic derivat de lipoxidació més semblant a l'escorça frontal que a les regions més properes anatòmicament seguint l'eix caudo-cranial.



**Figura 31. Nivell del marcador N<sup>ε</sup>-malondialdehid-lisina (MDAL) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació inversa entre els nivells de MDAL i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de *Spearman*  $r = -0,520$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 5 -9 individus de cada regió.

### 9.1.2.1.2. Relació entre el dany proteic derivat de glico- i lipoxidació i la seva distribució en el SNC

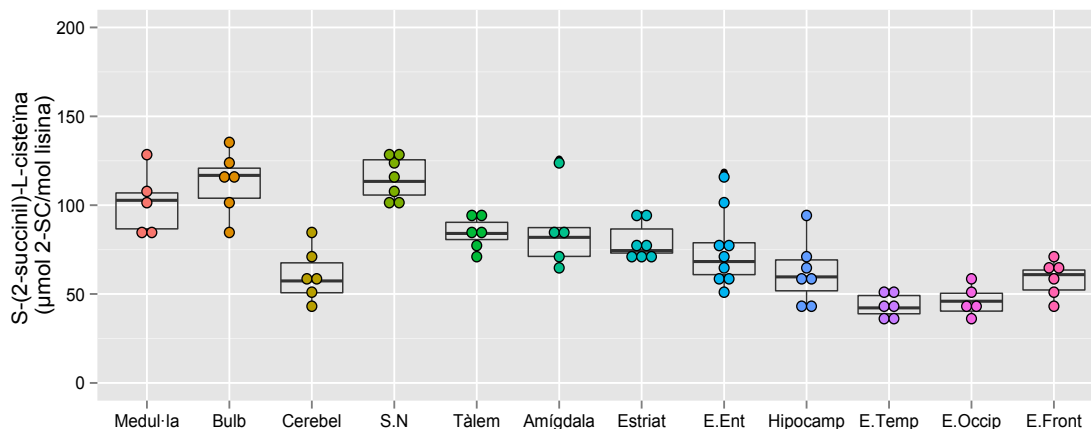
En la Figura 32 es mostren els resultats del dany proteic derivat de glico- i lipoxidació que s'ha quantificat mesurant el marcador N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML). Els resultats obtinguts del marcador CML mostren que existeix una correlació inversa significativa entre els nivells del marcador de CML i les diferents regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial. És a dir, el dany a l'aminoàcid lisina derivat de la glico- i lipoxidació disminueix seguint l'eix caudo-cranial. No obstant això, igual que en els resultats del marcador MDAL, el cerebel té una acumulació del dany proteic derivat de glico- i lipoxidació més semblant a l'escorça frontal que a la substància negra.



**Figura 32.** Nivell del marcador N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML) en 12 regions del SNC humà adult. Els resultats mostren l'existència d'una associació entre els nivells de CML i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = -0,380$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-9 individus de cada regió.

### 9.1.2.1.3. Relació entre el dany proteic derivat de l'estrès mitocondrial i la seva distribució en el SNC

En la Figura 33 es mostren els resultats del dany proteic que deriva de la reacció del fumarat amb la cisteïna que s'ha quantificat mesurant el marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC). Els resultats d'aquest marcador mostren l'existència d'una correlació inversa significativa entre els nivells del marcador 2-SC i les diferents regions del SNC humà ordenades seguint l'eix caudo-cranial. És a dir, el dany proteic derivat de l'estrès mitocondrial disminueix seguint l'eix caudo-cranial.



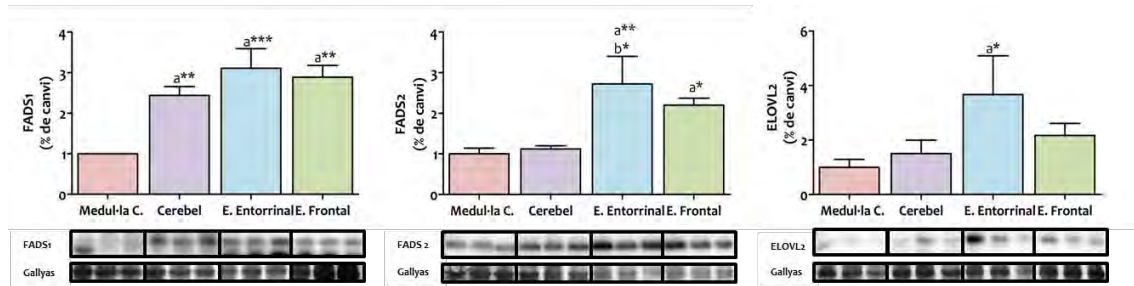
**Figura 33. Nivells del marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC) en 12 regions del SNC humà adult.** Els resultats mostren l'existència d'una associació inversa entre els nivells de 2-SC i les diferents regions del SNC humà adult estadísticament significativa (coeficient de correlació de Spearman  $r = -0,668$ ,  $p < 0,001$ ). Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5-9 individus de cada regió.

### 9.1.3. Immunodetecció per Western Blot

En base als resultats obtinguts en la composició dels àcids grassos de les diferents regions del SNC humà adult, s'ha procedit a l'estudi de les proteïnes específiques implicades en la biosíntesi dels àcids grassos, integrades dins dels sistemes desaturases-elongases i la  $\beta$ -oxidació peroxisomal. Aquesta determinació s'ha realitzat en les regions del SNC humà adult que presentaven un perfil en àcids grassos significativament més diferenciats entre elles. Les regions escollides han estat la medul·la cervical, el cerebel, l'escorça entorrinal i l'escorça frontal. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

#### 9.1.3.1. Desaturases i elongases

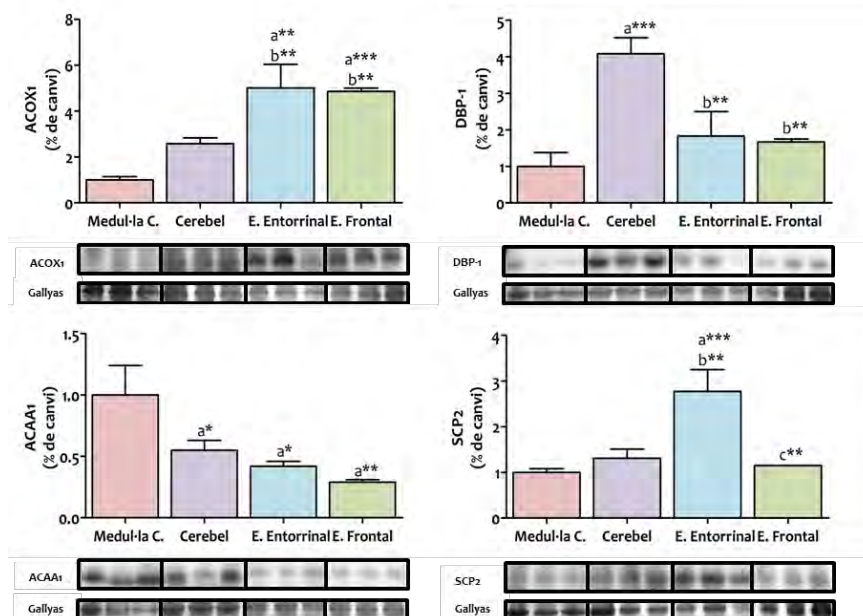
En la Figura 34 es mostren els resultats de l'expressió dels enzims desaturases i elongases que s'han analitzat mitjançant la detecció de les proteïnes FADS1, FADS2 i ELOVL2. La detecció de la proteïna FADS1 es veu augmentada significativament en totes les regions respecte a la medul·la cervical. De la mateixa manera, l'expressió de la proteïna FADS2 es veu significativament augmentada en l'escorça entorrinal i l'escorça frontal respecte la medul·la cervical, i respecte el cerebel en el cas de l'escorça entorrinal. I pel que fa a l'expressió de l'elongasa ELOVL2 també es mostra augmentada significativament en l'escorça entorrinal respecte la medul·la cervical.



**Figura 34. Expressió dels enzims desaturases i elongases implicades en la desaturació i allargament dels àcids grassos de 4 regions del SNC humà adult.** Les proteïnes detectades han estat FADS1, FADS2 i ELOVL2. Els valors representats en els gràfics ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en el cerebel, l'escorça entorrinal i l'escorça frontal respecte l'expressió en la medul·la cervical, normalitzant els valors amb la pròpia tinció de Gallyas. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 3 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte la medul·la cervical, <sup>b</sup> respecte el cerebel i <sup>c</sup> respecte l'escorça entorrinal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.1.3.2. $\beta$ -oxidació peroxisomal, via de síntesis dels àcids grassos poliinsaturats

En la Figura 35 es mostren els resultats de l'expressió de les proteïnes implicades en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal que s'han analitzat mitjançant la detecció de les proteïnes ACOX1, DBP-1, ACAA1 i SCP2. En els resultats podem observar que la detecció de la proteïna ACOX1 es veu augmentada significativament en l'escorça entorrinal i en l'escorça frontal respecte la medul·la cervical i el cerebel. Contràriament, l'expressió de la proteïna DBP-1 es veu significativament disminuïda en la medul·la cervical, l'escorça entorrinal i l'escorça frontal respecte el cerebel. Els resultats de la detecció de la proteïna ACAA1 mostren una disminució significativa en totes les regions estudiades respecte la medul·la cervical. I finalment, l'expressió de la proteïna SCP2 es veu augmentada significativament en l'escorça entorrinal respecte la medul·la cervical, el cerebel i l'escorça frontal.



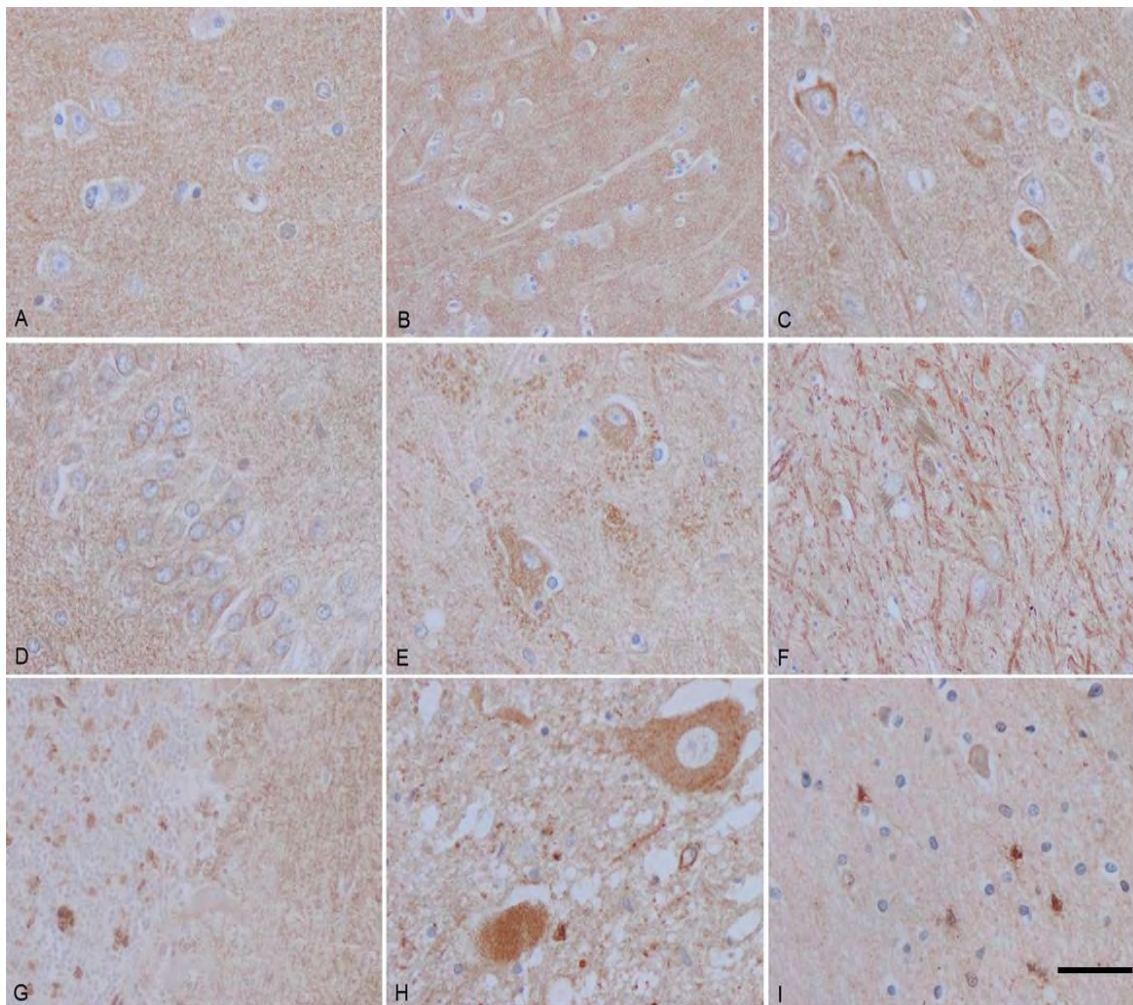
**Figura 35. Expressió de les proteïnes implicades en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, involucrades en el metabolisme dels àcids grassos i la seva síntesis, de 4 regions del SNC humà adult.** Les proteïnes detectades han estat ACOX1, DBP-1, ACAA1 i SCP2. Els valors representats en els gràfics ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en el cerebel, l'escorça entorrinal i l'escorça frontal respecte l'expressió en la medul·la cervical, normalitzant els valors amb la pròpia tinció de Gallyas. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 3 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte la medul·la cervical, <sup>b</sup> respecte el cerebel i <sup>c</sup> respecte l'escorça entorrinal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.1.4. Immunohistoquímica

Atès que els resultats obtinguts en l'estudi han mostrat diferències en la composició dels àcids grassos i en els mecanismes de biosíntesis dels àcids grassos entre les regions del SNC humà adult estudiades s'ha volgut comprovar la presència i localització, en les diferents regions del SNC humà adult, de enzims claus implicats en la biosíntesis dels àcids grassos i factors de resposta a estrès oxidatiu, per tal de determinar si les neurones tenen la capacitat o no de modular la seva composició lipídica. Els resultats d'aquest estudi mostren la presència d'aquestes proteïnes a nivell neuronal. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

#### 9.1.4.1. Enzim “*Fatty Acid Desaturase 2*” (FADS2)

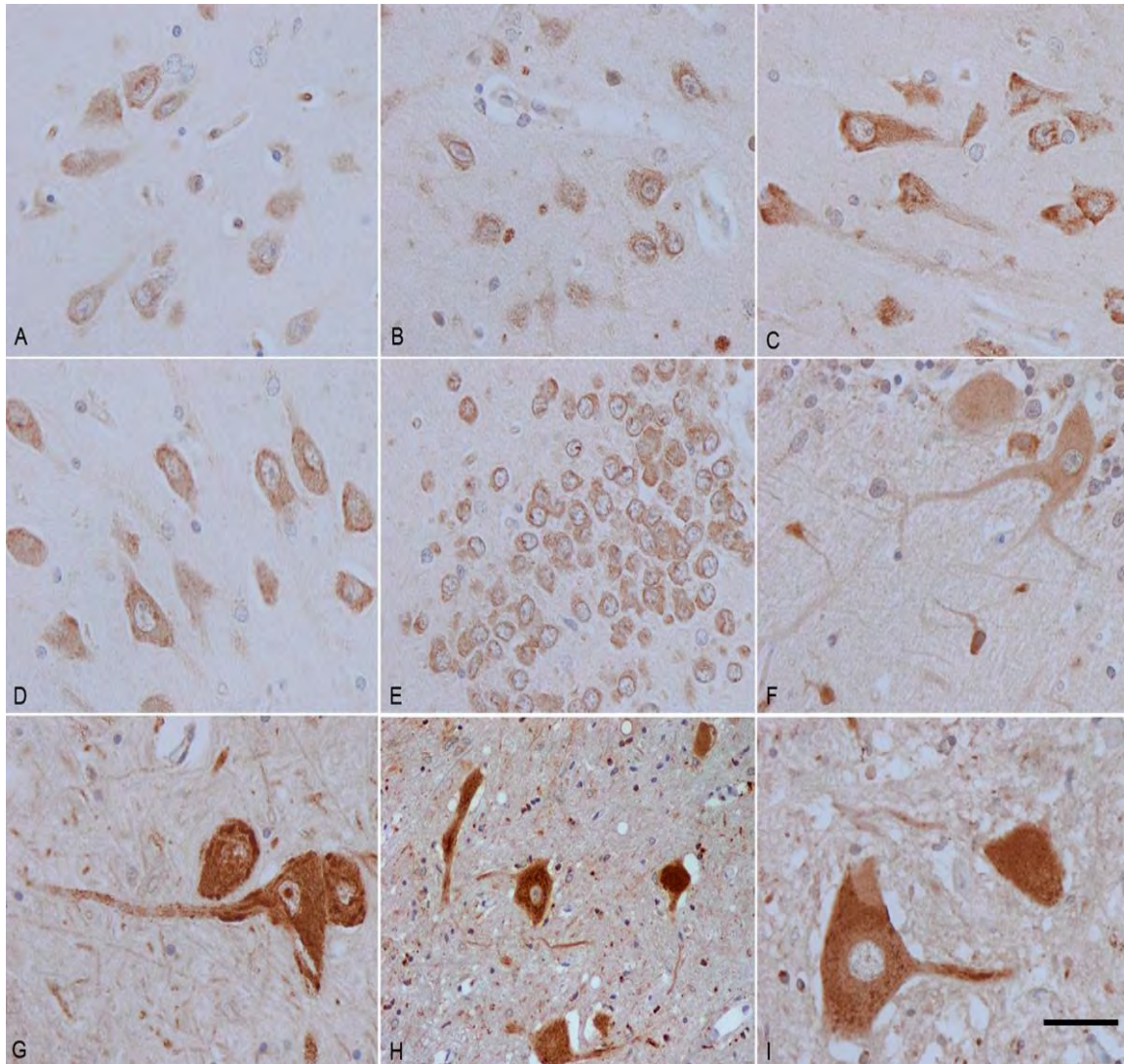
La Figura 36 mostra la presència i localització a nivell del sistema nerviós de l'enzim FADS2 implicat en la desaturació dels àcids grassos. Les imatges ens mostren com el marcatge (marró) d'aquest enzim s'observa a nivell neuronal en totes les regions del SNC humà estudiades.



**Figura 36. Expressió de la proteïna FADS2 de 9 regions del SNC humà adult.** A: Escorça temporal; B: Escorça entorrinal; C: Àrea CA1 de l'hipocamp; D: Hilus; E: Gir dentat; F: Escorça del cerebel; G: Substància negra; H: Banyana anterior de la medulla espinal; I: Substància blanca (cèl·lules de la glia). La immunohistoquímica de la proteïna FADS2 (la positivitat s'aprecia en color marró) es va realitzar en talls histològics parafinats que va ser contratenyits lleugerament amb hematoxilina per distingir els nuclis (color blau). Bar = 25 µm

### 9.1.4.2. Enzim “Acetyl-CoA acyltransferase 1” (ACAA1)

La Figura 37 mostra la presència i localització a nivell del sistema nerviós de l'enzim ACAA1 implicat en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal dels àcids grassos. Les imatges ens mostren com el marcatge (marró) d'aquest enzim s'observa a nivell neuronal en totes les regions del SNC humà estudiades.

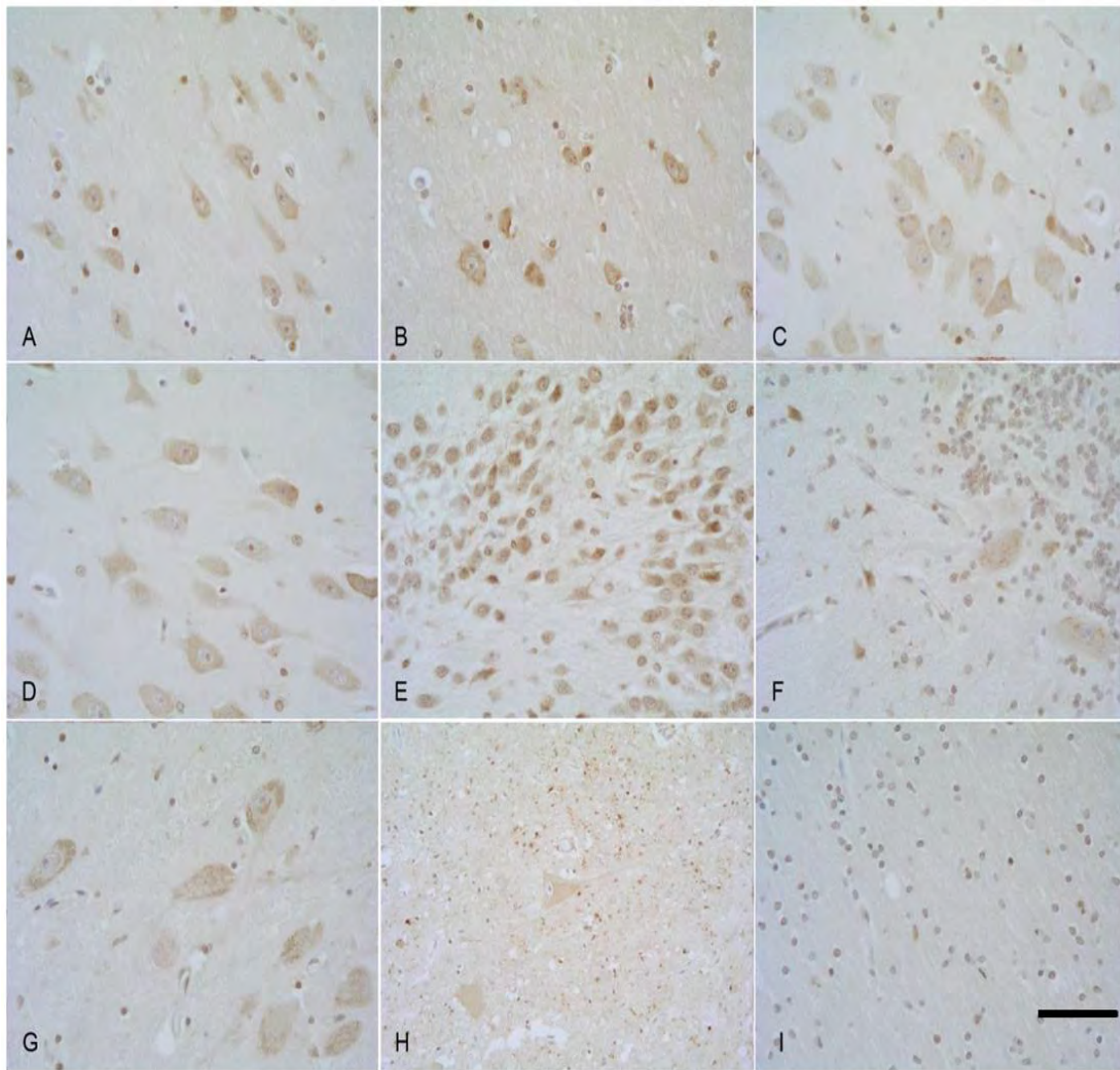


**Figura 37. Expressió de la proteïna ACAA1 de 9 regions del SNC humà adult.** A: Escorça temporal; B: Escorça entorrinal; C: Àrea CA1 de l'hipocamp; D: Hilus; E: Gir dentat; F: Escorça del cerebel; G: Substància negra; H: Banyana anterior de la medul·la espinal; I: Substància blanca (cèl·lules de la glia). La immunohistoquímica de la proteïna ACAA1 (la positivitat s'aprecia en color marró) es va realitzar en talls histològics parafinats que va ser contratenyits lleugerament amb hematoxilina per distingir els nuclis (blau). Bar = 25  $\mu$ m



9.1.4.3. “Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2” (Nrf2)

La Figura 38 mostra la presència i localització a nivell del sistema nerviós del factor Nrf2 implicat en la resposta antioxidant enfront a compostos carbonílics derivats de la peroxidació lipídica. Les imatges ens mostren com el marcatge (marró) d'aquest enzim s'observa a nivell neuronal en totes les regions del SNC humà estudiades.



**Figura 38. Expressió del factor NRF2 de 9 regions del SNC humà adult.** A: Escorça temporal; B: Escorça entorrinal; C: Àrea CA1 de l'hipocamp; D: Hilus; E: Gir dentat; F: Escorça del cerebel; G: Substància negra; H: Banya anterior de la medulla espinal; I: Substància blanca (cèl·lules de la glia). La immunohistoquímica de la proteïna Nrf2 (la positivitat s'aprecia en color marró) es va realitzar en talls histològics parafinats que va ser contratenyits lleugerament amb hematoxilina per distingir els nuclis (blau). Bar = 25 µm

## 9.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà

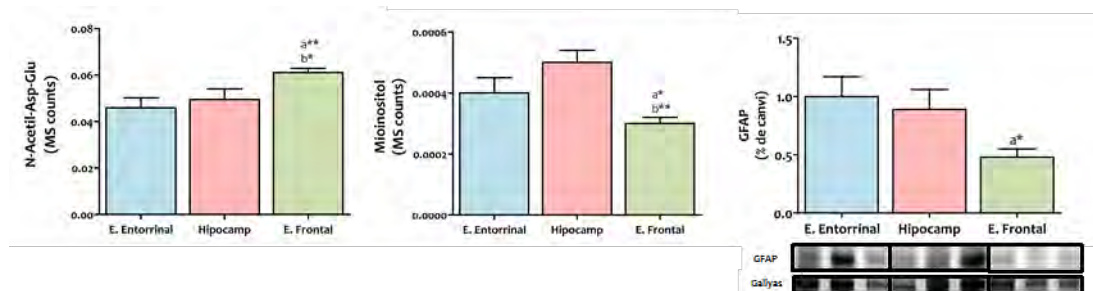
Per tal d'abordar els objectius del present estudi s'ha utilitzat la combinació d'una anàlisi metabolòmic dirigit i no dirigit amb el que s'han mesurat les concentracions de més de 40 metabòlits i determinat els perfils metabolòmics, respectivament, de tres regions diferents de l'escorça cerebral humana com són l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal. A més de l'anàlisi metabolòmic, també s'ha mesurat per western blot diferents factors associats a la resistència a l'estrès i la supervivència cel·lular, com és el factor de transcripció silenciador de RE-1 REST, el factor de transcripció FoxO1, els antioxidants catalasa i SOD1, i el regulador clau de la supervivència cel·lular mTOR.

### 9.2.1. Estudi metabolòmic dirigit

L'anàlisi de més de 40 metabòlits en tres regions del SNC humà adult com són l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal, per tal de determinar si existeixen diferències en el metabolisme bioenergètic, i en el metabolisme d'un caboni integrador del metabolisme de la serina, glicina i treonina, del metabolisme de la metionina i del metabolisme de les purines, mostra l'existència de diferències metabolòmiques significatives entre les tres regions analitzades. A continuació es desglossen els resultats dels metabòlits analitzats.

#### 9.2.1.1. Població cel·lular del SNC humà adult

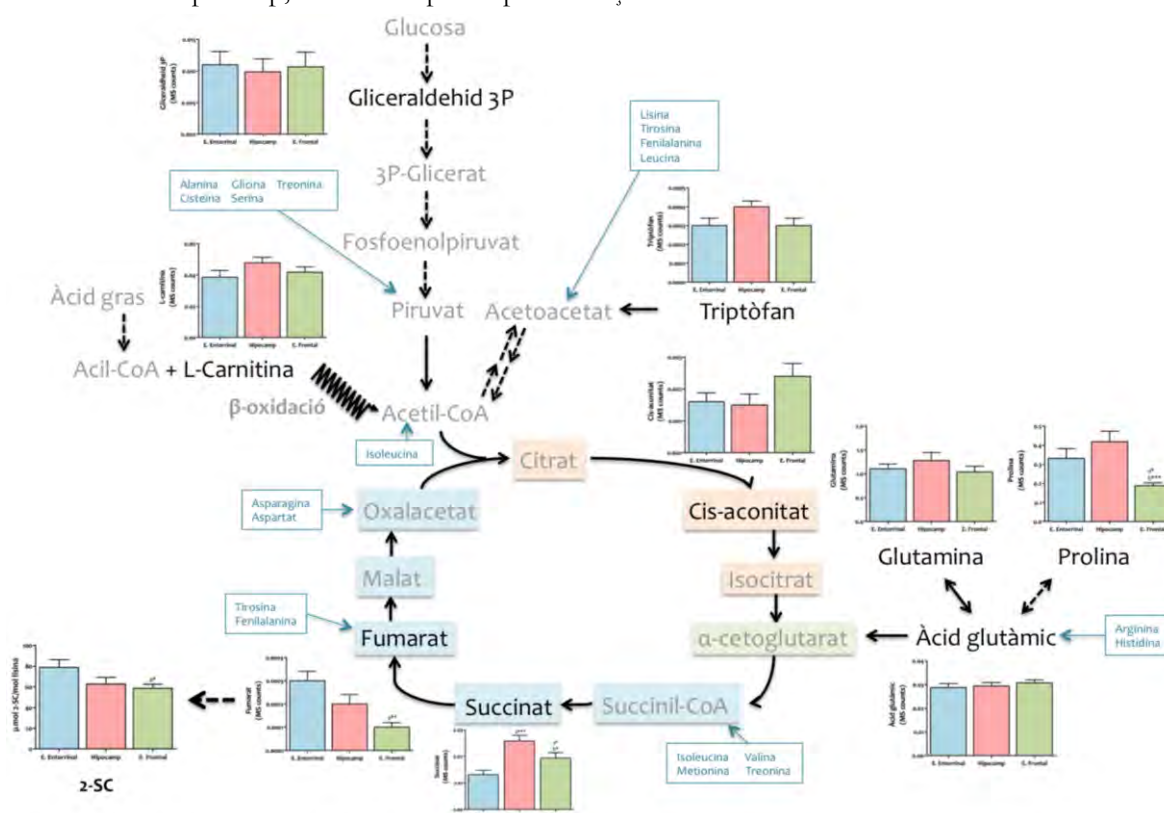
La Figura 39 mostra el contingut d'un marcador neuronal, mitjançant la detecció del metabòlit N-Acetil-Asp-Glu, i dos marcadors de cèl·lules de la glia, mitjançant la detecció del metabòlit Mioinositol i la proteïna GFAP (de l'anglès, *Glial fibrillary acidic protein*), presents en les diferents regions del SNC humà adult estudiades. En els resultats podem observar uns nivells significativament elevats del contingut del marcador neuronal a nivell de l'escorça frontal respecte les regions de l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Tanmateix, els nivells de tots dos marcadors de cèl·lules de la glia en l'escorça frontal són significativament menors als de l'escorça entorrinal i l'hipocamp.



**Figura 39.** Contingut de neurones i cèl·lules de la glia de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult **sa**. N-Acetil-Asp-Glu és utilitzat com a marcador del contingut neuronal. Mioinositol i GFAP com a marcadors del contingut de cèl·lules de la glia. N-Acetil-Asp-Glu i Mioinositol han estat determinat mitjançant TQMS; mentre que GFAP ha estat mesurat mitjançant western blot. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte l'escorça entorrinal, <sup>b</sup> respecte l'hipocamp. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.2.1.2. Metabòlits del cycle de Krebs

Les demandes bioenergètiques de les diferents regions del còrtex cerebral humà s'han mesurat mitjançant la detecció de metabòlits involucrats al cycle de Krebs, dels quals alguns són directes (cis-aconitat, succinat i fumarat) i altres indirectes (gliceraldehid 3P, carnitina, glutamina, àcid glutàmic i prolina) (Figura 40). No s'han detectat diferències interregionals per al cis-aconitat, gliceraldehid 3P, la carnitina, la glutamina i l'àcid glutàmic. Per contra, les concentracions de prolina i succinat són significativament menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp; mentre que no s'observen diferències significatives entre l'escorça entorrinal i l'hipocamp en el cas de la prolina. Així mateix, la concentració de fumarat es troba significativament disminuïda en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal; mentre que no s'observen diferències significatives entre l'escorça entorrinal i l'hipocamp, ni entre l'hipocamp i l'escorça frontal.



**Figura 40. Concentracions tissulars de metabòlits implicats en el metabolisme bioenergètic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.** Els metabòlits han estat detectats i quantificats mitjançant TQMS; Els nivells del marcador de dany oxidatiu, 2-SC han estat mesurats mitjançant GC-MS. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte l'escorça entorrinal, <sup>b</sup> respecte l'hipocamp. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Les molècules de color taronja contenen 6 àtoms de carboni, la verda ( $\alpha$ -cetoglutarat) 5 carbonis i les molècules blaves 4.

A partir d'intermediaris del cycle de Krebs poden generar modificacions post-traduccionals (PTM; de l'anglès, *Post-translational modification*) com és la succinació; una modificació química de la cisteïna en les proteïnes pel fumarat, la qual dona lloc a S-(2-succinil)-cisteïna (2-SC). Així doncs, 2-SC serveix com un biomarcador d'estrès mitocondrial. Els resultats mostren que els nivells de 2-SC són significativament més baixos en l'escorça frontal en comparació amb escorça entorrinal; mentre que no s'observen diferències significatives entre l'escorça entorrinal i l'hipocamp.

9.2.1.2. Metabòlits del metabolisme d'un carboni

9.2.1.2.1. Metabòlits del metabolisme de serina, glicina i treonina

La Figura 41 mostra el contingut dels diferents metabòlits implicats en el metabolisme de la serina, glicina i treonina a nivell de les tres regions del SNC humà adult estudiades. En els resultats podem observar l'existència de diferències interregionals en les concentracions de serina, glicina, treonina i metabòlits relacionats com són la sarcosina i la colina. Les concentracions de serina, glicina i treonina en l'escorça frontal són significativament menors respecte l'hipocamp, i en el cas de la serina també respecte l'escorça entorrinal. Tanmateix, en els metabòlits de glicina i treonina es produeix un augment significatiu en l'hipocamp respecte l'escorça entorrinal. D'altra banda, les concentracions de sarcosina també són significativament inferiors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp, i aquest últim també es troba significativament augmentat respecte l'escorça entorrinal. El metabòlit colina també mostra canvis significatius en els nivells de concentració menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal. Per contra, no s'han detectat diferències significatives interregionals per la betaïna.

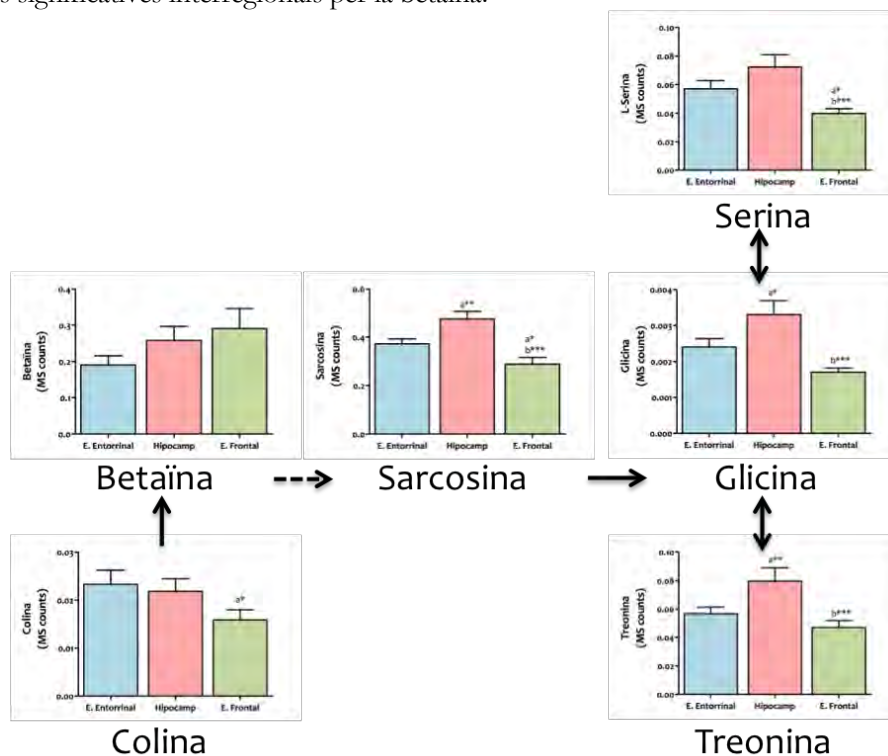


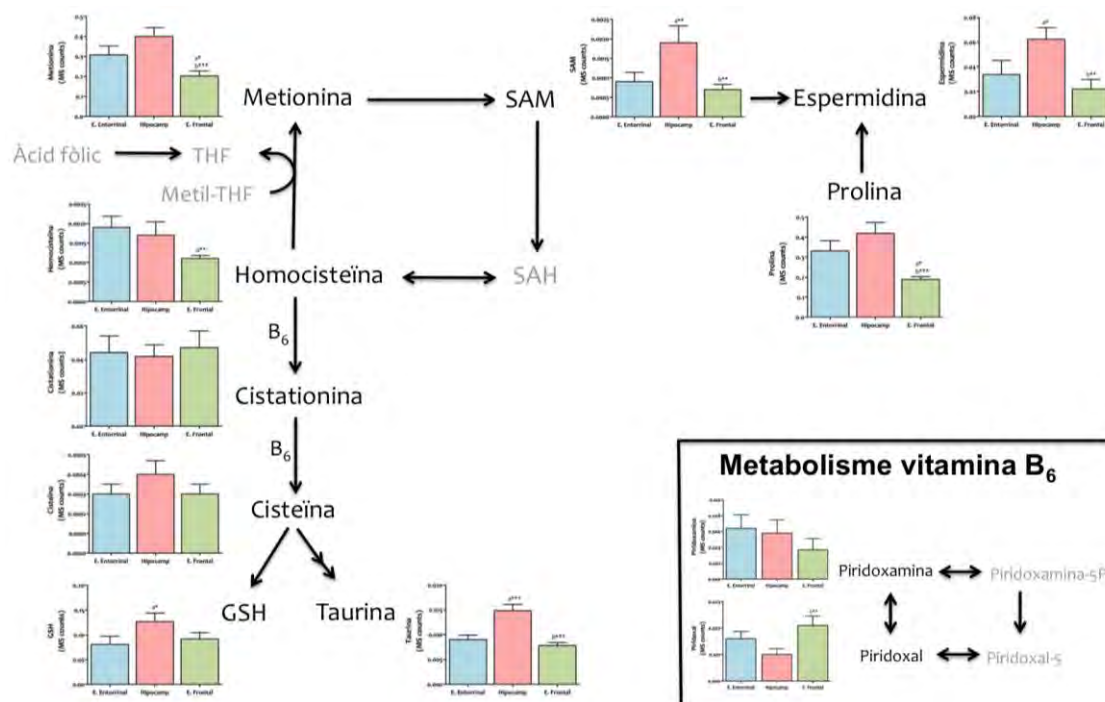
Figura 41. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme serina, glicina i treonina de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Els metabòlits han estat detectats i quantificats mitjançant TQMS; Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte l'escorça entorrinal, <sup>b</sup> respecte l'hipocamp. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

9.2.1.2.2. Metabòlits del metabolisme de la metionina

La Figura 42 mostra el contingut dels diferents metabòlits implicats en el metabolisme de la metionina -incloent el cicle de la metionina i la via de transsulfuració-. Els metabòlits analitzats han

estat: a) cycle de la metionina: metionina, S-adenosil-metionina (SAM) i homocisteïna; així com espermidina i prolina; i b) via de transsulfuració: cistationina, cisteïna, glutatió, taurina i vitamina B6 –piridoxal i piridoxamina-.

Les concentracions dels metabòlits del cycle de la metionina mostren nivells significativament menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal en l'homocisteïna, respecte l'hipocamp en el SAM i l'espermidina, i respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp en la metionina i la prolina; mentre que únicament s'observen diferències significatives entre l'escorça entorrinal i l'hipocamp en el cas del SAM i la prolina. Per contra, no s'han detectat canvis interregionals per als metabòlits de la via de transsulfuració, amb l'excepció del glutatió, la taurina i el piridoxal. Els nivells de glutatió i taurina es troben significativament augmentats en l'hipocamp respecte l'escorça entorrinal; mentre que únicament s'observen nivells significativament menors entre l'escorça frontal i l'hipocamp en la taurina. Per contra, el metabòlit piridoxal mostra una concentració significativament augmentada en la regió de l'escorça frontal respecte de l'hipocamp.



**Figura 42. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme de la metionina, incloent el cycle de la metionina i la via de transsulfuració, de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.** Els metabòlits han estat detectats i quantificats mitjançant TQMS; Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte l'escorça entorrinal, <sup>b</sup> respecte l'hipocamp. \* p< 0,05, \*\* p< 0,01 i \*\*\* p< 0,001.

### 9.2.1.2.2. Metabòlits del metabolisme de les purines

La Figura 43 mostra el contingut dels diferents metabòlits implicats en el metabolisme de les purines. Els metabòlits analitzats han estat: ribosa 5-fosfat, guanosina 5-monofosfat, inosina 5-monofosfat, AMP, xantosina, xantina, hipoxantina, inosina i adenosina.

Les concentracions dels metabòlits del metabolisme de les purines no presenten canvis significatius entre les diferents regions del SNC humà adult estudiades, amb l'excepció de la ribosa 5-fosfat, la xantosina i la hipoxantina. Les concentracions de ribosa 5-fosfat, xantosina i hipoxantina en l'escorça frontal són significativament menors respecte l'hipocamp, i en el cas de la xantosina i hipoxantina també són significativament menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal; mentre que no s'observen diferències significatives entre l'escorça entorrinal i l'hipocamp en cap cas.

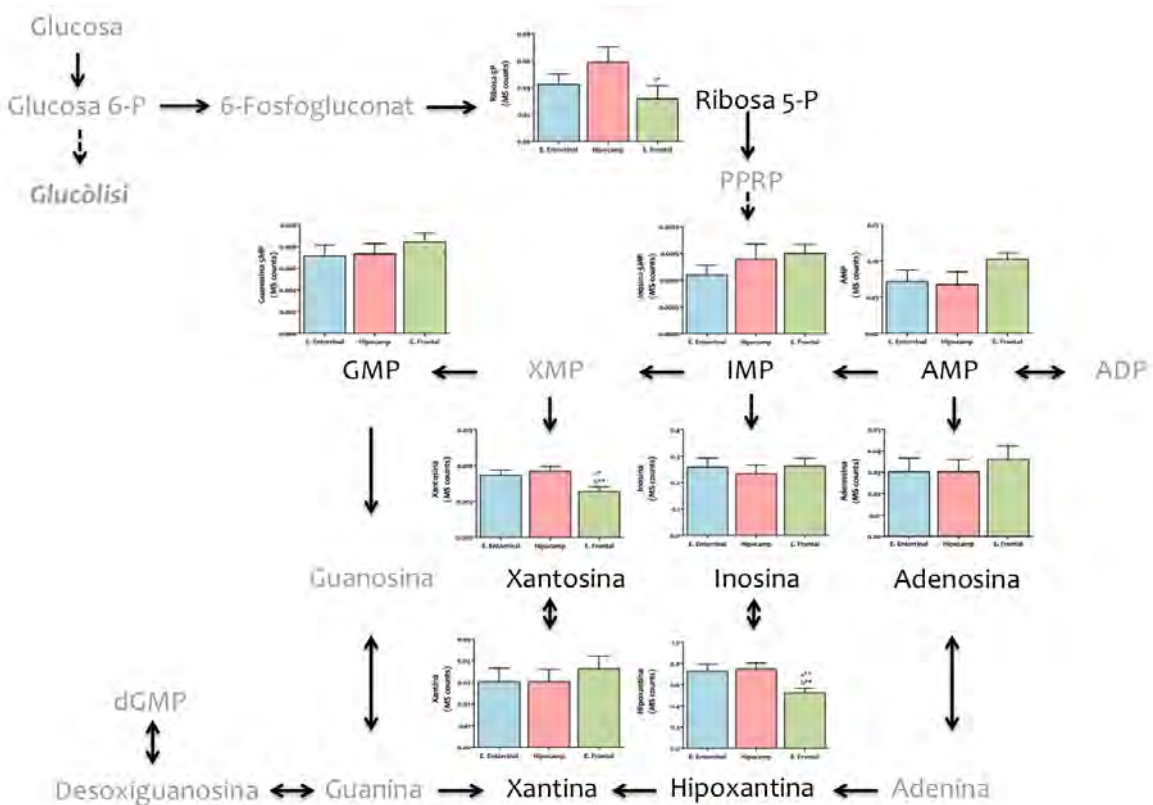


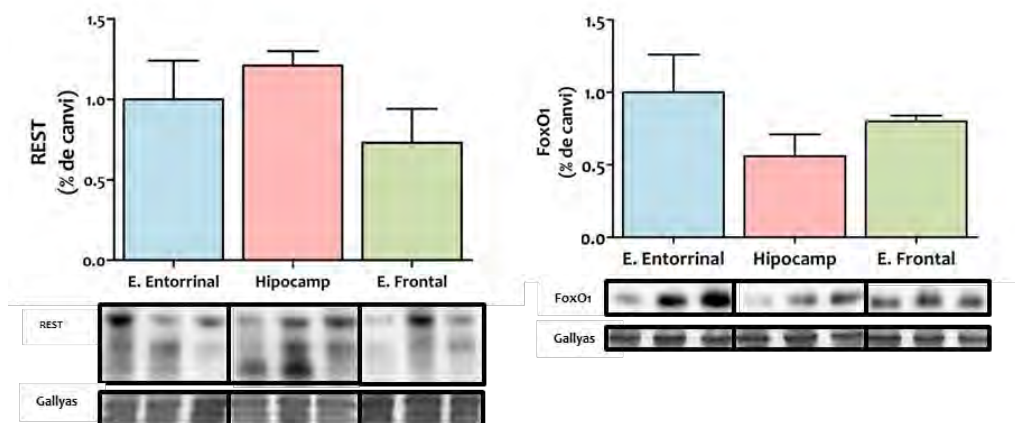
Figura 43. Concentracions tissulars dels metabòlits implicats en el metabolisme de les purines de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Els metabòlits han estat detectats i quantificats mitjançant TQMS; Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte l'escorça entorrinal, <sup>b</sup> respecte l'hipocamp. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.2.2. Immunodetecció per Western Blot

Un cop s'han detectat diferències interregionals significatives en l'estat metabòlic en les tres àrees del SNC humà adult estudiades, ens preguntem si aquestes diferències fenotípiques poden estar associades a canvis en els sistemes cel·lulars relacionats amb la resistència i resposta a l'estrès, i la supervivència cel·lular. A continuació es desglossen els paràmetres estudiats i els resultats obtinguts.

### 9.2.2.1. Factor de resistència a l'estrès oxidatiu

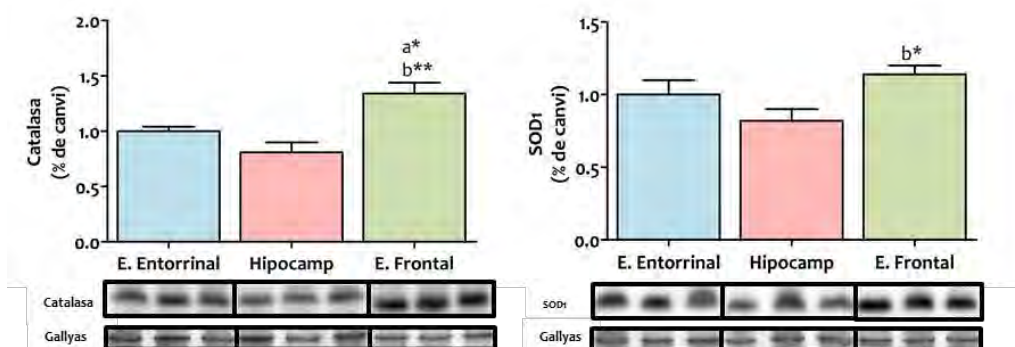
L'expressió dels sistemes cel·lulars relacionats amb l'estrès s'han analitzat mitjançant la detecció dels factors de transcripció REST, com a regulador de la resposta neuroprotector enfront l'estrès i que promou l'activació del factor FoxO1 per tal de mediar la resistència a l'estrès oxidatiu (Figura 44). Els resultats obtinguts mostren que en cap cas s'han detectat canvis interregionals.



**Figura 44.** Expressió de dos factors de transcripció de resistència a estrès oxidatiu de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Els factors analitzats han estat el factor de transcripció REST i FoxO1. Els valors representats en els gràfics ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en l'hipocamp i l'escorça frontal respecte l'expressió en l'escorça entorrinal, normalitzant els valors amb la tinció de Gallyas. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte la medul·la cervical, <sup>b</sup> respecte el cerebel i <sup>c</sup> respecte l'escorça entorrinal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.2.2.2. Enzims antioxidants

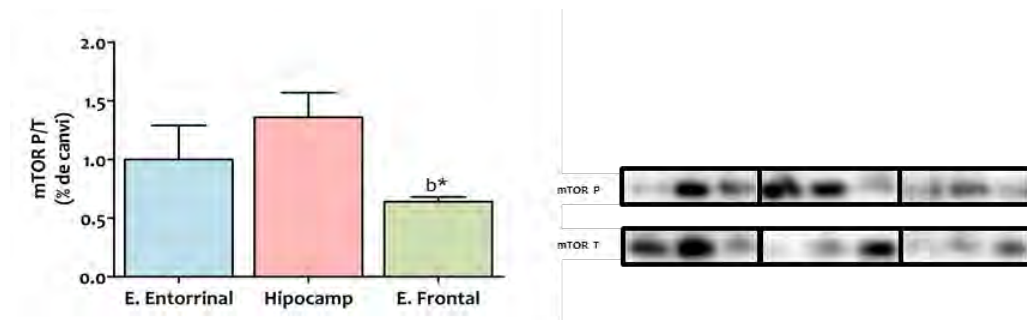
Els enzims catalasa i SOD1, que poden ser activats pels nivells del factor REST, han estat els enzims antioxidants analitzats com a proteïnes catalitzadores de la descomposició de peròxid d'hidrogen i superòxid, respectivament (Figura 45). La detecció de la proteïna catalasa en l'escorça frontal es veu significativament augmentada respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Uns resultats similars s'han obtingut en la detecció de la SOD1, ja que hi ha un augment significatiu a nivell d'escorça frontal respecte la regió de l'hipocamp.



**Figura 45.** Expressió de les proteïnes catalitzadores de la descomposició del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i el superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Les proteïnes analitzades han estat la catalasa i SOD1. Els valors representats en els gràfics ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en l'hipocamp i l'escorça frontal respecte l'expressió en l'escorça entorrinal, normalitzant els valors amb la tinció de Gallyas. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte la medul·la cervical, <sup>b</sup> respecte el cerebel i <sup>c</sup> respecte l'escorça entorrinal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.2.2.3. Factor de supervivència

mTOR és una serina/treonina quinasa molt conservada evolutivament en cèl·lules eucariotes que regula el creixement cel·lular i el metabolisme en resposta als nutrients, factors de creixement i a les condicions de l'energia cel·lular. Així, mTOR és un mestre regulador que detecta l'estat de nutrients i l'energia cel·lular, i es troba implicat en la supervivència cel·lular. A la figura inferior (Figura 46) es pot observar que l'activació mTOR és significativament menor a l'escorça frontal humana.

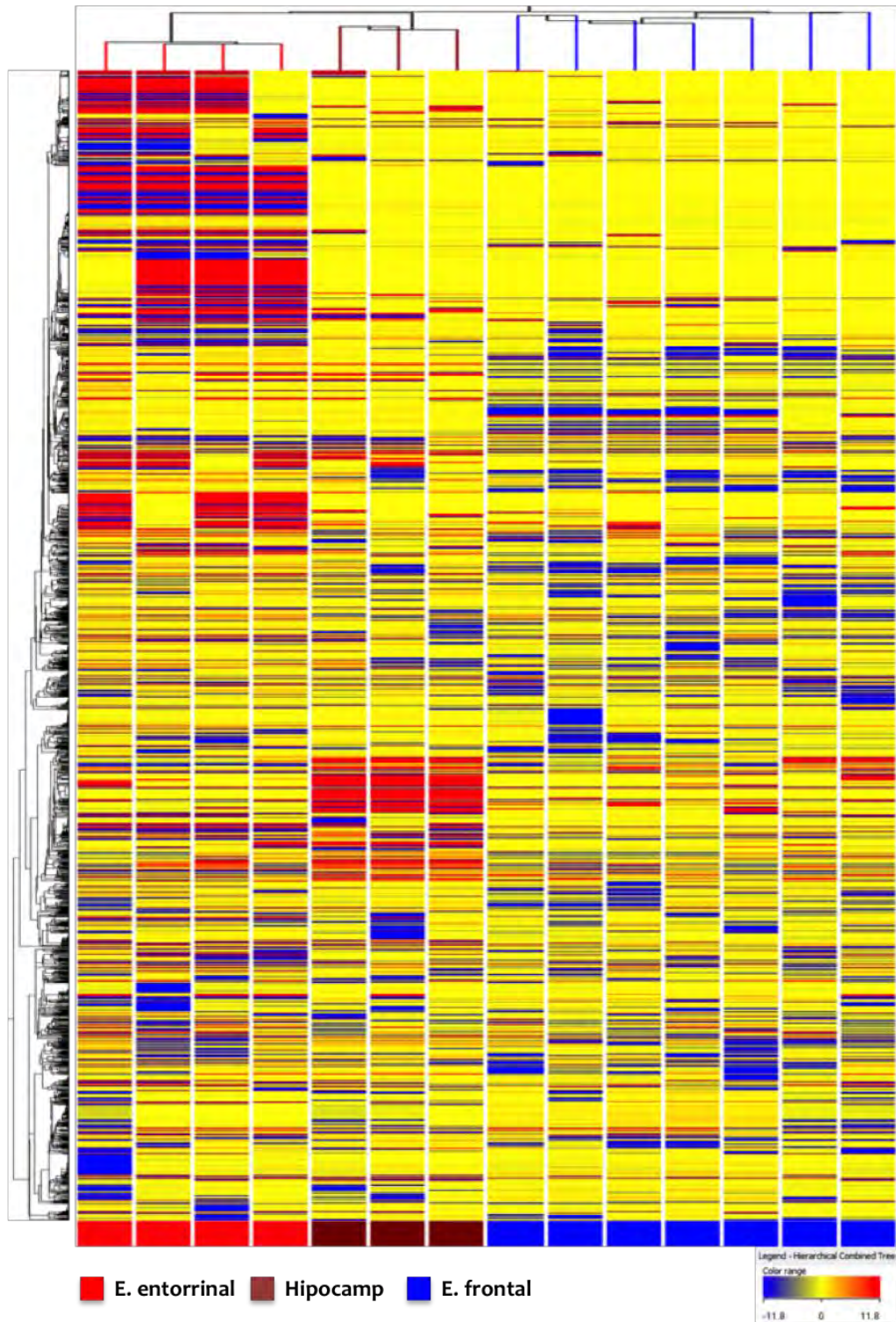


**Figura 46. Expressió d'una proteïna implicada en la supervivència cel·lular de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.** La proteïna analitzada ha estat mTOR total i mTOR fosforilada. Els valors representats en el gràfic ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en l'hipocamp i l'escorça frontal respecte l'expressió en l'escorça entorrinal, calculant la relació de la densitometria de mTOR fosforilat/densitometria de mTOR total. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 9-10 individus de cada regió. <sup>a</sup> respecte la medulla cervical, <sup>b</sup> respecte el cerebel i <sup>c</sup> respecte l'escorça entorrinal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

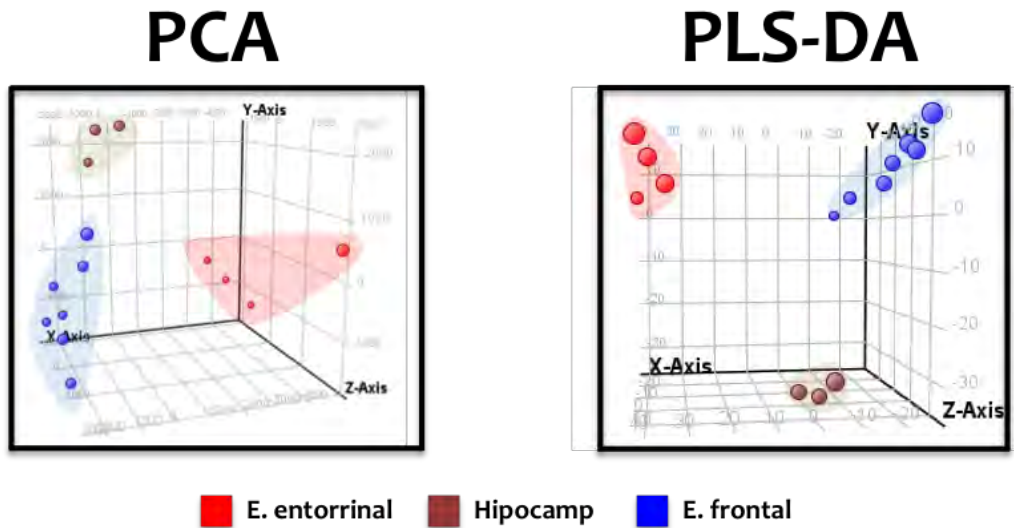
### 9.2.3. Metabolòmica no dirigida

Amb l'objectiu de confirmar si aquestes diferències interregionals en vies metabòliques particulars poden ser inscrites en un estat metabolòmic específic de regió més general, s'ha aplicat, a un grup més reduït però representatiu de mostres, una anàlisi no dirigida. Utilitzant un enfocament no dirigit i seleccionant només aquelles característiques moleculars que estaven presents com a mínim al 75 % de les mostres del mateix grup (al voltant de 3.500 metabòlits en la ionització positiva i negativa) s'ha realitzat estudis estadístics de multivariança. Com es mostra a la Figura 47 l'agrupació jeràrquica (*hierarchical clustering*) separa perfectament les tres regions cerebrals estudiades. D'altra banda, aquesta separació també és present quan s'aplica algoritmes en l'anàlisi de components principals no supervisats (PCA; de l'anglès, *Principal Component Analysis*) i en l'anàlisi de mínims quadrats (PLS-DA; de l'anglès, *Partial Least Discrimination Analysis*) (Figura 48), el que indica que l'àrea del cervell és el principal factor determinant de les diferències metabolòmiques. A més, i d'acord amb l'anàlisi d'agrupació, l'escorça entorrinal i l'escorça frontal es troben més a prop entre elles que l'hipocamp (Figura 47).





**Figura 47. Perfil metabòlic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa.** Diagrama HEATMAP i d'agrupació jeràrquica (*hierarchical clustering*) de les característiques moleculars que es troben en cada mostra de teixit nerviós. Cada línia d'aquest gràfic representa una massa exacta ordenada per temps de retenció i acolorida d'acord amb la seva intensitat normalitzada amb l'abundància del patró intern. L'escala de -8,5 (blau) a 8,5 (vermell) representa l'abundància normalitzada en unitats arbitràries.



**Figura 48.** Perfil metabolòmic de l'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal del cervell humà adult sa. Representació tridimensional dels anàlisis PCA i PLS-DA. L'anàlisi PLS-DA mostra una bona agrupació dels tres grups amb una precisió de 0,85 demostrant que comparteixen la majoria de característiques moleculars. Eix X: Component principal 1, Eix Y: Component principal 2, Eix Z: Component principal.

### **9.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà**

Per tal d'abordar els objectius plantejats del present estudi s'ha procedit: i) a l'anàlisi del perfil composicional dels àcids grassos totals, associant que es tracta majoritàriament de lípids de membrana, la detecció de proteïnes implicades en les vies de biosíntesis dels àcids grassos, així com la detecció de mediadors lipídics implicats en l'estat anti i proinflamatori en mostres d'escorça frontal humana d'individus sans amb edats compreses entre 40 i 89 anys; i ii) a l'anàlisi del dany oxidatiu, la detecció i localització de proteïnes implicades en a) la cadena de transport d'electrons i biogènesis mitocondrial; i b) factors de resistència a estrès oxidatiu i de supervivència cel·lular en mostres d'escorça frontal humana d'individus sans amb edats compreses entre 40 i 89 anys.

#### **9.3.1. Estudi lipídic**

##### **9.3.1.1. Anàlisi composicional dels àcids grassos**

L'anàlisi de la composició en àcids grassos en les diferents dècades de l'escorça frontal humana, per tal de determinar si existeixen variacions en la composició de les membranes lipídiques en el transcurs de l'envelliment, mostra canvis significatius entre les diferents dècades. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en la composició dels àcids grassos de les membranes lipídiques i els índex que en deriven.

###### **9.3.1.1.1. Perfil composicional en àcids grassos dels lípids de l'escorça frontal**

En la Taula 21 es mostra el perfil composicional dels àcids grassos de les membranes lipídiques d'escorces frontals humanes d'individus adults sans, d'edats compreses entre 40 i 89 anys. Els resultats obtinguts mostren diferències significatives durant l'envelliment en els diferents àcids grassos estudiats. El major nombre de canvis significatius es produeixen entre les dècades del 60 i 70 anys. No obstant, certs àcids grassos com el 20:4n-6 i el 22:6n-3 mostren una disminució significativa en la dècada d'edat més avançada.

###### **9.3.1.1.2. Índexs derivats de la composició en àcids grassos**

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global. Les dades s'han analitzat mitjançant una anàlisi multivariant no lineal utilitzant el model additiu generalitzat (GAM; de l'anglès, *generalized additive model*) per tal de predir les modificacions en la composició dels àcids grassos de les membranes d'escorça frontal d'humà adult en funció de la variable edat. Les variables sexe i temps *post-mortem* no s'han tingut en compte ja que no han estat estadísticament significatives en l'anàlisi previ (veure annex 1).

Taula 21. Composició en àcids grassos dels lípids de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les dades expressades com a mols en % són la mitjana ± SEM dels individus corresponents a cada dècada.

	Dècada 40 anys n=6	Dècada 50 anys n=10	Dècada 60 anys n=9	Dècada 70 anys n=22	Dècada 80 anys n=11
f14:0	1,48 ± 0,17	1,21 ± 0,07	1,53 ± 0,13 <sup>b*</sup>	1,19 ± 0,07 <sup>a*,c**</sup>	1,31 ± 0,06
f16:0	21,19 ± 0,66	20,27 ± 0,74	20,15 ± 0,85	25,32 ± 0,65 <sup>a***,b***,c***</sup>	24,17 ± 0,71 <sup>a**,b***,c**</sup>
f16:1n-7	1,47 ± 0,13	1,45 ± 0,10	1,85 ± 0,17 <sup>a*,b*</sup>	1,47 ± 0,08 <sup>a*,b*,c***</sup>	1,24 ± 0,08 <sup>c***</sup>
f18:0	21,43 ± 0,97	21,27 ± 0,61	20,30 ± 1,47	20,11 ± 0,59	22,45 ± 1,08 <sup>d*</sup>
f18:1n-9	26,56 ± 1,46	26,35 ± 1,04	27,82 ± 1,30	23,87 ± 0,66 <sup>c**</sup>	27,46 ± 1,25 <sup>d**</sup>
f18:2n-6	1,11 ± 0,10	1,16 ± 0,10	1,21 ± 0,13	1,16 ± 0,06	1,04 ± 0,07
f18:3n-3	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,32 ± 0,15	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,04
f18:4n-3	0,37 ± 0,20	0,20 ± 0,05	0,44 ± 0,24	0,36 ± 0,05	0,41 ± 0,06
f20:0	0,37 ± 0,07	0,74 ± 0,42	0,42 ± 0,12	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,04
f20:1n-9	1,36 ± 0,17	1,41 ± 0,17	1,81 ± 0,18 <sup>a*</sup>	1,13 ± 0,07 <sup>c***</sup>	1,43 ± 0,19
f20:2n-6	0,43 ± 0,12	0,31 ± 0,05	0,51 ± 0,19	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,02
f20:3n-6	1,18 ± 0,26	1,04 ± 0,05	1,54 ± 0,46	1,21 ± 0,08	1,09 ± 0,15
f20:4n-6	6,92 ± 0,43	6,73 ± 0,38	6,26 ± 0,32	6,55 ± 0,30	5,37 ± 0,32 <sup>a**,b**,d**</sup>
f20:5n-3	0,33 ± 0,12	0,25 ± 0,04	0,38 ± 0,18	0,34 ± 0,04	0,51 ± 0,27
f22:0	0,38 ± 0,10	0,73 ± 0,43	0,46 ± 0,13	0,42 ± 0,02	0,40 ± 0,04
f22:4n-6	4,27 ± 0,33	4,64 ± 0,20	4,40 ± 0,31	4,26 ± 0,23	3,51 ± 0,26 <sup>b**,c*,d*</sup>
f22:5n-6	1,19 ± 0,24	1,08 ± 0,12	1,16 ± 0,30	0,98 ± 0,07	0,72 ± 0,08 <sup>a*</sup>
f22:5n-3	0,58 ± 0,18	0,53 ± 0,05	0,60 ± 0,22	0,61 ± 0,04	0,44 ± 0,04
f22:6n-3	8,07 ± 0,95	9,15 ± 0,67	7,42 ± 0,60	9,28 ± 0,63	6,40 ± 0,67 <sup>b**,d**</sup>
f24:0	0,59 ± 0,09	0,78 ± 0,18	0,71 ± 0,14	0,65 ± 0,05	0,69 ± 0,09
f24:5n-3	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,02	0,40 ± 0,09 <sup>b*</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a**,b**,c***</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>a**,b**,c***</sup>
f24:6n-3	0,24 ± 0,05	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,08	0,15 ± 0,02 <sup>c**</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a*,b*,c***</sup>

<sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

En la Figura 49 es mostra la relació de la LMC dels àcids grassos de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. Els resultats obtinguts mostren que existeix una correlació negativa significativa entre la LMC i l'edat. No obstant això, aquest paràmetre es manté en un valor mitjà de 18 àtoms de carbonis.

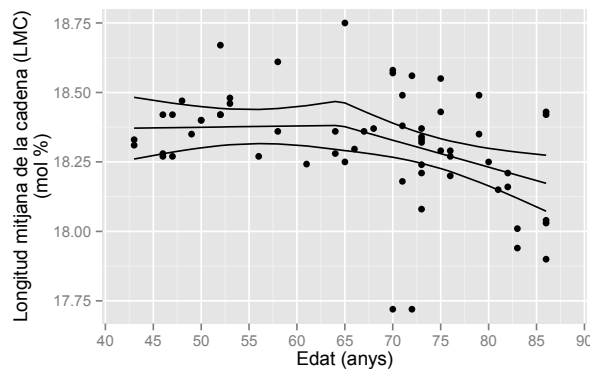
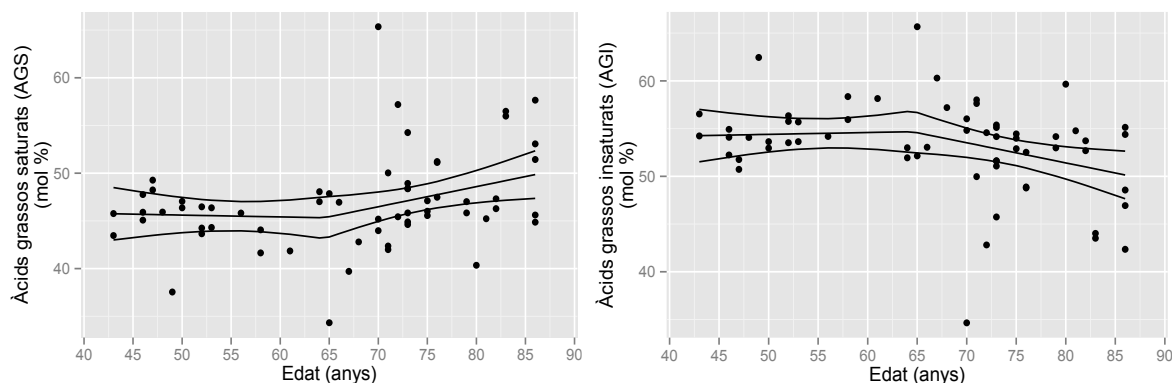


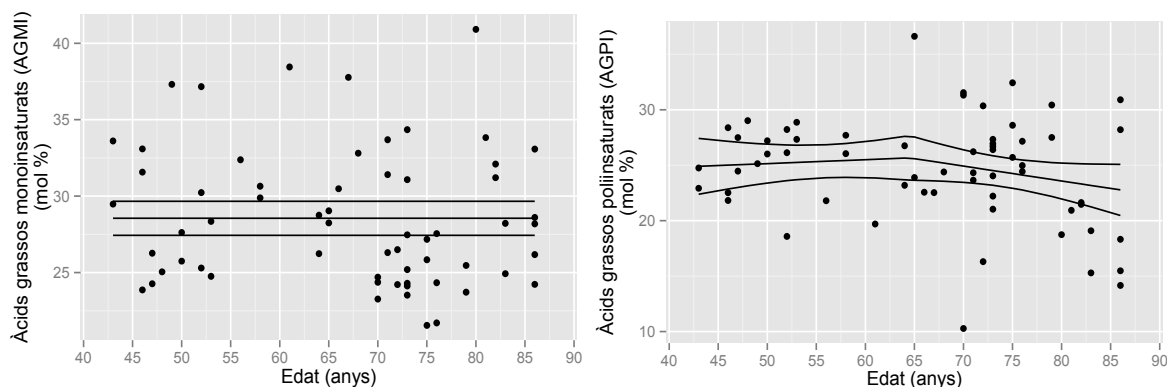
Figura 49. Relació de la longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos de l'escorça frontal humana amb l'edat. Els resultats mostren que existeix una correlació negativa significativa entre la LMC dels àcids grassos i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 58), analitzat pel model additiu generalitzat (p < 0,01, R<sup>2</sup>=0,146, desviació explicada=16,9 %).

En la Figura 50 es mostren els valors del contingut dels AGS i AGI, respectivament. Els resultats obtinguts mostren que existeix una correlació significativa entre el contingut en AGS i AGI i l'edat. No obstant això, la correlació és positiva en el contingut d'AGS i negativa en el contingut d'AGI. És a dir, en edat avançada els individus presenten una composició més elevada en AGS i més baixa en AGI.



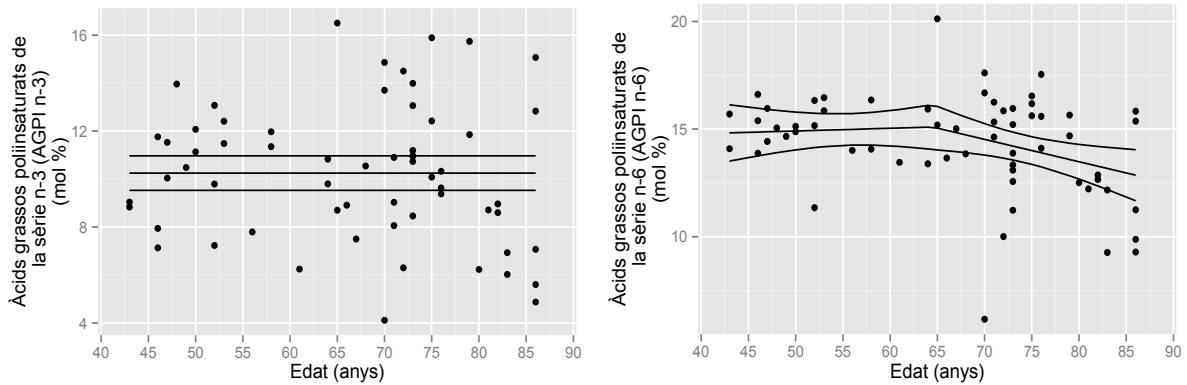
**Figura 50. Contingut d'àcids grassos saturats (AGS) i contingut d'àcids grassos insaturats (AGI) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat.** Els resultats mostren que existeix una correlació significativa entre el contingut d'AGS i l'edat, així com una correlació negativa significativa entre el contingut d'AGI i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 58), analitzat per al model additiu generalitzat ( $p < 0,01$ ,  $R^2=0,112$ , desviació explicada=1,34 % i  $p < 0,01$ ,  $R^2=0,112$ , desviació explicada=1,34 %, respectivament).

Dins dels AGI diferenciem entre els que contenen un doble enllaç o els que en tenen més d'un. Per tant, hem analitzat el contingut d'AGMI i el contingut d'AGPI (Figura 51). Els resultats obtinguts mostren que no existeix una correlació entre el contingut en AGMI i AGPI i l'edat.



**Figura 51. Contingut d'àcids grassos monoinsaturats (AGMI) i contingut d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat.** Els resultats mostren que no existeix una correlació entre el contingut d'AGMI i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 58), i tampoc entre el contingut d'AGPI i l'edat, analitzat per al model additiu generalitzat ( $p > 0,5$ ,  $R^2=6,97^{-13}$ , desviació explicada=3,37<sup>-10</sup> % i  $p > 0,05$ ,  $R^2= 0,049$ , desviació explicada= 6,88 %, respectivament).

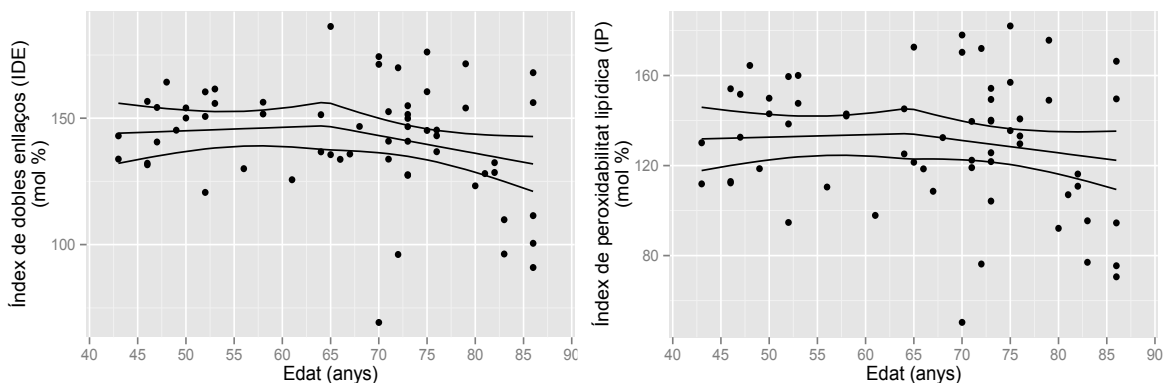
Dins dels AGPI diferenciem dos tipus de poliinsaturació, els de la sèrie n-3 i els de la sèrie n-6. Els resultats obtinguts no mostren una correlació entre el contingut d'AGPI n-3 i l'edat (Figura 52). No obstant, si que s'observa una correlació negativa significativa entre els nivells d'AGPI n-6 i l'edat (Figura 52).



**Figura 52.** Contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) i contingut d'àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. Els resultats mostren que no existeix una correlació significativa entre el contingut d'AGPI n-3 i l'edat, però sí que existeix una correlació negativa significativa entre els nivells d'AGPI n-6 i l'edat (rang d'edat 40-90 anys;  $n=58$ ), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p > 0,05$ ,  $R^2 = 1,07^{-11}$ , desviació explicada =  $2,4^{-9}$  % i  $p < 0,01$ ,  $R^2 = 0,116$ , desviació explicada = 13,8 %, respectivament).

### 9.3.1.1.3. Grau d'insaturació dels lípids d'escorça cerebral

Els dos paràmetres calculats que ens indiquen el grau d'insaturació dels lípids de membrana i la susceptibilitat d'aquestes a ser oxidades són l'IDE i l'IP. En la Figura 53 s'observa l'existència d'una correlació negativa significativa entre els nivells de l'IDE i l'edat. Per contra, no existeix una correlació entre l'IP i l'edat.



**Figura 53.** Índex de dobles enllaços (IDE) i índex de peroxidabilitat (IP) de l'escorça frontal humana en funció de l'edat. Els resultats mostren que existeix una correlació negativa significativa entre l'IDE i l'edat, però no existeix una correlació entre l'IP i l'edat (rang d'edat 40-90 anys;  $n=58$ ), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p < 0,05$ ,  $R^2 = 0,063$ , desviació explicada = 8,39 % i  $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,030$ , desviació explicada = 4,6 %).

### 9.3.1.1.4. Estimació estadística del *break point*

Amb l'objectiu d'intentar establir l'edat en la que s'observa una inflexió en els índexs estudiats en l'apartat anterior s'ha realitzat una estimació estadística –explicada en l'apartat de mètodes estadístics (veure apartat 8.9.3)-. Les dades obtingudes d'aquests anàlisis estadístics (representades a l'annex 2) mostren que cap dels índexs estudiats tenen un *break point* amb una  $R^2 < 0,1$ .

9.3.1.1.5. Estimació de les activitats desaturades i elongases

A partir de l'anàlisi del perfil composicional en àcids grassos també s'han estimat les activitats desaturades (Taula 22), elongases (Taula 23) i de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (Taula 24) en escorces frontals d'individus adults sans en edats compreses entre 40 i 89 anys. Els resultats obtinguts mostren diferències significatives durant l'envelliment en la major part de les activitats estimades. El major nombre de canvis significatius es produeixen en les edats més avançades. Un resultat a destacar és l'augment significatiu de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal en el pas dels anys.

Taula 22. Estimació de l'activitat desaturada de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  SEM dels individus corresponents a cada dècada.

		Dècada 40 anys n=6	Dècada 50 anys n=10	Dècada 60 anys n=9	Dècada 70 anys n=22	Dècada 80 anys n=11
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a**,b**</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a***,b***,c***</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a**,b**,c***</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,30 $\pm$ 0,16	1,26 $\pm$ 0,09	1,45 $\pm$ 0,16	1,21 $\pm$ 0,05	1,26 $\pm$ 0,10
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	7,30 $\pm$ 0,89	6,77 $\pm$ 0,57	5,79 $\pm$ 0,90	5,90 $\pm$ 0,93	5,62 $\pm$ 0,58
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	0,82 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,03 <sup>a*,b*</sup>	0,82 $\pm$ 0,07 <sup>d*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,54 $\pm$ 0,56	1,00 $\pm$ 0,07	1,25 $\pm$ 0,22	1,47 $\pm$ 0,19	1,77 $\pm$ 0,31

<sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

Taula 23. Estimació de l'activitat elongasa de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  SEM dels individus corresponents a cada dècada.

		Dècada 40 anys n=6	Dècada 50 anys n=10	Dècada 60 anys n=9	Dècada 70 anys n=22	Dècada 80 anys n=11
Elovl 3 (n-9)		0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>c**</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>c*</sup>
Elovl 6		1,01 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,02 <sup>a***,b***,c***</sup>	0,93 $\pm$ 0,03 <sup>b**,d**</sup>
Elovl 1-3-7		0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7		0,96 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,04 <sup>c**</sup>	0,89 $\pm$ 0,07 <sup>c*</sup>
Elovl 1-3-7		1,85 $\pm$ 0,15	1,98 $\pm$ 0,20	1,72 $\pm$ 0,11	1,55 $\pm$ 0,08 <sup>b*</sup>	1,86 $\pm$ 0,25
Elovl 5 (n-6)		0,42 $\pm$ 0,13	0,31 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,03
Elovl 2-5 (n-6)		0,62 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,07	0,65 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,05
Elovl 2-5 (n-3)		2,01 $\pm$ 0,18	2,46 $\pm$ 0,29	1,91 $\pm$ 0,14	2,03 $\pm$ 0,17	1,67 $\pm$ 0,23 <sup>b**</sup>
Elovl 2 (n-3)		0,61 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,20 <sup>a*,b**</sup>	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>a***,b***,c***</sup>	0,32 $\pm$ 0,03 <sup>a**,b**,c***</sup>

<sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

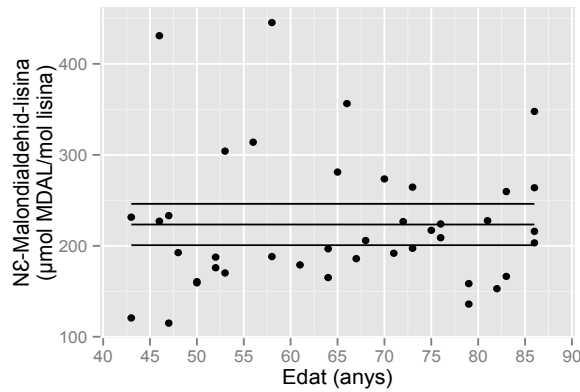
Taula 24. Estimació de l'activitat de la  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  SEM dels individus corresponents a cada dècada.

		Dècada 40 anys n=6	Dècada 50 anys n=10	Dècada 60 anys n=9	Dècada 70 anys n=22	Dècada 80 anys n=11
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	51,09 $\pm$ 9,23	45,54 $\pm$ 6,30	33,35 $\pm$ 5,52	79,55 $\pm$ 9,58 <sup>a*,b**,c**</sup>	72,25 $\pm$ 12,79 <sup>c**</sup>

<sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

### 9.3.1.2. Dany proteic derivat de lipoxidació

Paral·lelament a l'anàlisi del perfil en àcids grassos s'ha realitzat l'anàlisi del dany proteic derivat de lipoxidació mitjançant la detecció i quantificació del marcador N<sup>ε</sup>-malondialdehid-lisina (MDAL) (Figura 54). Les dades obtingudes no mostren una correlació entre els nivells de MDAL i l'edat.



**Figura 54.** Relació del marcador N<sup>ε</sup>-malondialdehid-lisina (MDAL) de l'escorça frontal humana amb l'edat. Els valors representats mostren que no existeix una correlació entre els nivells de MDAL i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 41), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p > 0,5$ ,  $R^2 = -0,025$ , desviació explicada=  $-0,009\%$ ).

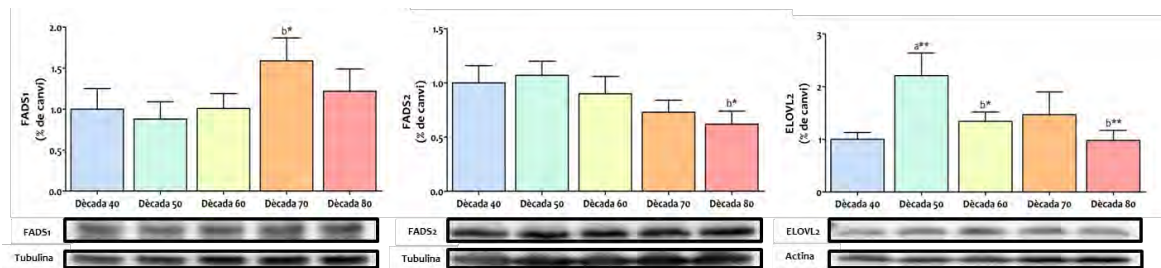
### 9.3.1.3. Immunodetecció per Western Blot

En base als resultats obtinguts en l'anàlisi del perfil composicional dels àcid grassos, s'han analitzat els possibles canvis durant l'envelliment de proteïnes implicades en la biosíntesis dels àcids grassos, integrades dins dels sistemes desaturases-elongases i la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, així com la detecció de mediadors lipídics implicats en l'estat anti i proinflamatori en mostres d'escorça frontal humana d'individus sans amb edats compreses entre 40 i 89 anys. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

#### 9.3.1.3.1. Desaturases i elongases

La Figura 55 mostra l'expressió dels enzims desaturases i elongases que s'han analitzat mitjançant la detecció de les proteïnes FADS1, FADS2 i ELOVL2. Els resultats obtinguts mostren que l'expressió de FADS1 augmenta significativament en la dècada dels 70 respecte la dècada dels 50. D'altra banda, l'expressió de la proteïna FADS2 es veu disminuïda significativament amb l'edat, particularment en les dècades d'edats avançades. I pel que fa a l'expressió de l'elongasa ELOVL2 també s'observa una disminució significativa amb l'edat.

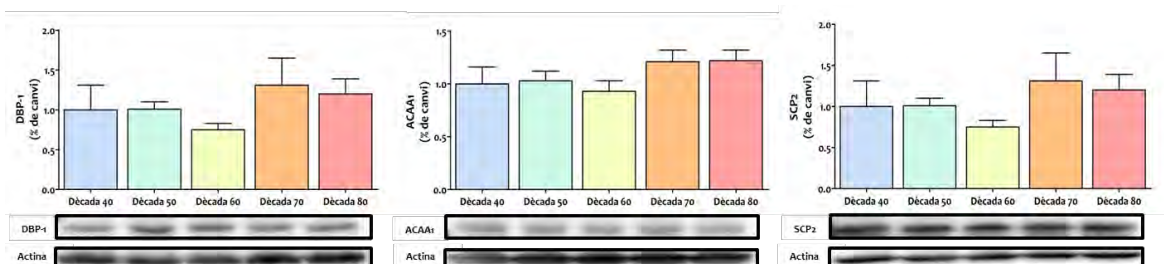




**Figura 55. Expressió de les proteïnes desaturases i elongases implicades en la dessaturació i allargament dels àcids grassos de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Les proteïnes detectades són FADS1, FADS2 i ELOVL2. Els valors representats en els gràfics ens indica el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors de FADS1 i FADS2 amb l'expressió de tubulina, i l'expressió d'ELOVL2 amb l'expressió d'actina. Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex 3. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Sota de les gràfiques es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

### 9.3.1.3.2. La $\beta$ -oxidació peroxisomal, via de síntesis dels àcids grassos poliinsaturats

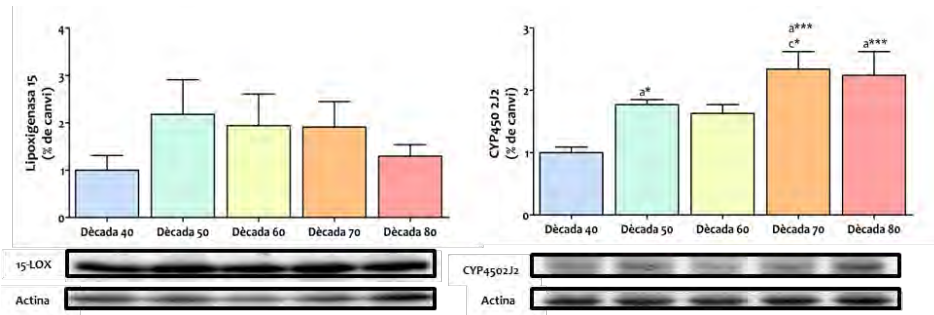
La Figura 56 mostra l'expressió de les proteïnes implicades en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal que s'han analitzat mitjançant la detecció de les proteïnes DBP-1, ACAA1 i SCP2. En els resultats podem observar que no es produeixen canvis en l'expressió d'aquestes proteïnes, sinó que l'expressió és mantinguda al llarg de la vida adulta.



**Figura 56. Expressió de les proteïnes implicades en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, involucrades en el metabolisme dels àcids grassos poliinsaturats i la seva síntesis, de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Les proteïnes detectades són la DBP-1, ACAA1 i SCP2. Els valors representats en els gràfics ens indica el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb l'expressió d'actina. Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex X. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Sota de les gràfiques es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

### 9.3.1.3.3. Proteïnes de caràcter antiinflamatori

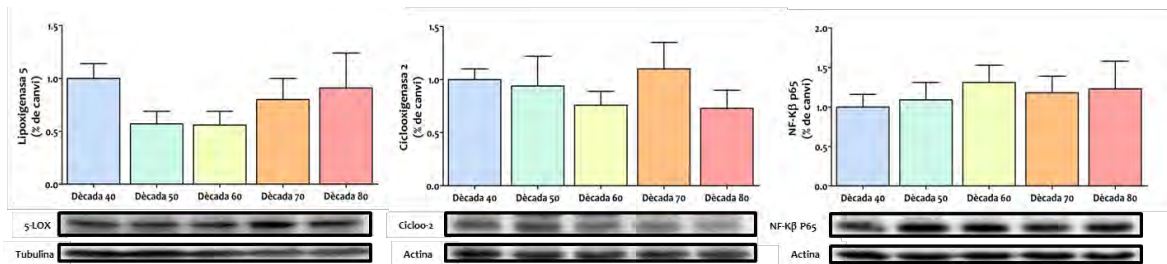
L'expressió de proteïnes de caràcter antiinflamatori s'ha analitzat mitjançant la detecció de la proteïna lipoxigenasa 15 (15-LOX) i el citocrom p450 2J2 (CYP450). Els resultats obtinguts mostren que l'expressió de 15-LOX es mantinguda al pas dels anys (Figura 57). No obstant, sí que s'observen canvis en l'expressió de la proteïna CYP450 amb l'edat. Els resultats mostren que existeix un augment significatiu amb l'edat, especialment en les edats més avançades (Figura 57).



**Figura 57. Expressió de proteïnes de caràcter antiinflamatori de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Les proteïnes detectades són la lipoxigenasa 15 i el citocrom p450 2J2. Els valors representats en els gràfics ens indica el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors de la lipoxigenasa 15 i el citocrom p450 2J2 amb l'expressió d'actina. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex 3. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Sota de les gràfiques es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

### 9.3.1.3.4. Proteïnes de caràcter proinflamatori

L'expressió de proteïnes de caràcter proinflamatori s'ha analitzat mitjançant la detecció de les proteïnes lipoxigenasa 5 (5-LOX) i ciclooxygenasa 2 (COX-2) participes del metabolisme de l'AA, i la proteïna NF-K $\beta$  p65. Els resultats obtinguts mostren que l'expressió de 5-LOX, COX-2 i NF-K $\beta$  p65 es mantinguda al llarg de la vida adulta (Figura 58).



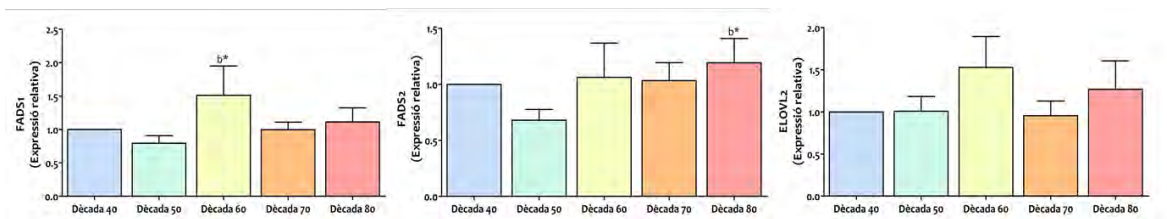
**Figura 58. Expressió de proteïnes de caràcter proinflamatori participes del metabolisme de l'àcid araquidònic de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Les proteïnes detectades són la lipoxigenasa 5, la ciclooxygenasa 2 i NF-K $\beta$  p65. Els valors representats en els gràfics ens indica el % de canvi en l'expressió de proteïnes en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors de lipoxigenasa 5 amb l'expressió de tubulina i la ciclooxygenasa i NF-K $\beta$  amb l'expressió d'actina. Les dades expressades són la mitjana la mitjana  $\pm$  SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex 3. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Sota de les gràfiques es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

### 9.3.1.4. Expressió del RNA missatger

Paral·lament a la detecció de les proteïnes implicades en la biosíntesis dels àcids grassos, integrades dins dels sistemes desaturases-elongases i la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, així com la detecció de mediadors lipídics implicats en l'estat anti i proinflamatori mitjançant la immunodetecció, s'han analitzat els nivells del RNA missatger d'aquestes mateixes proteïnes en mostres d'escorça frontal humana d'individus sans amb edats compreses entre 40 i 89 anys. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

### 9.3.1.4.1. Desaturases i elongases

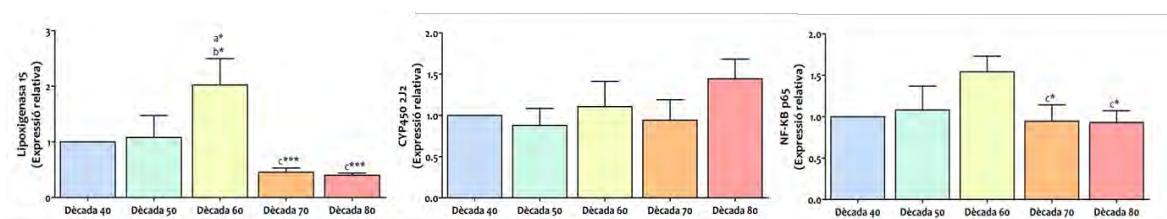
En la Figura 59 es mostren els resultats obtinguts de l'expressió relativa dels gens FADS1, FADS2 i ELOVL2. En els resultats podem observar que l'expressió relativa del gen FADS1 mostra un augment significatiu en la dècada dels 60 anys que no és mantingut en les dècades d'edat avançada. En canvi, en l'expressió relativa del gen FADS2 s'observa un augment significatiu amb l'edat, particularment en la dècada d'edat avançada. I finalment, les dades obtingudes en l'anàlisi del gen ELOVL2 mostren uns nivells mantinguts al llarg de temps.



**Figura 59. Expressió relativa del mRNA dels gens FADS1, FADS2 i ELOVL2 de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Els valors representats en els gràfics ens indiquen l'expressió relativa del mRNA dels gens en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb el gen de referència ACTB. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 individus de cada dècada. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.3.1.4.2. Estat inflamatori

En la Figura 60 es mostren els resultats obtinguts de l'expressió relativa dels gens relacionats amb una resposta antiinflamatòria (Lipoxigenasa 15 i Citocrom p450 2J2) i el gen relacionat amb una resposta proinflamatòria (NF-K $\beta$ ). En els resultats podem observar que l'expressió relativa del gen Lipoxigenasa 15 es troba augmentada significativament en la dècada dels 60 anys respecte la resta de dècades. Contràriament, els resultats que s'observen de l'expressió relativa dels gen Citocrom p450 2J2 mostren com els seus nivells són mantinguts al llarg de la vida adulta. D'altra banda, pel que fa al gen relacionat amb proinflamació els resultats mostren un disminució significativa amb el pas dels anys, especialment en les dècades d'edats avançades.



**Figura 60. Expressió relativa del mRNA dels gens Lipoxigenasa 15, Citocrom p450 2J2 i NF- K $\beta$  de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Els valors representats en els gràfics ens indiquen l'expressió relativa del mRNA dels gens en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb el gen de referència ACTB. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 individus de cada dècada. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

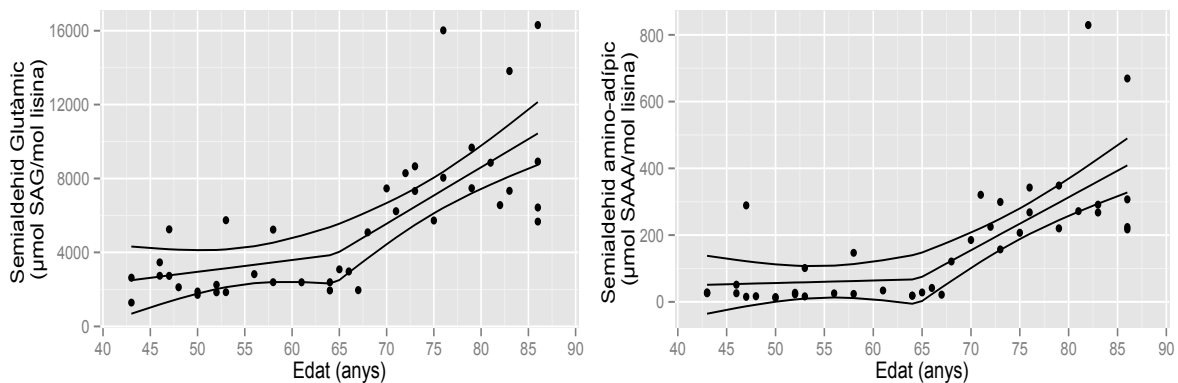
### 9.3.2. Estudi del dany oxidatiu

#### 9.3.2.1. Dany oxidatiu

L'anàlisi del dany oxidatiu en l'escorça frontal del SNC humà adult, mostra canvis significatius amb l'edat. Les dades s'han analitzat mitjançant una anàlisi multivariant no lineal utilitzant els models GAM, per tal de predir les modificacions en el dany oxidatiu en escorça frontal d'humà adult en funció de la variable edat. En aquest cas, les variables del sexe i del temps *post-mortem* no s'han tingut en compte ja que no són estadísticament significatives –tal i com és demostra en l'annex 2-. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en funció de l'origen del dany oxidatiu.

##### 9.3.2.1.1. Dany oxidatiu proteic

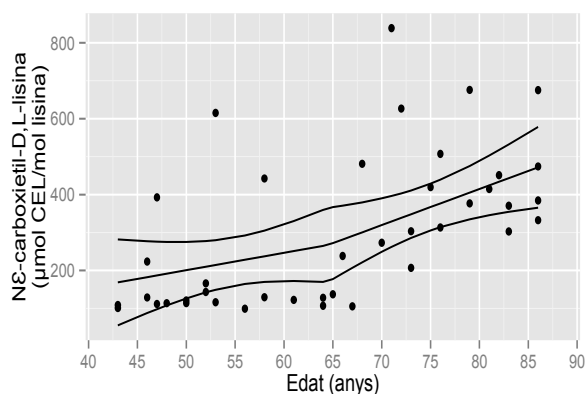
El dany oxidatiu produït directament a les proteïnes s'ha mesurat en base als marcadors semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA), marcadors d'oxidació directa dels aminoàcids prolina, el primer; i arginina i lisina, el segon. Els resultats obtinguts en tots dos marcadors mostren que existeix una correlació significativa entre els nivells de SAG i SAAA i l'edat, i és en la dècada dels 60 anys quan es produeix un canvi d'inflexió amb un augment significatiu de la taxa d'acumulació (Figura 61).



**Figura 61. Relació dels marcadors semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA) de l'escorça frontal humana amb l'edat.** Els valors representats en les gràfiques mostren que existeix una correlació significativa entre els nivells de SAG i l'edat, així com entre els nivells de SAAA i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 41), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p < 0,00001$ ,  $R^2=0,556$ , desviació explicada=57,7 % i  $p < 0,00001$ ,  $R^2=0,549$ , desviació explicada=57 %, respectivament).

##### 9.3.2.1.2. Dany proteic derivat de glicoxidació

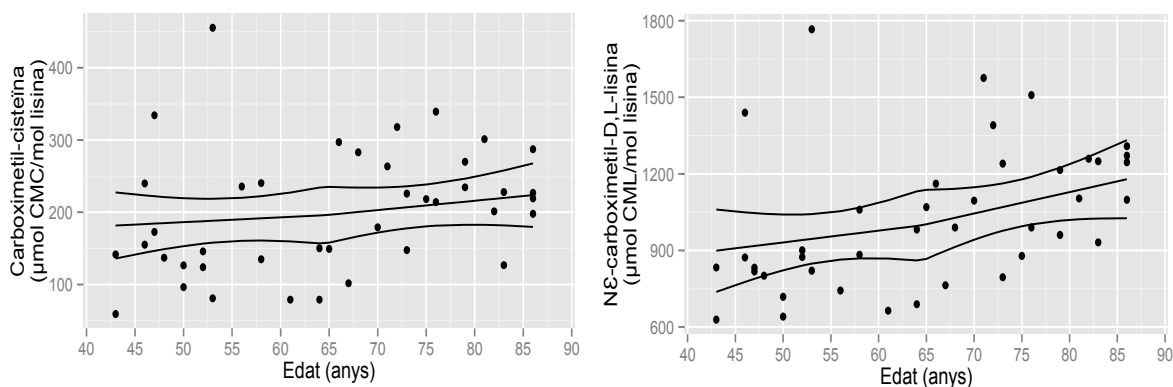
El dany proteic derivat de glicoxidació s'ha quantificat mitjançant el marcador N<sup>ε</sup>-Carboxietil-lisina (CEL). Els resultats d'aquest marcador de dany glicoxidatiu mostren una correlació significativa entre els nivells de CEL i l'edat, i és en la dècada dels 60 anys quan es produeix una inflexió amb un augment significatiu de la taxa d'acumulació (Figura 62).



**Figura 62. Relació del marcador N<sup>ε</sup>-Carboxietil-lisina (CEL) de l'escorça frontal humana amb l'edat.** Els valors representats mostren que existeix una correlació significativa entre els nivells de CEL i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 41), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p < 0,00028$ ,  $R^2 = 0,305$ , desviació explicada = 33,4 %).

### 9.3.2.1.3. Dany proteic derivat de glico i lipoxidació

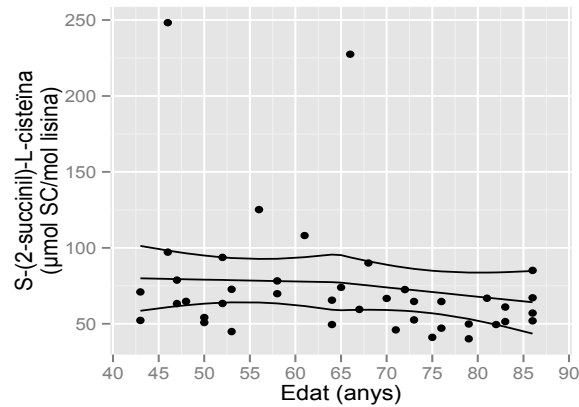
El dany proteic mixte derivat de glicoxidació i de lipoxidació s'ha quantificat mesurant els marcadors S-carboximetil-cisteïna (CMC) i N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML). Les dades obtingudes del marcador de la CMC no mostren canvis significatius en funció de l'edat. Contràriament, les dades obtingudes del marcador de la CML sí que mostren una correlació significativa amb l'edat i és en la dècada dels 60 anys quan es produeix una inflexió amb un augment significatiu en la taxa d'acumulació (Figura 63).



**Figura 63. Relació dels marcadors S-carboximetil-cisteïna (CMC) i N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML) de l'escorça frontal humana amb l'edat.** Els valors representats en les gràfiques mostren que no existeix una correlació entre els nivells de CMC i l'edat, però sí que existeix una correlació significativa entre els nivells de CML i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 41), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,053$ , desviació explicada = 7,51 % i  $p < 0,012$ ,  $R^2 = 0,156$ , desviació explicada = 18,7 %, respectivament).

### 9.3.2.1.4. Dany proteic derivat d'estrès mitocondrial

La Figura 64 mostra els resultats del dany proteic que deriva de la reacció del fumarat amb la cisteïna que s'ha quantificat mesurant el marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC), el qual és el producte resultant dels dos compostos mencionats. Els resultats obtinguts no mostren una correlació entre els nivells de 2-SC i l'edat.



**Figura 64. Relació del marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC) de l'escorça frontal humana amb l'edat.** Els valors representats en les gràfiques mostren que no existeix una correlació entre els nivells de 2-SC i l'edat (rang d'edat 40-90 anys; n= 41), analitzat pel model additiu generalitzat ( $p > 0,05$ ,  $R^2=0,039$ , desviació explicada=5,88 %).

#### 9.3.2.1.5. Estimació estadística del *break point*

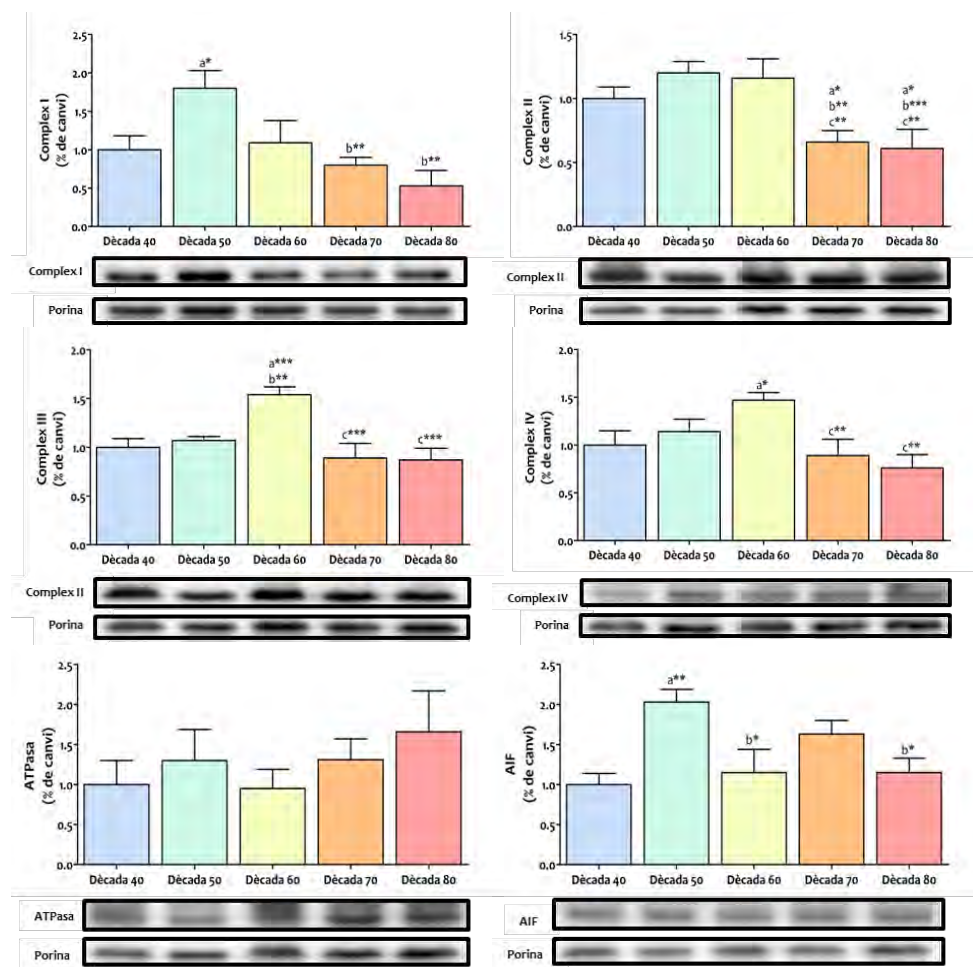
En termes de dany oxidatiu també s'ha intentat, mitjançant una estimació estadística –explicada en l'apartat de mètodes estadístics (veure apartat 8.9.3)-, establir el coneixement de l'edat en la que s'observa un *break point*, i per tant, una inflexió amb un augment significatiu en la taxa d'acumulació en els marcadors de dany oxidatiu estudiats. Les dades obtingudes d'aquestes anàlisis estadístiques (mostrades a l'annex 2) suggereixen que el punt d'inflexió es troba al voltant de 60 anys. (SAG:  $62,64 \pm 6,79$  anys d'edat,  $R^2(\text{adj})=0,5459$ ; SAAA:  $63,77 \pm 5,64$  anys d'edat,  $R^2(\text{adj})=0,538$ ; CEL:  $63,60 \pm 20,44$  anys d'edat,  $R^2(\text{adj})=0,2868$ ).

#### 9.3.2.2. Immunodetecció per Western Blot

En base als resultats obtinguts en les anàlisis anteriors i la possible influència moduladora de la mitocondria sobre l'envelliment, s'han analitzat proteïnes implicades en la cadena de transport d'electrons i biogènesis mitocondrial, així com la detecció de factors de resistència a estrès oxidatiu i supervivència cel·lular relacionats. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

##### 9.3.2.2.1. Complexes mitocondrials i AIF

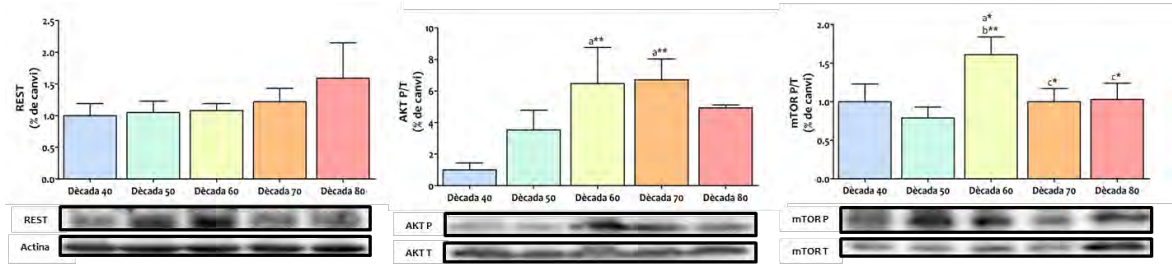
Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels diferents complexos que integren la cadena de transport electrònic mostren una disminució significativa en la concentració de tots els complexos (del CI al CIV) amb l'edat, i és en la dècada dels 60 on aquesta trajectòria a la disminució es fa evident (Figura 65). En referència al contingut mitocondrial de la flavoproteïna AIF, implicada en la biogènesis mitocondrial, observem que va amb la mateixa tendència que el complex I, i s'observa una disminució significativa al pas dels anys. D'altra banda, els resultats obtinguts en els nivells d'ATP sintasa no mostren cap canvi significatiu amb l'edat.



**Figura 65. Expressió dels diferents complexos de la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa (I, II, III, IV, ATPasa), i AIF presents en l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Els valors representats en el gràfic ens indiquen el % de canvi en l'expressió de les diferents proteïnes analitzades en les dècades dels 50, 60, 70, 80 respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb l'expressió de la respectiva porina. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex 3. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Sota de la gràfica es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

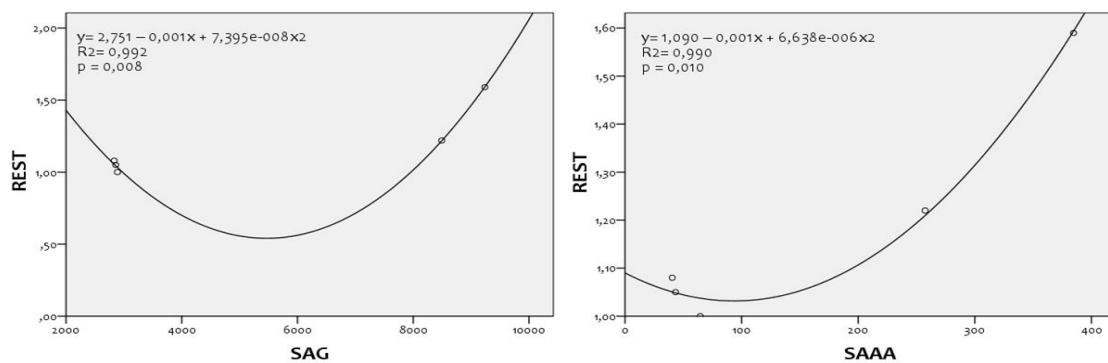
### 9.3.3.2.2. Factor de resistència a l'estrès oxidatiu i supervivència cel·lular

El factor de transcripció REST s'ha mesurat com a regulador de la resposta neuroprotectora a estrès, la serina/treonina quinasa (Akt) com a part de la via de transduccions de senyals d'Akt que promou la supervivència i el creixement en resposta a senyals extracel·lulars, i mTOR com a mestre regulador que detecta l'estat de nutrient i l'energia cel·lular. En la Figura 66 es mostren els resultats obtinguts de l'expressió d'aquestes proteïnes. Els resultats mostren una expressió de REST sostinguda al llarg de la vida adulta. L'expressió de la proteïna Akt i mTOR disminueixen tots dos significativament amb l'edat, especialment en edats avançades.



**Figura 66. Expressió del factor de resistència a l'estrès oxidatiu i supervivència cel·lular de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Les proteïnes detectades són REST, Akt i mTOR P/T. Els valors representats en els gràfics ens indica el % de canvi en l'expressió de les proteïnes en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors de REST amb l'expressió d'actina. En el cas de les proteïnes Akt i mTOR la gràfica indica el % de canvi en l'expressió, calculant la relació de la densitometria d'Akt fosforilat/densitometria d'Akt total i la densitometria de mTOR fosforilat/densitometria de mTOR total. Les dades expressades són la mitjana ± SEM de 5 individus de cada dècada. Veure les imatges dels Westerns amb les mostres individuals a l'annex 3. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 70 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 80. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001. Sota de les gràfiques es mostra les imatges de Western blot realitzades a partir del pool de les mostres corresponents a cada dècada.

Atès que s'ha descrit que REST presenta una expressió induïda per l'estat oxidatiu, s'ha procedit a veure si existeix una relació entre els marcadors d'oxidació proteica –SAG i SAAA- i la seva expressió. A la figura inferior (Figura 67) es pot observar una correlació entre el contingut del factor REST i els marcadors d'oxidació proteica -SAG i SAAA-.



**Figura 67. Relació entre l'estat basal dels marcadors específics de dany oxidatiu a proteïnes –SAG i SAAA- i l'expressió del factor de resistència a l'estrès oxidatiu –REST-.** L'ajust curvilini que es mostra en les figures s'han obtingut dels valors mitjans per cada edat de les dues variables.

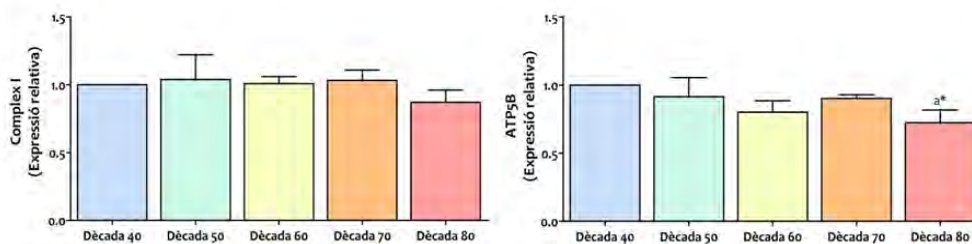
### 9.3.2.3. Expressió del RNA missatger

Per tal de determinar si els canvis en les proteïnes estudiades eren conseqüència d'una alteració en la traducció de la proteïna, es va fer una anàlisi per PCR a temps real de gens relacionats amb la cadena de transport d'electrons mitocondrial i amb els gens de resposta a estrès i de supervivència cel·lular.

#### 9.3.2.3.1. Complexes mitocondrials

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'expressió relativa del gen Complex I mostren uns nivells sostinguts al pas de l'edat. D'altra banda, els resultats de l'expressió relativa del gen ATP5B mostra una disminució significativament amb l'edat, particularment en la dècada d'edat més avançada (Figura 68).

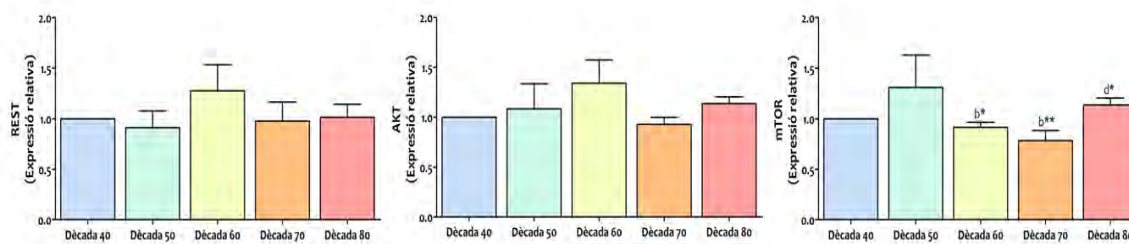




**Figura 68. Expressió relativa del mRNA dels gens NDUFA9 i ATP5B de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Els valors representats en els gràfics ens indiquen l'expressió relativa del mRNA dels gens en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb el gen de referència ACTB. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 individus de cada dècada. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.3.2.3.2. Factor de resistència a l'estrès oxidatiu i supervivència cel·lular

Els nivells del RNA missatger del factor de transcripció REST, així com els nivells d'expressió relativa de la proteïna Akt mostren que al llarg de la vida els seus nivells es mantenen sostinguts. D'altra banda, però, l'expressió relativa de mTOR disminueix significativament amb l'edat i en la dècada dels 80 anys s'observa un augment significatiu respecte la dècada dels 70 anys (Figura 69).



**Figura 69. Expressió relativa del mRNA dels gens REST, AKT i mTOR de l'escorça frontal humana en 5 dècades diferents.** Els valors representats en els gràfics ens indiquen l'expressió relativa del mRNA dels gens en les dècades dels 50, 60, 70 i 80, respecte l'expressió en la dècada dels 40 anys d'edat, normalitzant els valors amb el gen de referència ACTB. Les dades expressades són la mitjana  $\pm$  SEM de 4 individus de cada dècada. <sup>a</sup> respecte la dècada dels 40, <sup>b</sup> respecte la dècada dels 50, <sup>c</sup> respecte la dècada dels 60 i <sup>d</sup> respecte la dècada dels 70. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.3.2.4. Immunohistoquímica

Un cop fet l'anàlisi mitjançant la tècnica del Western blot i els nivells de mRNA de proteïnes s'ha volgut comprovar la presència i abundància, en les diferents regions del SNC humà adult, de certes proteïnes implicades en la producció de radicals lliures, resistència i supervivència a l'estrès, per tal de valorar amb una altra tècnica experimental si s'observen variacions durant les diferents dècades estudiades. A continuació es desglossen els resultats obtinguts.

#### 9.3.2.4.1. Localització agents inflamatoris i de resistència a estrès

La Figura 70 recull les imatges d'immunohistoquímica del Complex I, REST, Akt i mTOR en mostres d'escorça frontal humana. Les imatges obtingudes del Complex I ens mostren com el marcatge (marró) disminueix amb l'edat. REST, mostra un marcatge nuclear que no és veu afectat pel pas dels anys. I finalment, Akt i mTOR són localitzats a nivell citoplasmàtic i mostren una disminució de la seva reactivitat amb l'envelliment, especialment a partir de la dècada dels 60 anys.

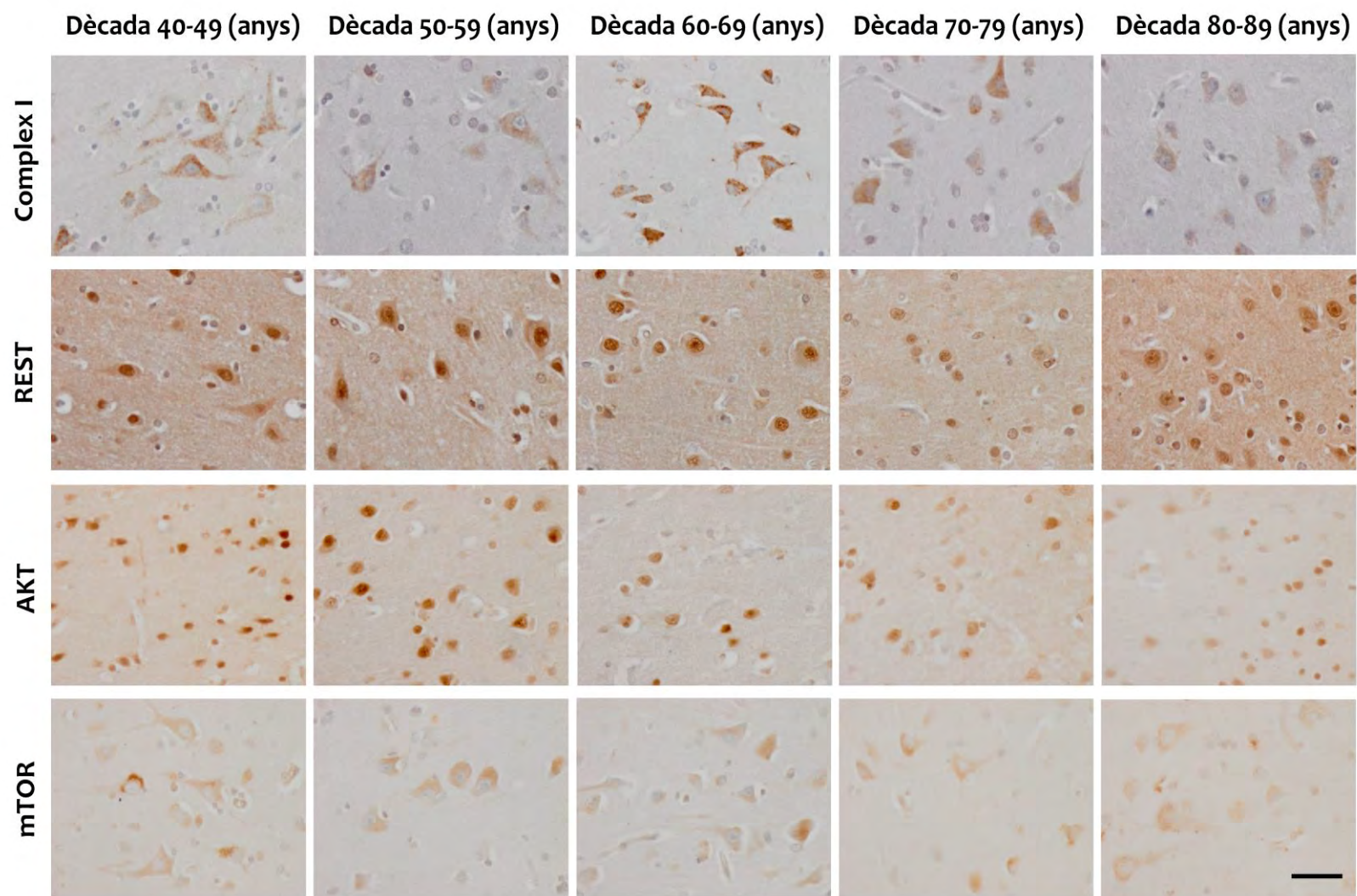


Figura 70. Expressió de proteïnes implicades en la producció de radicals lliures, inflamació, resistència i supervivència a l'estrès en teixit d'escorça frontal humana en 5 dècades diferents. La immunohistoquímica de les proteïnes subunitat NDUFS3 del Complex I de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, REST, AKT i mTOR (la positivitat s'aprecia en color marró) es va realitzar en talls histològics parafinats que va ser contratenyits lleugerament amb hematoxilina per distingir els nuclis (blau). Bar = 25 µm

## 9.4. Estudi de l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental

Per tal d'abordar els objectius plantejats en aquest estudi s'ha valorat l'efecte de l'envelliment i de la dieta RMet a nivell fisiològic en un model experimental de rata. Així, s'ha analitzat la composició en àcids grassos i s'han detectat i quantificat diferents marcadors de dany oxidatiu en 13 regions del SNC de rata, i també del fetge que s'ha utilitzat com a òrgan control (Annex 5).

### 9.4.1. Animals

#### 9.4.1.1. Pes i paràmetres bioquímics en plasma

La Taula 25 recull els valors obtinguts en la mesura del pes i dels paràmetres bioquímics mesurats en plasma de rates adultes, velles i velles RMet. D'una banda, s'observa que el pes corporal del grup de rates velles RMet és significativament inferior respecte les rates adultes i les rates velles control. D'altra banda, en referència als paràmetres bioquímics els resultats ens mostren que les rates velles RMet tenen uns nivells de triglicèrids en plasma significativament inferiors als de les rates adultes. Els nivells de colesterol en plasma mostren que les rates velles control augmenten significativament respecte les rates adultes. No obstant això, no s'observen canvis significatius en els nivells de glucosa entre els diferents grups estudiats. Tanmateix, l'anàlisi del nivell proteic de les rates, mostra que tant els nivells de proteïna total com els d'albumina es troben significativament disminuïts en les rates velles RMet respecte les rates adultes i les velles control. I en el cas dels nivells de proteïna total les rates velles també mostren valors significativament inferiors a les rates adultes.

Així mateix, a nivell hormonal s'ha mesurat la leptina i l'adiponectina i els resultats mostren que les rates velles RMet tenen uns valors de leptina significativament inferiors a les rates adultes i les rates velles. Tanmateix, les rates velles RMet tenen uns nivells de l'hormona adiponectina significativament superiors al de les rates adultes.

**Taula 25. Pes corporal, anàlisi bioquímica dels nivells de proteïna total, albumina, triglicèrids, colesterol, glucosa i les hormones leptina i adiponectina en plasma de rates adultes control, velles control i velles RMet.**

Paràmetres	Adultes	Velles	Velles RMet
Pes corporal (grams)	554,05 ± 17,36	568,57 ± 38,92	475,04 ± 21,30 <sup>a</sup> ; b*
<b>Paràmetres de plasma</b>			
Triglicèrids (mg/dL)	157,84 ± 18,20	123,36 ± 21,97	76,22 ± 7,83 <sup>a**</sup>
Colesterol (mg/dL)	132,40 ± 8,85	182,78 ± 15,07 <sup>a**</sup>	153,72 ± 10,42
Glucosa (mg/dL)	134,02 ± 15,63	108,29 ± 6,34	110,13 ± 16,14
Proteïna (g/dL)	5,00 ± 0,05	4,54 ± 0,20 <sup>a*</sup>	4,09 ± 0,19 <sup>a***; b*</sup>
Albumina (g/dL)	3,15 ± 0,07	2,92 ± 0,08	2,54 ± 0,11 <sup>a***; b**</sup>
<b>Hormones</b>			
Leptina (ng/mL)	21,57 ± 1,08	21,63 ± 1,95	11,44 ± 2,79 <sup>a***; b**</sup>
Adiponectina (ng/mL)	69,49 ± 2,71	69,36 ± 4,72	82,26 ± 6,29 <sup>a*</sup>

Els valors representats en la taula ens indiquen el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

## 9.4.2. Anàlisi composicionals dels àcids grassos

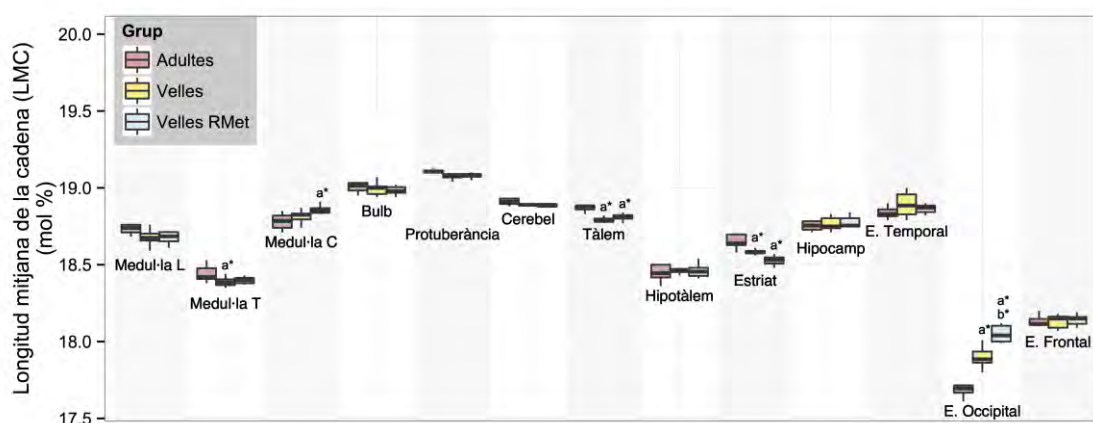
L'anàlisi de la composició en àcids grassos en les diferents regions del SNC de rata, per tal de determinar si existeixen canvis durant l'envelliment i l'efecte de la RMet aplicada en l'envelliment en les diferents regions del cervell de rata, mostra diferències entre grups i interregionals. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en la composició percentual dels àcids grassos de les membranes lipídiques i els índex que en deriven.

### 9.4.2.1. Perfil composicional en àcids grassos de les membranes lipídiques

En l'Annex 4 es mostren les dades obtingudes de la composició percentual dels diferents àcids grassos en les diferents regions estudiades del SNC de rata adulta, vella i vella amb RMet. Els resultats mostren majoritàriament diferències significatives entre grups en les diferents regions. No obstant, les diferències varien en funció de cada regió.

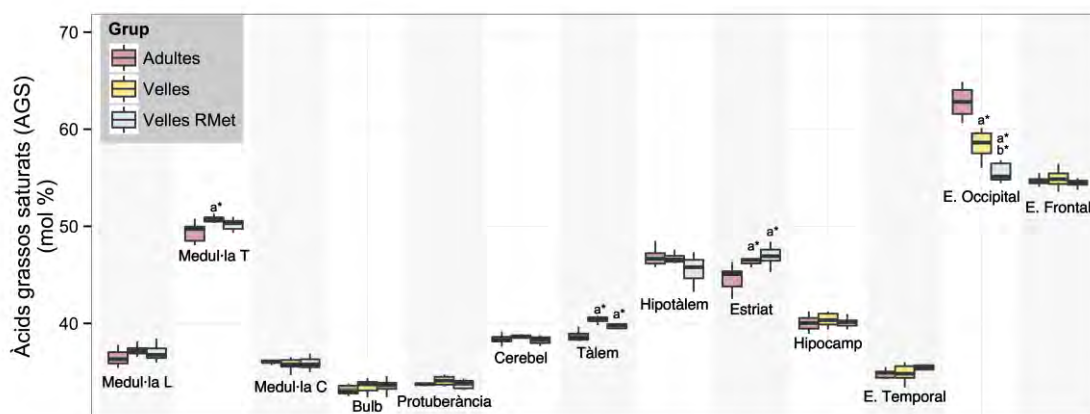
### 9.4.1.2. Índex derivats de la composició en àcids grassos

A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos s'han calculat una sèrie d'índexs que ens indiquen els canvis composicionals de forma global. En la Figura 71 es mostren els valors de la LMC dels àcids grassos analitzats en cada regió. Els resultats mostren diferències significatives entre grups i entre regions. L'anàlisi estratificat de cada regió –descriu en l'apartat 8.9.4- mostra una disminució significativa del grup velles respecte el grup d'adultes en les regions de medul·la toràctica, tàlem i estriat. A més, també s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions del tàlem i l'estriat. Contràriament, s'observa un augment significatiu del grup de velles RMet respecte el grup d'adultes en la medul·la cervical i del grup de velles i velles RMet respecte el grup adultes en l'escorça occipital. En aquesta última regió els nivells també són significativament augmentats en el grup de velles RMet respecte el grup de velles.

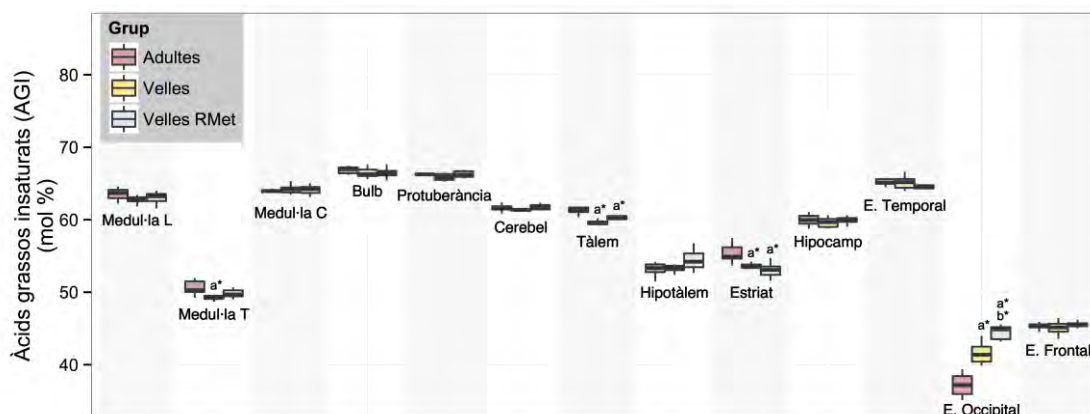


**Figura 71. Longitud mitjana de la cadena (LMC) dels àcids grassos en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 72 i en la Figura 73 es mostren els valors dels índex d'AGS i d'AGI, respectivament. En tots dos índexs s'observen diferències significatives entre grups i entre regions. L'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGS mostra un augment significatiu del grup velles respecte el grup d'adultes en les regions de medul·la toràcica, tàlem i estriat. A més, s'observa un augment significatiu del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions de tàlem i estriat. En la regió occipital s'observa una disminució significativa del grup velles i velles RMet respecte les adultes, i les velles RMet respecte les velles. Contràriament a aquest resultats, en l'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGI s'observa una disminució significativa del grup de velles respecte el grup d'adultes en les regions de medul·la toràcica, tàlem i estriat. A més, s'observa una disminució significativa del grup de velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions de tàlem i estriat. En sentit contrari, en la regió occipital s'observa un augment significatiu del grup de velles i velles RMet respecte les adultes, i les velles RMet respecte les velles.

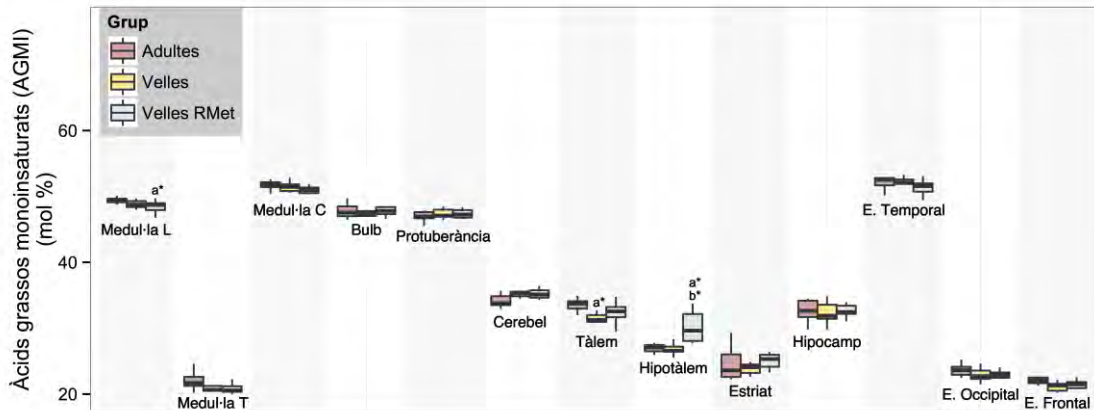


**Figura 72. Contingut en àcids grassos saturats (AGS) en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

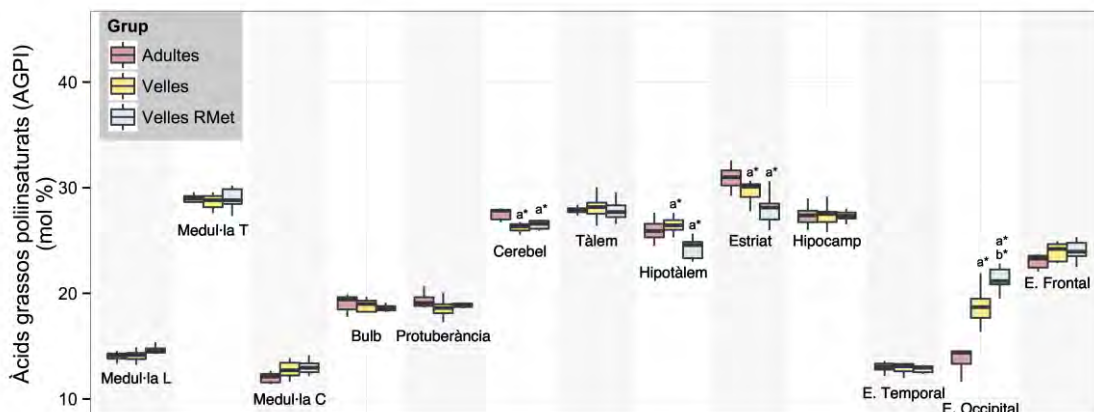


**Figura 73. Contingut en àcids grassos insaturats (AGI) en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dins dels AGI diferenciem entre els que contenen un doble enllaç (AGMI) (Figura 74) o els que en tenen més d'un (AGPI) (Figura 75).



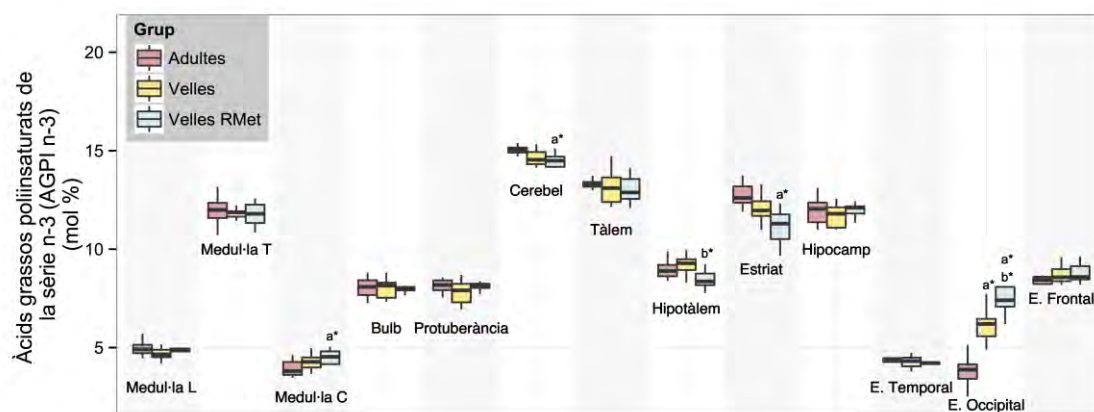
**Figura 74. Contingut en àcids grassos monoinsaturats (AGMI) en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .



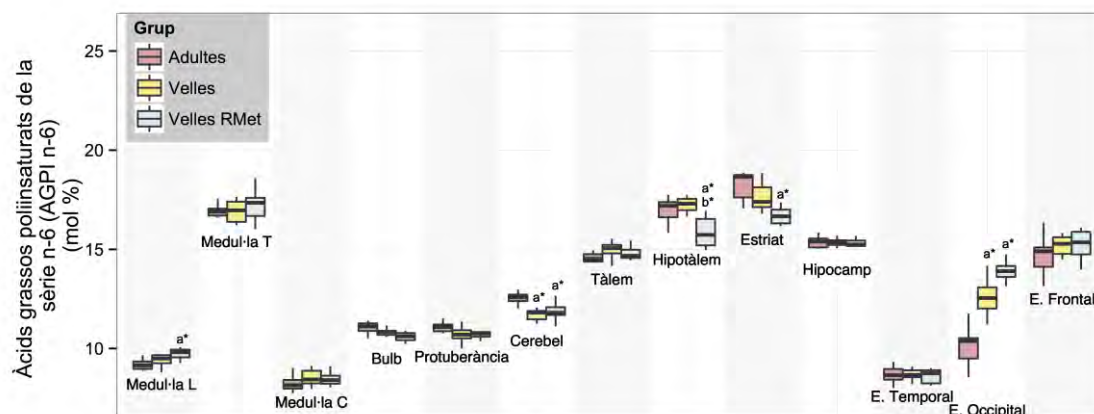
**Figura 75. Contingut en àcids grassos poliinsaturats (AGPI) en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

S'observa diferències significatives entre grups i entre regions en tots dos índex. L'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGMI mostra una disminució significativa del grup velles respecte el grup d'adultes en el tàlem, i del grup de velles RMet respecte el grup d'adultes en la medul·la lumbar. En la regió de l'hipotàlem s'observa un augment significatiu en el grup velles RMet respecte les adultes i les velles. D'altra banda, en l'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGPI s'observa una disminució significativa del grup velles respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel i estriat, i un augment significatiu en la regió del hipotàlem. De la mateixa manera, s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel, hipotàlem i l'estriat. En la regió occipital s'observa un augment significatiu del grup de velles i velles RMet respecte les adultes, i les velles RMet respecte les velles.

Dins dels AGPI diferenciem dos tipus de poliinsaturació, els de la sèrie n-3 (Figura 76) i els de la sèrie n-6 (Figura 77). En tots dos índex s'observen diferències significatives entre grups i entre regions. L'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGPI n-3 mostra un augment significatiu del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en la regió de medul·la cervical. En sentit contrari, s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel i estriat, i les velles RMet respecte les velles en l'hipotàlem. En la regió occipital s'observa un augment significatiu del grup velles i velles RMet respecte les adultes, i les velles RMet respecte les velles. En el cas dels resultats obtinguts en l'anàlisi estratificat de cada regió per l'índex AGPI n-6 s'observa un augment significatiu del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en la regió de la medul·la lumbar. Contràriament, s'observa una disminució significativa del grup velles i velles RMet respecte el grup d'adultes en el cerebel. Així mateix, en l'hipotàlem s'observa una disminució significativa en el grup velles RMet respecte les adultes i les velles, i en la regió de l'estriat s'observa una disminució significativa en el grup velles RMet respecte les adultes. Finalment, en l'escorça occipital s'observa un augment significatiu en el grup velles i velles RMet respecte les adultes.



**Figura 76.** Contingut en àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-3 (AGPI n-3) en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 77.** Contingut en àcids grassos poliinsaturats de la sèrie n-6 (AGPI n-6) en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

9.4.1.3. Grau d'insaturació dels lípids de membrana

Els dos paràmetres calculats que ens indiquen el grau d'insaturació de la membrana i la susceptibilitat d'aquesta a ser oxidada són l'IDE i l'IP. En la Figura 78 i la Figura 79 s'observen diferències significatives de l'IDE i l'IP entre grups i les regions del SNC de rata estudiades. L'anàlisi estratificat de cada regió per l'IDE mostra una disminució significativa del grup velles respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel i l'estriat. En el mateix sentit s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel, hipotàlem i estriat. En les regions de l'hipotàlem i l'estriat també s'observa una disminució significativa entre el grup velles RMet i les velles. Contràriament, en la regió de l'occipital s'observa un augment significatiu del grup velles i velles RMet respecte les adultes, i les velles RMet respecte les velles. En el cas dels resultats obtinguts en l'anàlisi estratificat de cada regió per l'IP s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions del cerebel, hipotàlem i estriat. També s'observa una disminució significativa del grup velles RMet respecte el grup de velles en l'hipotàlem i l'estriat. Contràriament, en l'escorça occipital s'observa un augment significatiu en el grup velles i velles RMet respecte les adultes i les velles RMet respecte les velles.

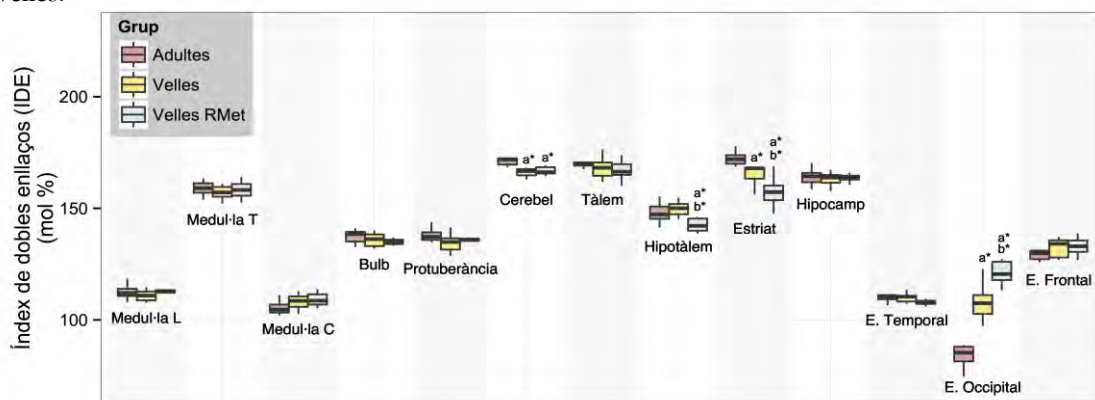


Figura 79. Índex de dobles enllaços (IDE) en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

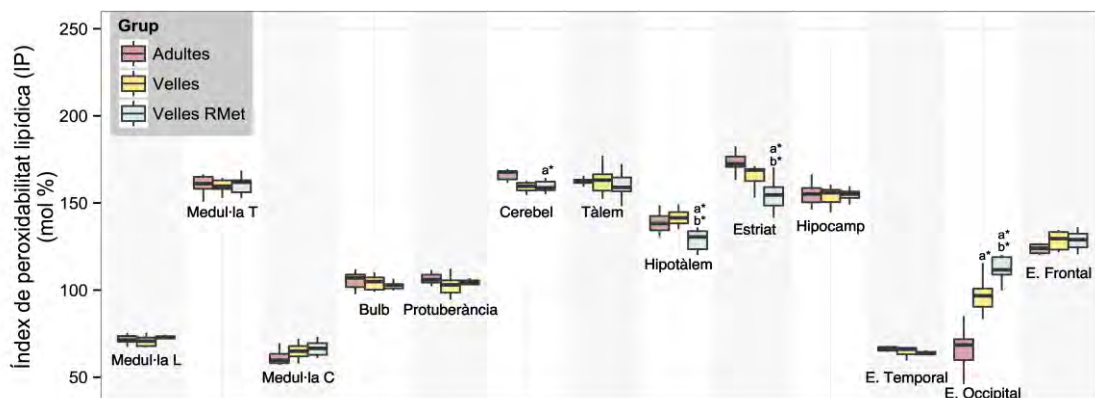


Figura 78. Índex de peroxidabilitat lipídica (IP) en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.



#### 9.4.1.4. Estimació de les activitats elongases i desaturases

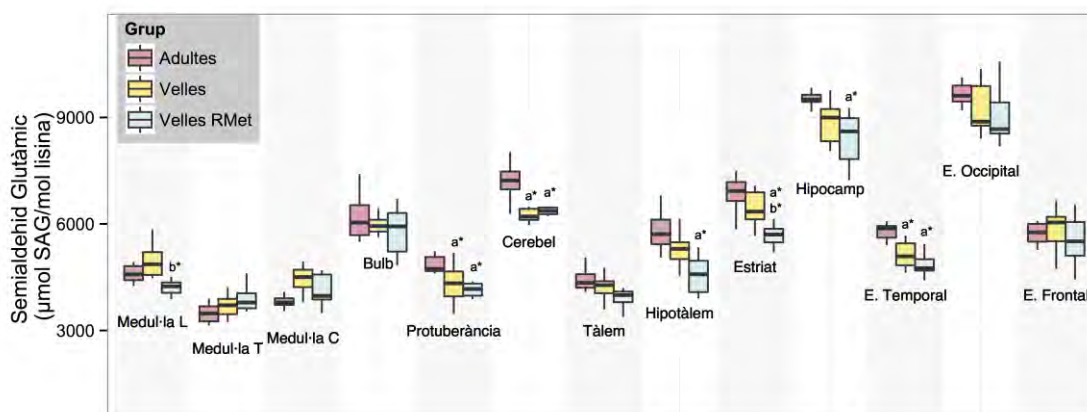
A partir de l'anàlisi composicional en àcids grassos també s'han estimat les activitats desaturases, elongases i de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, la via n-6 i n-3 en les diferents regions estudiades del SNC de rata adulta, vella i vella amb RMet. En l'annex 4 es representen les dades obtingudes, les quals mostren majoritàriament diferències significatives entre grups en les diferents regions. No obstant, les diferències varien en funció de cada regió.

#### 9.4.2. Dany oxidatiu

L'anàlisi del dany oxidatiu en les diferents regions del SNC de rata, per tal de determinar si la RMet es capaç de revertir el dany oxidatiu durant l'envelliment en les diferents regions del cervell humà, mostra diferències entre grups i interregional. A continuació es desglossen els resultats obtinguts en funció de l'origen del dany oxidatiu.

##### 9.4.2.1. Dany oxidatiu proteic

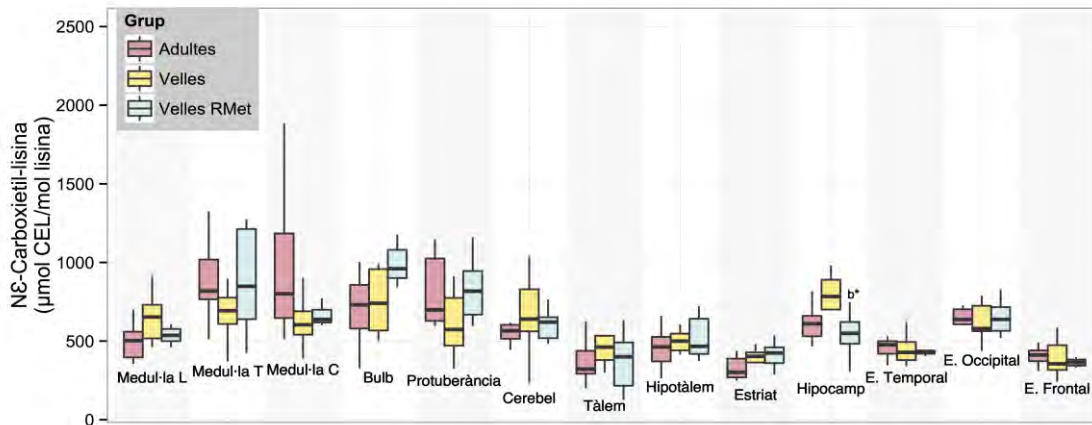
El dany oxidatiu produït directament a les proteïnes s'ha mesurat en base al marcador semialdehid glutàmic (SAG), marcador d'oxidació directa de l'aminoàcid prolina. Els resultats d'aquest marcador de dany oxidatiu mostren diferències significatives entre grups i entre regions. Mitjançant una anàlisi estratificat de cada regió s'observa disminucions significatives del grup de velles i velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions protuberància, cerebel, hipotàlem, hipocamp i l'escorça temporal. D'altra banda també hi ha una disminució significativa en el grup de velles RMet respecte les velles en les regions de la medul·la lumbar i l'estriat (Figura 80).



**Figura 80.** Nivells de Semialdehid Glutàmic en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.4.2.2. Dany proteic derivat de glicoxidació

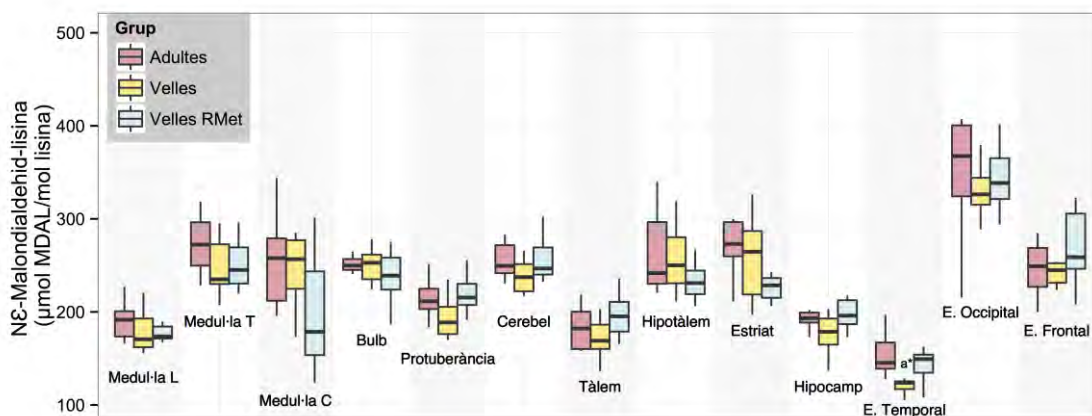
El dany proteic derivat de l'oxidació dels glúcids s'ha quantificat mitjançant el marcador N<sup>ε</sup>-Carboxietil-lisina (CEL). Els resultats d'aquest marcador de dany glicoxidatiu mostren diferències significatives entre grups i entre regions. No obstant, l'anàlisi estratificat de cada regió només mostra una disminució significativa del grup velles RMet respecte les velles control en la regió de l'hipocamp (Figura 81).



**Figura 81. Nivells de N<sup>ε</sup>-Carboxietil-lisina en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 9.4.2.3. Dany proteic derivat de lipoxidació

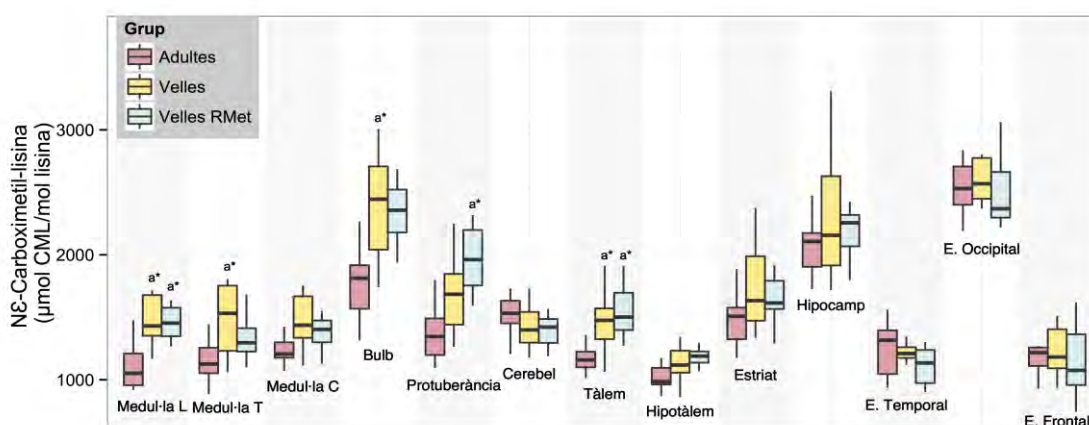
El dany proteic derivat de l'oxidació dels lípids s'ha quantificat mesurant el marcador N<sup>ε</sup>-malondialdehid-lisina (MDAL). Els resultats d'aquest marcador de dany lipoxidatiu mostren diferències significatives entre grups i entre regions. No obstant, l'anàlisi estratificat de cada regió només mostra una disminució significativa del grup velles respecte les adultes en la regió de l'escorça temporal (Figura 82).



**Figura 82. Nivells de N<sup>ε</sup>-Malondialdehid-lisina en 13 regions del SNC de rata.** Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 9.4.2.4. Dany proteic derivat de glico i lipoxidació

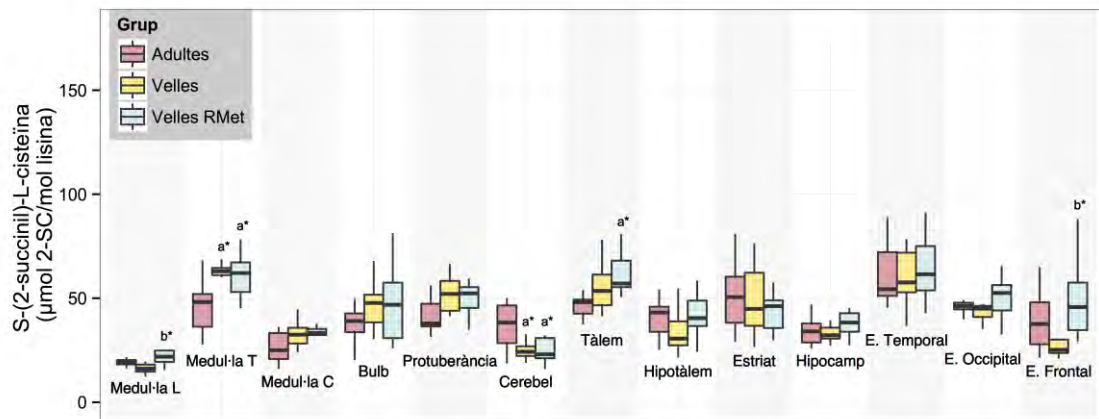
El dany a proteïnes derivat de la glicoxidació i la lipoxidació s'ha quantificat mesurant el marcador N<sup>ε</sup>-Carboximetil-lisina (CML) (Figura 83). Els resultats d'aquest marcador de dany mixte mostren diferències significatives entre grups i entre regions. Mitjançant una anàlisi estratificat de cada regió s'observa augments significatius del grup de velles respecte el grup d'adultes en les regions de medul·la lumbar, medul·la toràctica, bulb i tàlem. Així mateix, també s'observa augments significatius del grup de velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions de medul·la lumbar, protuberància i tàlem.



**Figura 83.** Nivells de N<sup>ε</sup>-Carboximetil-lisina en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana ± SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

#### 9.4.2.5. Dany proteic com a marcador d'estrès mitocondrial

El dany proteic que deriva de la reacció del fumarat amb la cisteïna s'ha quantificat mesurant el marcador S-(2-succinil)-L-cisteïna (2-SC) (Figura 84). Els resultats d'aquest marcador de dany mostren diferències significatives entre grups i entre regions. Mitjançant una anàlisi estratificat de cada regió s'observa un augment significatiu del grup de velles respecte el grup d'adultes en la regió de la medul·la toràctica. Així mateix, també s'observa augments significatius del grup de velles RMet respecte el grup d'adultes en les regions de la medul·la toràctica i el tàlem. En les regions de la medul·la lumbar i l'escorça frontal s'observa un augment en el grup de velles RMet respecte les velles. I finalment, en la regió del cerebel s'observa una disminució significativa del grup de velles i velles RMet respecte les adultes.



**Figura 84.** Nivells de S-(2-succinil)-L-cisteïna en 13 regions del SNC de rata. Els valors representats en la gràfica ens indica el canvi del grup velles i del grup velles RMet respecte el grup d'adultes, expressats com a mitjana  $\pm$  SEM de 8 animals per grup en cada regió. <sup>a</sup> respecte grup control adultes i <sup>b</sup> respecte grup controls velles. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .



## **DISCUSSIÓ**



## 10. DISCUSSIÓ

### 10.1. Lípids i vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

El procés d'envelliment afecta a tots els nivells d'organització biològica (molecular, cel·lular, orgànica i sistèmica) i el SNC no n'és una excepció. Aquest fet es constata pel declivi en el temps de les funcions motores, sensorials, reguladores, compartimentals i cognitives. A més, es coneix que l'edat és el principal factor de risc que determina el desenvolupament de desordres neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson o l'Esclerosi lateral amiotròfica, entre altres, manifestant-se especialment durant les dècades dels seixanta, setanta i vuitanta anys (Mattson and Magnus, 2006). És important remarcar, però, que tot i que aquestes malalties s'engloben dins de les neurodegeneratives, la zona del cervell que es veu afectada en cada una d'elles varia. Exemple d'això és que en la malaltia d'Alzheimer s'afecta inicialment l'hipocamp, en la malaltia de Parkinson la substància negra i en l'Esclerosi lateral amiotròfica la medul·la espinal. Per tant, existeix una variabilitat entre individus no només en la seva aparent velocitat d'envelliment i de desenvolupar aquestes malalties sinó que també en els sistemes neuronals més afectats i en com els seus dèficits relacionats amb l'edat es veuen compensats. En aquest escenari emergeix el concepte de “vulnerabilitat neuronal selectiva” referint-se a la diferent sensibilitat de les poblacions neuronals presents en el SNC enfront als factors que causen dany o mort cel·lular i que condueixen a l'envelliment i la neurodegeneració (Mattson and Magnus, 2006; Wang and Michaelis, 2010). Ara bé, tot i els recents avenços en el coneixement de la biologia i la fisiopatologia dels desordres neurodegeneratius, pocs són els estudis existents en els que es determinen els mecanismes subjacents d'aquesta vulnerabilitat neuronal selectiva en condicions fisiològiques i en les malalties relacionades amb l'edat (Jové et al., 2014; Mattson and Magnus, 2006; Naudí et al., 2015).

La idea que l'estrès oxidatiu d'origen mitocondrial està causalment relacionat amb el procés bàsic d'envelliment gaudeix actualment d'un ampli, tot i que no únic, consens dins de la comunitat científica, basat en un gran ventall d'evidències científiques (Pamplona and Barja, 2011, 2007; Sanz et al., 2006d). Els efectes de l'estrès oxidatiu són més visibles en teixits post-mitòtics, com és el cas del SNC, ja que les cèl·lules que es troben lesionades irreversiblement es perden o no es poden reemplaçar mitjançant mitosis de cèl·lules intactes. És per això que les cèl·lules del SNC s'afecten per i en resposta a l'edat molt més que les cèl·lules d'altres òrgans sistèmics. Així, les cèl·lules del cervell experimenten, durant l'envelliment, un increment de l'estrès oxidatiu detectable en totes les macromolècules -lípid, proteïnes i àcids nucleics-, i una pertorbació en l'homeòstasi energètica (Ferrer, 2009a; Martínez et al., 2010). Aquests canvis durant l'envelliment fisiològic es troben exacerbats en aquelles poblacions neuronals que són més vulnerables en els desordres



neurodegeneratiu (Dalfó et al., 2005; Fourcade et al., 2008; Ilieva et al., 2011, 2007; Martínez et al., 2008; Muntané et al., 2006; Pamplona et al., 2008, 2005a). Per tant, que un individu desenvolupi un desordre neurodegeneratiu durant l'envelliment està determinat tant per factors genètics com ambientals, els quals frenen o faciliten els mecanismes cel·lulars i moleculars de l'envelliment (Mattson and Magnus, 2006).

En aquest context, i des d'una aproximació de fisiologia comparada interregional emergeix una propietat característica que fa que aquest teixit sigui especialment sensible a la modificació oxidativa: la insaturació de membrana. Com ja s'ha dit anteriorment, la susceptibilitat de les membranes biològiques a les alteracions oxidatives es relaciona amb dos fets inherents, les propietats fisicoquímiques de la bicapa lipídica i la reactivitat química dels àcids grassos que formen la membrana (Hulbert et al., 2007; Pamplona, 2008). Per aquest motiu es va voler estudiar, de manera pionera fins al moment, si existien diferències a nivell de composició lipídica de membrana, específicament en el grau d'insaturació, entre les regions del SNC humà. Els resultats del present estudi mostren que la composició en àcids grassos varia depenent de la regió del cervell que analitzem (Taula 15 i 16). Globalment, els resultats obtinguts ens indiquen que tot i mantenir-se una LMC al voltant de 18 àtoms de carboni i una relació de saturats:insaturats d'aproximadament 40:60, existeixen diferències significatives entre els valors obtinguts de les diferents regions del SNC humà. Aquestes diferències són evidenciades especialment quan comparem la medul·la -regió més caudal- i l'escorça frontal -regió més cranial-, fet que denota la variabilitat interregional del SNC humà condicionada possiblement per les diferents necessitats i funcions atribuïdes a cada una de les regions. De fet, tan Söderberg i col·laboradors (Söderberg et al., 1990) com Veloso i col·laboradors (Veloso et al., 2011) ja van evidenciar, en un nombre petit de regions estudiades, que el cervell humà adult té una composició en fosfolípids característica de cada regió i que els nivells d'aquests fosfolípids totals es veuen disminuïts amb l'edat (Söderberg et al., 1990). Malgrat aquestes evidències, però, els mètodes utilitzats en aquests estudis no van permetre mesurar la composició en àcids grassos de les membranes, i qualsevol canvi a aquest nivell únicament es troben evidenciats en resultats preliminars del nostre grup en els que, en un nombre inferior de regions estudiades, ja s'observava la mateixa tendència (Naudí et al., 2013a).

Les diferències lipídiques interregionals observades en el present estudi es manifesten a nivell dels diferents tipus d'AGI. Específicament, aquestes diferències afecten principalment als AGMI i AGPI –tan els de la sèrie 3 com els de la sèrie 6- que semblen estar inversament relacionats. En altres paraules, com més elevada és la presència d'AGMI en una regió determinada, menor és el contingut en AGPI. El significat d'aquesta distribució diferencial no està elucidada, però és evident que pot determinar una susceptibilitat diferencial al dany oxidatiu ja que es coneix que les cadenes dels AGS i AGMI són essencialment resistents a la peroxidació mentre que els AGPI són fàcilment oxidables. A més, a major grau d'insaturació dels AGPI, més susceptibles seran a la lesió oxidativa.

De fet, Holman (Holman, 1954) va determinar empíricament les susceptibilitats relatives de les diferents cadenes d'àcids grassos i va descriure que el DHA (22:6 n-3), l'AGPI més insaturat amb 6 dobles enllaços, és extremadament susceptible a l'atac peroxidatiu essent 8 vegades més propens a la peroxidació que l'àcid linoleic (18:2 n-6), amb 2 dobles enllaços en la seva estructura. Es més, el DHA és 310 vegades més susceptible a la peroxidació que l'AGMI àcid oleic (18:1 n-9) (Hulbert et al., 2007). En aquest sentit, les dades obtingudes en el present treball mostren importants diferències en els percentatges del DHA entre regions ja que la quantitat d'aquest àcid gras en l'escorça frontal, temporal i occipital és quasi 8 vegades més elevada que la quantitat present en la medul·la espinal. Aquests resultats reforcen evidències prèvies on es descriu que en l'escorça cerebral és on hi ha una proporció més elevada d'aquest àcid gras (Fraser et al., 2010). Aquest fet, doncs, suggereix que les regions del SNC que tenen una susceptibilitat més elevada al dany oxidatiu és on es poden iniciar processos clau de l'envelliment fisiològic contribuint també en el desenvolupament d'una malaltia neurodegenerativa.

Existeixen, però, diferents maneres de calcular la susceptibilitat d'una membrana a ser oxidada. Entre elles trobem l'IP (una mesura de la susceptibilitat a la peroxidació), que s'obté combinant la susceptibilitat relativa dels diferents àcids grassos amb la composició en àcids grassos dels lípids d'una membrana en particular. En aquest context, els resultats obtinguts en el present estudi mostren de forma clara l'existència de diferències interregionals molt importants en l'IP en el SNC humà. Concretament, la màxima susceptibilitat de les membranes a la peroxidació lipídica es dona a l'escorça frontal, i disminueix progressivament fins arribar al seu valor mínim en el bulb raquidi i la medul·la espinal, fet que representa una reducció del 40 %. Aquestes diferències es poden assignar als canvis significatius observats en el contingut d'AGMI i AGPI entre aquestes regions que, al seu torn, poden atribuir-se majoritàriament a canvis en la composició de 4 àcids grassos específics: 18:1 n-9, 20:1 n-9, 20:4 n-6 (AA) i 22:6 n-3 (DHA).

Així doncs, les diferències interregionals observades en l'IP es deuen a canvis en el tipus d'AGI que participen en la composició de membrana. Aquest estudi demostra que existeix una redistribució sistemàtica entre els tipus d'AGPI presents altament insaturats a altres amb un menor grau d'insaturació i aquesta relació és regió-específica. Sorprenentment, els canvis observats mostren un gradient que segueix, considerant l'organització estructural del SNC en vertebrats, un eix caudo-cranial, fet que no té un significat conegut. Així doncs, els resultats obtinguts suggereixen que la insaturació de membrana pot ser una característica clau capaç de definir la vulnerabilitat neuronal selectiva.

Entre els mecanismes responsables de generar i mantenir diferències en el perfil d'àcids grassos cal destacar l'activitat dels enzims desaturasa (delta-5 i delta-6) i elongasa (Elovl 2) que juguen un paper clau en la via de biosíntesis dels AGPI, tant els de la sèrie 3 com els de la sèrie 6. La detecció i les estimacions d'aquestes activitats desaturasa i elongasa obtingudes en el present treball permeten

atribuir els canvis de composició en àcids grassos a les diferències interregionals en les activitats de les mateixes. Així, els mecanismes subjacents a la regulació de la insaturació de les membranes podrien explicar les diferències en composició d'àcids grassos de membrana i, al seu torn, l'IP, suggerint un mecanisme de regulació regió-específica. Aquest mecanisme també sembla expressar-se de forma diferencial en un eix caudo-cranial, probablement associat al procés de desenvolupament i inclús a l'evolució del SNC humà.

Es coneix que el DHA, tot i la seva alta susceptibilitat a ser oxidat, té una important funció protectora com a precursor d'importants mediadors lipídics, resolvines i neuroprotectines, de caràcter antiinflamatori i neuroprotector (Naudí et al., 2015; Piomelli et al., 2007), i com a activador de les defenses antioxidants neuronals mitjançant GPx4 (Casañas-Sánchez et al., 2015). Les diferències específiques descrites en aquest treball respecte el contingut de DHA, es poden deure a les variacions en les activitats desaturases, elongases i dels enzims implicats en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal també observades en el present estudi. Aquestes activitats enzimàtiques diferencials semblen ser clau per donar suport a les diferències interregionals en els perfils d'àcids grassos i suggereixen la possibilitat que les neurones poden mantenir activament el seu propi perfil de composició.

Tanmateix, pensem que tot i que les provisions de DHA es consideren actualment que procedeixen majoritàriament del fetge, de les cèl·lules endotelials i dels astròcits (Bazan et al., 2011; Kim, 2007; Spector), les neurones disposen de la maquinària necessària per a la biosíntesis dels AGPI atès que els requeriments de DHA per part de la neurona no estiguin condicionats a fluctuacions en el seu aport extern i així poder autoregular el seu contingut en base a les seves necessitats funcionals. En aquest sentit, els resultats que es mostren a les Figures 36, 37 i 38 recolzen aquesta hipòtesis, ja que les imatges realitzades en diferents regions del SNC humà adult demostren la presència d'enzims implicats en la biosíntesis dels AGPI a nivell neuronal, així com factors de resposta a l'oxidació lipídica, suggerint l'existència d'eficaços mecanismes d'adaptació i protecció a nivell neuronal. Aquestes evidències són reforçades per altres estudis previs realitzats en cultius cel·lulars amb neurones hipocampals de rata, els quals han demostrat la capacitat neuronal de la biosíntesis dels AGPI, com és el DHA (Kaduce et al., 2008). No obstant això, la comunitat científica encara és fa ressò de l'estudi conclouent de Moore i col·laboradors (Moore et al., 1991) en el que es descriu que solament els astròcits i no la neurona tenen la capacitat de sintetitzar DHA, atribuint exclusivament la seva síntesis a la presència de la desaturasa  $\Delta 4$ , responsable de la síntesis directa del 22:6n-3 a partir del 22:5n-3, i no a partir del 24:6 n-3 mitjançant un cicle de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (Sprecher, 2000). Així doncs, sembla que més estudis són necessaris per tal de consolidar aquesta important nova evidència.

Posteriorment a l'estudi de la composició dels àcids grassos i la consegüent susceptibilitat a l'estrès oxidatiu, ens hem centrat en l'estudi de les modificacions oxidatives en proteïnes. Els resultats mostren, sorprenentment, que els nivells de lesió lipoxidativa en proteïnes a les diferents regions del SNC humà adult estan inversament relacionats amb el grau d'insaturació de membrana. És a dir, quan més elevada és la presència d'AGPI per a una regió donada, menor és el contingut en dany oxidatiu. Un exemple és l'escorça frontal, ja que és l'àrea amb un major IP i, en conseqüència, amb un major risc de lesió lipoxidativa. Malgrat això, els nivells de lesió lipoxidativa de proteïnes són els més baixos indicant que altres mecanismes poden estar implicats en el manteniment de l'homeòstasi oxidativa a nivell del SNC humà.

Una possible explicació d'aquests resultats podria ser la presència d'eficaços mecanismes de protecció, com per exemple el factor Nrf2 –important regulador de l'estat redox i localitzat a nivell neuronal en el present estudi–, adaptats i molt regulats a les característiques específiques de cada regió. De fet, alguns d'aquests mecanismes de protecció també poden ser atribuïts al contingut en DHA i en AA, ja que com a precursors de mediadors lipídics antiinflamatoris i proinflamatoris, respectivament, poden jugar un paper clau en els nivells de dany oxidatiu en situació fisiològica (Piomelli et al., 2007). En situació patològica, però, són varis els estudis que descriuen un esgotament de DHA en l'escorça frontal en la malaltia d'Alzheimer (Igarashi et al., 2011; Martín et al., 2010; Pamplona et al., 2005a). Aquest fet podria ser explicat per la gran capacitat d'adaptació del SNC en el que en situació patològica el sistema respon cap a la disminució d'aquells AGPI més susceptibles a l'oxidació com a mecanisme de protecció enfront l'alteració homeostàtica. Així mateix i des d'una altra perspectiva, podem atribuir els baixos nivells dels marcadors de dany oxidatiu derivat de lipoxidació en les regions més cranials al correcte funcionament dels mecanismes eliminadors de les proteïnes danyades mitjançant la degradació enzimàtica per proteases citosòliques, als lisosomes i al proteasoma. Tanmateix, un mal funcionament d'aquests mecanismes, i per tant, una alteració en l'autofàgia dona lloc a disfunció neuronal i la seva mort en l'envelliment i en malalties relacionada amb l'edat (Keller et al., 2002; Lam et al., 2000; Sullivan et al., 2004). No obstant això, aquestes hipòtesis necessiten d'estudis més específics per tal de poder elucidar els mecanismes involucrats.

En la Taula 20 podem observar els diferents marcadors de dany oxidatiu detectats en les dotze regions analitzades del SNC humà adult. Els resultats obtinguts mostren que existeixen diferències entre regions en els paràmetres del dany oxidatiu, tant a nivell dels marcadors de lipoxidació, mixtes de glico i lipoxidació i d'estrès a nivell mitocondrial. Aquestes diferències observades mostren un gradient negatiu estadísticament significatiu que segueix, considerant l'organització estructural del SNC en vertebrats, un eix caudo-cranial. Malgrat que aquestes correlacions són significatives, les dades obtingudes de la regió del cerebel no segueix aquest eix caudo-cranial. Els seus nivells en els diferents marcadors de dany oxidatiu, així com la composició en àcids grassos, són similars als de

l'escorça frontal, regió llunyana del cerebel segons l'organització estructural del SNC. Aquesta semblança en quan al dany oxidatiu i en el perfil en àcids grassos entre aquestes dos regions no està elucidada però pot estar relacionada amb la seva morfologia i amb les seves funcions ja que, tot i que en el passat només funcions sensorials i motores s'atribuïen al cerebel, actualment hi ha evidències de la seva implicació en moltes altres funcions complexes, com la memòria de treball, processament espacial, funcions executives, processament emocional, l'idioma, la memòria, l'aprenentatge associatiu i el dolor (Diano et al., 2015; Stoodley and Schmahmann, 2009). Tanmateix, aquesta complexa funcionalitat del cerebel sembla estar protegida a nivell evolutiu de manera similar a l'escorça frontal. De fet, el cerebel és de les regions amb menor incidència d'afectació en malalties neurodegeneratives, en el que sorprenentment és manté intacte en la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, la malaltia de Hungtinton o en l'Esclerosi lateral amiotròfica (Mattson and Magnus, 2006).

Així doncs, el SNC humà adult presenta diferències interregionals a nivell del grau d'insaturació de membrana així com dels mecanismes responsables de generar-los, fet que suggereix l'existència de mecanismes de regulació regió-específics que s'expressen de forma diferencial en un eix caudo-cranial. A més, els resultats ens permeten postular que la neurona té els mecanismes necessaris i la capacitat de mantenir activament el seu propi perfil de composició lipídica per a la seva adaptació a les diferents necessitats en cada una de les regions. No obstant això, el grau d'insaturació no sembla ser la única característica clau capaç de definir la vulnerabilitat neuronal selectiva, sinó que els resultats suggereixen l'existència d'eficaços mecanismes de regulació de la lesió lipoxidativa i una alta capacitat d'adaptació del teixit a les seves necessitats, reduint el nivell basal del dany oxidatiu.

## 10.2. Metabolòmica i vulnerabilitat del sistema nerviós central humà

L'estudi dels canvis en el metabolisme cerebral específic d'humans és una branca recent de la investigació que es centra en els fenotips intermedis moleculars. Tot i que les vies metabòliques que són importants per a la funció cerebral -com el metabolisme energètic, la síntesi i degradació de neurotransmissors, i la biosíntesi de proteïnes i lípids- estan altament conservades a través de diversos tàxons (Peregrín-Alvarez et al., 2009), algunes evidències suggereixen que el metabolisme cerebral pot haver experimentat canvis considerables en els primats i, sense ambigüitats, en el llinatge evolutiu humà (Somel et al., 2013).

L'evolució humana està associada a la ràpida expansió en la mida i complexitat del cervell, que consegüentment ha donat lloc a l'aparició de les úniques i complexes habilitats cognitives. Aquests canvis evolutius s'han associat i recolzat amb un augment de la demanda energètica (Aiello and Wheeler, 1995; Cáceres et al., 2003; Fu et al., 2011; Mink et al., 1981; Somel et al., 2013). Les neurones del SNC humà realitzen un ampli ventall de funcions motores, sensorials, reguladores, comportamentals i cognitives que són dependents de la complexa organització de grups de poblacions neuronals formades, al seu torn, per una varietat de cèl·lules neuronals. La diversitat morfològica i funcional entre neurones suggereix que malgrat compartir totes elles un codi genètic idèntic, cada tipus neuronal té el seu propi perfil d'expressió gènica, és a dir, tenen el seu propi patró transcriptòmic i proteòmic que, al seu torn, s'expressa i es tradueix en un perfil metabolòmic neuronal específic (Jové et al., 2014).

Per tant, les propietats fenotípiques de les diferents cèl·lules neuronals són en última instància el producte de combinacions distintives dels productes gènics resultants expressats sobre el metaboloma com a modalitat informativa per definir la diversitat cel·lular en el SNC. El fet que regions específiques del SNC tinguin vulnerabilitats neuronals diferencials d'exposició a l'envelliment i a diverses malalties neurodegeneratives i neuropsiquiàtriques també redunten a l'especificitat en l'etiologia de cada malaltia i de l'heterogeneïtat en les respostes neuronals als processos que danyen les cèl·lules associades amb cadascuna de les malalties (Jové et al., 2014; Mattson and Magnus, 2006; Naudí et al., 2015). Per tant, per tal d'entendre millor els mecanismes que estan implicats en la resistència neuronal, la sensibilitat a l'estrès i la mort és necessari definir metabòlicament la vulnerabilitat cel·lular de les diferents regions del cervell en condicions fisiològiques.

Les evidències dels estudis comparatius d'expressió gènica i evolució suggereixen que les neurones neocorticals humanes es caracteritzen per tenir nivells inusualment alts del metabolisme energètic, juntament amb un augment de la densitat de cèl·lules de la glia en l'escorça frontal humana en comparació amb altres espècies de primats antropoides per suportar demandes metabòliques superiors (Sherwood et al., 2006). En el present estudi s'ha estès aquesta idea a tres regions

diferents del SNC humà adult sa per tal d'avaluar si existeixen diferències interregionals en la densitat de les cèl·lules de la glia relatives a les neurones, com a indicació directa de l'augment de les demandes metabòliques neuronals. En aquest sentit, els resultats del nostre estudi revelen que l'escorça frontal humana presenta un augment de la densitat neuronal, juntament amb una disminució concomitant de les cèl·lules de la glia en comparació amb les regions de l'escorça entorrinal i l'hipocamp, fet que suggereix que l'escorça frontal té una menor demanda metabòlica respecte les altres dues regions.

Aquesta observació ha estat reforçada per les dades obtingudes relacionades amb les demandes bioenergètiques de les diferents regions del còrtex cerebral humà, que mostren una menor quantitat de certs metabòlits involucrats directament i indirectament amb el cicle de *Krebs* en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Així doncs, els resultats evidencien unes necessitats metabòliques menors en l'escorça frontal respecte les altres dues regions estudiades. Un aspecte interessant és que els metabòlits que trobem amb concentracions inferiors en l'escorça frontal són metabòlits del cicle de *Krebs* que contenen 4 carbonis, com el succinat i el fumarat. Una conseqüència derivada d'aquest fet és que l'escorça frontal mostra una disminució de les modificacions post-traduccionals com és la succinació. Aquestes modificacions post-traduccionals són valorades mitjançant el marcador 2-SC, caracteritzat com a biomarcador de la disfunció mitocondrial, estrès oxidatiu i de la progressió cel·lular cap a l'apoptosi (Merkley et al., 2014) pel seu origen a partir del fumarat. Així doncs, aquests resultats ens suggereixen que l'escorça frontal té un perfil metabòlic neuroprotector, ja que un menor requeriment energètic d'aquesta regió li pot proporcionar una major regulació del sistema bioenergètic i de l'homeòstasi cel·lular.

Posteriorment, ens hem centrat en les diferències interregionals del metabolisme d'un carboni en l'escorça cerebral humana. El metabolisme d'un carboni integra l'estat dels nutrients cel·lulars mitjançant cicles d'unitats de carboni a partir d'aminoàcids específics per generar diverses funcions, incloent la biosíntesi de lípids, proteïnes i àcids nucleics, així com el manteniment de l'estat redox i l'estat genètic i epigenètic (Locasale, 2013). Particularment, ens hem centrat en l'anàlisi de metabòlits pertanyents al metabolisme de serina, glicina i treonina, al metabolisme de la metionina – cicle de metionina i via de transsulfuració- i al metabolisme de les purines.

Es sap que la fisiologia cel·lular requereix la creació d'unitats bàsiques per a nous components cel·lulars, com són les proteïnes. El metabolisme dels aminoàcids que implica serina i glicina, i les unitats de carboni que proporcionen aquestes, satisfà molts d'aquests requeriments. En aquest sentit, els resultats obtinguts en el present estudi demostren l'existència de diferències interregionals significatives en les concentracions de serina, glicina i treonina. Les concentracions de tots aquests metabòlits són significativament més baixos en l'escorça frontal, i més alts en l'hipocamp, en comparació de l'escorça entorrinal. Aquests resultats suggereixen que la regió de l'hipocamp té altes necessitats proteiques respecte les altres dues regions.

D'altra banda, les concentracions obtingudes dels metabòlits del nucli dur del cicle de la metionina mostren nivells significativament menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp. En aquest sentit, estudis de creixement mostren que defectes en el metabolisme d'un carboni al cervell induïxen alteracions profundes en la fisiologia cel·lular com a conseqüència de les importants vies en què intervé el metabolisme d'un carboni, però també, i més important, pels efectes tòxics derivats dels metabòlits que configuren el nucli del cicle de la metionina. En aquest sentit, per exemple, ha anat sorgint informació respecte a una connexió entre el metabolisme de la homocisteïna i la funció cognitiva, amb el desencadenament des del deteriorament cognitiu lleu a la demència vascular i la malaltia d'Alzheimer (Miller, 2003). Per contra, baixos nivells del contingut en metionina i els metabòlits derivats, constitutivament o de manera induïda -per exemple, mitjançant intervencions nutricionals- s'associen a una resistència a l'estrès i un augment de la longevitat (Naudí et al., 2007; Pamplona and Barja, 2011, 2006). Per tant, tot sembla indicar que els baixos nivells observats en el metabolisme d'un carboni en l'escorça frontal humana és una adaptació fisiològica que confereix a aquesta regió una resistència a l'estrès.

En el cas del metabolisme de les purines, les concentracions dels seus metabòlits no presenten canvis significatius entre les diferents regions del SNC humà adult estudiades, amb l'excepció de la ribosa 5-fosfat, la xantosina i la hipoxantina. Les concentracions de ribosa 5-fosfat, xantosina i hipoxantina són significativament baixes en l'escorça frontal, en comparació a l'escorça entorrinal i l'hipocamp. En aquest sentit, els resultats obtinguts suggereixen, un cop més, que la via de les pentoses fosfat, i per tant el metabolisme cel·lular, es troba més actiu en l'escorça entorrinal i l'hipocamp que en l'escorça frontal.

Tanmateix, els diferents estats metabòlics observats entre regions poden estar associats a canvis en els sistemes cel·lulars lligats a la resistència a l'estrès oxidatiu i a la supervivència cel·lular. I de fet, aquest és el cas a nivell d'antioxidants, ja que l'escorça frontal presenta majors nivells dels antioxidants catalasa i SOD1 respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Aquests resultats reforcen evidències prèvies on es descriu que l'escorça frontal d'humans sans és una de les regions amb una activitat més elevada en catalasa i SOD1 (Chen et al., 1994). Tanmateix, evidències disponibles indiquen que la via de senyalització mTOR participa en la senescència cel·lular, l'envelliment cerebral i en malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat (Bockaert and Marin, 2015; Garelick and Kennedy, 2011; Perluigi et al., 2015). mTOR és una serina/treonina quinasa molt conservada evolutivament en cèl·lules eucariotes que regula el creixement cel·lular i el metabolisme en resposta als nutrients, factors de creixement i a les condicions de l'energia cel·lular. Estudis de creixement mostren que una alteració en la senyalització de mTOR en el cervell afecta múltiples vies incloent el metabolisme de la glucosa, la producció d'energia, la funció mitocondrial, el creixement cel·lular i l'autofàgia. Tots aquests esdeveniments són claus en el deteriorament cognitiu relacionat amb l'edat, així com en malalties neurodegeneratives i neuropsiquiàtriques.



Contràriament, però, l'atenuació de la senyal de mTOR, mitjançant una intervenció farmacològica o bé nutricional, augmenta la longevitat i s'associa a l'esperança de vida saludable, incloent una millora en la funció cerebral (Garelick and Kennedy, 2011; Perluigi et al., 2015). En conseqüència, tot sembla indicar que els baixos nivells observats en la senyalització de mTOR en l'escorça frontal humana és també una adaptació fisiològica que confereix a aquesta regió una resistència a l'estrès.

Així doncs, els nostres resultats defineixen l'existència d'importants diferències metabòliques en tres regions del cervell humà d'adults sans que confirmen l'existència de diferències regió-específiques del SNC. Cal remarcar, però, que tot i que a través del nostre anàlisi es cobreixen les rutes metabòliques cel·lulars clau, està lluny de ser complet. No obstant això, els nostres resultats indiquen que la signatura metabòlica és una característica optimitzada associada amb la diversitat entre les poblacions neuronals de l'escorça cerebral, hipotetitzant que l'optimització metabòlica d'alguns trets fisiològics, com ara la resistència a l'estrès és específica de regió. Tanmateix, és evident que es necessiten més estudis per tal d'establir un àmpli atlas-metabòmic del cervell humà adult, i com això es projecta durant el procés d'envelliment i en l'aparició i progressió de les malalties neurodegeneratives i neuropsiquiàtriques.

### 10.3. Efecte de l'envelliment en la vulnerabilitat neuronal selectiva del sistema nerviós central humà

Com ja s'ha posat de manifest al llarg d'aquesta tesi, una vegada que les capacitats fisiològiques de l'ésser viu arriben al seu pic màxim, el cicle de la vida de pràcticament totes les espècies cel·lulars és seguit i caracteritzat per la disminució progressiva de l'eficiència en la capacitat funcional dels sistemes biològics (Pamplona and Barja, 2011). En conseqüència, la capacitat de mantenir l'homeòstasi en termes d'estrès oxidatiu és poc a poc atenuada. En aquest sentit, les cèl·lules del SNC no en són una excepció sinó que es veuen afectades per i en resposta a l'edat molt més que les cèl·lules d'altres òrgans sistèmics. El cervell és especialment vulnerable als efectes de la generació de ROS, tant a nivell fisiològic com a nivell patològic, a causa que aquest òrgan consumeix altes quantitats d'oxigen, té quantitats relativament baixes dels sistemes generals de defensa antioxidants en comparació a altres tipus de teixits, conté molts metalls de transició que poden ajudar al cicle redox i és molt ric en AGPI. Per tot això, la protecció neuronal contra la lesió oxidativa és crítica per a les funcions del SNC, i un ampli espectre d'adaptacions metabòliques han estat incorporades per al seu control. Exemple d'això en són la resistència dels components estructurals neuronals a la lesió oxidativa, intrínsecament lligada a la composició química de carbohidrats, lípids, àcids nucleics i proteïnes, així com la presència de components reguladors neuronals de la generació d'estrès oxidatiu i la incorporació d'un ampli ventall de defenses antioxidants que han estat seleccionades i conservades durant l'evolució animal (Pamplona and Costantini, 2011). Aquests fets ens condueixen a proposar que l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu és una de les principals forces directrius que determinen la vulnerabilitat diferencial de les cèl·lules nervioses a l'envelliment i a les malalties neurodegeneratives. Aquesta rellevància de l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu per a la supervivència neuronal explica el perquè les neurones estan intrínsecament equipades amb un mecanisme bioquímic que acobla el metabolisme de glucosa amb les defenses antioxidants (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Així doncs, la necessitat d'una continua adaptació canviant, la presència d'una susceptibilitat inherent i una "vulnerabilitat neuronal selectiva" poden ser els factors que modulen el procés de l'envelliment neuronal en un context fisiològic.

Ara bé, com hem vist en els estudis anteriors, aquestes característiques no són idèntiques en tot el SNC humà, sinó que existeixen diferències interregionals i consegüentment, els canvis en el SNC humà durant l'envelliment no es produeixen ni al mateix temps, ni amb la mateixa intensitat a tots els grups neuronals (Peters, 2006). En aquest sentit, una de les regions d'especial interès en determinar els possibles canvis fisiològics i moleculars que tenen lloc durant l'envelliment és l'escorça frontal. Mesuraments volumètriques del cervell, així com la tomografia per emissió de positrons i les mesures de la taxa metabòlica cerebral de la glucosa mostren com l'escorça cerebral és la regió més vulnerable a la pèrdua de volum dependent de l'edat (Raz and Rodrigue, 2006; Raz et al., 2007) i particularment, l'escorça frontal és la regió amb la major disminució de la taxa

metabòlica de glucosa en comparació amb tota la resta de regions en l'envelliment cerebral (Loessner et al., 1995; Reiman et al., 2010). A més, en la comparació interregional duta a terme en individus adults sans en el primer estudi de la present tesi, s'han pogut observar les característiques diferencials d'aquesta regió, ja que tot i ser la regió amb més contingut en AGPI, i per tant amb un major IP i, en conseqüència, amb un major risc de lesió lipoxidativa, els seus nivells de dany proteic derivat de lipoxidació han estat els més baixos. Així mateix, els resultats del segon estudi ens han mostrat que l'escorça frontal presenta un perfil metabolòmic i una adaptació a la resistència a l'estrès diferent a les regions de l'hipocamp i l'escorça entorrinal. És doncs, per la particularitat d'aquesta regió i la seva afectació en malalties neurodegeneratives tals com la malaltia d'Alzheimer, que l'estudi de l'envelliment del SNC humà s'ha centrat en la substància gris d'aquesta regió.

Un dels primers aspectes a estudiar ha estat la composició en àcids grassos de les membranes de l'escorça frontal humana d'individus d'entre 40 i 89 anys. Les primeres evidències existents que demostren que la composició lipídica de la membrana del cervell canvia amb l'edat daten a partir del 1958 (Burger and Seidel, 1958; Rouser and Yamamoto, 1968). Burguer i Seidel (Burger and Seidel, 1958) van trobar que la quantitat de lípids totals s'incrementa durant les dos primeres dècades de vida i després comencen a disminuir. Rouser i Yamamoto (Rouser and Yamamoto, 1968) també van demostrar una regressió curvilínia dels nivells de lípids en el cervell humà amb l'edat. No obstant això, com assenyalen Ledesma i col·laboradors (Ledesma et al., 2012), en ambdós estudis, els anàlisis es van dur a terme en cervells sencers, fet que va provocar que els resultats mostressin variacions en el contingut de lípids que podien reflectir les diferents proporcions de substància gris i blanca. Estudis més recents, però, han analitzat la composició lipídica de les membranes lipídiques en diferents àrees del cervell humà i han confirmat alteracions lipídiques associades a l'edat. En general, tots els canvis estan perfectament alineats al caràcter progressiu i deleteri del procés d'envelliment, i sembla que les concentracions de la majoria de lípids disminueixen en el cervell humà a partir dels 50 anys (Naudí et al., 2015).

Els nostres resultats mostren que l'augment de l'edat s'associa amb un increment progressiu del contingut en AGS i una disminució progressiva dels AGI, especialment per una disminució significativa dels nivells dels AGPI n-6, i no pels canvis globals dels AGPI n-3 ja que els seus nivells es mantenen sostinguts al llarg del temps. De fet, estudis previs ja suggerien una disminució significativa dels AGPI n-6 amb l'augment de l'edat, principalment per una disminució dels nivells d'AA, en l'escorça frontal humana al llarg de la vida adulta (Carver et al., 2001; McNamara et al., 2008) que inclús es poden adscriure a una disminució de les espècies moleculars lipídiques específiques com les de les classes PE i PS (Norris et al., 2015). En aquesta mateixa línia, els nostres resultats indiquen que existeix una disminució significativa en els nivells de DHA en el grup d'edat avançada, en concordància amb els resultats obtinguts per McNamara i col·laboradors (McNamara et al., 2008). No obstant això, els nivells globals d'AGPI n-3 es mantenen estables al pas del temps,

en concordància amb els resultats obtinguts per Carver i col·laboradors (Carver et al., 2001). Tanmateix, sembla ser que un augment dels nivells de DHA amb l'edat es pot adscriure a l'augment de les espècies moleculars lipídiques derivades de PC (PC 16:0/22:6), PE (PE 18:1/22:6, PE 18:1/22:6) i PS (PS 18:0/22:6), si més no a nivell mitocondrial (Norris et al., 2015). McNamara i col·laboradors (McNamara et al., 2008) també van mostrar que la disminució en el contingut de l'AA i de DHA durant l'envelliment observada en escorces orbitofrontals humanes d'individus d'entre 29 i 80 anys d'edat, s'associava a canvis en l'expressió gènica d'elongases i desaturases.

En aquest sentit, en el present estudi també es va voler analitzar a nivell gènic i a nivell de proteïna els potencials mecanismes responsables de generar variacions en el perfil d'àcids grassos amb l'augment de l'edat. Els resultats obtinguts mostren canvis en els nivells de les desaturases  $\Delta 5$  (FADS1),  $\Delta 6$  (FADS2) i l'elongasa 2 (ELOVL2) tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna, i tot sembla indicar que aquestes modificacions intenten compensar, com a resposta adaptativa, les variacions dels àcids grassos de les membranes. No obstant això, els resultats obtinguts a nivell de proteïna dels enzims implicats en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, claus en l'obtenció de DHA, no mostren cap canvi amb l'edat, fet que suggereix un intent actiu per mantenir estable en el temps els seus nivells atesa la seva enorme rellevància en la fisiologia neuronal. Així, els resultats obtinguts en el present estudi també suggereixen que la disminució de les concentracions de l'AA i del DHA, especialment en les edats més avançades, no és únicament conseqüència d'una disminució en els mecanismes de la biosíntesis dels àcids grassos, sinó que aquestes disminucions també es poden deure com a resultat d'un increment en la síntesis de mediadors lipídics bioactius, icosanoides i docosanoides respectivament, que poden regular múltiples funcions cel·lulars, des de comunicacions inter i intracel·lulars fins a la inflamació i la resolució (Harizi et al., 2008; Orr et al., 2013; Shahabi et al., 2014). Així doncs, els nostres resultats suggereixen l'existència de canvis durant l'envelliment a nivell de l'expressió d'enzims implicats en la biosíntesis de mediadors lipídics bioactius a partir del metabolisme de l'AA i del DHA.

D'una banda, l'AA és metabolitzat a través de COX-2 i LOX-5 generant diferents tipus de prostaglandines, tromboxans i leucotriens respectivament, de caràcter proinflamatori (Funk and Cyrus, 2001; Funk, 2001). En aquest sentit, els resultats obtinguts en el present estudi no mostren canvis en els seus nivells amb l'edat. De fet, Keleshian i col·laboradors (Keleshian et al., 2013) ja van evidenciar que en l'envelliment fisiològic de l'escorça frontal humana, els nivells de COX-2 no mostraven canvis significatius, tot i mostrar marcadors proinflammatoris activats, els quals són regulats pels nivells de NF- $\kappa$ B. Particularment, els nostres resultats mostren un augment significatiu dels nivells del mRNA de NF- $\kappa$ B p65 en la dècada dels 60. D'altra banda, però, els nostres resultats mostren un augment amb l'envelliment de l'enzim CYP4502J2, generador d'epoxigenases a partir del metabolisme del DHA, de caràcter neuroprotector i antiinflamatori, fet que confirma i iguala un estudi en el que es descriu un augment del mateix comparant el grup d'edat de 40 anys respecte el

de 70 anys (Keleshian et al., 2013). En aquesta línia antiinflamatòria, l'enzim LOX-15, generador de lipoxines, també es troba augmentat significativament a nivell gènic en la dècada dels 60 anys. De fet, aquestes troballes que es constaten en condicions fisiològiques com a respostes adaptatives als canvis deleteris induïts per l'envelliment contrasten amb les observades en condicions patològiques. Existeixen evidències que demostren un augment significatiu dels nivells de COX-2 i LOX-15 de caràcter proinflamatori i antiinflamatori respectivament, i una reducció significativa dels nivells de CYP450 generador d'epoxigenases de caràcter antiinflamatori, en l'escorça frontal humana en la malaltia d'Alzheimer (Praticò et al., 2004; Rao et al., 2011). Així doncs, la gran capacitat d'adaptació de l'escorça frontal humana associada amb l'envelliment fisiològic, sembla estar atenuada en situació patològica. No obstant això, aquestes hipòtesis necessiten d'estudis més específics per tal de poder elucidar els mecanismes subjacents involucrats.

A banda d'aquests resultats, el present estudi mostra que no existeix una correlació entre els nivells del marcador de dany proteic derivat de lipoxidació, MDAL, i el pas dels anys en l'escorça frontal humana. Una possible explicació d'aquests resultats podria ser la seva relació amb el valor de l'IP i la susceptibilitat a l'oxidació. En aquest sentit, els nostres resultats mostren que l'augment de l'edat no està associat a l'augment de l'IP en l'escorça frontal humana i per tant, no s'observa un augment de la susceptibilitat lipoxidativa amb l'envelliment, fet que sembla ser clau en el manteniment dels nivells d'aquest marcador de dany lipoxidatiu en situació fisiològica. En situació patològica, però, són varis els estudis que descriuen un augment d'aquest marcador i altres marcadors de dany oxidatiu en l'escorça frontal humana en la malaltia d'Alzheimer (Pamplona et al., 2005a). Aquest fet pot ser explicat per l'alteració de l'homeòstasi i la incapacitat de mantenir uns nivells d'oxidació lipídica sota control. Per tot això es pot suggerir que MDAL és un bon marcador definint el grau d'insaturació.

Posteriorment a l'estudi de caràcter lipídic i dels possibles mecanismes implicats en la seva variació durant l'envelliment, ens hem centrat en l'estudi de les modificacions oxidatives en proteïnes produïdes com a conseqüència de l'estrès oxidatiu. El present treball és el primer estudi en el que s'analitza marcadors específics de dany oxidatiu a proteïnes en l'escorça frontal humana d'adults sans que cobreixen un rang d'edat de 43 a 86 anys (n= 41 individus). Els nostres resultats demostren que hi ha un augment de l'oxidació directa a proteïnes (marcadors SAG i SAAA) i del dany oxidatiu derivat de glicoxidació (marcadors CML i CEL) en l'escorça frontal humana en el transcurs de la vida d'un adult. Aquest augment, però, sembla ser selectiu ja que les trajectòries temporals dels marcadors derivats de la modificació no enzimàtica dels residus de cisteïna (CMC i 2-SC) es mantenen sense canvis amb l'edat. Una possible explicació per aquesta dissociació en el comportament dels diferents marcadors de dany proteic pot recaure en els mecanismes d'homeòstasi cel·lular abans de la seva formació. En aquest sentit, l'augment dels marcadors d'oxidació directa a proteïnes pot reflexar un augment de la generació de radicals lliures, i també

una disminució en l'activitat dels mecanismes de recanvi proteic; i en l'augment dels marcadors del dany proteic derivat de glicoxidació, l'augment dels nivells no només poden expressar una condició d'augment d'estrès oxidatiu i disminució en el recanvi proteic, sinó que també pot ser degut a un major nivell en el contingut de compostos carbonílics els quals actuen com a substrat per a la formació d'aquests marcadors, i al seu torn, reflexa la concentració d'hidrats de carboni que participen fonamentalment en la glucòlisi anaeròbica. En contrast, el contingut sense canvis en els marcadors derivats de la modificació de cisteïna pot ser una indicació d'una millor preservació dels residus de cisteïna i la seva funcionalitat mitjançant mecanismes de reparació específics al llarg de la vida adulta, sent aquests mecanismes absents en altres tipus de marcadors.

Estudis d'expressió gènica suggereixen que l'expressió reduïda dels gens mitocondrials és una característica conservada en l'envelliment d'organismes que van des de *C.elegans* fins als éssers humans (Yankner et al., 2008; Zahn et al., 2007). Particularment, l'anàlisi de l'envelliment cerebral ha revelat una disminució progressiva de l'expressió gènica mitocondrial en rates, macacos rhesus i éssers humans (Blalock et al., 2003; Erraji-Benchekroun et al., 2005; Loerch et al., 2008; Lu et al., 2004). Així doncs, la funció mitocondrial sembla ser una important influència moduladora sobre el procés d'envelliment en totes les espècies estudiades, probablement a causa que una disminució de la funció mitocondrial també pot contribuir a dèficits funcionals dependents de l'edat en les neurones, i consegüentment que les neurones siguin més vulnerables a les patologies relacionades amb l'edat. En aquest sentit, els nostres resultats mostren una pèrdua progressiva en el contingut dels complexos de la cadena de transport electrònic mitocondrial (de CI al CIV), i també que aquesta disminució és efectiva a partir dels 60 anys en endavant, simultàniament amb el punt d'inflexió on es produeix un augment significatiu de la taxa d'acumulació dels marcadors de dany proteic.

Un altre element important és que el temps en el que s'inicia l'envelliment del cervell no està definit. Un estudi recent va mostrar que el perfil transcripcional de l'escorça frontal humana d'individus entre 26 i 106 anys d'edat defineix un conjunt de gens amb l'expressió disminuïda després de 40 anys d'edat (Lu et al., 2004). En el present estudi, es demostra que el punt d'inflexió, *break point*, en el qual les trajectòries temporals dels marcadors de dany oxidatiu proteic i de dany derivat de glicoxidació canvien en l'escorça frontal humana expressant un augment progressiu de dany proteic és als 60 anys d'edat. No obstant això, que els *breaks points* descrits (en el perfil transcripcional als 40 anys d'edat, la composició lipídica als 50 anys d'edat, i el dany a proteïnes als 60 anys d'edat) expressin un efecte perjudicial progressiu i addicional a nivell molecular, o bé, si són vies independents del procés d'envelliment, és una pregunta que segueix sense resposta. Però és plausible postular que aquests canvis podrien representar, a partir d'un llindar donat, el substrat molecular determinant d'un canvi en la trajectòria temporal normal cap a l'inici de la malaltia d'Alzheimer.

Per què algunes persones envelleixen amb la seva funció cognitiva relativament intacta, mentre que en altres aquesta funció cognitiva disminueix i desenvolupa la malaltia d'Alzheimer és una altra qüestió clau que roman sense resposta. Però, en qualsevol cas, la preservació de les neurones i la funció cognitiva al llarg d'una vida sencera exigeix una adaptació cel·lular que implica importants mecanismes de resposta a l'estrès. En aquest context, un estudi recent va mostrar que el factor REST (també conegut com *neuron-restrictive silencing factor*, NRSF) és induït en l'envelliment del cervell humà i regula una xarxa de gens que intervenen en la mort cel·lular, en la resistència a l'estrès i en la malaltia d'Alzheimer (Lu et al., 2014). Aquesta xarxa genètica es troba desregulada en les primeres etapes de la malaltia d'Alzheimer, un cop es perd el factor REST des del nucli (Lu et al., 2014). En l'envelliment dels éssers humans, elevats nivells de REST també s'associen amb la preservació de la funció cognitiva i l'augment de la longevitat (Lu et al., 2014). Els nostres resultats confirmen aquesta observació i demostren que els nivells sostinguts de REST i la seva presència a nivell nuclear està present al llarg de la vida adulta d'humans sans. A més, l'existent correlació entre el contingut del factor REST i els marcadors d'oxidació proteica (SAG i SAAA) reforça la idea que els factors d'estrès com l'estrès oxidatiu podria ser el detonant que indueix l'expressió de REST com una resposta adaptativa. En aquest context, es pot postular que el factor REST regula una resposta a estrès neuroprotectora que és fonamental per mantenir la viabilitat neuronal i la preservació cognitiva durant l'envelliment fisiològic.

Un mecanisme addicional pot ser mediat per la via de senyalització PI3-K / Akt / mTOR. Tots els components del sistema de senyalització PI3-K / Akt / mTOR s'expressen en alts nivells en el cervell, predominantment en les neurones, i també detectables en les cèl·lules glials (O' Neill, 2013). En les neurones post-mitòtiques la integrada coordinació de les respostes neuronals a través d'aquesta via de senyalització té un impacte funcional significatiu sobre les respostes a l'estrès, la funció sinàptica i el processament cognitiu, i està involucrat en la senescència cel·lular, l'envelliment del cervell, i en les malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat (Bockaert and Marin, 2015; Garelick and Kennedy, 2011; Perluigi et al., 2015). mTOR és una serina/treonina quinasa molt conservada que regula el creixement i el metabolisme cel·lular en resposta als nutrients, als factors de creixement i a l'estat energètic cel·lular. Un elevat nombre d'estudis mostren que l'alteració en la senyalització de mTOR en el cervell afecta múltiples vies incloent el metabolisme de la glucosa, la producció energètica, la funció mitocondrial, el creixement cel·lular i l'autofàgia. Així doncs, sembla que aquests esdeveniments poden ser clau en el deteriorament cognitiu relacionat amb l'edat, així com en les malalties neurodegeneratives. De fet, la senyalització mitjançant la PI3-K / Akt / mTOR i la seva activació mitjançant IGF-1R i IR és demostrablement pertorbat en el cervell d'individus amb la malaltia d'Alzheimer en comparació amb individus control de la mateixa edat, i moltes d'aquestes mesures es correlacionen amb la gravetat de la malaltia (Griffin et al., 2005; Moloney et al., 2010; Pei and Hugon, 2008; Talbot et al., 2012). En aquesta línia, l'augment de l'activació d'Akt i la seva localització subcel·lular alterada han estat descrites en neurones corticals i

de l'hipocamp en cervells amb la malaltia d'Alzheimer (Griffin et al., 2005; Pei et al., 2003). A més, els nivells de senyalització mTOR també augmenten selectivament en les neurones predictores del desenvolupament de cabdells neurofibril·lars (Pei and Hugon, 2008). Per contra, la disminució de la senyal de mTOR, a través de la intervenció farmacològica i nutricional, augmenta la longevitat i s'associa amb una esperança de vida saludable, incloent la millora de la funció cerebral (Garelick and Kennedy, 2011; Perluigi et al., 2015). Conseqüentment, a partir dels nostres resultats podem deduir que la baixa expressió d'Akt / mTOR observada en l'envelliment de l'escorça frontal, és una adaptació fisiològica encaminada a preservar la supervivència neuronal i conferir resistència a l'estrès durant la vida adulta.

Així doncs, els resultats obtinguts ens aquest estudi ens mostren que l'escorça frontal humana presenta diferències amb l'edat a nivell de la composició en àcids grassos, disminuint especialment els AGPI, AA i DHA. Aquesta variació no sembla ser conseqüència d'una desregulació dels mecanismes implicats en la biosíntesis dels àcids grassos sinó que els resultats suggereixen que aquesta variació es pot deure a l'activació de mecanismes neuroprotectors i de supervivència per tal de pal·liar els efectes de l'augment de l'edat. No obstant això, aquests mecanismes no semblen ser suficients per evitar l'augment dels marcadors de dany oxidatiu proteic i tot apunta que els mecanismes eliminadors de les proteïnes danyades poden estar alterats en l'envelliment. Contràriament a aquest augment, altres marcadors de dany oxidatiu no s'han vist augmentats, fet que denota una activa capacitat d'auto-regulació i protecció enfront de certes modificacions proteiques. A banda d'això, però, els resultats obtinguts ens suggereixen que existeix una edat crítica, en la dècada dels 60 anys en la qual s'accentuen els canvis a nivell de composició lipídica, a nivell dels marcadors de dany oxidatiu proteic, així com canvis a nivell d'enzims implicats en estats inflamatoris, neuroprotectors i de supervivència. Aquesta edat crítica és concentrada en la dècada dels 60 anys. Aquestes dades fisiològiques es veuen reforçades amb els canvis cognitius en humans descrits per Lindenberg (Lindenberger, 2014). Lindenberger, suggereix que tot i que els estudis mostren que la pèrdua cognitiva és progressiva amb l'augment de l'edat, canvis en les interaccions organisme-medi ambient durant l'edat adulta mouen l'estat cognitiu de l'individu cap a una trajectòria més positiva i és entre la dècada dels 60 i 70 anys quan s'observa aquest manteniment dels nivells cognitius. Així doncs, sembla que la dècada dels 60 anys en el SNC humà, justament la meitat de la longevitat màxima humana -122 anys-, és clau per a l'envelliment.



#### **10.4. Estudi de l'efecte de la restricció en metionina en l'envelliment del sistema nerviós central en un model experimental**

La RC, sense malnutrició, és la intervenció experimental no genètica més ben coneguda, capaç de disminuir la taxa d'envelliment, augmentar la longevitat màxima de moltes espècies i retardar l'aparició de malalties degeneratives (Barger et al., 2003; Pamplona and Barja, 2011, 2007, 2006). Malgrat que els mecanismes a través dels quals exerceix els seus efectes no estan clars, nombrosos estudis han demostrat que la RC és capaç de disminuir la producció mitocondrial de radicals lliures i el dany oxidatiu a macromolècules (Sanz et al., 2006d) i que aquests canvis poden ser produïts per la restricció de proteïnes independentment de la restricció calòrica (Ayala et al., 2007; Sanz et al., 2004) però no per la restricció de lípids (Sanz et al., 2006b) ni de carbohidrats (Sanz et al., 2006c).

Amb l'objectiu d'intentar esbrinar el component proteic responsable de la disminució de l'estrès oxidatiu mitocondrial durant la RC i RP, ens hem centrat amb l'aminoàcid metionina ja que nombrosos estudis identifiquen aquest aminoàcid com un agent clau en l'envelliment. De fet, diversos estudis confirmen que la RMet isocalòrica incrementa la longevitat de rata i ratolí (Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Sun et al., 2009), de forma similar a com ho fa la RP (Barrows and Kokkonen, 1975; Goodrick, 1978; Leto et al., 1976; Ross, 1976), tot i que en tots dos casos sembla que únicament són responsables d'aproximadament la meitat dels efectes de prolongació de la longevitat de la RC. Ara bé, la ingesta excessiva de metionina en la dieta és tòxica i aquesta toxicitat és molt més elevada que la produïda per qualsevol altre aminoàcid (Harper et al., 1970) provocant danys a òrgans vitals i incrementant l'estrès oxidatiu en nombrosos teixits (Gomez et al., 2009; Mori and Hirayama, 2000; Park et al., 2008). De fet, la metionina és un dels aminoàcids de les proteïnes més susceptibles a l'oxidació per radicals lliures (Moskovitz et al., 2001) i s'han obtingut evidències que el contingut en metionina de les proteïnes està inversament relacionat amb la longevitat màxima en mamífers (Pamplona et al., 2005b; Ruiz et al., 2005).

Així doncs, els efectes positius de la RMet isocalòrica sobre l'estrès oxidatiu i la longevitat han estat evidenciats en diversos estudis. Tot i que molt menys nombrosos, també són interessants els estudis en els que la RMet s'ha aplicat a edats avançades per tal de valorar si els seus efectes beneficiosos també es poden instaurar a aquestes edats, o bé si els efectes deleteris de l'envelliment resulten ja irreversibles. En aquest sentit, Sun i col·laboradors (Sun et al., 2009) i Sánchez-Roman i col·laboradors (Sanchez-Roman et al., 2012) han evidenciat que la RMet al 65 % i 40 % respectivament, iniciada en edats avançades (12 i 24 mesos respectivament) són capaces d'incrementar la longevitat en ratolins i mantenen la capacitat de reduir la producció de radicals lliures i consegüentment disminuir el dany oxidatiu en fetge de rata, tot i que en menor mesura que quan s'inicia a edats més primerenques i la restricció és del 80 % (Caro et al., 2008a; Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Sanz et al., 2006a). D'altra banda, els efectes

positius d'aquesta intervenció s'han observat sempre en una restricció a llarg termini (mínim un any) i depenent del teixit a curt o mig termini (de 6 setmanes a 6 mesos) (Gredilla and Barja, 2005; Pamplona and Barja, 2006). En base a aquests estudis, les evidències suggereixen que existeix un major efecte sobre la longevitat quan major és el temps de restricció, de manera que es postula que la reducció de la generació de radicals lliures pot ser el mecanisme a través del qual aquesta intervenció incrementa la longevitat. Això s'explicaria donat que quan menor és el temps de restricció, menor és el període de temps en el que la producció mitocondrial de ROS es troba reduïda i major és el dany que pot estar generant-se.

D'altra banda, a més dels seus efectes sobre la longevitat, la RMet isocalòrica també disminueix la incidència de malalties degeneratives associades a l'edat i comporta nombrosos efectes beneficiosos, tals com una reprogramació fisiològica del metabolisme tant a nivell tissular com cel·lular, similars als observats en animals sotmesos a RC. En aquest sentit, nombrosos estudis han descrit que la RMet del 80 % disminueix el pes corporal i indueix canvis en la funció endocrina que condueixen a una disminució dels nivells sanguinis de glucosa, insulina, IGF-1, colesterol, triglicèrids i leptina, així com a un augment dels nivells d'adiponectina (Caro et al., 2008a; Malloy et al., 2006; Perrone et al., 2013, 2010). I de fet, els resultats del nostre estudi demostren que aquests canvis en la funció endocrina de la dieta també es produeixen en l'aplicació de RMet del 80 % en rates de 26 mesos d'edat en una intervenció curta (7 setmanes). Els resultats mostren que es produeix una disminució significativa del pes corporal, dels nivells plasmàtics de triglicèrids i leptina, i un augment significatiu dels nivells d'adiponectina. Tanmateix, en el nostre estudi s'ha observat que la RMet del 80 % evita que els nivells de colesterol augmentin amb l'edat. Contràriament a les evidències citades anteriorment, però, els resultats obtinguts en el present estudi no mostren cap variació significativa en els nivells de glucosa entre rates adultes, velles i velles amb RMet, fet que suggereix que hi ha un correcte funcionament de l'homeòstasi de la glucosa en totes les rates estudiades. Així doncs, aquests resultats obtinguts de l'estat endocrí suggereixen que la RMet contribueix a una major resistència del sistema nerviós enfront a l'estrès oxidatiu.

A banda d'això, el nostre estudi dona un pas més enllà en l'anàlisi dels paràmetres bioquímics i mostra que en les rates velles amb RMet els nivells plasmàtics de proteïna total i d'albúmina són significativament inferiors respecte les rates adultes control i les rates velles control. De fet, Elshorbagy i col·laboradors (Elshorbagy et al., 2011) ja van evidenciar, en rates de 4 setmanes d'edat i una RMet del 80 %, que la RMet disminuïa els nivells plasmàtics de proteïna total i d'albúmina respecte les rates control. Malgrat aquestes evidències, Elshorbagy i col·laboradors no discuteixen aquest apartat en el seu estudi. Contràriament a aquest fet, nosaltres en un inici pensàvem que aquestes dades, juntament amb les adaptacions metabòliques descrites en l'apartat anterior, podien suggerir que les rates velles alimentades amb RMet del 80 % es trobaven en un estat catabòlic i amb una possible desnutrició. No obstant això, la recerca que avalés aquesta

hipòtesis ens ha permès reconduir el que suggereixen aquests resultats, i es que els nivells fisiològics i patològics dels valors de proteïna total i d'albumina en rata no han estat determinats, fet que ens porta a pensar que aquests nivells poden ser els òptims per a l'augment de la longevitat i la disminució de malalties relacionades amb l'edat. Ara bé, són necessaris més estudis per tal de comprovar l'estat fisiològic de les rates.

Un altre punt important en aquest estudi ha estat l'anàlisi lipídica ja que un estudi recent en el que s'investiguen els canvis genètics induïts per aquesta intervenció nutricional demostra que entre els nombrosos gens que es veuen modificats per la intervenció nutricional, destaquen els canvis en els enzims responsables de la composició lipídica, fet que posa de manifest com aquesta intervenció també pot estar actuant a través de la composició lipídica de les membranes cel·lulars (Perrone et al., 2012). En aquest context, resultats previs obtinguts en el nostre grup descriuen que una RMet del 80 % aplicada durant 6 mesos en ratolins induïx canvis en el perfil lipídica de forma similar en el cervell i la medul·la espinal, fet que suggereix un efecte específic de la restricció de metionina sobre el perfil lipídica del sistema nerviós, i de forma diferent sobre el teixit hepàtic. Els canvis descrits en aquests tres teixits després de la RMet es basen en modificacions de fosfolípids específics, esfingolípids i la ubiquinona 9, i es descriuen com a respostes adaptatives de la composició de la membrana lipídica amb el fi d'incrementar la resistència a l'estrès oxidatiu (Jové et al., 2013). Així doncs, en el present estudi es va voler estudiar si una RMet del 80 % aplicada en rates velles durant un període curt (7 setmanes) era capaç de modificar els canvis produïts en termes de composició lipídica i per tant, del grau de susceptibilitat, produïts durant l'envelliment en diferents regions del SNC de rata. Específicament, els resultats obtinguts mostren que la composició en àcids grassos varia depenent de la regió del cervell que analitzem, així com la resposta a la restricció de metionina sembla ser regió-específica. No obstant això, els resultats obtinguts mostren que poques són les diferències significatives durant l'envelliment entre les rates adultes i les rates velles estudiades, i consegüentment els resultats obtinguts en la comparació entre les rates velles amb RMet i les rates adultes i velles control no mostren una reversió dels canvis esperats durant l'envelliment de les rates sinó que, els resultats de les rates velles alimentades amb una dieta RMet o no mostren variació o bé mostren una accentuació dels canvis que es produeixen en les rates velles control respecte les adultes. És a dir, les modificacions observades en les rates amb RMet no s'associen a un retorn al perfil mostrat per les rates adultes, sinó que les rates RMet segueixen la mateixa tendència que les rates velles i en certes regions la RMet, tals com l'estriat o l'escorça occipital, accentua els canvis en la composició dels àcids grassos que s'observen en les rates envellides. Així doncs, aquestes dades suggereixen que a nivell de la composició en àcids grassos de les membranes de diferents regions del SNC de rata sembla que la intervenció de la restricció no ha estat aplicada el suficient temps per canviar el perfil lipídica, tal i com s'observa en l'estudi realitzat prèviament en el nostre laboratori (Jové et al., 2013).

Posteriorment a l'estudi de la composició dels àcids grassos, ens hem centrat en l'estudi de les modificacions oxidatives en proteïnes. En aquest sentit existeixen evidències de què una restricció del 40 % en metionina aplicada en rates de 24 mesos d'edat durant un període curt (7 setmanes) és capaç de reduir la producció de radicals lliures i els nivells de dany oxidatiu mitocondrial acompanyats pel descens generalitzat dels marcadors de modificació proteica en el fetge (Sanchez-Roman et al., 2012), de manera similar al que ja s'havia demostrat en rates joves (Caro et al., 2009b, 2008a; Sanchez-Roman and Barja, 2013). Comparablement a aquestes evidències, els resultats obtinguts en el present estudi mostren com el fetge, utilitzat com a òrgan control, presenta un descens significatiu dels nivells dels marcadors GSA i CEL en les rates velles RMet respecte els altres grups, fet que reforça les evidències observades en l'estudi anterior (Sanchez-Roman et al., 2012). No obstant això, els resultats obtinguts en el fetge del present estudi no han estat mantinguts a nivell de les diferents regions dels SNC de rata. De forma generalitzada podem observar que els nivells dels marcadors de modificació proteica són diferents en cada regió del SNC de rata i l'efecte de la RMet del 80 % aplicada en un període curt (7 setmanes) no sembla disminuir en cap regió els nivells dels marcadors estudiats, especialment en MDAL, CML i 2-SC, respecte les rates velles control. Ara bé, si que s'ha observat una disminució dels nivells de GSA i CEL en el grup de rates velles amb RMet en la medulla lumbar i l'hipocamp, respectivament. Malgrat això, però, els resultats obtinguts suggereixen, de la mateixa manera que en l'anàlisi de la composició en àcids grassos, que la RMet no ha fet cap tipus d'efecte a nivell del SNC de rata i sembla que malgrat ser una RMet intensa, un període de 7 setmanes és curt per arribar a observar canvis en la composició d'àcids grassos de les membranes i en els nivells de dany oxidatiu a nivell cerebral, tal i com s'ha vist en cervell de rates i ratolins joves (Caro et al., 2008a; Jové et al., 2013; Naudí et al., 2007) i en altres òrgans (Sanchez-Roman et al., 2012).

Així doncs, els nostres resultats demostren que les rates velles són capaces de respondre a la restricció de metionina mitjançant una adaptació metabòlica a nivell plasmàtic, la qual sembla contribuir a una major resistència enfront a l'estrès oxidatiu. No obstant això, els resultats suggereixen que la durada del tractament no ha estat suficient per tal d'induir els canvis, documentats per Caro i col·laboradors en cervell total (Caro et al., 2009b), en termes de composició lipídica i en els nivells dels marcadors de dany oxidatiu en les diferents regions dels SNC. Per tant, són necessaris més estudis per tal d'elucidar si la intervenció nutricional és més efectiva si s'aplica durant més temps i alhora aclarir si la RMet del 80 % aplicada en rates velles pot tenir alguna repercussió nutricional.



## **CONCLUSIONS**



## 11. CONCLUSIONS

1. El SNC humà adult presenta diferències interregionals a nivell del perfil composicional en àcids grassos de les membranes lipídiques especialment en el contingut d'AGMI, AGPI n-6 i AGPI n-3. Aquests canvis s'expressen de forma diferencial en un eix caudo-cranial, sent la regió de la medulla cervical la regió amb nivells més elevats d'AGMI i l'escorça frontal la regió amb els nivells més baixos. Aquestes diferències interregionals s'adscriuen a les diferències interregionals dels mecanismes responsables de la síntesis dels àcids grassos, i es suggereix l'existència de mecanismes de regulació regió-específics que s'expressen de forma diferencial en un eix caudo-cranial.
2. Les diferències interregionals en el contingut d'AGPI n-3 descrits en el SNC humà adult, s'adcriuen majoritàriament a importants canvis interregionals en el contingut de DHA. La rellevància d'aquest àcid gras explica la presència a nivell neuronal dels mecanismes necessaris per a la seva biosíntesis i la seva capacitat de mantenir activament el seu propi perfil composicional en àcids grassos, per a la seva adaptació a les diferents necessitats en cada una de les regions.
3. Seguint un eix caudo-cranial de les regions del SNC estudiades existeix un augment de la susceptibilitat a l'oxidació. Malgrat això, els nivells de dany proteic derivat de lipoxidació són els més baixos en les regions més cranials indicant que existeixen eficaços mecanismes de regulació de la lesió lipoxidativa a nivell neuronal (Nrf2) i una alta capacitat d'adaptació del teixit a les seves necessitats, reduint el nivell basal del dany oxidatiu.
4. L'escorça entorrinal, l'hipocamp i l'escorça frontal tenen un perfil metabòlic regió específic, en el que s'observa una major proximitat metabòlica entre les regions de l'escorça entorrinal i l'hipocamp respecte l'escorça frontal. En aquest sentit, l'escorça frontal humana presenta un augment de la densitat neuronal, juntament amb una disminució concomitant de les cèl·lules de la glia en comparació amb les regions de l'escorça entorrinal i l'hipocamp, fet que suggereix que l'escorça frontal té una menor demanda metabòlica respecte les altres dues regions.
5. Les concentracions de metabòlits relacionats amb rutes bioenergètiques i del metabolisme d'un carboni (particularment restringit al cicle de la metionina) són menors en l'escorça frontal respecte l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Aquestes troballes, juntament amb una disminució de les modificacions post-traduccionals com és la succinació, una millor capacitat antioxidant i un menor nivell de senyalització via mTOR també en l'escorça frontal suggereixen que aquesta regió del cervell té un perfil metabòlic neuroprotector i és especialment resistent a l'estrès en comparació a l'escorça entorrinal i l'hipocamp.



6. L'escorça frontal humana presenta alteracions en el perfil composicional en àcids grassos de les membranes lipídiques especialment disminuint el contingut en AGPI, AA i DHA, associades amb l'edat. Aquesta variació no sembla ser conseqüència d'una desregulació dels mecanismes implicats en la biosíntesis dels àcids grassos sinó que els resultats obtinguts suggereixen que aquesta variació es pot deure a l'activació de mecanismes antiinflamatoris i neuroprotectors, tals com el citocrom p450 generador d'epoxigenases a partir del metabolisme del DHA, per tal de pal·liar els efectes de l'augment de l'edat.

7. L'envelliment de l'escorça frontal humana s'associa a un augment del dany oxidatiu proteic i derivat de glicoxidació. Aquest augment és coincident amb una disminució en el contingut dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (del I al IV). A més, els nostres resultats suggereixen que el deteriorament de l'homeòstasi de l'estrès oxidatiu durant l'envelliment indueix una resposta d'adaptació dels mecanismes de resistència a estrès en base a una expressió sostinguda del factor neuroprotector REST, i la disminució de contingut d'Akt i mTOR al llarg de la vida adulta per tal de preservar la funció neuronal cel·lular.

8. Als 60 anys d'edat es produeix un punt d'inflexió *-break point-* en el qual les trajectòries temporals del dany oxidatiu proteic i derivat de glicoxidació, així com canvis a nivell d'enzims implicats en estats anti-inflamatoris, neuroprotectors i de supervivència, canvien en l'escorça frontal humana expressant un augment progressiu de dany proteic.

9. Les rates velles (26 mesos) són capaces de respondre a una restricció de metionina del 80 % a curt plaç mitjançant una adaptació metabòlica a nivell plasmàtic i hepàtic, la qual sembla contribuir a una major resistència enfront a l'estrès oxidatiu.

10. Regions del SNC de rates velles (26 mesos) no mostren canvis respecte a rates d'edat adulta (8 mesos) a nivell del perfil composicional en àcids grassos de les membranes lipídiques i dels marcadors de dany oxidatiu proteic i dany proteic derivat de glico i lipoxidació.

11. Una restricció de metionina del 80 % a curt plaç aplicada en rates velles (26 mesos) no mostra canvis en el perfil composicional en àcids grassos de les membranes lipídiques en les diferents regions del SNC de rata, i tampoc en els nivells dels marcadors de dany oxidatiu proteic i dany proteic derivat de glico i lipoxidació.

## **REFERÈNCIES**



## 12. REFERÈNCIES

### -A-

- Abelaira, H.M., Réus, G.Z., Neotti, M. V, Quevedo, J., 2014. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sci.* 101, 10–4.
- Aiello, L.C., Wheeler, P., 1995. The expensive-tissue hypothesis: The brain and the digestive system in human and primate evolution. *Curr. Anthropol.* 36, 199–221.
- Ando, S., Chang, N.C., Yu, R.K., 1978. High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. *Anal. Biochem.* 89, 437–50.
- Ansoleaga, B., Jové, M., Schlüter, A., Garcia-Esparcia, P., Moreno, J., Pujol, A., Pamplona, R., Portero-Otín, M., Ferrer, I., 2015. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 68–80.
- Ayala, V., Naudí, A., Sanz, A., Caro, P., Portero-Otín, M., Barja, G., Pamplona, R., 2007. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *Journals Gerontol. A, Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 352–360.

### -B-

- Barger, J.L., Walford, R.L., Weindruch, R., 2003. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp. Gerontol.* 38, 1343–51.
- Barja, G., 2013. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1420–45.
- Barja, G., 2007. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* 10, 215–224.
- Barja, G., 2004. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27, 595–600.
- Barja, G., 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 347–366.
- Barja, G., 1993. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic. Res. Commun.* 18, 63–70.
- Barrows, C.H., Kokkonen, G., 1975. Protein synthesis, development, growth and life span. *Growth* 39, 525–33.
- Baynes, J.W., Monnier, V.M., 1989. *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*, 1st ed. New York.
- Bazan, N.G., Molina, M.F., Gordon, W.C., 2011. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 321–351.
- Berchtold, N.C., Cribbs, D.H., Coleman, P.D., Rogers, J., Head, E., Kim, R., Beach, T., Miller, C., Troncoso, J., Trojanowski, J.Q., Zielke, H.R., Cotman, C.W., 2008. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15605–10.
- Bielski, B.H., Arudi, R.L., Sutherland, M.W., 1983. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258, 4759–4761.

- Bishop, N.A., Lu, T., Yankner, B.A., 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535.
- Bjelland, S., Seeberg, E., 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 531, 37–80.
- Blalock, E.M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J.P., Porter, N.M., Foster, T.C., Landfield, P.W., 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J. Neurosci.* 23, 3807–19.
- Bockaert, J., Marin, P., 2015. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol. Rev.* 95, 1157–87.
- Bomfim, T.R., Forny-Germano, L., Sathler, L.B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.-C., Decker, H., Silverman, M.A., Kazi, H., Melo, H.M., McClean, P.L., Holscher, C., Arnold, S.E., Talbot, K., Klein, W.L., Munoz, D.P., Ferreira, S.T., De Felice, F.G., 2012. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *J. Clin. Invest.* 122, 1339–53.
- Brand, M.D., Buckingham, J.A., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Murphy, M.P., Pakay, J.L., Talbot, D.A., Echtay, K.S., 2004. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem. Soc. Symp.* 203–213.
- Brand, M.D., Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Roebuck, S.J., Buckingham, J.A., Clapham, J.C., Cadenas, S., 2002. Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J.* 368, 597–603.
- Brigelius-Flohé, R., 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol. Chem.* 387, 1329–35.
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr.* 136, 1636S–1640S.
- Burger, M., Seidel, K., 1958. [Chemical biomorphosis of the human brain and sciatic nerve; a survey]. *Z. Alternsforsch.* 12, 52–79.
- Burke, S.N., Barnes, C.A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.
- C-**
- Cáceres, M., Lachuer, J., Zapala, M.A., Redmond, J.C., Kudo, L., Geschwind, D.H., Lockhart, D.J., Preuss, T.M., Barlow, C., 2003. Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13030–5.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A.T., Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2010. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1763–811.
- Calkins, M.J., Johnson, D.A., Townsend, J.A., Vargas, M.R., Dowell, J.A., Williamson, T.P., Kraft, A.D., Lee, J.-M., Li, J., Johnson, J.A., 2009. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 497–508.
- Cantero, A.-V., Portero-Otín, M., Ayala, V., Auge, N., Sanson, M., Elbaz, M., Thiers, J.-C., Pamplona, R., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., 2007. Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J.* 21, 3096–106.
- Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., Naudí, A., Jove, M., Pamplona, R., Barja, G., 2008a. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9, 183–196.

- Caro, P., Gómez, J., López-Torres, M., Sánchez, I., Naudí, A., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Barja, G., 2008b. Effect of every other day feeding on mitochondrial free radical production and oxidative stress in mouse liver. *Rejuvenation Res.* 11, 621–629.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Garcia, R., Lopez-Torres, M., Naudí, A., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009a. Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 10, 579–592.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudí, A., Ayala, V., López-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009b. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res.* 12, 421–434.
- Carver, J.D., Benford, V.J., Han, B., Cantor, A.B., 2001. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res. Bull.* 56, 79–85.
- Casañas-Sánchez, V., Pérez, J.A., Fabelo, N., Quinto-Aleman, D., Díaz, M.L., 2015. Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. *Front. Physiol.* 6, 203.
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1–11.
- Chen, C.T., Bazinet, R.P., 2015.  $\beta$ -oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 92, 33–40.
- Chen, G.G., Turecki, G., Mamer, O.A., 2009. A quantitative GC-MS method for three major polyamines in postmortem brain cortex. *J. Mass Spectrom.* 44, 1203–10.
- Chen, L., Richardson, J.S., Caldwell, J.E., Ang, L.C., 1994. Regional brain activity of free radical defense enzymes in autopsy samples from patients with Alzheimer's disease and from nondemented controls. *Int. J. Neurosci.* 75, 83–90.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201–4.
- Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., Bornkamm, G.W., 2007. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biol. Chem.* 388, 1019–25.
- Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246, 24–33.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., Puigserver, P., 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450, 736–40.
- Currais, A., 2015. Ageing and inflammation - A central role for mitochondria in brain health and disease. *Ageing Res. Rev.* 21, 30–42.
- D-**
- Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., Ferrer, I., 2005. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 816–30.
- Das, U.N., 2013. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in the pathobiology of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 42, 122–34.

- Dazert, E., Hall, M.N., 2011. mTOR signaling in disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 744–55.
- De Rezende, M.M., D’Almeida, V., 2014. Central and systemic responses to methionine-induced hyperhomocysteinemia in mice. *PLoS One* 9, e105704.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, (Pt 1):1–18.
- Declaration of Helsinki, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310, 2191–4.
- Del Arco, A., Segovia, G., de Blas, M., Garrido, P., Acuña-Castroviejo, D., Pamplona, R., Mora, F., 2011. Prefrontal cortex, caloric restriction and stress during aging: studies on dopamine and acetylcholine release, BDNF and working memory. *Behav. Brain Res.* 216, 136–45.
- Diano, M., D’Agata, F., Cauda, F., Costa, T., Geda, E., Sacco, K., Duca, S., Torta, D.M., Geminiani, G.C., 2015. Cerebellar Clustering and Functional Connectivity During Pain Processing. *Cerebellum*. doi:10.1007/s12311-015-0706-4
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105–12.
- Dobrosotskaya, I.Y., Seegmiller, A.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Rawson, R.B., 2002. Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* 296, 879–83.
- Dowhan, W., 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66, 199–232.
- Dowling, D.K., Simmons, L.W., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1737–45.
- E-**
- Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22, 4103–10.
- Efeyan, A., Comb, W.C., Sabatini, D.M., 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302–310.
- Elshorbagy, A.K., Valdivia-Garcia, M., Mattocks, D.A.L., Plummer, J.D., Smith, A.D., Drevon, C.A., Refsum, H., Perrone, C.E., 2011. Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearyl-coenzyme A desaturase. *J. Lipid Res.* 52, 104–12.
- Embley, T.M., Martin, W., 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623–630.
- Erraji-Benchekroun, L., Underwood, M.D., Arango, V., Galfalvy, H., Pavlidis, P., Smyrniotopoulos, P., Mann, J.J., Sibille, E., 2005. Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol. Psychiatry* 57, 549–58.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128.
- Evans, S.J., Choudary, P. V., Vawter, M.P., Li, J., Meador-Woodruff, J.H., Lopez, J.F., Burke, S.M., Thompson, R.C., Myers, R.M., Jones, E.G., Bunney, W.E., Watson, S.J., Akil, H., 2003. DNA microarray analysis of functionally discrete human brain regions reveals divergent transcriptional profiles. *Neurobiol. Dis.* 14, 240–50.

**-F-**

- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S., 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 637–47.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., Dennis, E.A., 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839–61.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., Dennis, E.A., 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S9–14.
- Farooqui, A.A., 2009. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling, and association with neurological disorders. *Neuroscientist* 15, 392–407.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P.A., Zhang, Z., Reddy, J.K., Spector, A.A., Wanders, R.J., 2001. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 42, 1987–95.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2012. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 443, 3–11.
- Ferrer, I., 2015. Selection of controls in the study of human neurodegenerative diseases in old age. *J. Neural Transm.* 122, 941–7.
- Ferrer, I., 2009a. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 425–31.
- Ferrer, I., 2009b. Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Prog. Neurobiol.* 88, 89–103.
- Ferrer, I., Martinez, A., Boluda, S., Parchi, P., Barrachina, M., 2008. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank.* 9, 181–94.
- Folch, J., Lees, M., Sloane stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fontana, L., Klein, S., Holloszy, J.O., 2010. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr).* 32, 97–108.
- Fourcade, S., López-Erauskin, J., Galino, J., Duval, C., Naudi, A., Jove, M., Kemp, S., Villarroya, F., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Pujol, A., 2008. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1762–73.
- Fraser, T., Tayler, H., Love, S., 2010. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 35, 503–13.
- Fritz, K.S., Petersen, D.R., 2013. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 59, 85–91.
- Fu, X., Giavalisco, P., Liu, X., Catchpole, G., Fu, N., Ning, Z.-B., Guo, S., Yan, Z., Somel, M., Paabo, S., Zeng, R., Willmitzer, L., Khaitovich, P., 2011. Rapid metabolic evolution in human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6181–6186.
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871–5.



Funk, C.D., Cyrus, T., 2001. 12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 11, 116–24.

**-G-**

Gamliel, A., Afri, M., Frimer, A.A., 2008. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1394–405.

Garelick, M.G., Kennedy, B.K., 2011. TOR on the brain. *Exp. Gerontol.* 46, 155–63.

Ghidoni, R., Sonnino, S., Tettamanti, G., Baumann, N., Reuter, G., Schauer, R., 1980. Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid. *J. Biol. Chem.* 255, 6990–5.

Giannakopoulos, P., Gold, G., Michel, J.P., Bouras, C., 1998. Cellular vulnerability in brain aging and Alzheimer's disease. Clinical correlates and molecular background. *Ann. Med. Interne (Paris)*. 149, 187–191.

Gomez, J., Caro, P., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 309–321.

Gomez, J., Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Sanchez, C., Suarez, H., Lopez-Torres, M., Barja, G., 2011. Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 377–86.

Goodrick, C.L., 1978. Body weight increment and length of life: the effect of genetic constitution and dietary protein. *J. Gerontol.* 33, 184–90.

Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713–3717.

Gredilla, R., Barja, G., López-Torres, M., 2001a. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 279–287.

Gredilla, R., López-Torres, M., Barja, G., 2002. Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc. Res. Tech.* 59, 273–7.

Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M., Barja, G., 2001b. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 15, 1589–91.

Griffin, R.J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J.A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R., O'Neill, C., 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J. Neurochem.* 93, 105–17.

Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49, 186–99.

**-H-**

Hagopian, K., Chen, Y., Simmons Domer, K., Soo Hoo, R., Bentley, T., McDonald, R.B., Ramsey, J.J., 2011. Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in mitochondrial subpopulations from mouse liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 227–36.

Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31, 261–72.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Han, X., 2007. Neurolipidomics: challenges and developments. *Front. Biosci.* 12, 2601–15.
- Hannover, A., 1843. Mikroskopiske undersøgelser af nervesystemet. Kgl Danske Vidensk Kabernes Selskobs Naturv Marth Afh.
- Harizi, H., Corcuff, J.-B., Gualde, N., 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 14, 461–9.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 145–147.
- Harper, A.E., Benevenga, N.J., Wohlhueter, R.M., 1970. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50, 428–558.
- Harper, S., 2014. Economic and social implications of aging societies. *Science* 346, 587–91.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E., Miller, R.A., 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–5.
- Hastie, T.J., Tibshirani, R.J., 1990. *Generalized Additive Models*. CRC Press.
- Haverkamp, J., Veh, R.W., Sander, M., Schauer, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.G., 1977. Demonstration of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid in brain gangliosides from various vertebrates including man. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* 358, 1609–12.
- Hawrylycz, M.J., Lein, E.S., Guillozet-Bongaarts, A.L., Shen, E.H., Ng, L., Miller, J.A., van de Lagemaat, L.N., Smith, K.A., Ebbert, A., Riley, Z.L., Abajian, C., Beckmann, C.F., Bernard, A., Bertagnoli, D., Boe, A.F., Cartagena, P.M., Chakravarty, M.M., Chapin, M., Chong, J., Dalley, R.A., Daly, B.D., Dang, C., Datta, S., Dee, N., Dolbeare, T.A., Faber, V., Feng, D., Fowler, D.R., Goldy, J., Gregor, B.W., Haradon, Z., Haynor, D.R., Hohmann, J.G., Horvath, S., Howard, R.E., Jeromin, A., Jochim, J.M., Kinnunen, M., Lau, C., Lazarz, E.T., Lee, C., Lemon, T.A., Li, L., Li, Y., Morris, J.A., Overly, C.C., Parker, P.D., Parry, S.E., Reding, M., Royall, J.J., Schulkin, J., Sequeira, P.A., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Sodt, A.J., Sunkin, S.M., Swanson, B.E., Vawter, M.P., Williams, D., Wohnoutka, P., Zielke, H.R., Geschwind, D.H., Hof, P.R., Smith, S.M., Koch, C., Grant, S.G.N., Jones, A.R., 2012. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489, 391–9.
- Heilbronn, L.K., de Jonge, L., Frisard, M.I., DeLany, J.P., Larson-Meyer, D.E., Rood, J., Nguyen, T., Martin, C.K., Volaufova, J., Most, M.M., Greenway, F.L., Smith, S.R., Deutsch, W.A., Williamson, D.A., Ravussin, E., 2006. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 295, 1539–48.
- Hermansson, M., Hokynar, K., Somerharju, P., 2011. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 50, 240–57.
- Higdon, A., Diers, A.R., Oh, J.Y., Landar, A., Darley-Usmar, V.M., 2012. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem. J.* 442, 453–464.
- Hirst, J., King, M.S., Pryde, K.R., 2008. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 976–980.
- Holloszy, J.O., Fontana, L., 2007. Caloric restriction in humans. *Exp. Gerontol.* 42, 709–12.
- Holman, R.T., 1954. Autoxidation of Fats and Related Substances, in: Holman, R.T., Lundberg, W.O., Malkin, T. (Eds.), *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*. Pergamon Press, London, pp. 51–98.
- Horáková, M., Deyl, Z., Hausmann, J., Macek, K., 1988. The effect of low protein-high dextrin diet and subsequent food restriction upon life prolongation in Fischer 344 male rats. *Mech. Ageing Dev.* 45, 1–7.

Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87, 1175–213.

**-I-**

Igarashi, M., DeMar, J.C., Ma, K., Chang, L., Bell, J.M., Rapoport, S.I., 2007. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation. *J. Lipid Res.* 48, 1150–8.

Igarashi, M., Ma, K., Gao, F., Kim, H.-W., Rapoport, S.I., Rao, J.S., 2011. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J. Alzheimers. Dis.* 24, 507–17.

Ilieva, E. V., Ayala, V., Jové, M., Dalfó, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M.J., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otín, M., 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 130, 3111–3123.

Ilieva, E. V., Kichev, A., Naudí, A., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otín, M., 2011. Mitochondrial dysfunction and oxidative and endoplasmic reticulum stress in argyrophilic grain disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 253–63.

Liff, J.J., Jia, J., Nelson, J., Goyagi, T., Klaus, J., Alkayed, N.J., 2010. Epoxyeicosanoid signaling in CNS function and disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 68–84.

Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 145–169.

Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J., Yu, B.P., 1988. 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.* 43, B13–21.

**-J-**

Jang, Y.C., Liu, Y., Hayworth, C.R., Bhattacharya, A., Lustgarten, M.S., Muller, F.L., Chaudhuri, A., Qi, W., Li, Y., Huang, J.-Y., Verdin, E., Richardson, A., Van Remmen, H., 2012. Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD. *Aging Cell* 11, 770–82.

Jové, M., Ayala, V., Ramírez-Núñez, O., Naudí, A., Cabré, R., Spickett, C.M., Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2013. Specific lipidome signatures in central nervous system from methionine-restricted mice. *J. Proteome Res.* 12, 2679–89.

Jové, M., Portero-Otín, M., Naudí, A., Ferrer, I., Pamplona, R., 2014. Metabolomics of Human Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 640–57.

**-K-**

Kaduce, T.L., Chen, Y., Hell, J.W., Spector, A.A., 2008. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 105, 1525–35.

Kahma, K., Brotherus, J., Haltia, M., Renkonen, O., 1976. Low and moderate concentrations of lysobisphosphatidic acid in brain and liver of patients affected by some storage diseases. *Lipids* 11, 539–44.

Kalani, A., Kamat, P.K., Givvimani, S., Brown, K., Metreveli, N., Tyagi, S.C., Tyagi, N., 2014. Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid. *J. Mol. Neurosci.* 52, 202–15.

- Kastman, E.K., Willette, A.A., Coe, C.L., Bendlin, B.B., Kosmatka, K.J., McLaren, D.G., Xu, G., Canu, E., Field, A.S., Alexander, A.L., Voytko, M. Lou, Beasley, T.M., Colman, R.J., Weindruch, R.H., Johnson, S.C., 2010. A calorie-restricted diet decreases brain iron accumulation and preserves motor performance in old rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 30, 7940–7.
- Keleshian, V.L., Modi, H.R., Rapoport, S.I., Rao, J.S., 2013. Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade, and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex. *J. Neurochem.* 125, 63–73.
- Keller, J.N., Gee, J., Ding, Q., 2002. The proteasome in brain aging. *Ageing Res. Rev.* 1, 279–93.
- Khaitovich, P., Muetzel, B., She, X., Lachmann, M., Hellmann, I., Dietzsch, J., Steigele, S., Do, H.-H., Weiss, G., Enard, W., Heissig, F., Arendt, T., Nieselt-Struwe, K., Eichler, E.E., Pääbo, S., 2004. Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. *Genome Res.* 14, 1462–1473.
- Khorakova, M., Deil, Z., Khausman Dzh, Matsek, K., [Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats]. *Fiziol. Zh.* 36, 16–21.
- Kim, H.-Y., 2007. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *J. Biol. Chem.* 282, 18661–5.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368, 545–53.

**-L-**

- Lam, Y.A., Pickart, C.M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R.J., Layfield, R., 2000. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9902–6.
- Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Merry, B.J., 2004. Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech. Ageing Dev.* 125, 529–538.
- Lane, N., 2002. *Oxygen: The Molecule that made the World.* Oxford University Press, Oxford, England.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jørgensen, M.H., Michaelsen, K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* 40, 1–94.
- Ledesma, M.D., Martin, M.G., Dotti, C.G., 2012. Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog. Lipid Res.* 51, 23–35.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th . ed. WH Freeman, US.
- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.-M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.-W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramee, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit,

- K., Shapovalova, N. V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.-R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., Jones, A.R., 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–76.
- Lenaz, G., 2012. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 93–136.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.-S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43, 36–54.
- Leto, S., Kokkonen, G.C., Barrows, C.H., 1976. Dietary protein, life-span, and biochemical variables in female mice. *J. Gerontol.* 31, 144–8.
- Liang, W.S., Dunckley, T., Beach, T.G., Grover, A., Mastroeni, D., Walker, D.G., Caselli, R.J., Kukull, W.A., McKeel, D., Morris, J.C., Hulette, C., Schmechel, D., Alexander, G.E., Reiman, E.M., Rogers, J., Stephan, D.A., 2007. Gene expression profiles in anatomically and functionally distinct regions of the normal aged human brain. *Physiol. Genomics* 28, 311–322.
- Lindenberger, U., 2014. Human cognitive aging: Corriger la fortune? *Science* (80-. ). 346, 572–578.
- Locasale, J.W., 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* 13, 572–83.
- Loerch, P.M., Lu, T., Dakin, K.A., Vann, J.M., Isaacs, A., Geula, C., Wang, J., Pan, Y., Gabuzda, D.H., Li, C., Prolla, T.A., Yankner, B.A., 2008. Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. *PLoS One* 3, e3329.
- Loessner, A., Alavi, A., Lewandrowski, K.U., Mozley, D., Souder, E., Gur, R.E., 1995. Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age. *J. Nucl. Med.* 36, 1141–9.
- Lopez-Torres, M., Barja, G., 2008. 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* 1780, 1337–1347.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G., 2002. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 882–889.
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T.-H., Kim, H.-M., Drake, D., Liu, X.S., Bennett, D.A., Colaiácovo, M.P., Yankner, B.A., 2014. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507, 448–54.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., Yankner, B.A., 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883–91.
- Luthria, D.L., Mohammed, B.S., Sprecher, H., 1996. Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 271, 16020–5.
- M-**
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510, 58–67.
- Maher, J., Yamamoto, M., 2010. The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 4–15.
- Mair, W., Dillin, A., 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 727–54.

- Mair, W., Piper, M.D., Partridge, L., 2005. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3, e223.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D., Orentreich, N., 2006. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 5, 305–14.
- Martin, B., Ji, S., Maudsley, S., Mattson, M.P., 2010. “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6127–33.
- Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* 5, 332–353.
- Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I., Díaz, M., 2010. Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer’s disease human brain cortex. *J. Alzheimers. Dis.* 19, 489–502.
- Martínez, A., Carmona, M., Portero-Otin, M., Naudí, A., Pamplona, R., Ferrer, I., 2008. Type-dependent oxidative damage in frontotemporal lobar degeneration: cortical astrocytes are targets of oxidative damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1122–36.
- Martínez, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Ferrer, I., 2010. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol.* 20, 281–97.
- Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., Longo, D.L., Allison, D.B., Young, J.E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W.F., Qi, W., Ingram, D.K., de Cabo, R., 2012. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489, 318–21.
- Mattson, M.P., 2002. Brain evolution and lifespan regulation: conservation of signal transduction pathways that regulate energy metabolism. *Mech. Ageing Dev.* 123, 947–53.
- Mattson, M.P., Magnus, T., 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 278–94.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A., 1935. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Nutrition* 5, 155–71; discussion 172.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652–9.
- McNamara, R.K., Liu, Y., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., 2008. The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 78, 293–304.
- Medvedev, Z.A., 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65, 375–98.
- Merkley, E.D., Metz, T.O., Smith, R.D., Baynes, J.W., Frizzell, N., 2014. The succinated proteome. *Mass Spectrom. Rev.* 33, 98–109.
- Merrill, A.H., Sullards, M.C., Allegood, J.C., Kelly, S., Wang, E., 2005. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods* 36, 207–24.
- Meyer, T.E., Kovács, S.J., Ehsani, A.A., Klein, S., Holloszy, J.O., Fontana, L., 2006. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, 398–402.
- Michaelis, T., Helms, G., Frahm, J., 1996. Metabolic alterations in brain autopsies: proton NMR identification of free glycerol. *NMR Biomed.* 9, 121–4.
- Miller, A.L., 2003. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern. Med. Rev.* 8, 7–19.
- Miller, D.S., Payne, P.R., 1968. Longevity and protein intake. *Exp. Gerontol.* 3, 231–4.

- Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R., Smith-Wheelock, M., 2005. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4, 119–25.
- Mink, J.W., Blumenschine, R.J., Adams, D.B., 1981. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am. J. Physiol.* 241, R203–12.
- Möller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R., Denicola, A., 2005. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 280, 8850–4.
- Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., O'Neill, C., 2010. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 31, 224–43.
- Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A., Horton, J.D., 2001. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 45358–66.
- Moore, S.A., 1993. Cerebral endothelium and astrocytes cooperate in supplying docosahexaenoic acid to neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 331, 229–33.
- Moore, S.A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G.R., Spector, A.A., 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J. Neurochem.* 56, 518–24.
- Mori, N., Hirayama, K., 2000. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J. Nutr.* 130, 2349–55.
- Morrison, B.M., Hof, P.R., Morrison, J.H., 1998. Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 44, S32–44.
- Morrison, J.H., Hof, P.R., 2002. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 136, 467–86.
- Morrison, J.H., Hof, P.R., 1997. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412–9.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 2001. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12920–12925.
- Mueller, S.G., Stables, L., Du, A.T., Schuff, N., Truran, D., Cashdollar, N., Weiner, M.W., 2007. Measurement of hippocampal subfields and age-related changes with high resolution MRI at 4T. *Neurobiol. Aging* 28, 719–26.
- Muntané, G., Dalfó, E., Martínez, A., Rey, M.J., Avila, J., Pérez, M., Portero, M., Pamplona, R., Ayala, V., Ferrer, I., 2006. Glial fibrillary acidic protein is a major target of glycoxidative and lipoxidative damage in Pick's disease. *J. Neurochem.* 99, 177–85.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Sato, H., Yamamoto, K., 2011. Secreted phospholipase A2 revisited. *J. Biochem.* 150, 233–55.
- N-**
- Nakamura, H., Murayama, T., 2014. Role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 307–12.
- Naudí, A., Cabré, R., Jové, M., Ayala, V., Gonzalo, H., Portero-Otín, M., Ferrer, I., Pamplona, R., 2015. Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer's Disease Pathology. *Int. Rev. Neurobiol.* 122, 133–89.

- Naudí, A., Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G., Pamplona, R., 2007. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* 10, 473–484.
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Cabré, R., Portero-Otín, M., Ferrer, I., Pamplona, R., 2013a. [A study of selective neuronal vulnerability in the human central nervous system]. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 48, 216–23.
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Cabré, R., Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2013b. Non-enzymatic modification of aminophospholipids by carbonyl-amine reactions. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3285–313.
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G., Pamplona, R., 2011a. Regulation of Membrane Unsaturation as Antioxidant Adaptive Mechanism in Long-lived Animal Species. *Free Radicals Antioxidants* 1, 3–12.
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Ramirez, O., Cabré, R., Prat, J., Portero-Otín, M., Ferrer, I., Pamplona, R., 2012. Region specific vulnerability to lipid peroxidation in the human central nervous system, in: Catalá, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation*. InTech, pp. 437–356.
- Naudí, A., Jové, M., Cacabelos, D., Ramírez, O., Ayala, V., Ilieva, E., Kichev, A., Ferrer, I., Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2011b. Membrane unsaturation, selective neuronal vulnerability, and age-related neurodegenerative diseases, in: Catalá, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation: Biological Implications*. InTech, pp. 47–70.
- Naudí, A., Jové, M., Ilieva, E., Cacabelos, D., Gonzalo, H., Serrano, J., Boada, J., Ayala, M. V., Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2009. Oxidación De Macromoléculas, Envejecimiento y Longevidad, in: Sastre, J., Pamplona, R., Ramón, J.R. (Eds.), *Biogerontología Médica*. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, Madrid, pp. 43–69.
- Naudí, A., Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2014. Estrés oxidativo, inflamación y envejecimiento, in: *Tratado de Medicina Geriátrica*. Elsevier, España, pp. 414–424.
- Norris, S.E., Friedrich, M.G., Mitchell, T.W., Truscott, R.J.W., Else, P.L., 2015. Human prefrontal cortex phospholipids containing docosahexaenoic acid increase during normal adult aging, whereas those containing arachidonic acid decrease. *Neurobiol. Aging* 36, 1659–69.
- Norton, W.T., Poduslo, S.E., Suzuki, K., 1966. Subacute sclerosing leukoencephalitis. II. Chemical studies including abnormal myelin and an abnormal ganglioside pattern. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 25, 582–97.
- O-**
- O' Neill, C., 2013. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 48, 647–53.
- O'Banion, M.K., Coleman, P.D., Callahan, L.M., 1994. Regional neuronal loss in aging and Alzheimer's disease: a brief review, in: *Seminars in Neuroscience*. pp. 307–314.
- O'Brien, J.S., Sampson, E.L., 1965. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* 6, 545–51.
- Omodei, D., Fontana, L., 2011. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 585, 1537–42.
- Opstad, K.S., Wright, A.J., Bell, B.A., Griffiths, J.R., Howe, F.A., 2010. Correlations between in vivo <sup>1</sup>H MRS and ex vivo <sup>1</sup>H HRMAS metabolite measurements in adult human gliomas. *J. Magn. Reson. Imaging* 31, 289–297.
- Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A., Zimmerman, J.A., 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* 123, 269–74.



- Orr, S.K., Palumbo, S., Bosetti, F., Mount, H.T., Kang, J.X., Greenwood, C.E., Ma, D.W.L., Serhan, C.N., Bazinet, R.P., 2013. Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation. *J. Neurochem.* 127, 378–93.
- Ottis, P., Koppe, K., Onisko, B., Dynin, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., Requena, J.R., Silva, C.J., Huston, J.P., Korth, C., 2012. Human and rat brain lipofuscin proteome. *Proteomics* 12, 2445–54.
- P-**
- Page, M.M., Robb, E.L., Salway, K.D., Stuart, J.A., 2010. Mitochondrial redox metabolism: aging, longevity and dietary effects. *Mech. Ageing Dev.* 131, 242–52.
- Pamplona, R., 2011. Advanced lipoxidation end-products. *Chem. Biol. Interact.* 192, 14–20.
- Pamplona, R., 2008. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1249–1262.
- Pamplona, R., Barja, G., 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12, 409–435.
- Pamplona, R., Barja, G., 2007. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res. Rev.* 6, 189–210.
- Pamplona, R., Barja, G., 2006. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 496–508.
- Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otín, M., 2002a. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 475–490.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 301, R843–63.
- Pamplona, R., Dalfo, E., Ayala, V., Bellmunt, M.J., Prat, J., Ferrer, I., Portero-Otín, M., 2005a. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J. Biol. Chem.* 280, 21522–21530.
- Pamplona, R., Naudí, A., Gavín, R., Pastrana, M.A., Sajnani, G., Ilieva, E. V., Del Río, J.A., Portero-Otín, M., Ferrer, I., Requena, J.R., 2008. Increased oxidation, glycooxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1159–66.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J., Gredilla, R., Barja, G., 2002b. Oxidative, glycooxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1437–1446.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., López-Torres, M., Barja, G., 2000. Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B286–91.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E., Barja, G., 2005b. Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Dordr).* 27, 267–80.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Requena, J., Barja, G., 2004. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp. Gerontol.* 39, 725–33.
- Pamplona, R., Requena, J.R., Portero-Otín, M., Prat, J., Thorpe, S.R., Bellmunt, M.J., 1998. Carboxymethylated phosphatidylethanolamine in mitochondrial membranes of mammals. Evidence for intracellular lipid glycooxidation. *Eur. J. Biochem.* 255, 685–689.

- Panganamala, R. V, Horrocks, L.A., Geer, J.C., Cornwell, D.G., 1971. Positions of double bonds in the monounsaturated alk-1-enyl groups from the plasmalogens of human heart and brain. *Chem. Phys. Lipids* 6, 97–102.
- Pani, G., 2015. Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.004
- Park, C.-M., Cho, C.-W., Rosenfeld, M.E., Song, Y.-S., 2008. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J. Med. Food* 11, 667–74.
- Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G., 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 263–9.
- Pei, J.-J., Hugon, J., 2008. mTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2525–32.
- Pei, J.-J., Khatoon, S., An, W.-L., Nordlinger, M., Tanaka, T., Braak, H., Tsujio, I., Takeda, M., Alafuzoff, I., Winblad, B., Cowburn, R.F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2003. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol.* 105, 381–92.
- Peregrín-Alvarez, J.M., Sanford, C., Parkinson, J., 2009. The conservation and evolutionary modularity of metabolism. *Genome Biol.* 10, R63. doi:10.1186/gb-2009-10-6-r63
- Perluigi, M., Di Domenico, F., Butterfield, D.A., 2015. mTOR Signaling in Aging and Neurodegeneration: At the Crossroad between Metabolism dysfunction and Impairment of autophagy. *Neurobiol. Dis.* doi:10.1016/j.nbd.2015.03.014
- Perrone, C.E., Malloy, V.L., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2013. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp. Gerontol.* 48, 654–60.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A.L., Jarvis-Morar, M., Plummer, J.D., Orentreich, N., 2010. Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats. *Metabolism.* 59, 1000–11.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A.L., Plummer, J.D., Chittur, S. V, Mohny, R., Vignola, K., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2012. Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 5, 132–57.
- Perry, T.L., Hansen, S., Gandham, S.S., 1981. Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J. Neurochem.* 36, 406–10.
- Peters, R., 2006. Ageing and the brain. *Postgrad. Med. J.* 82, 84–8.
- Petroff, O.A., Ogino, T., Alger, J.R., 1988. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolite levels and postmortem changes. *J. Neurochem.* 51, 163–71.
- Piantadosi, C.A., Carraway, M.S., Babiker, A., Suliman, H.B., 2008. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ. Res.* 103, 1232–1240.
- Piomelli, D., 2005. The challenge of brain lipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77, 23–34.
- Piomelli, D., Astarita, G., Rapaka, R., 2007. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 743–54.
- Piper, M.D.W., Partridge, L., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2011. Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab.* 14, 154–60.
- Portero-Otín, M., Pamplona, R., 2006. Is Endogenous Oxidative Protein Damage Involved in the Aging Process?, in: Pietzsch, J. (Ed.), *Protein Oxidation and Disease. Recent Research Developments in Phathological Biochemistry*, Kerala, India, pp. 91–142.

- Praticò, D., Zhukareva, V., Yao, Y., Uryu, K., Funk, C.D., Lawson, J.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2004. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 164, 1655–62.
- Prince, M., Prina, M., Guerchet, M., 2013. *World Alzheimer Report 2013*.
- R-**
- Raamsdonk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H. V, van Dam, K., Oliver, S.G., 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* 19, 45–50.
- Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., Kersten, S., 2009. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One* 4, e6796.
- Rao, J.S., Rapoport, S.I., Kim, H.-W., 2011. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. *Transl. Psychiatry* 1, e31. doi:10.1038/tp.2011.27
- Rapoport, S.I., 2014. Lithium and the other mood stabilizers effective in bipolar disorder target the rat brain arachidonic Acid cascade. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 459–467.
- Rapoport, S.I., Rao, J.S., Igarashi, M., 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 251–61.
- Raz, N., Rodrigue, K.M., 2006. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 730–748.
- Raz, N., Rodrigue, K.M., Haacke, E.M., 2007. Brain aging and its modifiers: insights from in vivo neuromorphometry and susceptibility weighted imaging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1097, 84–93.
- Redman, L.M., Ravussin, E., 2011. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 275–87.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. 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.* 123, 1939–1951.
- Reiman, E.M., Chen, K., Langbaum, J.B.S., Lee, W., Reschke, C., Bandy, D., Alexander, G.E., Caselli, R.J., 2010. Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer's disease and normal aging. *Neuroimage* 49, 169–76.
- Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2001. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 69–74.
- Richie, J.P., Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N., Zimmerman, J.A., 1994. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J.* 8, 1302–7.
- Ross, M.H., 1976. Nutrition and longevity in experimental animals. *Curr. Concepts Nutr.* 4, 43–57.
- Rouser, G., Feldman, G., Galli, C., 1965. Fatty acid compositions of human brain lecithin and sphingomyelin in normal individuals, senile cerebral cortical atrophy, Alzheimer's disease, Metachromatic leucodystrophy, Tay-sachs and Niemann-Pick disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 411–2.
- Rouser, G., Yamamoto, A., 1968. Curvilinear regression course of human brain lipid composition changes with age. *Lipids* 3, 284–7.

- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Barja, G., Pamplona, R., 2005. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1106–1114.
- S-**
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Exp. Gerontol.* 48, 1030–42.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Gomez, J., Suarez, H., Sanchez, C., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2011. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 699–708.
- Sanchez-Roman, I., Gómez, A., Pérez, I., Sanchez, C., Suarez, H., Naudí, A., Jové, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2012. Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology* 13, 399–411.
- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2006a. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 20, 1064–1073.
- Sanz, A., Caro, P., Barja, G., 2004. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 545–52.
- Sanz, A., Caro, P., Ibañez, J., Gómez, J., Gredilla, R., Barja, G., 2005. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 83–90.
- Sanz, A., Caro, P., Sanchez, J.G., Barja, G., 2006b. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 200–209.
- Sanz, A., Gomez, J., Caro, P., Barja, G., 2006c. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 327–333.
- Sanz, A., Pamplona, R., Barja, G., 2006d. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.* 8, 582–599.
- Sastry, P.S., 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24, 69–176.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C.A., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., Withers, D.J., 2008. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* 22, 807–18.
- Shahabi, P., Siest, G., Visvikis-siest, S., 2014. Influence of inflammation on cardiovascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived epoxyeicosatrienoic acids. *Drug Metab. Rev.* 46, 33–56.
- Sherwood, C.C., Stimpson, C.D., Raghanti, M.A., Wildman, D.E., Uddin, M., Grossman, L.I., Goodman, M., Redmond, J.C., Bonar, C.J., Erwin, J.M., Hof, P.R., 2006. Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13606–11.

- Shimokawa, I., Higami, Y., Yu, B.P., Masoro, E.J., Ikeda, T., 1996. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging (Milano)*. 8, 254–62.
- Smith, A., 2000. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., Dallner, G., 1990. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J. Neurochem.* 54, 415–23.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J., Lal, H., 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74, 121–33.
- Solon-Biet, S.M., Mitchell, S.J., Coogan, S.C.P., Cogger, V.C., Gokarn, R., McMahon, A.C., Raubenheimer, D., de Cabo, R., Simpson, S.J., Le Couteur, D.G., 2015. Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2015.05.007
- Somel, M., Liu, X., Khaitovich, P., 2013. Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 112–27.
- Sonnino, S., Chigorno, V., 2000. Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 63–77.
- Spector, A.A., Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J. Mol. Neurosci.* 16, 159–65; discussion 215–21.
- Spiteller, G., 2001. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.* 36, 1425–57.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 219–31.
- Sridharan, A., Pehar, M., Salamat, M.S., Pugh, T.D., Bendlin, B.B., Willette, A.A., Anderson, R.M., Kemnitz, J.W., Colman, R.J., Weindruch, R.H., Puglielli, L., Johnson, S.C., 2013. Calorie restriction attenuates astrogliosis but not amyloid plaque load in aged rhesus macaques: a preliminary quantitative imaging study. *Brain Res.* 1508, 1–8.
- Stipanuk, M.H., 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 539–77.
- Stoodley, C.J., Schmahmann, J.D., 2009. Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* 44, 489–501.
- Strassburg, K., Huijbrechts, A.M.L., Kortekaas, K.A., Lindeman, J.H., Pedersen, T.L., Dane, A., Berger, R., Brenkman, A., Hankemeier, T., van Duynhoven, J., Kalkhoven, E., Newman, J.W., Vreeken, R.J., 2012. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1413–26.
- Strehler, B.L., 1962. *Time, Cells and Aging*. Academic Press, New York.
- Stuart, J.A., Karahalil, B., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2004. Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB J.* 18, 595–7.
- Subramaniam, S., Fahy, E., Gupta, S., Sud, M., Byrnes, R.W., Cotter, D., Dinasarapu, A.R., Maurya, M.R., 2011. Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chem. Rev.* 111, 6452–90.
- Sullivan, P.G., Dragicevic, N.B., Deng, J.-H., Bai, Y., Dimayuga, E., Ding, Q., Chen, Q., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N., 2004. Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J. Biol. Chem.* 279, 20699–707.

Sultana, R., Perluigi, M., Allan Butterfield, D., 2013. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 157–69.

Sun, L., Sadighi Akha, A.A., Miller, R.A., Harper, J.M., 2009. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 711–22.

**-T-**

Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wolf, B.A., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., Arnold, S.E., 2012. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–38.

Terry, R.D., DeTeresa, R., Hansen, L.A., 1987. Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann. Neurol.* 21, 530–9.

Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 25, 275–81.

Trompier, D., Vejux, A., Zarrouk, A., Gondcaille, C., Geillon, F., Nury, T., Savary, S., Lizard, G., 2014. Brain peroxisomes. *Biochimie* 98, 102–10.

**-U-**

Ueno, K., Ando, S., Yu, R.K., 1978. Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin. *J. Lipid Res.* 19, 863–71.

**-V-**

Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–24.

Vance, D.E., Vance, J.E., 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.

Veloso, A., Fernández, R., Astigarraga, E., Barreda-Gómez, G., Manuel, I., Giralt, M.T., Ferrer, I., Ochoa, B., Rodríguez-Puertas, R., Fernández, J.A., 2011. Distribution of lipids in human brain. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 89–101.

Verhoef, P., Steenge, G.R., Boelsma, E., van Vliet, T., Olthof, M.R., Katan, M.B., 2004. Dietary serine and cystine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 674–9.

Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., Sprecher, H., 1991. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.* 266, 19995–20000.

**-W-**

Wallis, J.G., Watts, J.L., Browse, J., 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27, 467.

Wanders, R.J.A., Waterham, H.R., 2006. *Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited*. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 295–332.

Wang, X., Michaelis, E.K., 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* 2, 12.

- Weindruch, R., 2003. Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17 Suppl 2, S58–9.
- Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.K., Prolla, T.A., 2001. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr.* 131, 918S–923S.
- Weindruch, R., Naylor, P.H., Goldstein, A.L., Walford, R.L., 1988. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J. Gerontol.* 43, B40–2.
- West, J.D., Marnett, L.J., 2006. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 173–94.
- West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C., 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 769–72.
- Willette, A.A., Bendlin, B.B., Colman, R.J., Kastman, E.K., Field, A.S., Alexander, A.L., Sridharan, A., Allison, D.B., Anderson, R., Voytko, M.-L., Kemnitz, J.W., Weindruch, R.H., Johnson, S.C., 2012. Calorie restriction reduces the influence of glucoregulatory dysfunction on regional brain volume in aged rhesus monkeys. *Diabetes* 61, 1036–42.
- Willette, A.A., Coe, C.L., Birdsill, A.C., Bendlin, B.B., Colman, R.J., Alexander, A.L., Allison, D.B., Weindruch, R.H., Johnson, S.C., 2013. Interleukin-8 and interleukin-10, brain volume and microstructure, and the influence of calorie restriction in old rhesus macaques. *Age (Dordr.)* 35, 2215–27.
- Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., Scalbert, A., 2013. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D801–7.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D.D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J.A., Lim, E., Sobsey, C.A., Shrivastava, S., Huang, P., Liu, P., Fang, L., Peng, J., Fradette, R., Cheng, D., Tzur, D., Clements, M., Lewis, A., De Souza, A., Zuniga, A., Dawe, M., Xiong, Y., Clive, D., Greiner, R., Nazyrova, A., Shaykhtudinov, R., Li, L., Vogel, H.J., Forsythe, I., 2009. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 37, D603–10.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeronic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D.D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G.E., Macinnis, G.D., Weljie, A.M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B.D., Vogel, H.J., Querengesser, L., 2007. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 35, D521–6.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–84.
- X-**
- Xu, M., Ju, W., Hao, H., Wang, G., Li, P., 2013. Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metab. Rev.* 45, 311–52.
- Y-**
- Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., Sugiura, T., 2014. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* 53, 18–81.

- Yankner, B.A., Lu, T., Loerch, P., 2008. The aging brain. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 41–66.
- Yeagle, P., 1993. *The membranes of cells*. Academic Press.
- Yetukuri, L., Ekroos, K., Vidal-Puig, A., Oresic, M., 2008. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol. Biosyst.* 4, 121–7.
- Yin, D., Chen, K., 2005. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp. Gerontol.* 40, 455–65.

**-Z-**

- Zahn, J.M., Poosala, S., Owen, A.B., Ingram, D.K., Lustig, A., Carter, A., Weeraratna, A.T., Taub, D.D., Gorospe, M., Mazan-Mamczarz, K., Lakatta, E.G., Boheler, K.R., Xu, X., Mattson, M.P., Falco, G., Ko, M.S.H., Schlessinger, D., Firman, J., Kummerfeld, S.K., Wood, W.H., Zonderman, A.B., Kim, S.K., Becker, K.G., 2007. AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genet.* 3, e201.
- Zhang, W., Li, P., Hu, X., Zhang, F., Chen, J., Gao, Y., 2011. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front. Biosci.* 17, 2653–2670.
- Zimniak, P., 2011. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1087–105.





**ANNEX**



## 13. ANNEX

### 13.1. ANNEX 1

A continuació s'adjunten els outputs de l'anàlisi multivariant no lineal GAM generats amb les variables sexe i temps post-mortem.

Formula:  
LMC ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	18.287718	0.050789	360.072	<2e-16 ***
SexeMALE	0.027969	0.048871	0.572	0.569
PMdelay	0.001336	0.005800	0.230	0.819

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.568	2	4.56	0.00502 **

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.121 Deviance explained = 17.3%  
GCV = 0.037445 Scale est. = 0.034641 n = 61

Formula:  
AGS ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	45.74816	1.25996	36.309	<2e-16 ***
SexeMALE	1.87860	1.21240	1.549	0.127
PMdelay	0.01826	0.14389	0.127	0.899

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.536	2	4.321	0.0059 **

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.123 Deviance explained = 17.4%  
GCV = 23.045 Scale est. = 21.331 n = 61

Formula:  
AGI ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	54.25184	1.25996	43.058	<2e-16 ***
SexeMALE	-1.87860	1.21240	-1.549	0.127
PMdelay	-0.01826	0.14389	-0.127	0.899

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.536	2	4.321	0.0059 **

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.123 Deviance explained = 17.4%  
GCV = 23.045 Scale est. = 21.331 n = 61

Formula:  
AGMI ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	30.4129	1.1743	25.899	<2e-16 ***
SexeMALE	-2.0529	1.1291	-1.818	0.0742 .
PMdelay	-0.1120	0.1348	-0.831	0.4097

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.3263	2	0.206	0.287

R-sq.(adj) = 0.0413 Deviance explained = 7.85%  
GCV = 20.037 Scale est. = 18.944 n = 61

Formula:  
AGPI ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	23.68176	1.28860	18.378	<2e-16 ***
SexeMALE	0.40199	1.23999	0.324	0.747
PMdelay	0.09862	0.14738	0.669	0.506

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.184	2	1.517	0.0861.

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.0273 Deviance explained = 7.89%

GCV = 24.113 Scale est. = 22.459 n = 61

Formula:  
AGPI<sub>n3</sub> ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	9.93151	0.78130	12.711	<2e-16 ***
SexeMALE	-0.13264	0.75075	-0.177	0.860
PMdelay	0.05784	0.08984	0.644	0.522

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	3.28e-09	2	0	0.375

---

R-sq.(adj) = -0.0269 Deviance explained = 0.729%

GCV = 8.8714 Scale est. = 8.4351 n = 6

Formula:  
AGPI<sub>n6</sub> ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	13.78160	0.60518	22.773	<2e-16 ***
SexeMALE	0.53622	0.58235	0.921	0.361
PMdelay	0.03591	0.06913	0.520	0.605

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.499	2	3.489	0.0134 *

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.102 Deviance explained = 15.5%

GCV = 5.3169 Scale est. = 4.9248 n = 61

Formula:  
IDE ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	138.2351	5.9076	23.399	<2e-16 ***
SexeMALE	0.5199	5.6849	0.091	0.927
PMdelay	0.4424	0.6754	0.655	0.515

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.277	2	1.959	0.0545.

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.039 Deviance explained = 9.15%

GCV = 506.77 Scale est. = 471.23 n = 61

Formula:  
IP ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	123.0593	7.8446	15.687	<2e-16 ***
SexeMALE	3.8291	7.5479	0.507	0.614
PMdelay	0.7044	0.8982	0.784	0.436

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.9214	2	0.892	0.153

---

R-sq.(adj) = 0.0136 Deviance explained = 6.16%

GCV = 893.83 Scale est. = 836.37 n = 61

Formula:  
SAG ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	5154.60	801.08	6.435	1.81e-07 ***
SexeMALE	1366.65	801.67	1.705	0.0968 .
PMdelay	-66.70	86.52	-0.771	0.4458

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.895	2	27.36	4.75e-09 ***

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.573 Deviance explained = 61.4%  
GCV = 6.962e+06 Scale est. = 6.1307e+06 n = 41

Formula:  
SAAA ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	198.459	39.304	5.049	1.28e-05 ***
SexeMALE	-44.180	39.333	-1.123	0.269
PMdelay	-1.261	4.245	-0.297	0.768

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.878	2	21.62	1.23e-07 ***

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.541 Deviance explained = 58.5%  
GCV = 16757 Scale est. = 14763 n = 41

Formula:  
CEL ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	335.273	54.138	6.193	3.7e-07 ***
SexeMALE	-31.756	54.175	-0.586	0.561
PMdelay	-2.274	5.851	-0.389	0.700

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.67	2	7.348	0.000722 ***

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.274 Deviance explained = 34.1%  
GCV = 31750 Scale est. = 28134 n = 41

Formula:  
CML ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1059.695	82.675	12.818	4.23e-15 ***
SexeMALE	-8.797	82.714	-0.106	0.916
PMdelay	-4.336	8.941	-0.485	0.631

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.401	2	3.177	0.0173 *

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.115 Deviance explained = 19%  
GCV = 73912 Scale est. = 65979 n = 41

Formula:  
CMC ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	221.637	26.990	8.212	7.23e-10 ***
SexeMALE	0.805	26.979	0.030	0.976
PMdelay	-3.258	2.924	-1.115	0.272

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.9133	2	1.013	0.123

R-sq.(adj) = 0.0345 Deviance explained = 10.5%  
GCV = 7851.9 Scale est. = 7102.4 n = 41

Formula:  
SC ~ s(Age, k = 3, bs = "ps", m = 0) + Sexe + PMdelay

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	77.7200	13.3325	5.829	1.06e-06 ***
SexeMALE	-8.5682	13.3261	-0.643	0.524
PMdelay	0.1785	1.4443	0.124	0.902

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.8891	2	0.952	0.132

R-sq.(adj) = 0.00477 Deviance explained = 7.66%  
GCV = 1915.7 Scale est. = 1734 n = 41

## 13.2 ANNEX 2

A continuació s'adjunten els outputs del model lineal amb segmentació generats per tal de determinar l'edat aproximada en la qual les variables en termes de composició d'àcids grassos i de dany oxidatiu proteic mostren un punt d'inflexió.

Call:  
segmented.lm(obj = lmLMC, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
52.160	3.606

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	17.37804	0.79780	21.782	<2e-16 ***
Age	0.02107	0.01661	1.268	0.21
U1.Age	-0.03031	0.01690	-1.794	NA

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1827 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.1951, Adjusted R-squared: 0.1527

Convergence attained in 4 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGS, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
59.570	7.589

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	52.7803	12.2885	4.295	6.87e-05 ***
Age	-0.1516	0.2451	-0.618	0.539
U1.Age	0.4118	0.2673	1.541	NA

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.669 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.148, Adjusted R-squared: 0.1031

Convergence attained in 2 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGI, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
59.570	7.589

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	47.2197	12.2885	3.843	0.000309 ***
Age	0.1516	0.2451	0.618	0.538776
U1.Age	-0.4118	0.2673	-1.541	NA

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.669 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.148, Adjusted R-squared: 0.1031

Convergence attained in 2 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGMI, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
75.850	8.014

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	34.20513	3.86326	8.854	2.68e-12 ***
Age	-0.09130	0.06178	-1.478	0.145
U1.Age	0.29684	0.31280	0.949	NA

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.459 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.04426, Adjusted R-squared: -0.006041

Convergence attained in 3 iterations with relative change  
2.007406e-16

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGPI, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)), control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
76.370	6.345

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	24.883240	3.859568	6.447	2.64e-08 ***
Age	0.007178	0.060821	0.118	0.906
U1.Age	-0.569352	0.486401	-1.171	NA

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.629 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.1184, Adjusted R-squared: 0.07204

Convergence attained in 4 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGPI3, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)), control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
75.020	6.059

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	8.80345	2.45837	3.581	0.000708 ***
Age	0.02861	0.03931	0.728	0.469785
U1.Age	-0.26879	0.19905	-1.350	NA

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.837 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.06889, Adjusted R-squared: 0.01988

Convergence attained in 3 iterations with relative change -1.247362e-16

Call:  
segmented.lm(obj = lmAGPI6, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)), control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
75.900	4.539

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	15.84545	1.89452	8.364	1.71e-11 ***
Age	-0.01712	0.03030	-0.565	0.574
U1.Age	-0.25608	0.15340	-1.669	NA

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.187 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.1722, Adjusted R-squared: 0.1286

Convergence attained in 4 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmIDE, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)), control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
78.400	3.939

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	149.0000	17.6731	8.431	1.33e-11 ***
Age	-0.0644	0.2785	-0.231	0.818
U1.Age	-3.2811	2.2273	-1.473	NA

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 21.2 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.1297, Adjusted R-squared: 0.08386

Convergence attained in 2 iterations with relative change 0

Call:  
segmented.lm(obj = lmIP, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)), control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
77.370	5.107

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	130.56799	23.51046	5.554	7.65e-07 ***
Age	0.05768	0.37049	0.156	0.877
U1.Age	-3.82514	2.96290	-1.291	NA

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 28.2 on 57 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.1092, Adjusted R-squared: 0.06232

Convergence attained in 2 iterations with relative change -1.6056e-16



Call:

```
segmented.lm(obj = lmSAG, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
  control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))
```

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
62.640	6.794

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	841.72	6119.54	0.138	0.891
Age	39.43	119.93	0.329	0.744
U1.Age	275.16	138.99	1.980	NA

Residual standard error: 2553 on 37 degrees of freedom

Multiple R-Squared: 0.58, Adjusted R-squared: 0.5459

Convergence attained in 5 iterations with relative change -1.236086e-16

---

Call:

```
segmented.lm(obj = lmSAAA, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
  control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))
```

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
63.770	5.641

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	46.188	292.068	0.158	0.875
Age	0.105	5.724	0.018	0.985
U1.Age	16.412	6.634	2.474	NA

Residual standard error: 121.8 on 37 degrees of freedom

Multiple R-Squared: 0.5727, Adjusted R-squared: 0.538

Convergence attained in 4 iterations with relative change 0

---

Call:

```
segmented.lm(obj = lmCEL, seg.Z = ~Age, psi = list(Age = c(60)),  
  control = seg.control(it.max = 10, display = TRUE))
```

Estimated Break-Point(s):

Est.	St.Err
63.60	20.44

t value for the gap-variable(s) V: 0

Meaningful coefficients of the linear terms:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	-50.532	398.602	-0.127	0.900
Age	4.756	7.812	0.609	0.546
U1.Age	6.146	9.054	0.679	NA

Residual standard error: 166.3 on 37 degrees of freedom

Multiple R-Squared: 0.3403, Adjusted R-squared: 0.2868

Convergence attained in 4 iterations with relative change 2.27617e-16

## 13.3. ANNEX 3

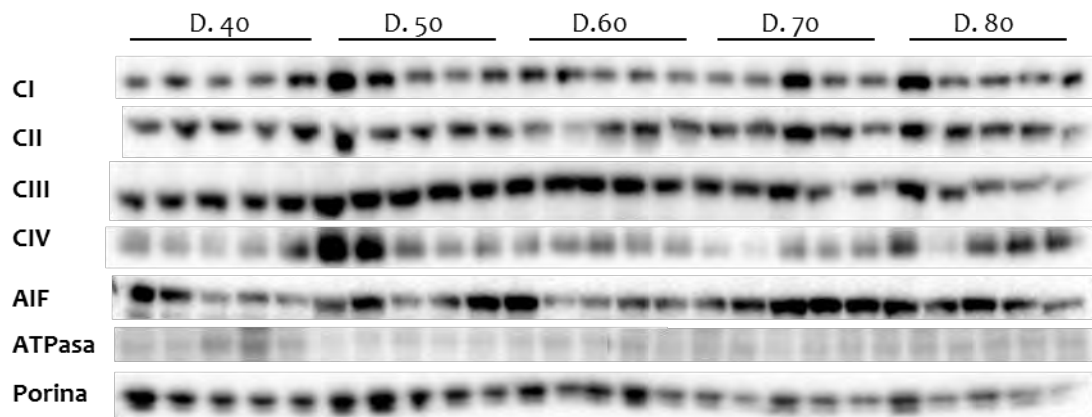


Figura S1. Imatges representatives de les immunotransferències en escorça frontal humana de diferents dècades d'edat en gels de 26 pouets.

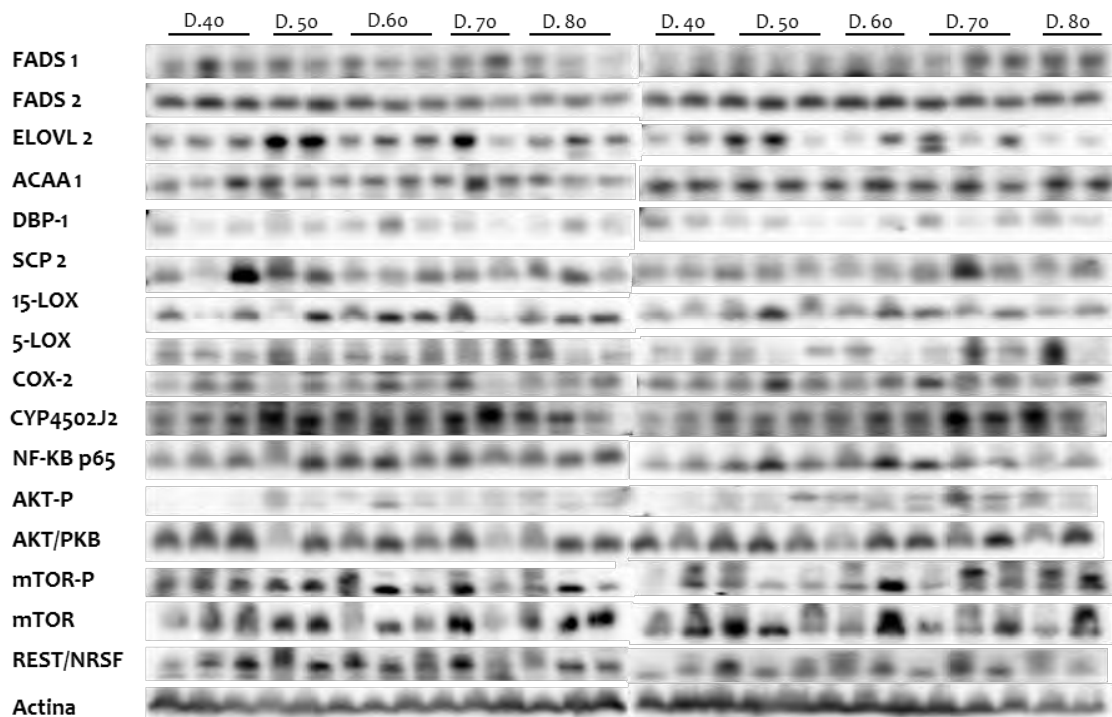


Figura S2. Imatges representatives de les immunotransferències en escorça frontal humana de diferents dècades d'edat en 2 gels consecutius de 15 pouets.

## 13.4. ANNEX 4

## Medul·la lumbar

Taula S1. Perfil composicional en àcids grassos de la medul·la lumbar de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	1,92 ± 0,04	1,86 ± 0,05	1,86 ± 0,07
16:0	15,02 ± 0,28	15,68 ± 0,22	15,71 ± 0,23
16:1n-7	0,46 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,59 ± 0,04 <sup>a*</sup>
18:0	13,59 ± 0,16	14,05 ± 0,20	14,06 ± 0,07
18:1n-9	35,00 ± 0,45	34,76 ± 0,34	34,58 ± 0,28
18:2n-6	0,97 ± 0,05	1,21 ± 0,07 <sup>a*</sup>	1,35 ± 0,07 <sup>a***</sup>
18:3n-6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:4n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
20:0	1,81 ± 0,10	1,61 ± 0,08	1,58 ± 0,06
20:1n-9	9,23 ± 0,47	8,88 ± 0,38	8,86 ± 0,37
20:2n-6	0,41 ± 0,01	0,34 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>a**</sup>
20:3n-6	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01
20:4n-6	5,20 ± 0,08	5,41 ± 0,07	5,61 ± 0,06 <sup>a***</sup>
20:5n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,04 ± 0,00
22:0	1,93 ± 0,09	1,61 ± 0,05 <sup>a**</sup>	1,72 ± 0,07
22:1n-9	1,12 ± 0,04	1,03 ± 0,02	0,98 ± 0,02 <sup>a**</sup>
22:4n-6	2,07 ± 0,04	1,86 ± 0,05 <sup>a**</sup>	1,84 ± 0,02 <sup>a**</sup>
22:5n-6	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
22:5n-3	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01
22:6n-3	3,33 ± 0,05	3,37 ± 0,09	3,48 ± 0,08
24:0	2,20 ± 0,12	2,24 ± 0,11	2,14 ± 0,11
24:1	3,52 ± 0,09	3,58 ± 0,11	3,45 ± 0,10
24:5n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
24:6n-3	1,26 ± 0,08	1,07 ± 0,04	1,14 ± 0,04

Composició en àcids grassos de la medul·la lumbar de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S2. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de la medul·la lumbar de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,68 ± 0,06	18,61 ± 0,07	18,68 ± 0,02
AGS	36,46 ± 0,28	36,84 ± 0,32	36,87 ± 0,31
AGI	62,75 ± 0,54	62,84 ± 0,22	63,06 ± 0,28
AGMI	49,19 ± 0,29	48,81 ± 0,21	48,45 ± 0,37
AGPI	13,98 ± 0,15	14,04 ± 0,18	14,61 ± 0,13 <sup>a*</sup> ; <sup>b*</sup>
AGPI n-3	4,83 ± 0,12	4,68 ± 0,11	4,87 ± 0,10
AGPI n-6	9,15 ± 0,09	9,36 ± 0,12	9,74 ± 0,10 <sup>a**</sup> ; <sup>b*</sup>
IDE	111,46 ± 0,94	110,69 ± 0,85	112,73 ± 0,58
IP	71,27 ± 0,94	70,40 ± 1,03	73,03 ± 0,93

Taula S3. Estimació de l'activitat desaturasa de la medul·la lumbar de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	2,58 $\pm$ 0,05	2,48 $\pm$ 0,05	2,45 $\pm$ 0,03
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,90 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,05 <sup>a*</sup>	1,11 $\pm$ 0,06 <sup>a*</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	13,97 $\pm$ 0,35	14,81 $\pm$ 0,48	14,72 $\pm$ 0,26
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	56,01 $\pm$ 3,68	49,17 $\pm$ 2,32	52,83 $\pm$ 2,36
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,30 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,04

Taula S4. Estimació de l'activitat elongasa de la medul·la lumbar de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,27 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
Elovl 6	0,91 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	1,08 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,06
Elovl 1-3-7	1,14 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,07 <sup>a**</sup>	1,24 $\pm$ 0,04
Elovl 5 (n-6)	0,43 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,03 <sup>a***</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,40 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>	0,33 $\pm$ 0,01 <sup>a***</sup>
Elovl2-5 (n-3)	4,04 $\pm$ 0,29	3,98 $\pm$ 0,27	4,45 $\pm$ 0,28
Elovl2 (n-3)	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01

Taula S5. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de la medul·la lumbar de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	2,37 $\pm$ 0,37	3,18 $\pm$ 0,12	3,05 $\pm$ 0,08

## Medul·la toràtica

Taula S6. Perfil composicional en àcids grassos de la medul·la toràtica de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	2,12 ± 0,06	1,40 ± 0,29 <sup>a*</sup>	2,07 ± 0,06 <sup>b*</sup>
16:0	13,30 ± 0,10	13,22 ± 0,21	13,51 ± 0,22
16:1n-7	0,25 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,03
18:0	13,74 ± 0,15	14,59 ± 0,23 <sup>a*</sup>	14,46 ± 0,22 <sup>a*</sup>
18:1n-9	33,07 ± 0,47	32,28 ± 0,33	31,59 ± 0,21 <sup>a*</sup>
18:2n-6	0,79 ± 0,05	1,02 ± 0,04 <sup>a*</sup>	1,12 ± 0,09 <sup>a**</sup>
18:3n-6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
18:4n-3	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
20:0	2,22 ± 0,07	2,15 ± 0,07	2,19 ± 0,07
20:1n-9	13,38 ± 0,36	13,75 ± 0,30	13,88 ± 0,15
20:2n-6	0,55 ± 0,02	0,45 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>a**</sup>
20:3n-6	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,01
20:4n-6	4,35 ± 0,10	4,42 ± 0,09	4,26 ± 0,07
20:5n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00
22:0	1,68 ± 0,03	1,64 ± 0,03	1,69 ± 0,03
22:1n-9	1,20 ± 0,02	1,07 ± 0,03 <sup>a**</sup>	1,05 ± 0,02 <sup>a**</sup>
22:4n-6	2,47 ± 0,04	2,32 ± 0,06 <sup>a*</sup>	2,16 ± 0,02 <sup>a**</sup> ; <sup>b*</sup>
22:5n-6	0,15 ± 0,01	0,26 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>a*</sup>
22:5n-3	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00 <sup>a*</sup>
22:6n-3	2,72 ± 0,09	2,68 ± 0,08	2,52 ± 0,03
24:0	1,73 ± 0,08	1,88 ± 0,06	1,88 ± 0,06
24:1	4,05 ± 0,11	4,62 ± 0,15 <sup>a*</sup>	4,72 ± 0,15 <sup>a**</sup>
24:5n-3	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a*</sup>
24:6n-3	1,50 ± 0,06	1,40 ± 0,06	1,46 ± 0,05

Composició en àcids grassos de la medul·la toràtica de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S7. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de la medul·la toràtica de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,76 ± 0,05	18,89 ± 0,03	18,79 ± 0,08
AGS	34,81 ± 0,15	34,89 ± 0,31	35,53 ± 0,27
AGI	64,83 ± 0,25	65,11 ± 0,31	63,98 ± 0,44
AGMI	51,77 ± 0,40	52,04 ± 0,40	51,60 ± 0,37
AGPI	13,06 ± 0,24	13,07 ± 0,27	12,26 ± 0,32
AGPI n-3	4,41 ± 0,12	4,27 ± 0,11	4,22 ± 0,03
AGPI n-6	8,65 ± 0,15	8,80 ± 0,18	8,09 ± 0,30
IDE	109,67 ± 0,77	109,54 ± 0,97	106,09 ± 1,34
IP	66,19 ± 1,20	65,50 ± 1,31	63,05 ± 0,71

Taula S8. Estimació de l'activitat desaturasa de la medul·la toràtica de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	2,41 $\pm$ 0,04	2,22 $\pm$ 0,05 <sup>a**</sup>	2,19 $\pm$ 0,03 <sup>a**</sup>
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,65 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,02
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	12,26 $\pm$ 0,37	13,59 $\pm$ 0,60	12,92 $\pm$ 0,21
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	67,85 $\pm$ 3,70	53,46 $\pm$ 4,26 <sup>a*</sup>	54,68 $\pm$ 2,61 <sup>a*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,30 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,13

Taula S9. Estimació de l'activitat elongasa de la medul·la toràtica de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,41 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,01
Elovl 6	1,03 $\pm$ 0,01	1,11 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,03
Elovl 1-3-7	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	0,76 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,02
Elovl 1-3-7	1,03 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,02
Elovl 5 (n-6)	0,72 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>	0,43 $\pm$ 0,03 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,57 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>
Elovl2-5 (n-3)	2,65 $\pm$ 0,11	2,25 $\pm$ 0,18	2,15 $\pm$ 0,04 <sup>a*</sup>
Elovl2 (n-3)	0,26 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>

Taula S10. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de la medul·la toràtica de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	1,82 $\pm$ 0,09	1,94 $\pm$ 0,09	1,74 $\pm$ 0,06

## Medul·la cervical

Taula S11. Perfil composicional en àcids grassos de la medul·la cervical de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	2,57 ± 0,05	2,28 ± 0,09 <sup>a*</sup>	2,26 ± 0,06 <sup>a**</sup>
16:0	13,34 ± 0,16	13,34 ± 0,08	13,08 ± 0,14
16:1n-7	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
18:0	14,56 ± 0,14	15,01 ± 0,16	14,97 ± 0,12
18:1n-9	33,10 ± 0,51	32,77 ± 0,35	31,93 ± 0,32 <sup>a*</sup>
18:2n-6	0,71 ± 0,03	0,93 ± 0,04 <sup>a***</sup>	0,99 ± 0,03 <sup>a***</sup>
18:3n-6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:4n-3	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
20:0	2,19 ± 0,10	2,03 ± 0,07	2,16 ± 0,09
20:1n-9	12,88 ± 0,41	12,80 ± 0,19	13,06 ± 0,22
20:2n-6	0,48 ± 0,01	0,40 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>a**</sup>
20:3n-6	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01
20:4n-6	4,18 ± 0,08	4,47 ± 0,06	4,39 ± 0,09
20:5n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>a***, b**</sup>
22:0	1,72 ± 0,03	1,58 ± 0,01 <sup>a**</sup>	1,65 ± 0,03
22:1n-9	1,20 ± 0,03	1,14 ± 0,04	1,10 ± 0,03
22:4n-6	2,31 ± 0,04	2,16 ± 0,08	2,12 ± 0,04
22:5n-6	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,02
22:5n-3	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00
22:6n-3	2,60 ± 0,07	2,92 ± 0,10	2,91 ± 0,10
24:0	1,76 ± 0,05	1,74 ± 0,06	1,75 ± 0,05
24:1	4,19 ± 0,12	4,46 ± 0,13	4,78 ± 0,13 <sup>a**</sup>
24:5n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
24:6n-3	1,17 ± 0,09	1,15 ± 0,07	1,44 ± 0,05 <sup>a*, b*</sup>

Composició en àcids grassos de la medul·la cervical de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S12. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de la medul·la cervical de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,70 ± 0,05	18,79 ± 0,02	18,85 ± 0,01 <sup>a**</sup>
AGS	36,14 ± 0,13	35,69 ± 0,29	35,87 ± 0,23
AGI	63,48 ± 0,27	64,17 ± 0,22	64,13 ± 0,23
AGMI	51,45 ± 0,28	51,44 ± 0,27	51,13 ± 0,30
AGPI	12,03 ± 0,30	12,73 ± 0,30	12,99 ± 0,24
AGPI n-3	3,94 ± 0,15	4,26 ± 0,15	4,53 ± 0,14 <sup>a*</sup>
AGPI n-6	8,09 ± 0,16	8,47 ± 0,16	8,46 ± 0,13
IDE	104,86 ± 1,22	107,86 ± 1,28	109,05 ± 1,09
IP	61,09 ± 1,60	64,54 ± 1,72	66,52 ± 1,53

Taula S13. Estimació de l'activitat desaturasa de la medul·la cervical de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	2,28 $\pm$ 0,04	2,19 $\pm$ 0,03	2,13 $\pm$ 0,03 <sup>a*</sup>
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,66 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,03 <sup>a**</sup>	0,79 $\pm$ 0,02 <sup>a**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	13,22 $\pm$ 0,38	14,58 $\pm$ 0,45	13,85 $\pm$ 0,48
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	58,90 $\pm$ 5,72	47,43 $\pm$ 4,19	59,93 $\pm$ 5,13
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,37 $\pm$ 0,16	1,41 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,09

Taula S14. Estimació de l'activitat elongasa de la medul·la cervical de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,39 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,00
Elovl 6	1,09 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	0,80 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,02
Elovl 1-3-7	1,02 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,03
Elovl 5 (n-6)	0,69 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>	0,41 $\pm$ 0,01 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,55 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,02 <sup>a**</sup>	0,48 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>
Elovl 2-5 (n-3)	2,50 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,17	1,95 $\pm$ 0,08 <sup>a**</sup>
Elovl 2 (n-3)	0,28 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>

Taula S15. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de la medul·la cervical de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	2,28 $\pm$ 0,12	2,57 $\pm$ 0,12	2,07 $\pm$ 0,02 <sup>b**</sup>



## Bulb raquidi

Taula S16. Perfil composicional en àcids grassos del bulb raquidi de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,02
16:0	13,14 ± 0,16	13,31 ± 0,13	13,26 ± 0,11
16:1n-7	0,34 ± 0,01	0,38 ± 0,01 <sup>a*</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a**</sup>
18:0	14,78 ± 0,13	15,31 ± 0,21	15,44 ± 0,14 <sup>a**</sup>
18:1n-9	33,27 ± 0,32	33,16 ± 0,27	32,56 ± 0,21
18:2n-6	0,84 ± 0,03	0,98 ± 0,05	1,09 ± 0,04 <sup>a***</sup>
18:3n-6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a**</sup>
18:3n-3	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a**</sup>
18:4n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
20:0	1,42 ± 0,07	1,45 ± 0,08	1,52 ± 0,07
20:1n-9	9,15 ± 0,45	9,23 ± 0,29	9,65 ± 0,23
20:2n-6	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,01 <sup>a*</sup>
20:3n-6	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,01
20:4n-6	6,35 ± 0,12	6,27 ± 0,09	6,19 ± 0,07
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:0	1,39 ± 0,03	1,31 ± 0,02	1,38 ± 0,03
22:1n-9	1,06 ± 0,04	0,95 ± 0,01 <sup>a*</sup>	0,99 ± 0,02
22:4n-6	2,76 ± 0,03	2,47 ± 0,09 <sup>a**</sup>	2,36 ± 0,03 <sup>a***</sup>
22:5n-6	0,31 ± 0,03	0,36 ± 0,04	0,31 ± 0,02
22:5n-3	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,00
22:6n-3	5,77 ± 0,221	5,73 ± 0,25	5,72 ± 0,06
24:0	1,91 ± 0,05	1,84 ± 0,11	1,76 ± 0,06
24:1	3,80 ± 0,10	4,05 ± 0,13	3,97 ± 0,07
24:5n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:6n-3	2,10 ± 0,08	1,98 ± 0,07	2,14 ± 0,03

Composició en àcids grassos del bulb raquidi de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S17. Índexs derivats de la composició en àcids grassos dl bulb raquidi de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,91 ± 0,09	18,93 ± 0,04	18,98 ± 0,01
AGS	32,82 ± 0,42	33,54 ± 0,25	33,75 ± 0,19
AGI	66,80 ± 0,19	66,25 ± 0,19	66,24 ± 0,20
AGMI	47,48 ± 0,57	47,17 ± 0,24	47,55 ± 0,24
AGPI	19,03 ± 0,30	18,64 ± 0,39	18,69 ± 0,11
AGPI n-3	8,05 ± 0,18	7,89 ± 0,28	8,04 ± 0,07
AGPI n-6	10,99 ± 0,15	10,76 ± 0,14	10,65 ± 0,08
IDE	137,00 ± 1,07	135,14 ± 1,62	135,24 ± 0,48
IP	105,31 ± 1,87	102,98 ± 2,53	103,24 ± 0,79

Taula S18. Estimació de l'activitat desaturasa del bulb raquidi de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a**</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	2,23 $\pm$ 0,02	2,17 $\pm$ 0,04	2,11 $\pm$ 0,02 <sup>a**</sup>
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,91 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,05 <sup>a**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	18,67 $\pm$ 0,41	18,20 $\pm$ 0,42	16,92 $\pm$ 0,50 <sup>a*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	91,78 $\pm$ 4,22	82,36 $\pm$ 7,11	85,08 $\pm$ 4,66
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,49 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,06 <sup>a*</sup>

Taula S19. Estimació de l'activitat elongasa del bulb raquidi de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,28 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,01
Elovl 6	1,13 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	0,99 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03
Elovl 1-3-7	1,23 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,03
Elovl 5 (n-6)	0,45 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>	0,29 $\pm$ 0,01 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,44 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>
Elovl2-5 (n-3)	2,38 $\pm$ 0,06	2,16 $\pm$ 0,15	2,27 $\pm$ 0,09
Elovl2 (n-3)	0,27 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02

Taula S20. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal del bulb raquidi de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	2,79 $\pm$ 0,18	2,90 $\pm$ 0,14	2,68 $\pm$ 0,03

## Protuberància

Taula S21. Perfil composicional en àcids grassos de la protuberància de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,41 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,33 ± 0,01 <sup>a**</sup>
16:0	12,59 ± 0,06	12,95 ± 0,09 <sup>a**</sup>	12,65 ± 0,05 <sup>b*</sup>
16:1n-7	0,32 ± 0,01	0,36 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,36 ± 0,00 <sup>a**</sup>
18:0	15,46 ± 0,05	15,29 ± 0,14	15,43 ± 0,10
18:1n-9	32,46 ± 0,29	32,57 ± 0,31	32,54 ± 0,20
18:2n-6	0,82 ± 0,02	0,95 ± 0,03 <sup>a*</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>a***</sup>
18:3n-6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3n-3	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:4n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
20:0	1,38 ± 0,06	1,53 ± 0,03	1,50 ± 0,08
20:1n-9	8,18 ± 0,24	8,36 ± 0,16	8,56 ± 0,12
20:2n-6	0,37 ± 0,01	0,31 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a**</sup>
20:3n-6	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01
20:4n-6	6,27 ± 0,08	6,18 ± 0,05	6,18 ± 0,08
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:0	1,51 ± 0,02	1,42 ± 0,03 <sup>a*</sup>	1,46 ± 0,02
22:1n-9	1,15 ± 0,01	1,09 ± 0,02 <sup>a*</sup>	1,11 ± 0,01
22:4n-6	2,94 ± 0,04	2,56 ± 0,09 <sup>a***</sup>	2,47 ± 0,02 <sup>a***</sup>
22:5n-6	0,33 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,02
22:5n-3	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00
22:6n-3	5,59 ± 0,13	5,34 ± 0,17	5,54 ± 0,10
24:0	2,44 ± 0,12	2,62 ± 0,15	2,28 ± 0,09
24:1	4,74 ± 0,09	4,97 ± 0,17	4,79 ± 0,11
24:5n-3	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a**</sup>
24:6n-3	2,45 ± 0,07	2,30 ± 0,08	2,43 ± 0,02

Composició en àcids grassos de la protuberància de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S22. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de la protuberància de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	19,04 ± 0,06	19,04 ± 0,03	18,99 ± 0,09
AGS	33,72 ± 0,09	33,97 ± 0,16	33,82 ± 0,17
AGI	66,03 ± 0,24	65,88 ± 0,18	65,87 ± 0,40
AGMI	46,71 ± 0,37	47,35 ± 0,26	47,32 ± 0,27
AGPI	19,32 ± 0,26	18,53 ± 0,33	18,56 ± 0,39
AGPI n-3	8,23 ± 0,18	7,82 ± 0,23	8,18 ± 0,13
AGPI n-6	11,09 ± 0,10	10,71 ± 0,15	10,71 ± 0,12
IDE	137,80 ± 1,08	134,36 ± 1,56	133,18 ± 2,27
IP	107,27 ± 1,64	102,37 ± 2,18	102,09 ± 2,97

Taula S23. Estimació de l'activitat desaturasa de la protuberància de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a*</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	2,10 ± 0,03	2,13 ± 0,03	2,11 ± 0,02
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,92 ± 0,02	1,10 ± 0,02 <sup>a***</sup>	1,12 ± 0,03 <sup>a***</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	18,06 ± 0,42	18,55 ± 0,56	17,65 ± 0,45
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	100,97 ± 8,05	106,14 ± 7,38	135,49 ± 5,76 <sup>a**;</sup> <sup>b*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,59 ± 0,09	1,58 ± 0,13	1,57 ± 0,07

Taula S24. Estimació de l'activitat elongasa de la protuberància de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Elovl 6	1,23 ± 0,00	1,18 ± 0,01 <sup>a***</sup>	1,22 ± 0,01 <sup>b**</sup>
Elovl 1-3-7	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Elovl 1-3-7	1,11 ± 0,06	0,94 ± 0,02 <sup>a*</sup>	0,96 ± 0,03
Elovl 1-3-7	1,61 ± 0,06	1,85 ± 0,11	1,60 ± 0,04
Elovl 5 (n-6)	0,45 ± 0,01	0,31 ± 0,01 <sup>a***</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,47 ± 0,01	0,41 ± 0,01 <sup>a***</sup>	0,40 ± 0,00 <sup>a***</sup>
Elovl2-5 (n-3)	2,34 ± 0,08	2,09 ± 0,11	1,98 ± 0,04 <sup>a**</sup>
Elovl2 (n-3)	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01 <sup>a*</sup>

Taula S25. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de la protuberància de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	2,23 ± 0,04	2,33 ± 0,08	2,30 ± 0,03

## Cerebel

Taula S26. Perfil composicional en àcids grassos del cerebel de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,26 ± 0,00	0,29 ± 0,01 <sup>a*</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a***</sup>
16:0	17,93 ± 0,16	18,00 ± 0,04	17,83 ± 0,14
16:1n-7	0,38 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,01
18:0	17,63 ± 0,06	17,70 ± 0,09	17,66 ± 0,08
18:1n-9	26,00 ± 0,14	26,53 ± 0,25	26,74 ± 0,21 <sup>a*</sup>
18:2n-6	1,14 ± 0,02	1,19 ± 0,04	1,37 ± 0,05 <sup>a***, b**</sup>
18:3n-6	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00 <sup>a*</sup>
18:4n-3	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
20:0	0,70 ± 0,04	0,83 ± 0,01 <sup>a*</sup>	0,79 ± 0,04
20:1n-9	4,06 ± 0,14	4,48 ± 0,07 <sup>a*</sup>	4,49 ± 0,10 <sup>a*</sup>
20:2n-6	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,30 ± 0,01
20:3n-6	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,01
20:4n-6	7,69 ± 0,08	7,27 ± 0,09 <sup>a**</sup>	7,36 ± 0,09 <sup>a*</sup>
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,04 ± 0,00
22:0	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,76 ± 0,02
22:1n-9	1,08 ± 0,09	1,01 ± 0,02	1,03 ± 0,03
22:4n-6	2,60 ± 0,03	2,22 ± 0,05 <sup>a***</sup>	2,22 ± 0,05 <sup>a***</sup>
22:5n-6	0,43 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,41 ± 0,03
22:5n-3	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,00
22:6n-3	13,43 ± 0,12	12,96 ± 0,14	12,89 ± 0,17 <sup>a*</sup>
24:0	1,11 ± 0,05	1,00 ± 0,02	1,03 ± 0,02
24:1	2,26 ± 0,05	2,54 ± 0,10	2,41 ± 0,08
24:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
24:6n-3	1,31 ± 0,04	1,38 ± 0,03	1,45 ± 0,03 <sup>a*</sup>

Composició en àcids grassos del cerebel de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S27. Índexs derivats de la composició en àcids grassos del cerebel de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,91 ± 0,01	18,75 ± 0,08	18,89 ± 0,00
AGS	38,37 ± 0,17	38,35 ± 0,16	38,24 ± 0,14
AGI	61,52 ± 0,15	61,41 ± 0,12	61,58 ± 0,20
AGMI	33,64 ± 0,35	35,27 ± 0,16 <sup>a**</sup>	35,01 ± 0,33 <sup>a**</sup>
AGPI	27,53 ± 0,19	26,05 ± 0,19 <sup>a***</sup>	26,57 ± 0,16 <sup>a**</sup>
AGPI n-3	15,00 ± 0,10	14,59 ± 0,16	14,58 ± 0,15
AGPI n-6	12,53 ± 0,12	11,65 ± 0,12 <sup>a***</sup>	11,99 ± 0,15 <sup>a*</sup>
IDE	170,56 ± 0,96	165,22 ± 0,86 <sup>a***</sup>	166,91 ± 0,64 <sup>a*</sup>
IP	166,05 ± 1,14	158,66 ± 1,08 <sup>a***</sup>	160,06 ± 1,27 <sup>a**</sup>

Taula S28. Estimació de l'activitat desaturasa del cerebel de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,47 ± 0,01	1,50 ± 0,02	1,51 ± 0,02
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	0,94 ± 0,02	1,03 ± 0,03 <sup>a*</sup>	1,06 ± 0,03 <sup>a**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	24,65 ± 0,42	24,45 ± 0,73	23,36 ± 0,63
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	31,22 ± 1,76	34,49 ± 1,58	36,78 ± 1,87
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,84 ± 0,05	1,83 ± 0,08	1,99 ± 0,09

Taula S29. Estimació de l'activitat elongasa del cerebel de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,00
Elovl 6	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,00	0,99 ± 0,01
Elovl 1-3-7	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,04 ± 0,00
Elovl 1-3-7	1,09 ± 0,05	0,91 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,97 ± 0,04
Elovl 1-3-7	1,49 ± 0,06	1,34 ± 0,03 <sup>a*</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>a*</sup>
Elovl 5 (n-6)	0,29 ± 0,01	0,23 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,34 ± 0,00	0,31 ± 0,01 <sup>a***</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>a***</sup>
Elovl2-5 (n-3)	3,76 ± 0,07	3,30 ± 0,18 <sup>a*</sup>	3,11 ± 0,12 <sup>a**</sup>
Elovl2 (n-3)	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,34 ± 0,01

Taula S30. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal del cerebel de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet	
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	10,39 ± 0,44	9,42 ± 0,15	8,91 ± 0,28 <sup>a**</sup>

## Tàlem

Taula S31. Perfil composicional en àcids grassos del tàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,36 ± 0,03	0,46 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,42 ± 0,01
16:0	16,89 ± 0,16	18,44 ± 0,18 <sup>a***</sup>	17,80 ± 0,30 <sup>a*</sup>
16:1n-7	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,01
18:0	19,16 ± 0,15	19,64 ± 0,08 <sup>a*</sup>	19,32 ± 0,12
18:1n-9	27,00 ± 0,25	25,81 ± 0,37	26,69 ± 0,50
18:2n-6	0,85 ± 0,02	0,90 ± 0,05	1,04 ± 0,04 <sup>a**, b*</sup>
18:3n-6	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:4n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
20:0	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,02	0,55 ± 0,04
20:1n-9	2,93 ± 0,09	2,69 ± 0,09	2,93 ± 0,15
20:2n-6	0,17 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
20:3n-6	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,40 ± 0,01 <sup>a*, b**</sup>
20:4n-6	8,88 ± 0,05	9,07 ± 0,08	8,87 ± 0,14
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:0	0,66 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,63 ± 0,04
22:1n-9	0,95 ± 0,08	0,87 ± 0,03	0,91 ± 0,02
22:4n-6	3,63 ± 0,03	3,61 ± 0,08	3,51 ± 0,05
22:5n-6	0,68 ± 0,05	0,82 ± 0,03	0,70 ± 0,05
22:5n-3	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,00
22:6n-3	11,66 ± 0,11	11,90 ± 0,33	11,54 ± 0,28
24:0	1,00 ± 0,04	0,89 ± 0,06	0,94 ± 0,06
24:1	1,91 ± 0,05	1,60 ± 0,11 <sup>a*</sup>	1,73 ± 0,11
24:5n-3	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:6n-3	1,37 ± 0,06	0,99 ± 0,05 <sup>a***</sup>	1,21 ± 0,06 <sup>b*</sup>

Composició en àcids grassos del tàlem de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S32. Índexs derivats de la composició en àcids grassos del tàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,86 ± 0,01	18,79 ± 0,01 <sup>a**</sup>	18,79 ± 0,02 <sup>a**</sup>
AGS	38,58 ± 0,24	40,45 ± 0,18 <sup>a***</sup>	39,67 ± 0,29 <sup>a**</sup>
AGI	61,22 ± 0,18	59,35 ± 0,23 <sup>a***</sup>	59,91 ± 0,28 <sup>a**</sup>
AGMI	33,07 ± 0,38	31,40 ± 0,53	32,64 ± 0,73
AGPI	27,86 ± 0,13	27,96 ± 0,45	27,95 ± 0,36
AGPI n-3	13,28 ± 0,09	13,14 ± 0,31	13,01 ± 0,24
AGPI n-6	14,58 ± 0,09	14,82 ± 0,15	14,85 ± 0,13
IDE	169,02 ± 0,53	167,42 ± 2,07	167,69 ± 1,43
IP	162,30 ± 0,77	162,06 ± 3,21	158,24 ± 3,82

Taula S33. Estimació de l'activitat desaturasa del tàlem de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,41 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>	1,38 $\pm$ 0,03
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	2,16 $\pm$ 0,05	2,43 $\pm$ 0,12	2,46 $\pm$ 0,06
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	24,94 $\pm$ 0,36	26,40 $\pm$ 0,95	22,57 $\pm$ 0,78 <sup>b**</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	48,13 $\pm$ 3,18	35,46 $\pm$ 2,75 <sup>a*</sup>	38,00 $\pm$ 3,46
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,77 $\pm$ 0,12	1,79 $\pm$ 0,09	1,68 $\pm$ 0,07

Taula S34. Estimació de l'activitat elongasa del tàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,11 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00
Elovl 6	1,13 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,01 <sup>a***</sup>	1,09 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>
Elovl 1-3-7	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	1,33 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,02 <sup>a**</sup>	1,16 $\pm$ 0,03 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	1,50 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,04
Elovl 5 (n-6)	0,20 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00 <sup>a***</sup>	0,15 $\pm$ 0,00 <sup>a***</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,41 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>
Elovl2-5 (n-3)	3,15 $\pm$ 0,10	3,11 $\pm$ 0,15	3,04 $\pm$ 0,13
Elovl2 (n-3)	0,25 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01

Taula S35. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal del tàlem de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	8,60 $\pm$ 0,40	12,35 $\pm$ 0,92 <sup>a***</sup>	9,05 $\pm$ 0,40 <sup>b**</sup>



## Hipotàlem

Taula S36. Perfil composicional en àcids grassos de l'hipotàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,39 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,00
16:0	18,84 ± 0,29	18,82 ± 0,26	18,43 ± 0,21
16:1n-7	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,00
18:0	18,75 ± 0,11	19,07 ± 0,12	19,11 ± 0,08
18:1n-9	26,81 ± 0,33	26,42 ± 0,35	26,86 ± 0,07
18:2n-6	0,73 ± 0,02	0,78 ± 0,04	0,86 ± 0,03 <sup>a**</sup>
18:3n-6	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:3n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:4n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
20:0	0,53 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,59 ± 0,05
20:1n-9	2,75 ± 0,20	2,83 ± 0,26	2,91 ± 0,18
20:2n-6	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01
20:3n-6	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,01
20:4n-6	9,29 ± 0,13	9,30 ± 0,17	9,22 ± 0,08
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
22:0	0,58 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,61 ± 0,04
22:1n-9	0,82 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,94 ± 0,04
22:4n-6	4,35 ± 0,01	4,26 ± 0,04	4,21 ± 0,03 <sup>a**</sup>
22:5n-6	0,51 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,03
22:5n-3	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,00
22:6n-3	10,77 ± 0,29	10,55 ± 0,25	10,72 ± 0,20
24:0	0,94 ± 0,06	0,95 ± 0,05	0,98 ± 0,05
24:1	1,50 ± 0,11	1,58 ± 0,13	1,61 ± 0,09
24:5n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
24:6n-3	0,91 ± 0,04	0,89 ± 0,07	0,99 ± 0,06

Composició en àcids grassos de l'hipotàlem de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S37. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'hipotàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,53 ± 0,14	18,68 ± 0,08	18,78 ± 0,01
AGS	40,04 ± 0,28	40,36 ± 0,24	40,09 ± 0,18
AGI	58,90 ± 0,56	59,33 ± 0,47	60,04 ± 0,15
AGMI	32,17 ± 0,62	31,97 ± 0,71	32,83 ± 0,30
AGPI	27,35 ± 0,40	27,06 ± 0,31	27,30 ± 0,18
AGPI n-3	11,95 ± 0,26	11,71 ± 0,21	11,98 ± 0,14
AGPI n-6	15,34 ± 0,12	15,26 ± 0,12	15,32 ± 0,07
IDE	161,09 ± 2,81	162,15 ± 1,11	163,28 ± 0,74
IP	152,59 ± 3,64	150,38 ± 3,47	154,52 ± 1,29

Taula S38. Estimació de l'activitat desaturasa de l'hipotàlem de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,43 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,01
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	1,93 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,16	2,41 $\pm$ 0,12 <sup>a*</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	31,39 $\pm$ 0,82	29,53 $\pm$ 1,84	27,71 $\pm$ 1,21
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	28,17 $\pm$ 1,86	25,02 $\pm$ 2,59	27,10 $\pm$ 1,66
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,85 $\pm$ 0,04	1,69 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 0,09

Taula S39. Estimació de l'activitat elongasa de l'hipotàlem de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,10 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01
Elovl 6	1,00 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	1,09 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>	1,03 $\pm$ 0,02
Elovl 1-3-7	1,63 $\pm$ 0,04	1,70 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,05
Elovl 5 (n-6)	0,22 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01
Elovl 2-5 (n-6)	0,47 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01
Elovl2-5 (n-3)	3,33 $\pm$ 0,12	3,28 $\pm$ 0,09	2,80 $\pm$ 0,09 <sup>a**,b**</sup>
Elovl2 (n-3)	0,25 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03

Taula S40. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'hipotàlem de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	12,08 $\pm$ 0,88	12,46 $\pm$ 1,12	11,10 $\pm$ 0,78

## Estriat

Taula S41. Perfil composicional en àcids grassos de l'estriat de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,69 ± 0,02	0,77 ± 0,03 <sup>a*</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>a***</sup>
16:0	21,75 ± 0,39	22,65 ± 0,15	22,52 ± 0,20
16:1n-7	0,47 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,01
18:0	21,12 ± 0,24	22,03 ± 0,13 <sup>a**</sup>	22,36 ± 0,14 <sup>a***</sup>
18:1n-9	19,10 ± 0,20	20,13 ± 0,18 <sup>a*</sup>	21,25 ± 0,32 <sup>a***; b**</sup>
18:2n-6	0,85 ± 0,03	0,82 ± 0,04	0,93 ± 0,04
18:3n-6	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a*; b*</sup>
18:3n-3	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a*</sup>
18:4n-3	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00
20:0	0,26 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,03 <sup>a**</sup>
20:1n-9	1,22 ± 0,08	1,36 ± 0,07	1,56 ± 0,10 <sup>a*</sup>
20:2n-6	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
20:3n-6	0,24 ± 0,00	0,27 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a***</sup>
20:4n-6	12,48 ± 0,20	11,77 ± 0,13 <sup>a*</sup>	11,32 ± 0,18 <sup>a***</sup>
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:0	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,03 <sup>a*</sup>
22:1n-9	1,58 ± 0,19	1,35 ± 0,11	1,08 ± 0,06 <sup>a*</sup>
22:4n-6	3,40 ± 0,07	3,44 ± 0,05	3,11 ± 0,05 <sup>a**; b***</sup>
22:5n-6	1,09 ± 0,11	1,23 ± 0,10	1,02 ± 0,07
22:5n-3	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
22:6n-3	12,16 ± 0,22	11,41 ± 0,27	10,44 ± 0,36 <sup>a***</sup>
24:0	0,27 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,51 ± 0,08 <sup>a**</sup>
24:1	0,53 ± 0,05	0,61 ± 0,03	0,74 ± 0,05 <sup>a**</sup>
24:5n-3	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:6n-3	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,44 ± 0,04 <sup>a***; b*</sup>

Composició en àcids grassos de l'estriat de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S42. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'estriat de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,23 ± 0,25	18,58 ± 0,01	18,53 ± 0,01
AGS	44,36 ± 0,59	46,45 ± 0,18 <sup>a**</sup>	46,95 ± 0,35 <sup>a***</sup>
AGI	53,46 ± 0,71	53,56 ± 0,21	53,05 ± 0,35
AGMI	22,39 ± 0,44	23,89 ± 0,29 <sup>a*</sup>	25,09 ± 0,40 <sup>a***</sup>
AGPI	30,95 ± 0,38	29,30 ± 0,45 <sup>a*</sup>	27,96 ± 0,52 <sup>a***;</sup>
AGPI n-3	12,73 ± 0,21	12,04 ± 0,26	11,13 ± 0,33 <sup>a***</sup>
AGPI n-6	18,22 ± 0,26	17,72 ± 0,27	16,83 ± 0,25 <sup>a**</sup>
IDE	167,78 ± 3,40	163,77 ± 1,81	157,40 ± 2,41 <sup>a*</sup>
IP	173,01 ± 2,14	164,07 ± 2,21	154,47 ± 3,30 <sup>a***; b*</sup>

Taula S43. Estimació de l'activitat desaturasa de l'estriat de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	0,90 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,95 ± 0,02
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	1,84 ± 0,08	2,24 ± 0,18 <sup>a*</sup>	2,11 ± 0,14
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	51,95 ± 0,98	43,49 ± 1,09 <sup>a***</sup>	39,71 ± 1,17 <sup>a***</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	6,70 ± 1,07	5,92 ± 0,38	14,89 ± 2,71 <sup>a**;</sup> <sup>b**</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,33 ± 0,07	1,34 ± 0,06	1,39 ± 0,10

Taula S44. Estimació de l'activitat elongasa de l'estriat de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00 <sup>a*</sup>
Elovl 6	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,99 ± 0,01
Elovl 1-3-7	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	1,14 ± 0,04	1,01 ± 0,01 <sup>a**</sup>	1,01 ± 0,01 <sup>a**</sup>
Elovl 1-3-7	0,93 ± 0,06	1,14 ± 0,08	1,31 ± 0,12 <sup>a*</sup>
Elovl 5 (n-6)	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Elovl 2-5 (n-6)	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,27 ± 0,01
Elovl2-5 (n-3)	3,13 ± 0,28	2,98 ± 0,19	2,87 ± 0,14
Elovl2 (n-3)	0,39 ± 0,06	0,36 ± 0,03	0,29 ± 0,02

Taula S45. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'estriat de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet	
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	48,17 ± 4,47	39,28 ± 4,03	26,36 ± 3,56 <sup>a**</sup>

## Hipocamp

Taula S46. Perfil composicional en àcids grassos de l'hipocamp de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	1,29 ± 0,03	1,26 ± 0,02	1,39 ± 0,03 <sup>b**</sup>
16:0	22,95 ± 0,31	23,08 ± 0,19	21,70 ± 0,44 <sup>a*;b*</sup>
16:1n-7	0,39 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01
18:0	20,98 ± 0,09	20,71 ± 0,10	20,45 ± 0,17 <sup>a*</sup>
18:1n-9	22,78 ± 0,45	22,86 ± 0,22	25,12 ± 0,49 <sup>a***;b***</sup>
18:2n-6	0,62 ± 0,01	0,69 ± 0,03	0,88 ± 0,05 <sup>a***;b**</sup>
18:3n-6	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a***;b*</sup>
18:3n-3	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a**</sup>
18:4n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a**</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>b***</sup>
20:0	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,53 ± 0,04 <sup>a**;b*</sup>
20:1n-9	1,65 ± 0,05	1,88 ± 0,08	2,60 ± 0,26 <sup>a***;b**</sup>
20:2n-6	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,01 <sup>a**;b**</sup>
20:3n-6	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,33 ± 0,01 <sup>a***;b**</sup>
20:4n-6	11,94 ± 0,17	12,06 ± 0,12	10,73 ± 0,28 <sup>a***;b***</sup>
20:5n-3	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a**</sup>
22:0	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,59 ± 0,04 <sup>a**;b**</sup>
22:1n-9	0,84 ± 0,06	0,93 ± 0,03	0,85 ± 0,03
22:4n-6	3,22 ± 0,07	3,14 ± 0,06	3,03 ± 0,03
22:5n-6	0,82 ± 0,05	0,95 ± 0,06	0,73 ± 0,05 <sup>b*</sup>
22:5n-3	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
22:6n-3	8,61 ± 0,18	8,78 ± 0,19	7,93 ± 0,20 <sup>b**</sup>
24:0	0,71 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,83 ± 0,03 <sup>a**;b*</sup>
24:1	0,79 ± 0,04	0,85 ± 0,03	1,19 ± 0,12 <sup>a**;b**</sup>
24:5n-3	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:6n-3	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,33 ± 0,05 <sup>a**;b**</sup>

Composició en àcids grassos de l'hipocamp de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S47. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'hipocamp de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,44 ± 0,02	18,46 ± 0,01	18,46 ± 0,02
AGS	46,96 ± 0,35	46,46 ± 0,09	45,50 ± 0,52 <sup>a*</sup>
AGI	53,04 ± 0,35	53,20 ± 0,23	54,50 ± 0,53 <sup>a*</sup>
AGMI	26,87 ± 0,25	26,81 ± 0,30	30,19 ± 0,84 <sup>a***;b***</sup>
AGPI	25,96 ± 0,42	26,39 ± 0,29	24,30 ± 0,36 <sup>a**;b***</sup>
AGPI n-3	8,99 ± 0,20	9,16 ± 0,20	8,46 ± 0,17 <sup>b*</sup>
AGPI n-6	16,96 ± 0,25	17,24 ± 0,14	15,85 ± 0,27 <sup>a**;b***</sup>
IDE	146,99 ± 2,24	149,47 ± 1,34	142,42 ± 1,06 <sup>b**</sup>
IP	138,82 ± 2,39	141,21 ± 1,89	129,01 ± 2,11 <sup>a**;b***</sup>

Taula S48. Estimació de l'activitat desaturasa de la medul·la toràctica de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,10 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,03 <sup>a**;</sup> b**
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	2,69 $\pm$ 0,06	2,79 $\pm$ 0,12	2,53 $\pm$ 0,14
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	46,62 $\pm$ 1,00	43,65 $\pm$ 1,25	33,31 $\pm$ 1,82 <sup>a***;</sup> b***
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	5,27 $\pm$ 0,78	5,05 $\pm$ 0,73	11,35 $\pm$ 1,89 <sup>a**;</sup> b**
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,22 $\pm$ 0,11	1,57 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,13

Taula S49. Estimació de l'activitat elongasa de l'hipocamp de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,07 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a**;</sup> b*
Elovl 6	0,92 $\pm$ 0,00	0,90 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01 <sup>b**</sup>
Elovl 1-3-7	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a**;</sup> b*
Elovl 1-3-7	1,27 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,03 <sup>a*</sup>	1,11 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	1,52 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,06
Elovl 5 (n-6)	0,16 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00
Elovl 2-5 (n-6)	0,27 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>b**</sup>
Elovl 2-5 (n-3)	2,84 $\pm$ 0,22	3,90 $\pm$ 0,50	3,96 $\pm$ 0,23
Elovl 2 (n-3)	0,42 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,03

Taula S50. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'hipocamp de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	52,50 $\pm$ 4,92	59,41 $\pm$ 6,63	28,40 $\pm$ 4,09 <sup>a**;</sup> b***

## Escorça temporal

Taula S51. Perfil composicional en àcids grassos de l'escorça temporal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,87 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,91 ± 0,02
16:0	26,39 ± 0,31	27,05 ± 0,16	26,62 ± 0,17
16:1n-7	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,48 ± 0,01
18:0	21,55 ± 0,16	22,09 ± 0,06 <sup>a**</sup>	22,02 ± 0,11 <sup>a*</sup>
18:1n-9	17,74 ± 0,27	17,74 ± 0,17	17,96 ± 0,20
18:2n-6	0,96 ± 0,05	0,94 ± 0,03	1,04 ± 0,05
18:3n-6	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
18:3n-3	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,03 ± 0,00
18:4n-3	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00 <sup>b**</sup>
20:0	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,17 ± 0,01
20:1n-9	0,68 ± 0,02	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,02
20:2n-6	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,00
20:3n-6	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01 <sup>a*</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>a***</sup>
20:4n-6	11,94 ± 0,12	11,90 ± 0,14	12,14 ± 0,21
20:5n-3	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
22:0	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01
22:1n-9	2,05 ± 0,27	1,62 ± 0,09	1,56 ± 0,12
22:4n-6	2,81 ± 0,07	2,78 ± 0,06	2,79 ± 0,04
22:5n-6	0,75 ± 0,08	0,81 ± 0,05	0,80 ± 0,04
22:5n-3	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00
22:6n-3	11,65 ± 0,26	11,45 ± 0,11	11,45 ± 0,22
24:0	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01
24:1	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01
24:5n-3	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:6n-3	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00 <sup>a**</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a***</sup>

Composició en àcids grassos de l'escorça temporal de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S52. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'escorça temporal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,43 ± 0,02	18,35 ± 0,03	18,38 ± 0,02
AGS	49,42 ± 0,37	50,65 ± 0,20 <sup>a**</sup>	50,17 ± 0,20
AGI	50,40 ± 0,37	49,16 ± 0,10 <sup>a**</sup>	49,70 ± 0,21
AGMI	20,88 ± 0,60	20,67 ± 0,20	20,77 ± 0,28
AGPI	28,82 ± 0,25	28,48 ± 0,24	28,94 ± 0,33
AGPI n-3	11,97 ± 0,26	11,76 ± 0,11	11,78 ± 0,22
AGPI n-6	16,85 ± 0,16	16,72 ± 0,21	17,16 ± 0,27
IDE	159,7 ± 1 0,96	156,15 ± 0,97	157,95 ± 1,35
IP	160,73 ± 1,87	158,59 ± 1,33	160,30 ± 1,87

Taula S53. Estimació de l'activitat desaturasa de l'escorça temporal de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	0,82 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,01
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	2,03 $\pm$ 0,04	2,40 $\pm$ 0,07 <sup>a**</sup>	2,41 $\pm$ 0,08 <sup>a**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	50,95 $\pm$ 1,46	46,26 $\pm$ 1,53 <sup>a*</sup>	43,24 $\pm$ 0,64 <sup>a**</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	3,09 $\pm$ 0,25	4,30 $\pm$ 0,21 <sup>a**</sup>	3,68 $\pm$ 0,26
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,88 $\pm$ 0,11	2,15 $\pm$ 0,13	2,19 $\pm$ 0,09

Taula S54. Estimació de l'activitat elongasa de l'escorça temporal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00
Elovl 6	0,82 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	1,03 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>	0,98 $\pm$ 0,01
Elovl 1-3-7	1,70 $\pm$ 0,05	1,83 $\pm$ 0,06	1,70 $\pm$ 0,05
Elovl 5 (n-6)	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00
Elovl 2-5 (n-6)	0,24 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,00
Elovl2-5 (n-3)	2,77 $\pm$ 0,31	3,39 $\pm$ 0,18	3,11 $\pm$ 0,17
Elovl2 (n-3)	0,40 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>a*</sup>	0,35 $\pm$ 0,02

Taula S55. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'escorça temporal de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	125,67 $\pm$ 3,70	110,74 $\pm$ 3,19 <sup>a**</sup>	108,15 $\pm$ 2,02 <sup>a**</sup>



## Escorça occipital

Taula S56. Perfil composicional en àcids grassos de l'escorça occipital de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	1,06 ± 0,03	1,03 ± 0,03	1,02 ± 0,02
16:0	35,32 ± 0,36	32,13 ± 0,46 <sup>a***</sup>	29,84 ± 0,32 <sup>a***; b***</sup>
16:1n-7	0,64 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,53 ± 0,01 <sup>a**</sup>
18:0	25,92 ± 0,19	24,61 ± 0,12 <sup>a***</sup>	23,97 ± 0,07 <sup>a***; b**</sup>
18:1n-9	21,33 ± 0,24	20,59 ± 0,32	20,62 ± 0,31
18:2n-6	0,86 ± 0,03	0,93 ± 0,04	1,04 ± 0,04 <sup>a**</sup>
18:3n-6	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>
18:3n-3	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>
18:4n-3	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>
20:0	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,01 <sup>a***; b*</sup>
20:1n-9	0,64 ± 0,03	0,75 ± 0,05	0,85 ± 0,05 <sup>a**</sup>
20:2n-6	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00 <sup>a***; b*</sup>
20:3n-6	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01 <sup>a***</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a***; b**</sup>
20:4n-6	7,03 ± 0,36	9,12 ± 0,25 <sup>a***</sup>	9,93 ± 0,14 <sup>a***</sup>
20:5n-3	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>
22:0	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01
22:1n-9	0,70 ± 0,03	0,85 ± 0,04	0,98 ± 0,05 <sup>a***</sup>
22:4n-6	1,20 ± 0,08	1,71 ± 0,09 <sup>a***</sup>	2,00 ± 0,05 <sup>a***; b*</sup>
22:5n-6	0,28 ± 0,04	0,51 ± 0,04 <sup>a***</sup>	0,54 ± 0,03 <sup>a***</sup>
22:5n-3	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
22:6n-3	3,32 ± 0,31	5,78 ± 0,33 <sup>a***</sup>	7,12 ± 0,24 <sup>a***; b**</sup>
24:0	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>a***</sup>
24:1	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,02 <sup>a**</sup>
24:5n-3	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00 <sup>a**</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>
24:6n-3	0,20 ± 0,01	0,14 ± 0,02 <sup>a***</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>a***</sup>

Composició en àcids grassos de l'escorça occipital de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S57. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'escorça occipital de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	17,57 ± 0,08	17,91 ± 0,03 <sup>a***</sup>	18,04 ± 0,03 <sup>a***</sup>
AGS	62,82 ± 0,55	58,37 ± 0,53 <sup>a***</sup>	55,51 ± 0,33 <sup>a***; b***</sup>
AGI	36,67 ± 0,72	41,62 ± 0,53 <sup>a***</sup>	44,40 ± 0,34 <sup>a***; b**</sup>
AGMI	23,32 ± 0,26	22,90 ± 0,36	23,07 ± 0,29
AGPI	13,35 ± 0,76	18,72 ± 0,66 <sup>a***</sup>	21,33 ± 0,40 <sup>a***; b*</sup>
AGPI n-3	3,80 ± 0,28	6,11 ± 0,33 <sup>a***</sup>	7,43 ± 0,24 <sup>a***; b**</sup>
AGPI n-6	9,55 ± 0,48	12,62 ± 0,35 <sup>a***</sup>	13,90 ± 0,19 <sup>a***; b*</sup>
IDE	82,27 ± 3,54	107,93 ± 3,06 <sup>a***</sup>	120,93 ± 1,95 <sup>a***; b**</sup>
IP	65,92 ± 4,21	96,77 ± 3,88 <sup>a***</sup>	112,11 ± 2,57 <sup>a***; b*</sup>

Taula S58. Estimació de l'activitat desaturasa de l'escorça occipital de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	0,82 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	1,74 $\pm$ 0,08	2,19 $\pm$ 0,10 <sup>a**</sup>	2,27 $\pm$ 0,09 <sup>a**</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	45,31 $\pm$ 1,48	43,49 $\pm$ 1,69	39,62 $\pm$ 0,96 <sup>a*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	3,09 $\pm$ 0,12	3,87 $\pm$ 0,35	4,16 $\pm$ 0,35
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	0,99 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,12

Taula S59. Estimació de l'activitat elongasa de l'escorça occipital de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>a*</sup>	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>a***</sup>
Elovl 6	0,73 $\pm$ 0,00	0,77 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>	0,80 $\pm$ 0,01 <sup>a***; b**</sup>
Elovl 1-3-7	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a***; b*</sup>
Elovl 1-3-7	1,14 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,03 <sup>a***</sup>	0,96 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>
Elovl 1-3-7	1,01 $\pm$ 0,06	1,29 $\pm$ 0,02 <sup>a***</sup>	1,32 $\pm$ 0,03 <sup>a***</sup>
Elovl 5 (n-6)	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00
Elovl 2-5 (n-6)	0,17 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,00 <sup>a**</sup>	0,20 $\pm$ 0,00 <sup>a***; b*</sup>
Elovl 2-5 (n-3)	0,97 $\pm$ 0,03	1,79 $\pm$ 0,23 <sup>a**</sup>	2,16 $\pm$ 0,16 <sup>a***</sup>
Elovl 2 (n-3)	1,05 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,10 <sup>a**</sup>	0,50 $\pm$ 0,04 <sup>a***</sup>

Taula S60. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'escorça occipital de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	18,18 $\pm$ 2,73	42,04 $\pm$ 3,47 <sup>a***</sup>	57,46 $\pm$ 2,40 <sup>a***; b**</sup>

## Escorça frontal

Taula S61. Perfil composicional en àcids grassos de l'escorça frontal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,92 ± 0,02	0,91 ± 0,01	0,92 ± 0,02
16:0	29,03 ± 0,014	29,31 ± 0,26	28,83 ± 0,12
16:1n-7	0,54 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,52 ± 0,01
18:0	24,17 ± 0,23	24,19 ± 0,11	24,20 ± 0,10
18:1n-9	19,71 ± 0,26	19,18 ± 0,19	19,47 ± 0,20
18:2n-6	0,94 ± 0,02	1,00 ± 0,03	1,06 ± 0,06
18:3n-6	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
18:3n-3	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
18:4n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
20:0	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01
20:1n-9	0,71 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,71 ± 0,04
20:2n-6	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,01
20:3n-6	0,20 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01 <sup>a***</sup>
20:4n-6	10,20 ± 0,26	10,49 ± 0,11	10,53 ± 0,18
20:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:0	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,00
22:1n-9	0,57 ± 0,05	0,58 ± 0,03	0,62 ± 0,02
22:4n-6	2,38 ± 0,08	2,35 ± 0,05	2,35 ± 0,07
22:5n-6	0,80 ± 0,07	0,99 ± 0,09	0,91 ± 0,08
22:5n-3	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
22:6n-3	7,95 ± 0,25	8,31 ± 0,19	8,36 ± 0,17
24:0	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,01
24:1	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
24:5n-3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
24:6n-3	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00 <sup>a*</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a**</sup>

Composició en àcids grassos de l'escorça frontal de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S62. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de l'escorça frontal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	18,12 ± 0,01	18,13 ± 0,01	18,12 ± 0,02
AGS	54,63 ± 0,19	54,89 ± 0,35	54,45 ± 0,15
AGI	44,67 ± 0,58	45,09 ± 0,34	45,43 ± 0,16
AGMI	21,77 ± 0,33	21,15 ± 0,25	21,40 ± 0,27
AGPI	23,05 ± 0,58	23,94 ± 0,30	24,03 ± 0,33
AGPI n-3	8,57 ± 0,17	8,74 ± 0,18	8,78 ± 0,17
AGPI n-6	14,67 ± 0,36	15,20 ± 0,19	15,25 ± 0,27
IDE	128,67 ± 2,74	132,49 ± 1,52	132,94 ± 1,43
IP	123,50 ± 3,31	128,55 ± 1,91	128,69 ± 1,97

Taula S63. Estimació de l'activitat desaturasa de l'escorça frontal de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	0,82 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,80 ± 0,01
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	1,81 ± 0,06	1,99 ± 0,08	2,05 ± 0,09
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	49,68 ± 0,31	47,75 ± 2,05	43,81 ± 1,12 <sup>a*</sup>
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	5,10 ± 0,55	3,88 ± 0,34 <sup>a*</sup>	3,86 ± 0,36
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	1,03 ± 0,16	1,10 ± 0,07	1,18 ± 0,06

Taula S64. Estimació de l'activitat elongasa de l'escorça frontal de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Elovl 6	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,00	0,84 ± 0,01
Elovl 1-3-7	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Elovl 1-3-7	1,02 ± 0,04	0,86 ± 0,03 <sup>a**</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>a**</sup>
Elovl 1-3-7	0,85 ± 0,05	1,01 ± 0,15	1,07 ± 0,08
Elovl 5 (n-6)	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00
Elovl 2-5 (n-6)	0,23 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,22 ± 0,01
Elovl2-5 (n-3)	2,76 ± 0,22	2,65 ± 0,15	2,43 ± 0,14
Elovl2 (n-3)	0,41 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,03

Taula S65. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal de l'escorça frontal de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	43,85 ± 3,05	54,04 ± 2,12 <sup>a*</sup>	56,40 ± 1,92 <sup>a**</sup>

## 13.5. ANNEX 5

## Fetge

Taula S66. Perfil composicional en àcids grassos de fetge de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
14:0	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,10	0,34 ± 0,02
16:0	22,22 ± 0,53	23,06 ± 0,58	24,07 ± 0,55
16:1n-7	2,90 ± 0,38	3,11 ± 0,92	1,59 ± 0,31
18:0	9,21 ± 0,49	10,70 ± 1,63	11,75 ± 0,85
18:1n-9	17,55 ± 0,75	17,83 ± 1,35	18,58 ± 1,31
18:2n-6	25,91 ± 1,20	23,79 ± 1,07	23,58 ± 1,47
18:3n-6	0,67 ± 0,05	0,77 ± 0,10	1,08 ± 0,12 <sup>a**</sup>
18:3n-3	0,45 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,22 ± 0,02 <sup>a***</sup>
18:4n-3	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01
20:0	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00
20:1n-9	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01 <sup>a*</sup>
20:2n-6	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,01 <sup>a***</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a***</sup>
20:3n-6	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03
20:4n-6	14,44 ± 0,89	13,90 ± 1,06	12,24 ± 0,39
20:5n-3	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>a***, b*</sup>
22:0	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
22:1n-9	1,09 ± 0,07	1,10 ± 0,12	0,93 ± 0,05
22:4n-6	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,03
22:5n-6	0,28 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,48 ± 0,05 <sup>a*</sup>
22:5n-3	0,38 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,35 ± 0,02
22:6n-3	2,20 ± 0,23	2,48 ± 0,29	2,89 ± 0,15
24:0	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,04
24:1	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
24:5n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a**</sup>
24:6n-3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00 <sup>a***</sup>

Composició en àcids grassos del fetge de rata en l'experiment de restricció de metionina en envelliment. Els valors representat estan expressats com a mitjana ± SEM de 7-8 animals. <sup>a</sup> comparant Velles i Velles RMet respecte el grup de rates adultes; <sup>b</sup> comparant Velles RMet respecte el grup de rates Velles. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Taula S67. Índexs derivats de la composició en àcids grassos de fetge de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
LMC	17,97 ± 0,04	17,97 ± 0,07	17,90 ± 0,05
AGS	32,38 ± 0,80	34,72 ± 1,38	36,62 ± 1,28 <sup>a*</sup>
AGI	67,06 ± 0,60	65,28 ± 1,38	63,05 ± 1,49 <sup>a*</sup>
AGMI	21,59 ± 1,01	22,23 ± 2,10	21,16 ± 1,66
AGPI	45,47 ± 0,99	43,04 ± 1,43	43,43 ± 0,89
AGPI n-3	3,30 ± 0,24	3,42 ± 0,27	3,66 ± 0,17
AGPI n-6	42,16 ± 0,93	39,63 ± 1,34	38,23 ± 1,63
IDE	154,90 ± 3,15	150,93 ± 3,54	146,33 ± 3,09
IP	111,49 ± 4,96	109,76 ± 6,18	107,08 ± 3,09

Taula S68. Estimació de l'activitat desaturasa del fetge de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,97 $\pm$ 0,17	1,88 $\pm$ 0,37	1,65 $\pm$ 0,18
$\Delta 8$ (n-6)	20:3/20:2	1,08 $\pm$ 0,06	1,54 $\pm$ 0,12 <sup>a**</sup>	1,60 $\pm$ 0,08 <sup>a***</sup>
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	49,12 $\pm$ 5,23	40,24 $\pm$ 4,54	41,23 $\pm$ 3,84
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	1,01 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,03
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	0,20 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>a***; b**</sup>

Taula S69. Estimació de l'activitat elongasa del fetge de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
Elovl 3 (n-9)	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
Elovl 6	0,41 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,03
Elovl 1-3-7	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
Elovl 1-3-7	1,52 $\pm$ 0,03	1,59 $\pm$ 0,10	1,73 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>
Elovl 1-3-7	3,22 $\pm$ 0,11	3,49 $\pm$ 0,10	3,02 $\pm$ 0,07 <sup>b**</sup>
Elovl 5 (n-6)	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a**</sup>	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a**</sup>
Elovl 2-5 (n-6)	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
Elovl2-5 (n-3)	2,69 $\pm$ 0,31	4,71 $\pm$ 1,15	5,84 $\pm$ 0,80 <sup>a**</sup>
Elovl2 (n-3)	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a***; b**</sup>

Taula S70. Estimació de l'activitat  $\beta$ -oxidació Peroxisomal del fetge de rata.

		Adultes	Velles	Velles RMet
$\beta$ -oxidació Peroxisomal	22:6/24:6	123,38 $\pm$ 9,20	110,58 $\pm$ 9,77	102,30 $\pm$ 9,41

Taula S71. Estimació de marcadors de dany oxidatiu en fetge de rata.

	Adultes	Velles	Velles RMet
SAG	5065,61 $\pm$ 172,70	4995,30 $\pm$ 172,56	4271,18 $\pm$ 111,08 <sup>a**, b**</sup>
CEL	247,74 $\pm$ 12,07	208,38 $\pm$ 25,21	185,15 $\pm$ 6,92 <sup>a*</sup>
MDAL	295,19 $\pm$ 14,74	296,34 $\pm$ 11,31	271,13 $\pm$ 6,12
CML	1957,57 $\pm$ 99,95	2005,31 $\pm$ 126,75	2201,91 $\pm$ 73,49
2-SC	111,75 $\pm$ 16,06	102,94 $\pm$ 7,88	106,39 $\pm$ 6,76

SAG: Semialdehid glutàmic; CEL: MDAL: N<sup>É</sup>-Malondialdehid-lisina; CML: N<sup>É</sup>- carboximetil-lisina; 2-SC: S-(2-succinil)-L-cisteïna.



## ARTICLES





## **Resistance to stress determines region-specific vulnerability in the adult human cerebral cortex**

Rosanna Cabré,<sup>1</sup> Mariona Jové,<sup>1</sup> Alba Naudí,<sup>1</sup> Victoria Ayala,<sup>1</sup> Gerard Piñol-Ripoll,<sup>2</sup> Maria Pilar Gil-Villar,<sup>2</sup> Mayelin Dominguez-Gonzalez,<sup>3</sup> Elia Obis,<sup>1</sup> Rebeca Berdun,<sup>1</sup> Natalia Mota-Martorell,<sup>1</sup> Manuel Portero-Otin,<sup>1</sup> Isidre Ferrer,<sup>3,4,\*</sup> and Reinald Pamplona<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Institute for Research in Biomedicine of Lleida (UdL-IRBLleida), Av. Alcalde Rovira Roure-80, E-25198 Lleida, Spain.

<sup>2</sup>Neurology Division, Hospital Santa María of Lleida, E-25006 Lleida, Spain.

<sup>3</sup>Institute of Neuropathology, University of Barcelona, E-08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Center for Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), ISCIII, Spain

### **\*Corresponding authors:**

Prof. Dr. Isidre Ferrer, Institute of Neuropathology, Service of Pathology, Bellvitge University Hospital, Carrer Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain. Phone: + 34 93 2607452; Email: [8082ifa@gmail.com](mailto:8082ifa@gmail.com)

Prof. Dr. Reinald Pamplona, Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomedica de Lleida (IRBLleida), Edifici Biomedicina 1, Av. Alcalde Rovira Roure-80, Lleida 25198, Catalonia, Spain. Phone: +34-973702442, Fax: +34-973702426; E-mail: [reinald.pamplona@mex.udl.cat](mailto:reinald.pamplona@mex.udl.cat)

### **Short title:**

Metabolomics of human cerebral cortex

**Key words:** energy metabolism, mammalian target of rapamycin (mTOR), metabolomics, methionine cycle, mitochondrial stress, nucleotide metabolism, one-carbon metabolism, selective neuronal vulnerability

## Abstract

Brain neurons offer a diverse response to stresses and adverse factors during development and aging, and as a result of both neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. This multiplicity of responses can be ascribed to the great diversity among neuronal populations. Here we have determined the metabolomic profile of three healthy adult human brain regions—entorhinal cortex, hippocampus, and frontal cortex—using mass spectrometry-based technologies. Our results show the existence of a lessened energy demand, mitochondrial stress and lower one-carbon metabolism (particularly restricted to the methionine cycle) specifically in frontal cortex. These findings, along with the better antioxidant capacity and lower mTOR signaling also in frontal cortex, suggest that this brain region is especially resistant to stress compared to the entorhinal cortex and hippocampus which are more vulnerable regions. Globally, our results show the presence of specific metabolomic adaptations in three mature and healthy human brain regions, confirming the existence of cross-regional differences in the human brain.

## Introduction

Human evolution is associated with rapid expansion of brain size and complexity, leading to the emergence of distinctive cognitive skills. These evolutionary changes have been linked to and supported by adaptations in brain metabolism, especially with respect to increased energy demand (Mink et al. 1981; Caceres et al. 2003; Uddin et al. 2004; Fu et al. 2011; Somel et al. 2013). Thus, neurons in the human nervous system can perform a wide array of motor, sensory, regulatory, behavioural, and cognitive functions. This functional diversity is expressed in the central nervous system (CNS) by a complex organization in different regions that groups neuronal populations with a diversity of nerve cells. The morphological and functional diversity among neuronal cells suggests that each neuron type, and by extension each brain region, has its own genomic expression profile, independently of genes with the greatest percentage of expressing cells, i.e. the ‘housekeeping’ genes necessary for the basal function of all cells, and related to cellular metabolism (Hawrylycz et al. 2012; Lein et al. 2007). The genomic profile configures a transcriptomic and proteomic pattern which, in turn, is expressed and translated in a regional neuron-specific metabolomic profile. Because each level of organization depends on the other, and a perturbation in one network can affect another, the phenotypic properties of different brain regions are ultimately the product of distinctive combinations of expressed gene products and their regulation, resulting in the metabolome as the informative modality to define cellular diversity in the CNS.

The fact that specific regions of the CNS exhibit differential vulnerabilities to aging and various neurodegenerative (NDD) and neuropsychiatric diseases (NPD) also redounds to the heterogeneity in neuronal responses to cell-damaging processes associated with each of the diseases (Mattson and Magnus 2006), in addition to the specificity in the aetiology of each disease. So, in order to better

understand the mechanisms which are involved in neuronal resistance/sensitivity to stress and death, it is crucial to define cell vulnerability of the different brain regions in physiological conditions. From this scenario of cellular diversity emerges the concept of selective neuronal vulnerability (SNV) (Mattson and Magnus 2006; Saxena and Caroni 2011) which may be described as the endogenous differential sensitivity of cell populations in the CNS, and their susceptibility to stresses that cause cell damage or death which can lead to NDD and NPD.

This study focuses on the prospects that an 'omic' approach offers for the identification of traits that define the SNV for a given brain region, and their potential involvement in the neuronal aging process and the development of NDD and NPD. Despite the fact that systems biology-based approaches allow a global characterization (at the molecular level) of complex global biological systems, to date no metabolomic studies investigating cross-regional differences in the human brain have been reported. To overcome this limitation, here we used the combination of mass spectrometry-based technologies (ESI-TQ-MS/MS and ESI-QTOF-MS/MS) to measure the concentrations of 36 specific metabolites and to determine the metabolomic profiles, respectively, of three different regions of the human cerebral cortex.

We designed a panel of metabolites mostly belonging to the one-carbon metabolism, as an integrator of nutrient status and energy metabolism. For one-carbon metabolism, the integration is carried out through the donation of carbon units from specific amino acids; this involves three pathways: the folate cycle, the methionine cycle and the trans-sulfuration pathway (Locasale 2013). In addition to the metabolomic analysis, we have also measured, using western blot, different factors associated with stress resistance and cell survival such as the antioxidants catalase and SOD1, the FOXO transcriptional factor FOXO1, the repressor element 1-silencing transcription factor REST, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, the mechanistic target of rapamycin mTOR.

Using this approach, we studied metabolic differences in three functionally and evolutionarily distinct brain regions: entorhinal cortex, hippocampus and frontal cortex. The frontal cortex is a brain region that emerged recently during primate evolution. It is implicated in complex associative functions including reasoning, planning, social behavior, and general intelligence; while the entorhinal-hippocampus system function as a hub in a widespread network for memory. We also focused in hippocampus, entorhinal and frontal cortex areas because their importance in aging, NDDs as Alzheimer's disease (AD), and NPDs as schizophrenia. This allowed us to examine how resistance to stress determines region-specific vulnerability in the adult human cerebral cortex.

## Materials and Methods

### Chemicals

Unless otherwise specified, all reagents were from Sigma-Aldrich, and of the highest purity available.

### Human samples

Brain samples were obtained from the Institute of Neuropathology Brain Bank following the guidelines of the local ethics committee, and in accordance with recently published criteria of sample quality (Ferrer 2015). The selection of cases examined in the present study corresponded to a consecutive series of donations having in common (i) lack of neurological symptoms and signs, (ii) lack of known hepatic or renal function impairment, and (iii) lack of evidence of prolonged agonal state. The brains of adult healthy subjects were obtained from 3 to 15 h after death, and were immediately prepared for morphological and biochemical studies (see Table 1).

At autopsy, one hemisphere was fixed in 4% buffered formalin for about three weeks while the other hemisphere was cut in coronal sections 1 cm thick, selected samples of the brain dissected and kept in labelled plastic bags, immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until use. The neuropathological study, was carried out on formalin-fixed, paraffin-embedded samples of the frontal, primary motor, primary sensory, parietal, temporal superior, temporal inferior, anterior cingulate, anterior insular, and primary and associative visual cortices; entorhinal cortex and hippocampus; caudate, putamen and globus pallidus; medial and posterior thalamus; subthalamus; Meynert nucleus; amygdala; midbrain (two levels), pons and medulla oblongata; and cerebellar cortex and dentate nucleus. De-waxed sections, 5 mm thick, were stained with haematoxylin and eosin, and Klüver Barrera or processed for immunohistochemistry to  $\beta$ -amyloid, phosphorylated tau,  $\alpha$ -synuclein, ubiquitin, p62, TDP43, glial fibrillary protein and microglia markers.

Selected cases did not show lesions on the neuropathological examination including any kind of  $\beta$ -amyloid, tau, hypoxic and vascular pathology. Following the initial screening, the present series includes 20 cases: 16 men 4 women, aged from 43 to 66 years with post-mortem delay ranging from 3h 10 min to 20h 30 min (Table 1). Frozen samples of the entorhinal cortex (n=11), hippocampus (n=9) and frontal cortex area 8 (n=11) were used for metabolomic studies. Samples from the three regions were processed in parallel.

### Metabolomic analysis

An important technical concern is the relevance of metabolite measurements made in postmortem brain tissue to *in vivo* metabolite concentrations. The criteria applied for the selection of cases ensure the quality of the samples and the preservation of the concentration of *in vivo* metabolites

measured. Reinforcing this, previous studies demonstrated that the concentration of many metabolites, such as myo-inositol, creatine, glutamine, glutamate, N-acetylaspartate, and taurine remained stable in postmortem brain tissue over long time intervals (Opstad et al. 2010; Perry et al. 1981; Michaelis et al. 1996; Petroff et al. 1988). Similarly, experiments quantifying brain polyamines, such as spermine, spermidine, and putrescine, in postmortem human brain using GC-MS did not report any significant relationship between these metabolite concentrations and postmortem interval (Chen et al. 2009). Because most of these metabolites belong to metabolic pathways associated with one-carbon metabolites, we understand that metabolites analysed in the present study showed long-term stability and no indication of postmortem-induced concentration change; consequently, we may exclude postmortem delay as a confounding factor in this study.

### ***Metabolite extraction from brain samples***

Tissue samples (35-50 mg) were homogenized using 20 volumes of cold methanol containing 1 µg/mL of phenylalanine C13 as internal standard and 1µM butylhydroxytoluene as antioxidant. Then, samples were incubated at 20°C for 1 hour and centrifuged at 12000g for 3 min, and supernatants subjected to mass spectrometry analysis.

### ***Triple Quadrupole Mass Spectrometry***

For analysis, we have developed a new method (using a targeted approach based on LC ESI-TQ MS/MS) to detect and quantify a metabolomics panel including 36 metabolites belonging to energy metabolism and one-carbon metabolism in human brain tissue (see Table 2). Samples were decoded and randomized before injection. Every 5 samples, internal and external standards were injected as a quality control.

Samples were analysed with liquid chromatography (UPLC 1290, Agilent Technologies, San Jose, CA, USA) coupled with electrospray ionization on a triple quadrupole mass spectrometer (ESI-TQ MS/MS, Agilent Technologies 6420, San Jose, CA, USA). For analysis 6µL of the extract was injected. Chromatographic separation was achieved on a reversed phase C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 µm particles; Agilent Technologies, San Jose, CA, USA) column using a flow rate of 0.2 mL/min during a 19 min gradient (0–5 min 0% B, 5-8 min from 0% B to 30% B, 8-9 min from 30% B to 100% B, 8-12 min 100% B, 12-13 min from 100% B to 0% B, 13-19 min 0% B), while using the solvents A, 0.1% formic acid, and B, acetonitril 0.1% formic acid. Electrospray ionization was performed in both positive and negative ion mode (depending on the target metabolite) using N<sub>2</sub> at a pressure of 50 psi for the nebulizer with a flow of 12L/min and a temperature of 325°C, respectively.

To detect the individual metabolites, multiple reaction monitoring (MRM) in negative and in positive ion mode was performed with individually optimized fragmentor voltage and collision

energies (Optimizer application, MassHunter, Agilent Technologies, San Jose, CA, USA). Most of MRM parameters were achieved by flow injection of pure standards and the MassHunter Optimizer software (Agilent Technologies, San Jose, CA, USA). However, some of metabolites need a manual optimization using MassHunter Qualitative Analyses (Agilent Technologies, San Jose, CA, USA). All the MRM parameters obtained from optimization were compared to the literature when available for certain compounds. Finally, a chromatographic system was applied to determine retention time of each standard. Peak determination and peak area integration were performed with MassHunter Qualitative Analyses (Agilent Technologies, San Jose, CA, USA).

### ***QTOF Mass spectrometry***

Metabolite extracts were evaporated using a Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain), re-suspended in water 0.4% acetic acid:methanol (1:1), and subjected to mass-spectrometry using an HPLC 1290 series coupled with an ESI-Q-TOF MS/MS 6520 (Agilent Technologies, San Jose, CA, USA). Specifically, 2 $\mu$ L of sample extract was applied to a reversed-phase column Zorbax SB-Aq (1.8 $\mu$ m 2.1 X 50mm; Agilent Technologies, Barcelona, Spain) equipped with a precolumn Zorba-SB-C8 Rapid Resolution Cartridge (2.1 X 30mm 3.5  $\mu$ m) with a column temperature of 60°C. The flow rate was 0.6mL/min. Solvent A was composed of water containing 0.2% acetic acid and solvent B was composed of methanol 0.2% acetic acid. The gradient started at 2% B and increased to 98% B in 13min and held at 98% B for 6min. Post-time was established at 5min, as previously described (Ansoleaga et al. 2015).

Data were collected in positive and negative electrospray mode TOF operated in full-scan mode at 100–3000 m/z in an extended dynamic range (2 GHz), using N<sub>2</sub> as the nebulizer gas (5 L/min, 350 °C). The capillary voltage was 3500 V with a scan rate of 1 scan/s. The ESI source used a separate nebulizer for the continuous, low-level (10 L/min) introduction of reference mass compounds: 121.050873, 922.009798 (positive ion mode), and 119.036320, 966.000725 (negative ion mode), which were used for continuous online mass calibration. The MassHunter Data Analysis Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used to collect the results, and the MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used to obtain the molecular features of the samples, representing various co-migrating ionic species of a given molecular entity using the Molecular Feature Extractor algorithm (Agilent Technologies, Barcelona, Spain), as described (Jove et al. 2015; Sana et al. 2008). Finally, the MassHunter Mass Profiler Professional Software (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used to perform a nontargeted metabolomic analysis of the extracted features. We selected samples with a minimum absolute abundance of 5000 counts and with a minimum of 2 ions. Multiple charge states were not considered. Compounds from different samples were aligned using an RT window of 0.1%  $\pm$  0.15min and a mass window of 5.0ppm  $\pm$  2.0mDa. Only common features (found in at least 75% of the samples of the same condition) were analyzed, correcting for individual bias. Data for

principal component analysis (PCA), partial-least-square discriminant analyses (PLS-DA), and hierarchical clustering were obtained using this software.

### ***Mass spectrometry analysis of 2-SC***

2-SC was determined as trifluoroacetic acid methyl ester (TFAME) derivatives in acid hydrolysed, delipidated, and reduced brain protein samples by GC/MS using a HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with an MSD5973A Series detector and a 7683 Series automatic injector, an HP-5MS column (30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m), and the described temperature program (Naudi et al. 2013). Quantification was performed with internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. Analyses were carried out with selected ion-monitoring GC/MS (SIM-GC/MS). The ions used were lysine and [ $^2\text{H}_8$ ]lysine, m/z 180 and 187, respectively, and 2-SC and [ $^2\text{H}_2$ ]SC, m/z 284 and 286. The amounts of product was expressed as  $\mu$ moles of 2-SC per mol of lysine.

### **Western blot Analysis**

The amounts of different factors associated with stress resistance and cell survival such as the antioxidants catalase and SOD1, the FOXO transcriptional factor FOXO1, the repressor element 1-silencing transcription factor REST, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, mechanistic target of rapamycin mTOR, were estimated using western blot analyses in samples from brain tissue.

Brain tissue (50mg from each specific brain region) was homogenized in a buffer containing 180 mM KCl, 5 mM MOPS, 2 mM EDTA, 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid, 1  $\mu$ M butylated hydroxyltoluene, protease inhibitor mix (80-6501-23, Amersham Biosciences), and phosphatase inhibitors (Na $_3$ VO $_4$  1 mM, NaF 1mM). A brief centrifugation (1000 rpm at 4°C for 3 min) to pellet and remove cellular debris was performed. The protein concentration was measured using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay 500-0006). Proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE. Samples were mixed with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 20% 2- $\beta$ -mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min. Proteins (35  $\mu$ g) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide minigels. For immunodetection, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio Rad) in a buffer containing 25 mM TRIS, 192 mM Glycine and 20% methanol, to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). The membranes were immersed in blocking solution (0.5% BSA Sigma-Aldrich A4503, 0.1% Tween in TBS) at room temperature for 1h. After blocking, the membranes were washed two times using 0.05% TBS-T buffer. Afterwards, they were incubated in primary solution using specific antibodies: anti-GFAP (1:1000, ref. ab7260), anti-catalase (1:1000, ref. ab16731), anti-SOD1 (1:5000, ref. ab52950), anti-FoxO1 (1:1000, ref. 2880 Cell Signaling), anti-REST (1:1000, ref. ab21635), and anti-phospho-mTOR and anti-mTOR



(1:1000 in both cases, ref. 2971s and 2972-Cell Signaling Technology, respectively). An antibody to actin (1:5000, ref. A5441 Sigma) was also used in each analysis to determine the amount of the different factors in reference to total protein mass.

The primary antibody was incubated at 4°C for 16 h. Then, the membrane was washed three times in 0.05% TBS-T buffer and incubated at room temperature for 1 h with the appropriate secondary antibodies [ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase linked whole antibody-NA93IV GE Healthcare (1:50000) and ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugated-31460 Pierce Biotechnology (1:100000)]. After five washes with 0.05% TBS-T buffer, bands were visualized using an enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, MA, USA). Signal quantification and recording was performed with ChemiDoc equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, Spain). The amounts of the determined factors were specifically calculated from the ratio of their densitometry values in reference to the densitometry values of their own actin content. Ratio of phospho-mTOR to total-mTOR was calculated. The amounts of REST and GFAP were specifically calculated from the ratio of their densitometry values in reference to the densitometry values of their gallyas stain protein.

### **Statistical analysis**

All statistic calculations were performed using the SPSS software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Values were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were made with ANOVA followed by DMS tests for paired groups. The minimum level of statistical significance was set at  $p < 0.05$  in all the analyses.

### **Results**

Evidence from comparative studies of gene expression and evolution suggest that human neocortical neurons are characterized by unusually high levels of energy metabolism, along with an increase in glial cell density in the human frontal cortex in comparison with other anthropoid primate species in order to support greater metabolic demands (Sherwood et al. 2006). We have extended this idea to three different regions of the adult human brain cerebral cortex to evaluate possible differences in the density of glial cells relative to neurons, as an indirect indication of increased neuronal metabolic demands. Our results demonstrate that frontal cortex shows an increased density of neurons along with a concomitant decrease in glial cells compared to entorhinal cortex ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) and hippocampus ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 1), suggesting lower neuronal metabolic demands specifically in frontal cortex.

To explore the bioenergetic demands of the different regions of the human cerebral cortex, we measured using a TQMS approach a myriad of metabolites which directly (aconitate, succinate, and fumarate) or indirectly (tryptophan, glutamate, glutamine, proline, carnitine and glyceraldehyde-3-

phosphate) are associated with or involved in Krebs cycle (Fig. 2). No interregional differences were detected for aconitate, tryptophan, carnitine, glutamate, or glutamine. In contrast, the concentrations of succinate and fumarate, and of proline, were significantly lower in frontal cortex compared to entorhinal cortex and hippocampus, while no differences were observed between entorhinal cortex and hippocampus.

The post-translational modifications (PTMs) of cysteine residues include oxidation, S-glutathionylation, S-nitrosylation, and succination, all of which modify protein function or turnover in response to a changing intracellular redox environment. Succination is a chemical modification of cysteine in proteins by the Krebs cycle intermediate, fumarate, yielding S-(2-succino) cysteine (2SC). 2-SC serves as a biomarker of mitochondrial stress, and recent studies suggest that succination is a mechanistic link between mitochondrial dysfunction, oxidative and ER stress, and cellular progression toward apoptosis (Merkley et al. 2014). Results show that the steady-state levels of 2-SC are significantly lower in frontal cortex compared to entorhinal cortex, with no differences between entorhinal cortex and hippocampus (Fig. 2).

Cell physiology requires the construction of building blocks for new cellular components, including proteins, lipids, and nucleic acids, as well the maintenance of cellular redox status, and genetic and epigenetic status. Amino acid metabolism involving serine and glycine, and the carbon units that they provide, satisfies many of these requirements. Figure 3 demonstrates the existence of significant inter-regional differences in the concentrations of serine, glycine, and threonine, and related metabolites such as choline, betaine, and sarcosine, thereby verifying that the concentrations of all these metabolites are significantly lower in frontal cortex, and higher in hippocampus, compared to entorhinal cortex.

We then investigated interregional differences of one-carbon metabolism in human cerebral cortex. One-carbon metabolism integrates cellular nutrient status by cycling carbon units from amino acid inputs to generate diverse outputs, including redox maintenance and cellular biosynthesis. In particular, we focused our analysis on metabolites belonging to the methionine metabolism (including the methionine cycle and the transsulfuration pathway) and purine metabolism. To assess these pathways, we measured with TQMS the metabolites (directly or closely related to) that follow: a) for methionine cycle: methionine, S-adenosyl-methionine, and homocysteine, as well as spermidine and proline; b) for the transsulfuration pathway: cystationine, cysteine, glutathione, taurine, and vitamin B6 (pyridoxal and pyridoxamine); and finally, c) for purine metabolism: inosine monophosphate (IMP), adenosine monophosphate (AMP), guanosine monophosphate (GMP), adenosine, inosine, xanthosine, hypoxanthine, and xanthine, and we included the metabolite from pentose phosphate pathway ribose-5-phosphate. TQMS analysis showed a marked decrease in the concentration of all metabolites of the methionine cycle in frontal cortex with respect to hippocampus and/or entorhinal cortex, while significantly higher concentrations of SAM and

spermidine in hippocampus compared to entorhinal cortex were detected (Fig. 4). No interregional changes were detected for metabolites of the transsulfuration pathway, with the exception of taurine, which was significantly higher in hippocampus compared to entorhinal cortex, and again lower in frontal cortex compared to hippocampus (Fig. 4). No interregional difference was detected for the metabolites of the purine metabolism, with the exception of xanthosine, hypoxanthine and ribose-5P, which were significantly lower in frontal cortex (Fig. 5).

We then considered whether this interregional different metabolic status might be associated with changes in cellular systems linked to stress resistance and cell survival. To this end, we measured the antioxidant enzymes catalase and SOD1, the FOXO transcriptional factor FOXO1, the repressor element 1-silencing transcription factor REST, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, mechanistic target of rapamycin mTOR (Fig. 6). Western blots analysis showed that catalase and SOD1 were significantly and specifically increased in frontal cortex, that FOXO1 and REST did not show interregional differences, and that the activation of mTOR was significantly lower in frontal cortex.

We finally examined whether these particular interregional differences in metabolic pathways could be ascribed to a more general region-specific metabolomic status. For this purpose, we determined the tissue metabolomic profile using high-throughput metabolomic profiling technologies. Using an untargeted approach and selecting only those molecular features which were present in at least 75% of the samples of the same group (about 3500 joining positive and negative ionization modes) we performed the multivariate statistics. As shown in Figure 7A hierarchical clustering perfectly discriminates among the three brain regions studied. Furthermore, this discrimination was also present when PCA and PLS-DA algorithms were applied (Fig. 7B), indicating that brain area is the main factor determining metabolome differences. Furthermore, and according to clustering analyses, entorhinal and frontal cortex were closer to each other than to hippocampus (Fig. 7A).

## **Discussion**

Although metabolic pathways that are significant for brain function are highly conserved across diverse taxa (Peregrin-Alvarez et al. 2009), current findings show that brain metabolism experienced considerable changes in primates and, unambiguously, in the human evolutionary lineage (Somel et al. 2013). In addition to evolutionary considerations, brain neurons offer a diverse response to stresses and adverse factors during aging or as a result of both NDD and NPD (Mattson and Magnus 2006; Jove et al. 2014; Naudi et al. 2015). The morphological and functional diversity among neuronal cells, the temporal trajectory of functional losses during the aging process, the temporal pattern and specificity in the appearance and development of each NDD and NPD, as well as the heterogeneity in

neuronal responses to cell-damaging processes associated with each of the diseases, all confirm the existence of a cross-regional SNV (Mattson and Magnus 2006; Jove et al. 2014; Naudi et al. 2015). This SNV could be expressed through a neuron(region)-specific metabolomic profile. Hence, metabolomics can help to define and improve understanding of cellular (regional) diversity in the CNS. From an inter-regional comparative perspective there is, however, a lack of studies focused on outlining the specific metabolomics of the distinctly functional sub-regions of the brain. The establishment of metabolic differences between areas (including differing regulation of critical pathways) could help define the susceptibility of individuals to NDD and NPD, opening a new way to improved understanding of these pathologies and potentially allowing for earlier diagnosis and improved prognosis. To shed light on this, we performed a comparative metabolomic analysis of three healthy human brain regions: entorhinal cortex, hippocampus, and frontal cortex.

Our results show the existence of reduced energy demand, mitochondrial stress and one-carbon metabolism (particularly restricted to the methionine cycle) specifically in frontal cortex. These findings along with a better antioxidant capacity and lower mTOR signaling as well in frontal cortex suggest that this brain region is especially resistant to stress compared to the entorhinal cortex and hippocampus, which are more vulnerable regions.

The one-carbon metabolism can be considered as an integrator of nutrient status. Thus, inputs in the form of glucose and amino acids enter the metabolic network, are metabolized, and then become output for diverse biological functions. For one-carbon metabolism, the integration is supported through the donation of carbon units from specific amino acids. These carbon units are distributed via a series of pathways for use in diverse cellular processes that include cellular biosynthesis, regulation of redox status, regulation of epigenetics through nucleic acid and protein methylation, and genome maintenance through the regulation of nucleotide pools. The partitioning of carbon units into these different cellular outputs involves three interrelated pathways: the folate cycle, the methionine cycle and the transsulfuration pathway. More and more studies have shown that defects in one-carbon metabolism in brain induce deep disturbances in cell physiology as a consequence of the relevant pathways where one-carbon metabolism is involved, and also, more importantly, through the toxic effects derived from the metabolites which shape the core of the methionine cycle. Thus, information has been emerging regarding a connection between homocysteine metabolism and cognitive function, from mild cognitive decline to vascular dementia and Alzheimer's disease (Miller 2003). In contrast, low methionine and derived metabolite content, either constitutively or induced by nutritional intervention, is associated with resistance to stress and a longer lifespan (Pamplona and Barja 2006; Naudi et al. 2007; Pamplona and Barja 2011). Hence, we may infer that the lower one-carbon metabolism observed in frontal cortex is a physiological adaption which confers a resistance to stress on this region.

Available evidence indicates that the mTOR signaling pathway is involved in cellular senescence, brain aging, and age-related neurodegenerative diseases (Garelick and Kennedy 2011; Perluigi et al. 2015; Bockaert and Marin 2015). mTOR is a conserved serine/threonine kinase which regulates cell growth and metabolism in response to nutrients, growth factors, and cellular energy conditions. An increasing number of studies show that disturbance in mTOR signaling in the brain affects multiple pathways including glucose metabolism, energy production, mitochondrial function, cell growth, and autophagy. All these events are key players in age-related cognitive decline as well as NDD and NPD. Conversely, attenuation of the mTOR signal, through pharmacological and nutritional intervention, increases longevity and is associated with a healthy lifespan, including improvement in brain function (Garelick and Kennedy 2011; Perluigi et al. 2015). Consequently, we may infer that the lower mTOR signalling observed in frontal cortex is a physiological adaption which confers a resistance to stress on this region.

Our results define the existence of deep metabolome differences of three different mature and healthy human brain regions, confirming the existence of cross-regional differences in the human brain. We must note, however, that even though our analysis covers key cellular metabolic pathways, it is far from being comprehensive. Nevertheless, our findings indicate that the metabolomics signature is an optimized feature associated with diversity among neuronal populations in brain cortex, allowing us to hypothesize that the metabolic optimization of some physiological traits, such as resistance to stress, is region-specific. However, it is evident that more studies are needed to establish a metabolomic-wide atlas of metabolites in the adult human brain, and to show how this is projected during the aging process and the onset and progression of NDD and NPD.

## **Acknowledgements**

R.C. received predoctoral fellowships from the Autonomous Government of Catalonia. We thank T. Yohannan for editorial help.

## **Funding**

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Institute Carlos III (FIS grants PI14/00757 and PI14/00328), and the Autonomous Government of Catalonia (2014SGR69 and 2014SGR168) to I.F. and R.P. This study has been co-financed by FEDER funds from the European Union.

## Author Contributions

I.F. and R.P. designed the experiments. R.C., M.J., M.P.O., and R.P. analyzed the data. R.C., A.N., V.A., G.P.R., M.P.G.V, M.D.G., E.O., R.B., and N.M.M. performed the experiments. R.P. supervised the design and data interpretation. The manuscript was written by I.F. and R.P. and edited by R.P. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## References

- Ansoleaga B, Jové M, Schlüter A, Garcia-Esparcia P, Moreno J, Pujol A, Pamplona R, Portero-Otín M, Ferrer I. 2015. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 36(1):68-80.
- Bockaert J, Marin P. 2015. mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev*. 95(4):1157-1187.
- Cáceres M, Lachuer J, Zapala MA, Redmond JC, Kudo L, Geschwind DH, Lockhart DJ, Preuss TM, Barlow C. 2003. Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(22):13030-13035.
- Chen GG, Turecki G, Mamer OA. 2009. A quantitative GC-MS method for three major polyamines in postmortem brain cortex. *J Mass Spectrom*. 44(8):1203-1210.
- Ferrer I. 2015. Selection of controls in the study of human neurodegenerative diseases in old age. *J Neural Transm*. 122(7):941-947.
- Fu X, Giavalisco P, Liu X, Catchpole G, Fu N, Ning ZB, Guo S, Yan Z, Somel M, Pääbo S, Zeng R, Willmitzer L, Khaitovich P. 2011. Rapid metabolic evolution in human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(15):6181-6186.
- Garelick MG, Kennedy BK. 2011. TOR on the brain. *Exp Gerontol*. 46(2-3):155-163.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnolli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, Daly BD, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbeare TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarz ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sodt AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wohnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SG, Jones AR. 2012. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 489(7416):391-399.
- Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. 2014. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 73(7):640-657.

Jové M, Maté I, Naudí A, Mota-Martorell N, Portero-Otín M, De la Fuente M, Pamplona R. 2015. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. doi: 10.1093/Gerona/glv074.

Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. 2013. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res*. 41(Database issue):D793-800.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445(7124):168-176.

Locasale JW. 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 13(8):572-583.

Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. 7: 278–294.

Merkley ED, Metz TO, Smith RD, Baynes JW, Frizzell N. 2014. The succinated proteome. *Mass Spectrom Rev*. 33(2):98-109.

Michaelis T, Helms G, Frahm J. 1996. Metabolic alterations in brain autopsies: proton NMR identification of free glycerol. *NMR Biomed*. 9(3):121-124.

Miller AL. 2003. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev*. 8(1):7-19.

Mink JW, Blumenshine RJ, Adams DB. 1981. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am J Physiol*. 241(3):R203-R212.

Naudí A, Cabré R, Jové M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R. 2015. Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer's Disease Pathology. *Int Rev Neurobiol*. 122:133-189.

Naudí A, Caro P, Jové M, Gómez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R. 2007. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res*. 10(4):473-484.

Naudí A, Jové M, Cacabelos D, Ayala V, Cabre R, Caro P, Gomez J, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R. 2013. Formation of S-(carboxymethyl)-cysteine in rat liver mitochondrial proteins: effects of caloric and methionine restriction. *Amino Acids*. 44(2):361-371.

- Opstad KS, Wright AJ, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. 2010. Correlations between in vivo (1)H MRS and ex vivo (1)H HRMAS metabolite measurements in adult human gliomas. *J Magn Reson Imaging*. 31(2):289-297.
- Pamplona R, Barja G. 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology*. 12(5):409-435.
- Pamplona R, Barja G. 2006. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta*. 1757(5-6):496-508.
- Peregrín-Alvarez JM, Sanford C, Parkinson J. 2009. The conservation and evolutionary modularity of metabolism. *Genome Biol*. 10: R63.
- Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. 2015. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.014.
- Perry TL, Hansen S, Gandham SS. 1981. Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J Neurochem*. 36(2):406-410.
- Petroff OA, Ogino T, Alger JR. 1988. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolite levels and postmortem changes. *J Neurochem*. 51(1):163-171.
- Sana TR, Roark JC, Li X, Waddell K, Fischer SM. 2008. Molecular formula and METLIN Personal Metabolite Database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. *J Biomol Tech*. 19: 258–266.
- Saxena S, Caroni P. 2011. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*. 71: 35–48.
- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR. 2006. Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(37):13606-13611.
- Somel M, Liu X, Khaitovich P. 2013. Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat Rev Neurosci*. 14(2):112-27.



**Table 1. Cases examined**

Case	Age (y)	Gender	Post-mortem delay	Entorhinal cortex	Hippocampus	Frontal cortex
1	43	Man	4h 35 min			x
2	43	Man	5h 55 min			x
3	47	Man	4h 55 min			x
4	48	Woman	4h			x
5	50	Man	17h 15 min	x		
6	52	Man	4h 04 min	x		
7	52	Man	4h 40 min			x
8	53	Man	7h 25 min			x
9	54	Woman	14h 25 min	x	x	
10	54	Man	10h 35 min	x	x	
11	56	Man	3h 45 min	x	x	x
12	56	Man	8h 50 min	x	x	
13	57	Man	20h 30 min	x	x	
14	58	Man	3h 10 min	x	x	
15	58	Man	4h			x
16	58	Man	8h 05 min	x	x	
17	59	Man	4h 15 min	x	x	
18	61	Man	3h 55 min		x	x
19	64	Woman	5 h			x
20	66	Woman	4h 15 min	x		x

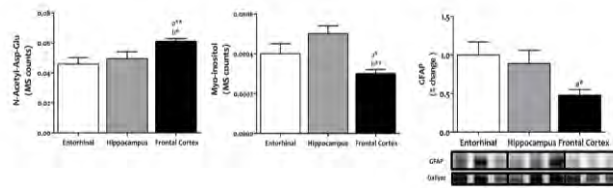
**Table 2. Analytical traits of the panel of metabolites designed to be measured in the samples of cerebral cortex from healthy adults.**

Dynamic MRM								
Compound name	Precursor ion	Product ion	Ret time (min)	Delta ret time	Fragmentor	Collision energy	Cell accelerator voltage	Polarity
3 P-Glycerate (*)	185	97	0.82	1	75	12	7	Negative
Cis-Aconitate	175.03	129	1.5	1	65	4	7	Positive
Fumarate	115	71	1.8	1	60	4	7	Negative
Glutamic acid	146	102.1	0.8	1	75	12	7	Negative
Glutamine	147.1	84	0.79	1	70	16	7	Positive
Glyceraldehyde 3P	168.99	97	0.8	1	119	4	7	Negative
L-Carnitine	162.1	60.1	0.81	1	107	16	7	Positive
NADH (*)	666	136.7	2.4	1	124	44	7	Positive
NADPH (*)	746.1	302	1.57	1	129	36	7	Positive
Phosphoenolpyruvate (*)	166.97	79	0.84	1	55	8	7	Negative
Proline	116.07	70.1	0.81	1	75	16	7	Positive
Pyruvate (*)	87	43.1	1.4	1	35	4	7	Negative
Succinate	117	73.1	2.2	1	65	8	7	Negative
Tryptophan	205.1	188.1	9.8	1	70	4	7	Positive
Betaine	118.09	58.1	0.82	1	107	28	7	Positive
Choline	105.12	61.1	0.78	1	92	16	7	Positive
Glycine	76	48.1	0.78	1	35	0	7	Positive
L-Serine	106.05	60.1	0.79	1	60	8	7	Positive
Sarcosine	90.06	44.1	0.8	1	40	16	7	Positive
Threonine	120.1	74.1	0.8	1	65	4	7	Positive
5-Methyl-THF (*)	460.2	313.3	13.3	2	104	12	7	Positive
Cysteine	122.03	59	0.85	1	129	24	7	Positive
Cystathionine	223.08	88	0.8	1	77	24	7	Positive
Folate acid (*)	442.15	295.1	9.35	2	92	8	7	Positive
GSH	308.09	84	1.6	1	97	28	7	Positive
GSSG (*)	613.16	355	1.4	1	161	16	7	Positive
Homocysteine	136.2	90	0.88	1	65	4	7	Positive
Methionine	150.06	56.1	1.4	1	70	12	7	Positive
PLP (*)	248	94.2	1.6	1	110	28	7	Positive
Pyridoxal	168.1	150	1.6	1	70	8	7	Positive
Pyridoxamine	169.1	150.2	0.82	1	70	12	7	Positive
SAH (*)	385.13	136	4.39	1	97	12	7	Positive
SAM	399.15	250	0.8	1	100	8	7	Positive

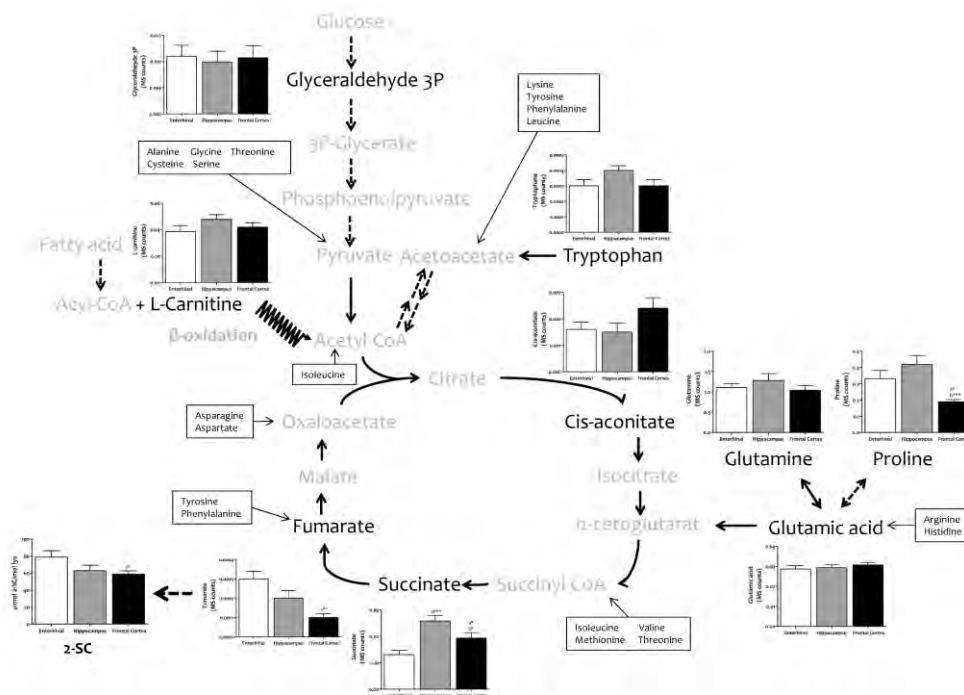
Dynamic MRM								
Compound name	Precursor ion	Product ion	Ret time (min)	Delta ret time	Fragmentor	Collision energy	Cell accelerator voltage	Polarity
Spermidine	146.2	72.1	0.71	1	75	12	7	Positive
Taurine	124	80	0.8	1	102	20	7	Negative
Adenosine	268.1	136	6	1	92	12	7	Positive
ADP (*)	426.02	158.9	1.33	1	134	20	7	Negative
AMP	348.07	136	1.8	1	102	16	7	Positive
Desoxyguanosine (*)	268.1	110	9.3	1	168	44	7	Positive
Desoxyguanosine 5MP (*)	348.07	152	3.58	1	85	8	7	Positive
Guanine (*)	152.1	135	1.46	1	107	16	7	Positive
Guanosine 5MP	364	152	0.86	1	87	8	7	Positive
Hypoxanthine	137.05	55.1	2	1	109	32	7	Positive
Inosine	269.09	137	7.3	1	70	4	7	Positive
Inosine 5MP	349.06	137	2.08	1	72	4	7	Positive
Inosine 5DP (*)	427	158.9	1.2	2	119	24	7	Negative
Ribose 5-P	151.06	68.9	0.67	1	40	16	7	Positive
Xanthine	153	110	2.54	1	92	16	7	Positive
Xanthosine	285.1	153	7.6	2	65	4	7	Positive
L-Carnosine (*)	227.1	110.2	0.8	1	92	20	7	Positive
Myo-inositol	179.05	87	0.75	1	102	16	7	Negative
N-Acetyl-Asp-Glut	305.1	148	2.9	1	70	4	7	Positive
N-Acetyl-Asp acid (*)	174	88	1.49	1	75	12	7	Positive
Phenilalanine- <sup>13</sup> C (standard)	167.09	120.1	5.9	2	70	8	7	Positive

Of the initial 53 metabolites included in and optimized for the analysis, 17 (marked by \*) were finally excluded because after the extraction method they were absent. So the final analyzed panel was composed of 36 metabolites.

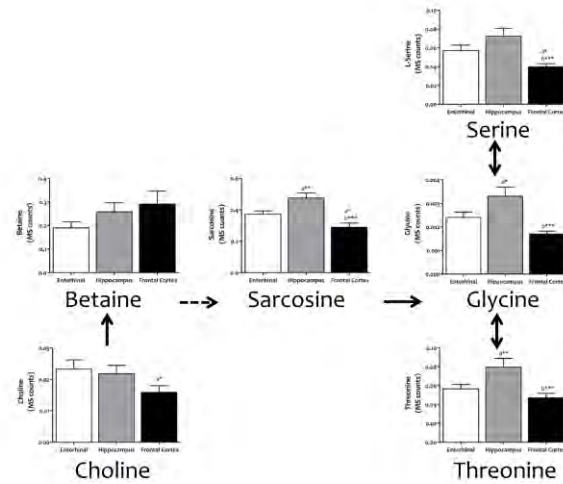
Figures



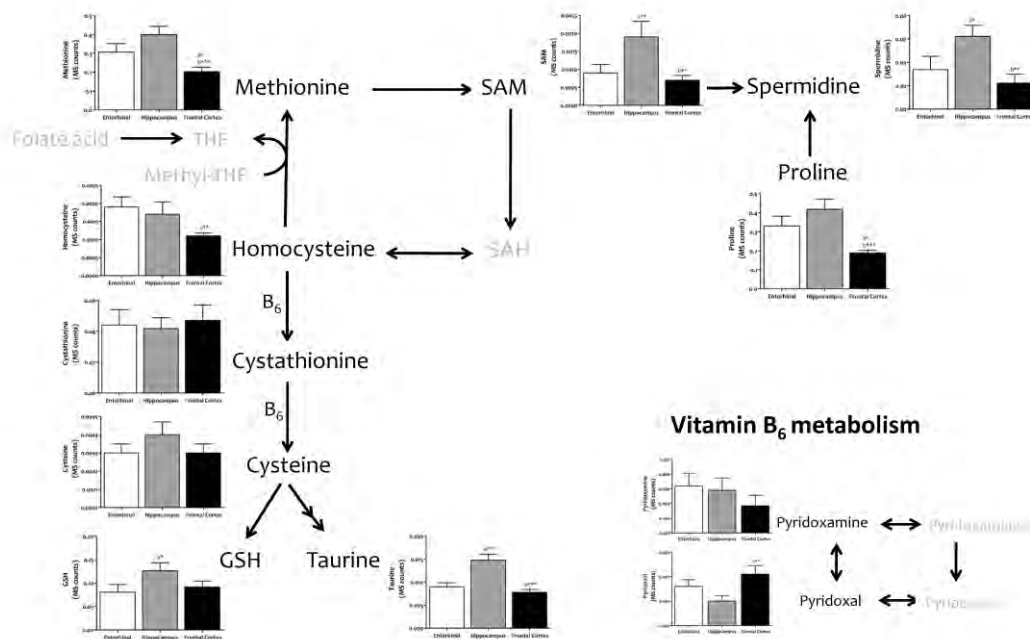
**Figure 1. Content of neurons and glial cells in different regions of the adult human cerebral cortex.** N-acetyl-Asp-Glu was used as marker for neuronal content, and myoinositol and GFAP as markers for glial cells content. N-acetyl-Asp-Glu and Myoinositol were determined with TQMS, while GFAP was measured with western blot. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



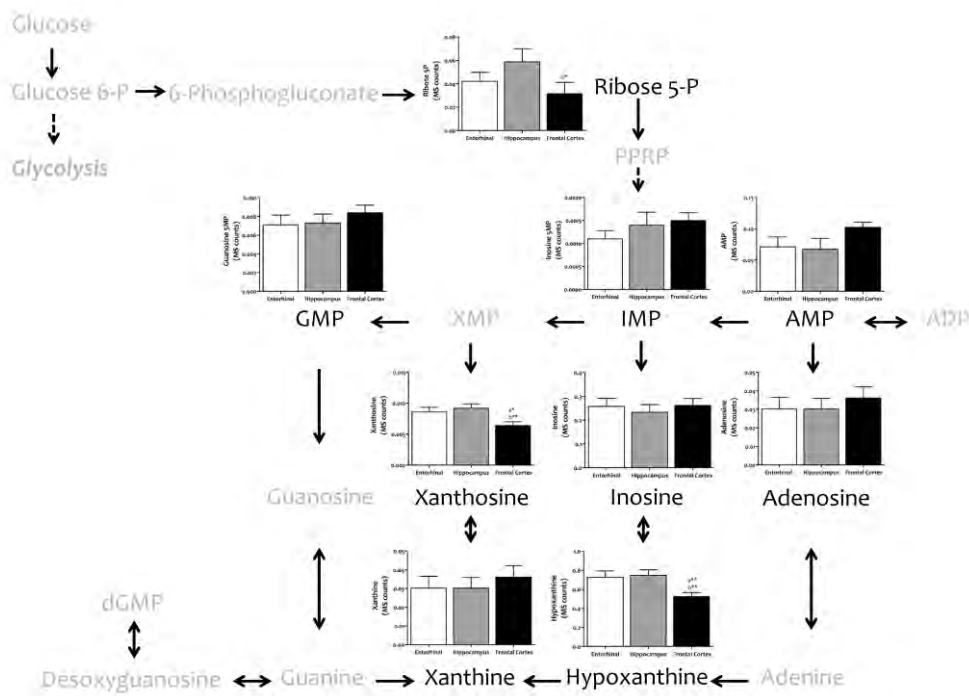
**Figure 2. Concentrations of metabolites involved in bioenergetics metabolism in different regions of the adult human cerebral cortex.** Metabolites were detected and quantified with TQMS. The steady-state level of 2-SC was measured with GC-MS. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



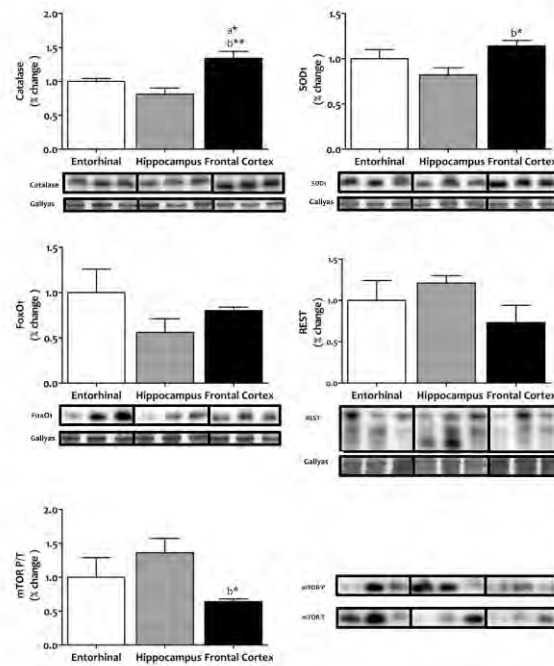
**Figure 3. Tissue concentrations of metabolites from the serine, glycine and threonine metabolism in different regions of the adult human cerebral cortex.** All metabolites were measured with TQMS. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



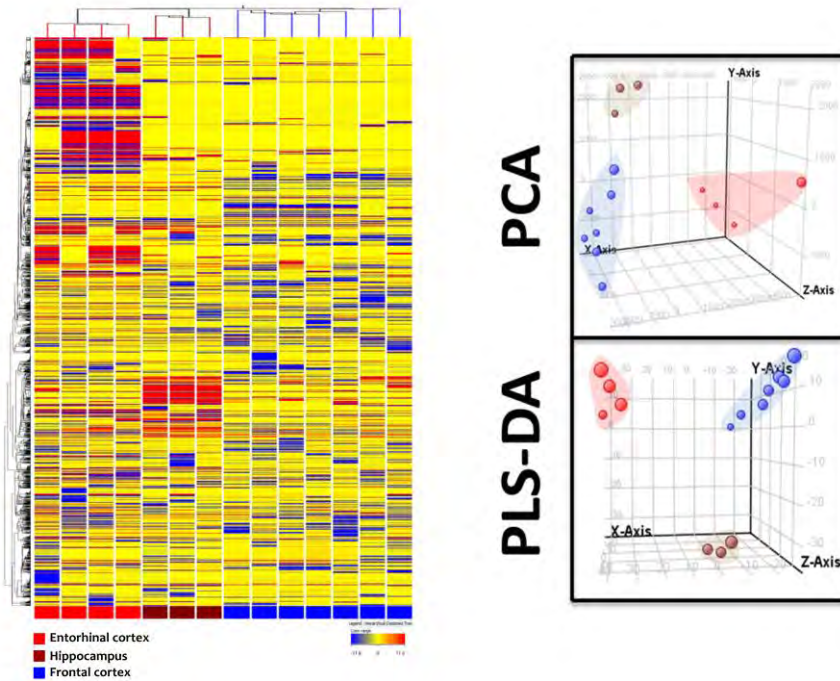
**Figure 4. Tissue concentrations of metabolites belonging to the methionine metabolism, including the methionine cycle and the transsulfuration pathway, in different regions of the adult human cerebral cortex.** All metabolites were measured with TQMS. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



**Figure 5. Tissue concentrations of metabolites from the purine metabolism in different regions of the adult human cerebral cortex.** All metabolites were measured with TQMS. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



**Figure 6. Tissue protein expression of factors associated with stress resistance and cell survival in different regions of the adult human cerebral cortex.** The antioxidants catalase and SOD1, the FOXO transcriptional factor FOXO1, the repressor element 1-silencing transcription factor REST, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, mechanistic target of rapamycin mTOR, where all determined with Western Blot. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . a, significant differences with respect to entorhinal cortex; b, significant differences with respect to hippocampus.



**Figure 7. Metabolomic profiles of entorhinal cortex, frontal cortex, and hippocampus of healthy adult brain human.** (A). Heat map representation of hierarchical clustering of molecular features found in sample. Each line of this graph represents an accurate mass, coloured according to its abundance intensity normalized to internal standard and baselining to median/mean across the samples. The scale from  $-11.9$  (blue) to  $11.9$  (red) represents this normalized abundance in arbitrary units. (B). Tridimensional PCA and PLS-DA graphs.





# Sixty years old is the breakpoint of human frontal cortex aging

Rosanna Cabré,<sup>1,#</sup> Alba Naudí,<sup>1,#</sup> Mayelin Dominguez-Gonzalez,<sup>2</sup> Victoria Ayala,<sup>1</sup> Mariona Jove,<sup>1</sup> Natalia Mota-Martorell,<sup>1</sup> Gerard Piñol-Ripoll,<sup>3</sup> Maria Pilar Gil-Villar,<sup>3</sup> Montserrat Rué,<sup>4</sup> Manuel Portero-Otín,<sup>1</sup> Isidre Ferrer,<sup>2,5,\*</sup> Reinald Pamplona<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Institute for Research in Biomedicine of Lleida (UdL-IRBLleida), E-25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>Institute of Neuropathology, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, E-08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Neurology Division, Hospital Santa Maria of Lleida, E-25006 Lleida, Spain

<sup>4</sup>Department of Basic Medical Sciences, University of Lleida-Institute for Research in Biomedicine of Lleida (UdL-IRBLleida), E-25198 Lleida, Spain

<sup>5</sup>Center for Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), ISCIII, Spain

<sup>#</sup>These authors have contributed equally to this work

## \*Corresponding authors:

Prof. Dr. Isidre Ferrer, Institute of Neuropathology, Service of Pathology, Bellvitge University Hospital, Carrer Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain. Phone: + 34 93 2607452; Email: [8082ifa@gmail.com](mailto:8082ifa@gmail.com)

Prof. Dr. Reinald Pamplona, Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomedica de Lleida (IRBLleida), Edifici Biomedicina 1, Av. Alcalde Rovira Roure-80, Lleida 25198, Catalonia, Spain. Phone: +34-973702442, Fax: +34-973702426; E-mail: [reinald.pamplona@mex.udl.cat](mailto:reinald.pamplona@mex.udl.cat)

## Short title:

Aging of human brain

**Key words:** cell survival pathways, mechanistic target of rapamycin (mTOR), mitochondria respiratory chain, mitochondrial stress, protein oxidation, repressor element 1-silencing transcription factor (REST)

## Abstract

The aging of the human brain is a cause of cognitive decline in the elderly and the major risk factor for Alzheimer's disease. Human neurons are functional over an entire lifespan, yet the mechanisms that preserve function and protect against neurodegeneration during aging are unknown. Furthermore, the time in life when brain aging begins is undefined. Here we show that oxidative and glycoxidative damage significantly increases during human brain aging, with a breakpoint at 60 years old. This trajectory is coincident with a decrease in the content of the mitochondrial respiratory chain complex I to IV. In addition, our findings suggest that the deterioration in oxidative stress homeostasis during aging induces an adaptive response of stress resistance mechanisms based on the sustained expression of REST, and decreased expression of Akt and mTOR over the adult lifespan in order to preserve cell neural survival and function.

## Introduction

Human brain aging is characterized by stereotypical structural and neurophysiological changes and variable degrees of cognitive decline (Andrews-Hanna et al., 2007; Yankner et al., 2008; Bishop et al., 2010; Naudi et al., 2015). Indeed cognitive decline is emerging as one of the greatest health challenges of the 21st century. As the life expectancy of the population has increased, so too has the prevalence of cognitive decline and dementia, mostly in the form of Alzheimer's disease (AD). Thus, current data indicate that eighty-one percent of people who have AD are age 75 or older in the United States (Hebert et al., 2013). So, the greatest risk factor for cognitive decline and AD in the elderly is age itself. Consequently, the development of age-related neurodegenerative pathologies must be understood in the context of the molecular bases of the physiological aging process.

Functional genetic analysis has identified signaling pathways and phenotypes that influence aging in model organisms and brain aging in mammals. Among them, of particular note are changes in genes involved in synaptic plasticity, vesicular transport, mitochondrial function and stress-response (Lee et al., 2000; Jiang et al., 2001; Blalock et al., 2003; Lu et al., 2004; Erraji-Benchekroun et al., 2005; Lin and Beal, 2006; Zahn et al., 2007; Yankner et al., 2008; Bishop et al., 2010; Jove et al., 2014).

Human neurons, however, are functional over an entire healthy lifespan, in contrast to AD pathology, but the mechanisms that preserve function and protect against neurodegeneration during aging are unknown. Multiple lines of evidence suggest that progressive oxidative damage is a conserved, central mechanism of age-related functional decline (Sohal, 2002; Pamplona and Costantini, 2011; Jove et al., 2014), but surprisingly little is known about the changes occurring in specific oxidative markers in the human brain over the adult lifespan. Furthermore, the methods

used in these studies did not allow measurement of specific markers, and any changes at this level are yet to be determined. In addition, the time in life when brain aging begins is as yet undefined.

In the present work, the use of mass spectrometry technologies allowed us to determine a specific non-enzymatic oxidative protein damage profile of the human frontal cortex in individuals ranging from 40 to 90 years old. The choice of frontal cortex is based on the fact that it is a brain region that emerged recently during primate evolution and it is implicated in cognitive function including reasoning, planning, social behavior, and general intelligence. In addition to the protein damage marker analysis, we also measured the content of mitochondrial complexes of the electron transport chain, as well as different factors associated with stress resistance and cell survival such as the repressor element 1-silencing transcription factor REST, a regulator of neuroprotective stress response, and the serine/threonine kinase AKT, a member of the AKT signal transduction pathway that promotes survival and growth in response to extracellular signals, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, the mechanistic target of rapamycin mTOR.

## **Material and Methods**

### **Chemicals**

Unless otherwise specified, all reagents were from Sigma-Aldrich, and of the highest purity available.

### **Human samples**

Brain samples were obtained from the Institute of Neuropathology Brain Bank following the guidelines of the local ethics committee, and in accordance with recently published criteria of sample quality (Ferrer 2015). The selection of cases examined in the present study corresponded to a consecutive series of donations having in common (i) lack of neurological symptoms and signs, (ii) lack of known hepatic or renal function impairment, and (iii) lack of evidence of prolonged agonal state. The brains of adult healthy subjects were obtained from 3 to 15 h after death, and were immediately prepared for morphological and biochemical studies (see Table 1).

At autopsy, one hemisphere was fixed in 4% buffered formalin for about three weeks while the other hemisphere was cut in coronal sections 1 cm thick; selected samples of the brain were dissected and kept in labelled plastic bags, immediately frozen on dry ice, and stored at -80°C until use. The neuropathological study, was carried out on formalin-fixed, paraffin-embedded samples of the frontal, primary motor, primary sensory, parietal, temporal superior, temporal inferior, anterior cingulate, anterior insular, and primary and associative visual cortices; entorhinal cortex and hippocampus; caudate, putamen and globus pallidus; medial and posterior thalamus; subthalamus; Meynert nucleus; amygdala; midbrain (two levels), pons and medulla oblongata; and cerebellar cortex and dentate nucleus. De-waxed sections, 5 mm thick, were stained with haematoxylin and

eosin, and Klüver Barrera, or processed for immunohistochemistry to  $\beta$ -amyloid, phosphorylated tau,  $\alpha$ -synuclein, ubiquitin, p62, TDP43, glial fibrillary protein, and microglia markers.

Selected cases did not show lesions on neuropathological examination including any kind of  $\beta$ -amyloid, tau, hypoxic, or vascular pathology. Following initial screening, the present series included 41 cases: 22 men and 19 women, with an age ranging from 43 to 86 years, and with post-mortem delay ranging from 2h to 19h 30 min (Table 1). Frozen samples of frontal cortex area 8 were used for biochemical studies.

### **Protein oxidation, glycooxidation, and succination**

Markers of protein oxidation (the protein carbonyls glutamic [GSA] and amino adipic [AASA] semialdehydes), glycooxidation (carboxyethyl-lysine [CEL], carboxymethyl-lysine [CML], and carboxymethyl-cysteine [CMC]), and succination (S-(2-succinyl) cysteine [2SC]), were determined as trifluoroacetic acid methyl ester (TFAME) derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced tissue protein samples by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Pamplona et al. 2005) using an HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with an MSD5973A Series detector and a 7683 Series automatic injector, a HP-5MS column (30-m x 0.25-mm x 0.25- $\mu$ m), and the described temperature program (Pamplona et al. 2005). Quantification was performed by internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. Analyses were carried out with selected ion-monitoring GC/MS (SIM-GC/MS). The ions used were: lysine and [2H8]lysine, m/z 180 and 187, respectively; 5-hydroxy-2-aminovaleric acid and [2H5]5-hydroxy-2-aminovaleric acid (stable derivatives of GSA), m/z 280 and 285, respectively; 6-hydroxy-2-aminocaproic acid and [2H4]6-hydroxy-2-aminocaproic acid (stable derivatives of AASA), m/z 294 and 298, respectively; CEL and [2H4]CEL, m/z 379 and 383, respectively; CML and [2H2]CML, m/z 392 and 394, respectively; CMC and [13C3-15N]CMC, m/z 271 and 273, respectively; and 2-SC and [2H2]SC, m/z 284 and 286. The amounts of product were expressed as  $\mu$ moles of GSA, AASA, CEL, CML, CMC, or SC per mol of lysine.

### **Western blotting**

The amounts of a) the mitochondrial respiratory chain complex I to IV, b) the complex I regulatory factors AIF (apoptosis-inducing factor), c) the repressor element 1-silencing transcription factor REST, and d) the serine/threonine kinase AKT, a member of the AKT signal transduction pathway that promotes survival and growth in response to extracellular signals, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, the mechanistic target of rapamycin mTOR, were estimated using western blot analyses in samples from brain tissue. Brain samples (50mg) were homogenized in a buffer containing 180 mM KCl, 5 mM MOPS, 2 mM EDTA, 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid, 1  $\mu$ M butylated hydroxytoluene, protease inhibitor mix (80-

6501-23, Amersham Biosciences), and phosphatase inhibitors ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, NaF 1mM). After a brief centrifugation (1000 rpm at 4°C for 3 min) to pellet cellular debris, protein concentrations were measured in the supernatants using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay 500-0006). Proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE. Samples were mixed with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 20% 2- $\beta$ -mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min. Proteins (20  $\mu\text{g}$  for respiratory chain complexes and AIF, and 35  $\mu\text{g}$  for the others) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide minigels. For immunodetection, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio Rad) in a buffer containing 25 mM TRIS, 192 mM glycine, and 20% methanol, to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). The membranes were immersed in blocking solution (0.2% I-Block Tropic AI300 or 0.5% BSA Sigma-Aldrich A4503, 0.1% Tween in TBS) at room temperature for 1 hour. After blocking, the membrane was washed two times using 0.05% TBS-T buffer. Afterwards, the membrane was incubated in primary solution using specific antibodies: anti-29kDa (NDUFS3) subunit of complex I (1:1000, ref. 459130, Invitrogen), anti-70kDa subunit (Flavoprotein) of complex II (1:500, ref. 459200, Invitrogen), anti-48kDa (CORE 2) subunit of complex III (1:1000, ref. 456220, Invitrogen), anti-57kDa (COXI subunit) of complex IV (1:1000, ref. 459600, Invitrogen), anti-AIF (1:1000, ref. A7549, Sigma), anti-porin (1:1000, ref. A31855, Molecular Probes), anti-actin (1:5000, ref. A5411, Sigma), anti-REST (1:1000, ref. ab21635, Abcam), anti-phospho-Akt (1:1000, ref. 9271, Invitrogen) and anti-Akt (1:1000, ref. 44-609G, Invitrogen), and anti-phospho-mTOR and anti-mTOR (1:1000 in both cases, ref. 2971s and 2972-Cell Signaling Technology, respectively).

The primary antibody was incubated at room temperature for 1 hour for mtComplexes and AIF, and at 4°C for 16 h for the other factors. The membrane was washed three times in 0.05% TBS-T buffer and incubated at room temperature for 1 hour with the appropriate secondary antibodies [ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase linked whole antibody-NA93IV GE Healthcare (1:30000) and ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugated-31460 Pierce Biotechnology (1:100000)]. After five washes with 0.05% TBS-T buffer, bands were visualized using an enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, MA, USA). Signal quantification and recording was performed with ChemiDoc equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, Spain). The amounts of the determined factors were specifically calculated from the ratio of their densitometry values in reference to the densitometry values of their own porin content. The amount of REST was specifically calculated from the ratio of their densitometry values in reference to the actin content. Ratios of phospho-mTOR to total-mTOR, and phospho-AKT to total-AKT, were also calculated.

## **RNA purification**

The purification of RNA from human frontal cortex ( $n = 3-4$  samples per decade) was carried out with RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol provided by the manufacturer, after DNase digest to avoid extraction and later amplification of genomic DNA. Quality of isolated RNA was first measured with Bioanalyzer Assay (Agilent, Santa Clara, CA). The concentration of each sample was obtained from A260 measurements with Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). RNA integrity (RIN) was tested using the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RIN values were higher than 6 for all samples used (see Table 1).

## **Retrotranscription reaction**

The retrotranscriptase reaction was carried out using a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the protocol provided by the supplier. Parallel reactions for an RNA sample were run in the absence of MultiScribe Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA.

## **TaqMan PCR**

TaqMan quantitative RT-PCR assays for each gene were performed in triplicate on cDNA samples obtained from the retrotranscription reaction using the ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA). For each 10 $\mu$ L TaqMan reaction, 4.5 $\mu$ L cDNA was mixed with 0.5 $\mu$ L 20x TaqMan Gene Expression Assays and 5 $\mu$ L of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reactions were carried out using the following parameters: 50°C for 2min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1min. Finally, all TaqMan PCR data were captured using the Sequence Detection Software (SDS version 1.9; Applied Biosystems). The identification numbers and names of all TaqMan probes used are shown in Table 2. Samples were analyzed with the double-delta cycle threshold ( $\Delta\Delta CT$ ) method. The  $\Delta CT$  values represent normalized target gene levels with respect to the internal control (ACTB). The  $\Delta\Delta CT$  values were calculated as the  $\Delta CT$  of each test sample minus the mean  $\Delta CT$  of the calibrator samples for each target gene. The fold change was determined using the equation  $2(-\Delta\Delta CT)$ .

## **Immunohistochemistry**

Tissue samples were embedded in paraffin, and 4- $\mu$ m thick coronal sections were obtained with a sliding microtome. Endogenous peroxidases were blocked by incubation in 10% methanol–1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 15 minutes, followed by 3% normal horse serum solution, and then incubated at 4°C overnight with one of the primary antibodies indicated-

that is, anti-mtComplex 1 (ref. 459130, Invitrogen), anti-REST (ref. ab21635, Abcam), anti-Akt (ref. 44-609G, Invitrogen), and anti-mTOR (ref. 2972-Cell Signaling Technology). Sections were subsequently rinsed and incubated with biotinylated secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark), followed by EnVision+ system peroxidase (Dako) and, finally, the chromogen diaminobenzidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Some sections were incubated without the primary antibodies; no immunostaining was detected in these sections. Sections were lightly counterstained with hematoxylin. After staining, the sections were dehydrated and coverslipped for microscopic assessment. The mounting medium used for image acquisition was DPX. Images were acquired with an Olympus BX51 microscope (UPlan FL N 20 × /0.50 Ph1) (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) connected to an Olympus DP71 camera and Cell^B software (Olympus Corporation).

### **Statistical analysis**

To model the relationships between brain age and protein oxidative damage biomarkers were used, both generalized additive model (GAM) and joinpoint regression. GAM (Hastie et al., 1990) is an extension of the Generalised Linear Model (GLM) where the assumption of linear dependency between the response variable and the covariates is relaxed. GAMs provide more flexibility than GLMs to capture non-linear relationships by using smooth functions like piecewise polynomials that join at points called knots. After the GAM analysis, in order to search for a potential break point in the age variable in relation to each independent variable (protein oxidative damage biomarkers) a joinpoint regression was applied. Joinpoint regression is a statistical modeling technique that explains the relationship between two variables by means of a segmented linear regression constrained so as to be continuous everywhere, in particular in those places where the slope of the regression function changes. These two analyses were done using the libraries “mgcv” and “segmented” of the R statistical software v.2.10.

Regression equations were obtained using nonlinear regression analyses with the curve estimation method of the SPSS/PC software for Windows (SPSS, Chicago, IL). Comparisons between groups were analyzed with one way ANOVA. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$  in all the analyses. These statistical analyses were performed using the SPSS software (SPSS, Chicago, IL, USA).

### **Results**

Evidence from comparative studies of gene expression and evolution suggest that human neocortical neurons are characterized by unusually high levels of energy metabolism (Sherwood et al. 2006; Somel et al., 2013). Furthermore, multiple lines of evidence suggest that defects of energy



metabolism, mitochondrial dysfunction, and progressive oxidative damage are a conserved, central mechanism of age-related functional decline of the human brain (Jove et al, 2014). We applied this idea to a key region of the adult human brain, the frontal cortex, to evaluate temporal trajectories of specific protein damage markers using a mass spectrometry technique, as direct markers of protein oxidation. Our results demonstrate the existence of a significant relationship between frontal cortex specific protein damage markers and age analysed by generalized additive model (GAM). In particular, this relationship shows an increase with age for the protein oxidation-derived markers GSA and AASA, and the glycooxidation-derived markers CEL and CML (p-values of the age smooth term were  $p < 0.00001$  for GSA and AASA,  $p = 0.0003$  for CEL, and  $p = 0.012$  for CML) (Figure 1).

The post-translational modifications of cysteine residues include oxidation, S-glutathionylation, S-nitrosylation, glycooxidation, and succination, all of which modify protein function or turnover in response to a changing intracellular redox environment (Thorpe and Baynes, 2003). Succination is a chemical modification of cysteine in proteins by the Krebs cycle intermediate, fumarate, yielding 2-SC. 2-SC serves as a biomarker of mitochondrial stress, and recent studies suggest that succination is a mechanistic link between mitochondrial dysfunction, oxidative and ER stress, and cellular progression toward apoptosis (Merkley et al. 2014). In contrast to oxidative and glycooxidative markers, no changes associated with age for the protein non-enzymatic modification of the cysteine residues CMC and the cysteine-derived succination marker SC were detected. (p-values of the age smooth term were  $p = 0.114$  for CMC, and  $p = 0.155$  for 2-SC) (Figure 1).

Reinforcing our findings, the potential interference of the variables gender and post-mortem time in the temporal trajectories of the different protein damage markers was ruled out after applying the corresponding GAM analysis (see Supplementary Data).

To shed light upon a possible juncture when brain aging begins, we applied a jointpoint regression model to determine the breakpoint where the temporal trajectories for oxidative and glycooxidative markers show a significant inflection point followed with a more pronounced increase in protein damage. Our analysis suggests that the breakpoint is located around 60 years old (GSA:  $62.64 \pm 6.79$  years old,  $R^2(\text{adj}) = 0.5459$ ; AASA:  $63.77 \pm 5.64$  years old,  $R^2(\text{adj}) = 0.538$ ; CEL:  $63.60 \pm 20.44$  years old,  $R^2(\text{adj}) = 0.2868$ ).

Because organ-specific analysis of brain aging has revealed a progressive decline in mitochondrial gene expression in rats, rhesus macaques, and humans (Lu et al., 2004; Blalock et al., 2003; Loerch et al., 2008), and mitochondrial function seems to exert an important modulating influence on the aging process (Pamplona and Barja, 2006), we investigated the content of mitochondrial electron transport chain complexes during human brain aging. Our results showed a significant decrease in the concentration of all electron transport chain complexes (from CI to CIV) with age, with this

trajectory especially evident in the decade following age 60 (Figure 2). In parallel, we also observed a decrease in the content of mitochondrial AIF which is consistent with the decrease in the amount of complex I because AIF, in addition to apoptotic functions, is also required for mitochondrial oxidative phosphorylation and has a specific role in the biogenesis and maintenance of complex I (Vahsen et al. 2004; Porter and Urbano 2006) (Figure 2). In contrast, the expression of complex V (ATP synthase) did not show any difference with age.

We then considered whether these changes in protein oxidative damage and mitochondrial complexes might be associated with changes/adaptions in cellular systems linked to stress resistance and cell survival. To this end, we measured the repressor element 1-silencing transcription factor REST, a regulator of neuroprotective stress response (Lu et al., 2014), and the serine/threonine kinase Akt, a member of the Akt signal transduction pathway that promotes survival and growth in response to extracellular signals, and the master regulator that senses cell nutrient and energy status, the mechanistic target of rapamycin mTOR (O'Neill, 2013). Western blot analysis showed sustained expression of REST over the adult lifespan which was also observed for mRNA expression (Figure 3). Interestingly, a significant correlation was also observed, expressed through a quadratic equation, between the REST content and the protein oxidation markers GSA and AASA (Figure 4). The protein expression of Akt decreased significantly with age, especially at advanced ages, but this is not reflected in the mRNA levels, whereas mTOR protein expression and mRNA levels decrease significantly with age, especially at advanced ages (Figure 3).

In this line, the results obtained with immunohistochemistry for complex I, REST, Akt, and mTOR in human frontal cortex tissue confirm the temporal trajectories described above and demonstrate that the observed changes may be ascribed to neurons (Figure 5). Thus, the punctate cytoplasmic Complex I immunoreactivity detected in neurons, suggestive of their mitochondrial location, showed a decrease in staining across the decades. For REST, nuclear immunoreactivity was detected in neurons which were unaffected with age, indicative of sustained expression during normal brain aging. Finally, Akt and mTOR were detected at the cytoplasmic level, verifying decreased immunoreactivity in neurons during brain aging, particularly from 60 onward.

## Discussion

Available evidence suggests that progressive oxidative damage is a conserved, central mechanism of age-related functional decline (Sohal, 2002; Muller FL et al., 2007; Pamplona and Costantini, 2011; Jove et al., 2014). Thus, previous studies have reported increased levels of a) protein carbonyls, comparing young adults versus aged animal groups, in whole brain and specific regions in rats (Brizzee et al., 1969; Dubey et al., 1996; Forster et al., 1996), and in the occipital lobe of human brain tissue (Smith et al., 1991); b) 8-oxodG, a marker of DNA oxidation, in rat brain (Herrero and Barja 2001; Hamilton, 2001), and c) the advanced glycation endproducts Ne-carboxymethyl-lysine

(CML), imidazolone and pentosidine, all of them using immunohistochemistry techniques, in aged and AD human brains (Takeda et al., 2001; Jono et al., 2002, Luth et al., 2005). The present study is the first to analyze selective and specific protein oxidative damage markers by mass spectrometry in frontal cortex from healthy humans covering an age range of 43 to 86 years old (n=41 individuals). Our results demonstrate that there is an increase in protein oxidative (GSA and AASA markers) and glycoxidative (CML and CEL markers) damage in human frontal cortex over the course of the adult lifespan. This increase seems to be selective because temporal trajectories for markers derived from the non-enzymatic modification of cysteine residues (CMC and SC) were maintained unchanged with age. A possible explanation for this dissociation in the behavior of different protein damage markers may be the cellular homeostatic mechanisms behind their formation. Thus, the increase in the oxidation markers could reflect an increase in the net flux of free radical generation, but also a decrease in the activity of protein turnover mechanisms; and for protein glycoxidation, the increased levels could express an increased oxidative stress status (again free radical generation and protein turnover), but also an increased level in the content of carbonyl compounds which act as a substrate for the formation of these markers which, in turn, reflect the concentration of carbohydrates that participate essentially in anaerobic glycolysis. In contrast, the unchanged content in markers derived from cysteine modification may be an indication of better preservation of cysteine residues and their functionality by specific repair mechanisms over the adult lifespan—mechanisms which are absent for other kind of markers.

Gene expression studies suggest that reduced expression of mitochondrial genes is a conserved feature of aging in organisms ranging from *C.elegans* to humans (Yankner et al., 2008; Zahn et al., 2007). In particular, organ-specific analysis of brain aging has revealed a progressive decline in mitochondrial gene expression in rats, rhesus macaques, and humans (Lu et al., 2004; Blalock et al., 2003; Erraji-Benchekroun et al., 2005; Loerch et al., 2008). Mitochondrial function seems to be an important modulating influence on the aging process in all species tested, probably due to the fact that a normal decrement in mitochondrial function may also contribute to age-dependent functional deficits in neurons and render neurons vulnerable to age-dependent pathology. Our results demonstrate a progressive loss in the content of mitochondrial electron transport chain complexes from CI to CIV, and also that this decrease is effective from age 60 onward, concomitant with the breakpoint where the accrual of protein damage markers starts.

Another important element is that the time in life when brain aging begins is undefined. A recent study showed that transcriptional profiling of the human frontal cortex from individuals ranging from 26 to 106 years of age defined a set of genes with reduced expression after age 40 (Lu et al., 2004). In addition to this change in transcriptional profile, other studies analyzing the lipid composition of different areas of human brain have also confirmed the occurrence of age-related lipid alterations. Globally, all the described changes are perfectly aligned to the progressive and

deleterious character of the aging process, and it seems that concentrations of most lipids in the human brain decrease after the age of 50 (Naudi et al., 2015). In the present study, we demonstrate that the breakpoint at which the temporal trajectories for oxidative and glycoxidative markers change in human frontal cortex expressing a progressive increase in protein damage is at 60 years old. Whether the described breakpoints (transcriptional profile at 40 years old, lipid composition at 50 years old, and protein damage at 60 years old) express a progressive and additional deleterious effect at molecular levels, or are independent pathways of the aging process, is a question that remains unanswered. But it is plausible to postulate that these changes might represent, from a given threshold, the molecular substrate determining a change in the normal temporal trajectory toward the onset of AD pathology.

Why some individuals age with their cognitive function relatively intact whereas others decline and develop AD is another key question which remains without answer. But, in any case, the preservation of neurons and cognitive function across an entire lifespan demands a cellular adaptation involving robust stress-response mechanisms. In this context, a recent study showed that REST (also known as neuron-restrictive silencer factor, NRSF) is induced in the aging human brain and regulates a network of genes that mediate cell death, stress resistance, and AD pathology (Lu et al., 2014). This gene network becomes dysregulated at early stages of AD when REST is lost from the nucleus (Lu et al., 2014). In aging humans, elevated REST levels are also associated with preservation of cognitive function and increased longevity (Lu et al., 2014). Our results confirm this observation and demonstrate that the presence of sustained and elevated REST levels at the nuclear level is present over the adult lifespan of healthy humans. In addition, the correlation between REST content and protein oxidation reinforces the idea that stressors like oxidative stress could be the trigger inducing REST expression as an adaptive response. In this context, it may be postulated that REST regulates a neuroprotective stress response that is central to maintaining neuronal viability and cognitive preservation during physiological aging.

An additional mechanism may be mediated by the PI3-K/Akt/mTOR signaling pathway. All components of the PI3-K/Akt/mTOR signaling system are expressed at high levels in the brain, predominantly in neurons but also detectable in glial cells (O'Neill, 2013). In post-mitotic neurons the integrated coordination of neuronal responses through this signaling pathway has significant functional impact on stress responses, synaptic function, and cognitive processing, and it is involved in cellular senescence, brain aging, and age-related neurodegenerative diseases (Garelick and Kennedy 2011; Perluigi et al. 2015; Bockaert and Marin 2015). mTOR is a conserved serine/threonine kinase which regulates cell growth and metabolism in response to nutrients, growth factors, and cellular energy conditions. An increasing number of studies show that disturbance in mTOR signaling in the brain affects multiple pathways including glucose metabolism, energy production, mitochondrial function, cell growth, and autophagy. All these

events could be key players in age-related cognitive decline as well as neurodegenerative diseases. Thus, signaling through the PI3-K/Akt/mTOR pathway and its activation by IGF-1R and IR is demonstrably disturbed in the brain of individuals with AD compared with those of the same age without the disease, and many of these measures correlate with disease severity (Griffin et al., 2005; Moloney et al., 2010; Pei and Hugon, 2008; Talbot et al., 2012). In this line, increased Akt activation and its altered subcellular location have been described in hippocampal and cortical neurons in the AD brain (Griffin et al., 2005; Pei et al., 2003). In addition, levels of mTOR signaling are also selectively increased in neurons predicted to develop neurofibrillary tangles (Pei and Hugon, 2008). Conversely, attenuation of the mTOR signal, through pharmacological and nutritional intervention, increases longevity and is associated with a healthy lifespan, including improvement in brain function (Garelick and Kennedy 2011; Perluigi et al. 2015). Consequently, we infer that the lower Akt/mTOR expression observed in the frontal cortex with age in the present study for the first time is a physiological adaptation aimed at preserving neuronal survival and conferring resistance to stress over the adult lifespan.

Here we show that oxidative and glycoxidative damage significantly increases during human brain aging, with a breakpoint at 60 years old. This trajectory is coincident with a decrease in the content of the mitochondrial respiratory chain complex I to IV. In addition, our findings suggest that the deterioration in oxidative stress homeostasis during aging induces an adaptive response of stress resistance mechanisms based on a sustained expression of REST, and decreased content of Akt and mTOR over the adult lifespan in order to preserve cell neural function.

## **Acknowledgements**

R.C. received predoctoral fellowships from the Autonomous Government of Catalonia. We thank T. Yohannan for editorial help.

## **Funding**

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Institute of Health Carlos III (FIS grants PI14/00757 and PI14/00328), and the Autonomous Government of Catalonia (2014SGR69 and 2014SGR168) to I.F. and R.P. This study was co-financed by FEDER funds from the European Union ('Una manera de hacer Europa').

## **Author Contributions**

I.F. and R.P. designed the experiments. R.C., A.N., M.R., and R.P. analyzed the data. R.C., A.N., M.D.G., V.A., M.J., N.M.M., G.P.R., M.P.G.V, and M.P.O. performed the experiments. R.P. supervised the design and data interpretation. The manuscript was written by I.F. and R.P. and edited by R.P. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## References

Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*. 2007 Dec 6;56(5):924-35.

Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):529-35.

Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci*. 2003 May 1;23(9):3807-19.

Bockaert J, Marin P. 2015. mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev*. 95(4):1157-1187.

Brizzee KR, Cancilla PA, Sherwood N, Timiras PS. The amount and distribution of pigments in neurons and glia of the cerebral cortex. Autofluorescent and ultrastructural studies. *J Gerontol*. 1969 Apr;24(2):127-35.

Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Sep 1;333(1):189-97.

Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, Mann JJ, Sibille E. Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol Psychiatry*. 2005 Mar 1;57(5):549-58.

Ferrer I. Selection of controls in the study of human neurodegenerative diseases in old age. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Jul;122(7):941-7.

Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4765-9.

Garelick MG, Kennedy BK. 2011. TOR on the brain. *Exp Gerontol*. 46(2-3):155-163.

Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 2005 Apr;93(1):105-17.

Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10469-74.

Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013 May 7;80(19):1778-83.

Herrero A, Barja G. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat. *J Am Aging Assoc*. 2001 Apr;24(2):45-50

Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1930-4.

Jono T, Kimura T, Takamatsu J, Nagai R, Miyazaki K, Yuzuriha T, Kitamura T, Horiuchi S. Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathol Int*. 2002 Sep;52(9):563-71.

Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014 Jul;73(7):640-57.

Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):294-7.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):787-95.

Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, Wang J, Pan Y, Gabuzda DH, Li C, Prolla TA, Yankner BA. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One*. 2008 Oct 2;3(10):e3329.

Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, Yang TH, Kim HM, Drake D, Liu XS, Bennett DA, Colaiácovo MP, Yankner BA. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*. 2014 Mar 27;507(7493):448-54.

Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004 Jun 24;429(6994):883-91.

Lüth HJ, Ogunlade V, Kuhla B, Kientsch-Engel R, Stahl P, Webster J, Arendt T, Münch G. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex*. 2005 Feb;15(2):211-20.

Merkley ED, Metz TO, Smith RD, Baynes JW, Frizzell N. The succinated proteome. *Mass Spectrom Rev*. 2014 Mar-Apr;33(2):98-109.

Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging*. 2010 Feb;31(2):224-43.

- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*. 2007 Aug 15;43(4):477-503.
- Naudí A, Cabré R, Jové M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R. Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer's Disease Pathology. *Int Rev Neurobiol*. 2015;122:133-89.
- O' Neill C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2013 Jul;48(7):647-53.
- Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):496-508.
- Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Oct;301(4):R843-63.
- Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, Portero-Otín M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):21522-30.
- Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinger M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol*. 2003 Apr;105(4):381-92.
- Pei JJ, Hugon J. mTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2008 dec;12(6B):2525-32.
- Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. 2015. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.014.
- Porter AG, Urbano AG (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioassays* 28:834–843.
- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR. 2006. Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(37):13606-13611.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 1;88(23):10540-3.
- Sohal RS. Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 1;33(5):573-4.



Somel M, Liu X, Khaitovich P. 2013. Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat Rev Neurosci.* 14(2):112-27.

Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1316-38.

Takeda A, Wakai M, Niwa H, Dei R, Yamamoto M, Li M, Goto Y, Yasuda T, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Yasuda Y, Miyata T, Sobue G. Neuronal and glial advanced glycation end product [Nepsilon-(carboxymethyl)lysine] in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol.* 2001 Jan;101(1):27-35.

Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):275-81.

Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 23:4679–4689.

Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:41-66.

Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram DK, Lustig A, Carter A, Weeraratna AT, Taub DD, Gorospe M, Mazan-Mamczarz K, Lakatta EG, Boheler KR, Xu X, Mattson MP, Falco G, Ko MS, Schlessinger D, Firman J, Kummerfeld SK, Wood WH 3rd, Zonderman AB, Kim SK, Becker KG. AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genet.* 2007 Nov;3(11):e201.

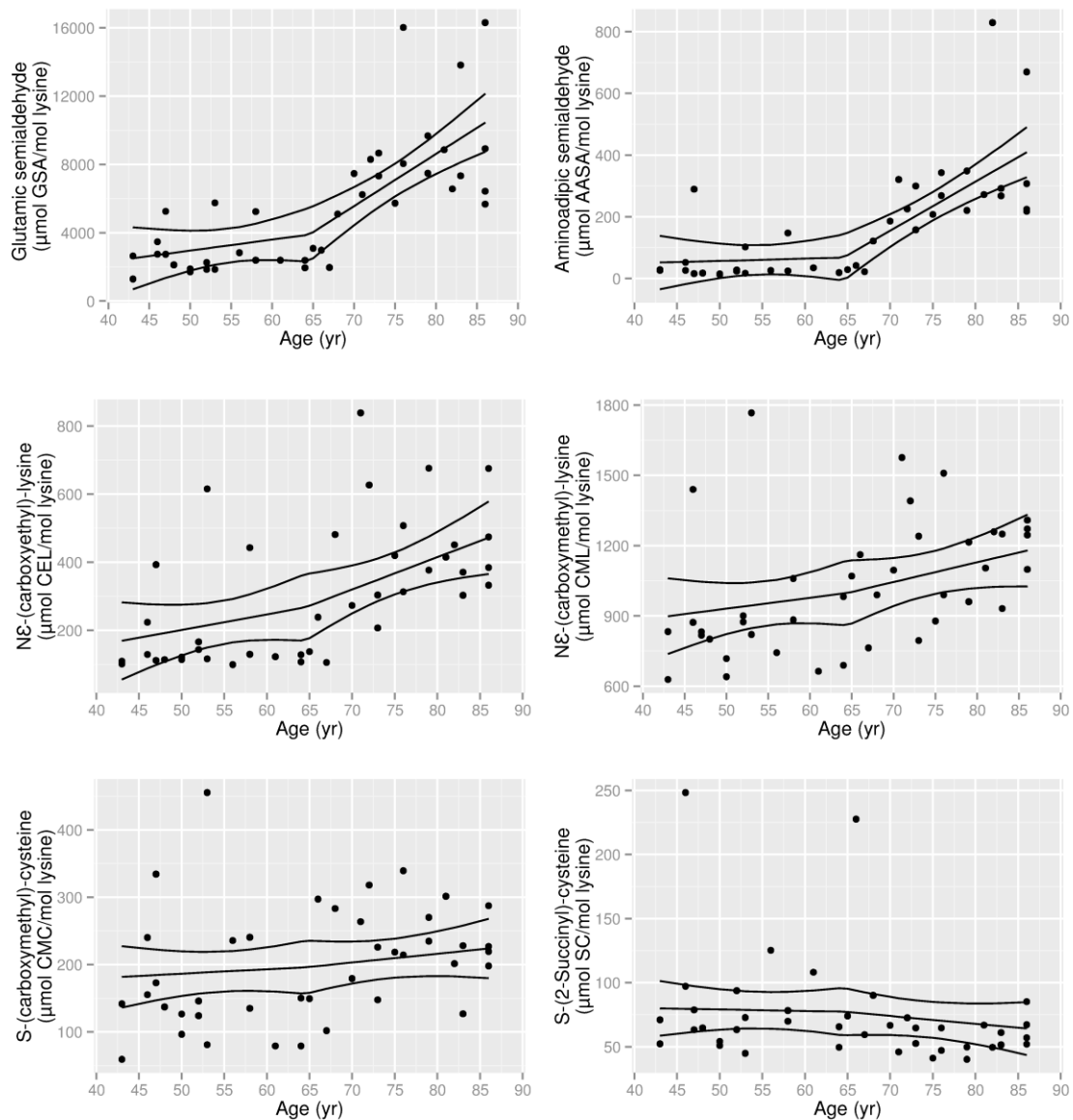
**Table 1. Summary of cases examined.**

Case	Gender	Age (y)	PM Delay	RIN Values
1	Man	43	4 h 35 min	7.3
2	Man	43	5 h 55 min	7.5
3	Woman	46	9 h 35 min	6.9
4	Man	46	15 h	7.5
5	Man	47	4 h 55 min	
6	Woman	48	4 h	
7	Woman	50	14 h 30 min	
8	Man	50	17 h 15 min	
9	Woman	52	5 h 45 min	6.6
10	Man	52	4 h 40 min	7.1
11	Man	53	3 h	
12	Man	53	7 h 25 min	
13	Man	56	3 h 45 min	7.1
14	Woman	58	4 h	
15	Man	58	4 h	7.3
16	Man	61	3 h 55 min	7.4
17	Woman	64	5 h	
18	Man	64	8 h 35 min	
19	Man	65	16 h	6.1
20	Woman	66	4 h 15min	7.1
21	Woman	67	5 h 20 min	5.8
22	Man	68	10 h 55 min	
23	Man	70	2 h	7.3
24	Woman	71	6 h	6.7
25	Woman	71	8 h 30 min	6.7
26	Man	72	3 h 35 min	7.5
27	Woman	73	4 h 30 min	
28	Woman	73	5 h 30 min	
29	Woman	75	3 h 25 min	
30	Man	76	4 h 15 min	
31	Man	76	6 h 30 min	
32	Woman	79	3 h 35 min	
33	Woman	79	5 h	
34	Woman	81	4 h	
35	Woman	82	3 h 05 min	6.9
36	Man	83	3 h 03 min	7
37	Man	83	4 h 30 min	7.3
38	Woman	86	4 h 15 min	
39	Woman	86	19 h 30 min	
40	Man	86	5 h 35 min	6
41	Man	86	18 h	

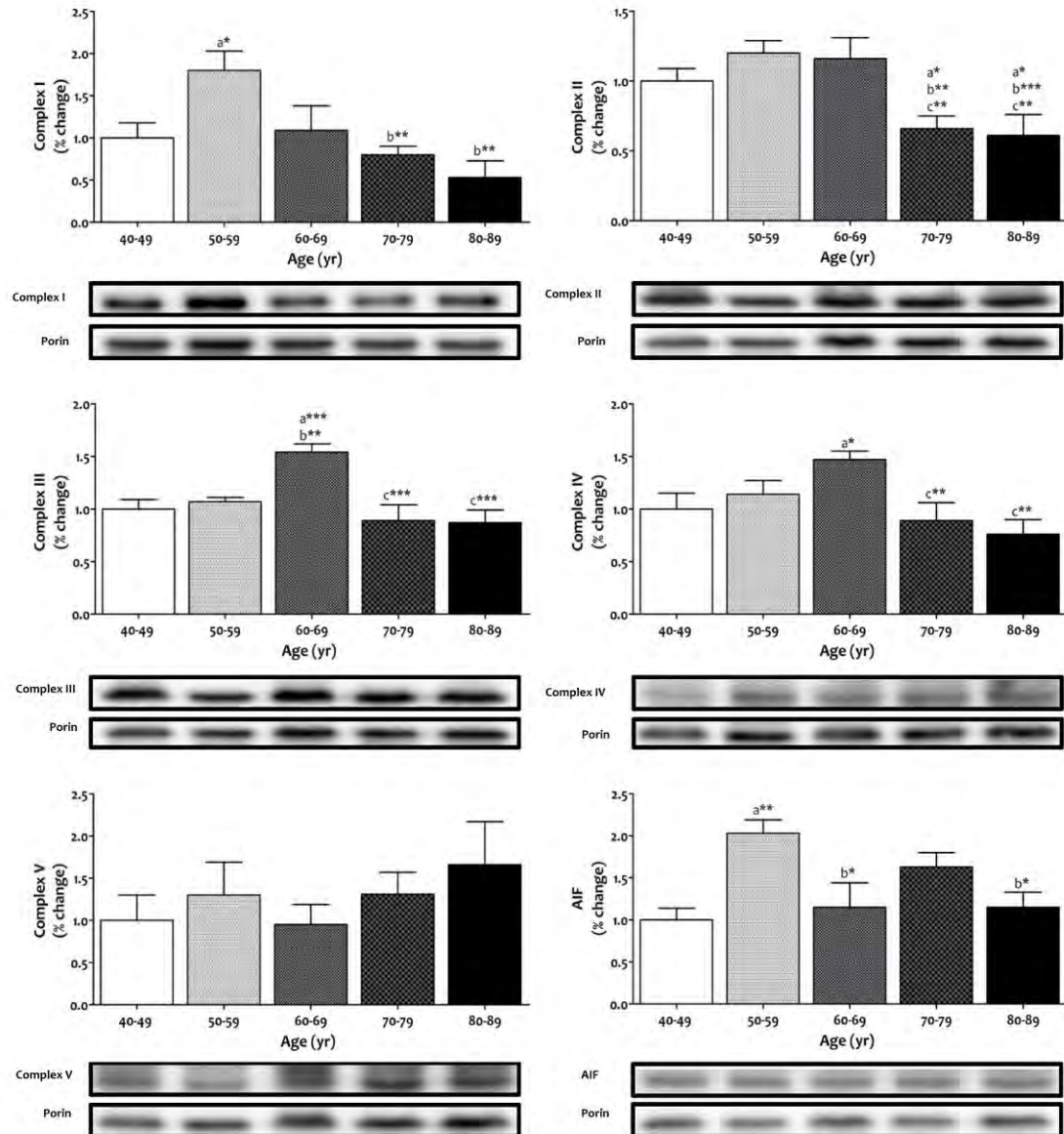
**Table 2. TaqMan probes used for the study, including probes for normalization (ACTB).**

Gene	Full name	Target name
ACTB	$\beta$ -Actin	Hs99999903_m1
AKT1	Protein Kinase B	Hs00178289_m1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	Hs00234508_m1
REST	RE1 Silencing Transcription Factor	Hs00958503_m1

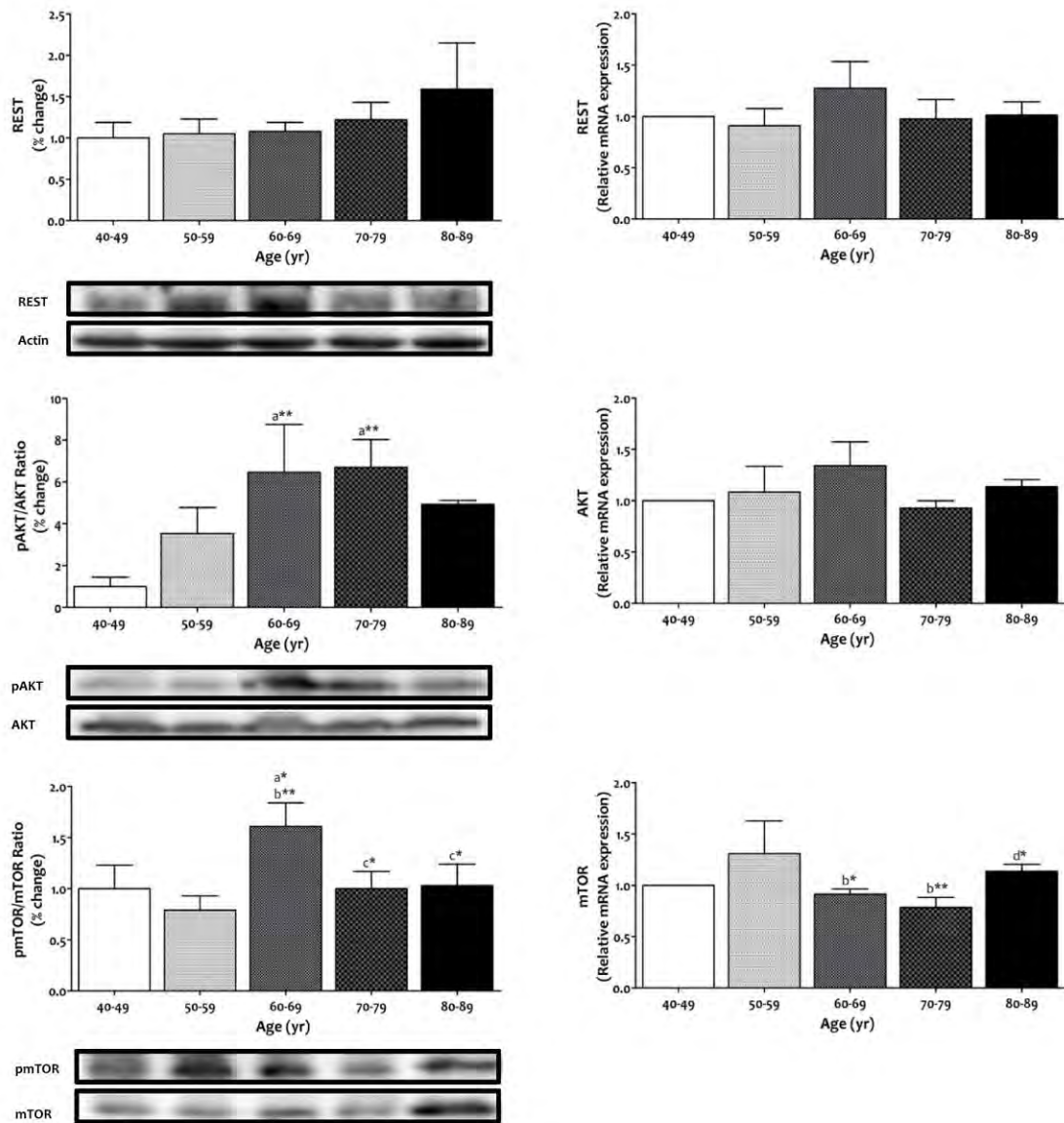
**Figures**



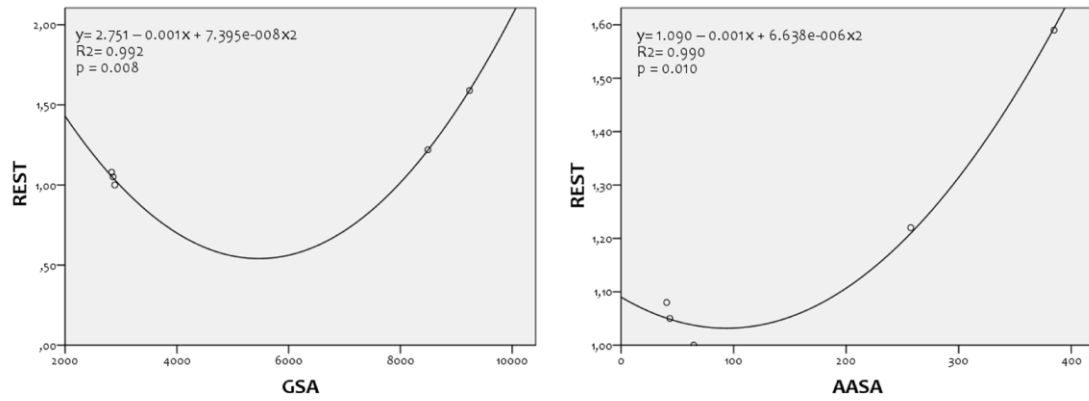
**Figure 1. Relationship between age and different protein oxidative biomarkers.** Graphics show the trend of each variable with age, analyzed by generalized additive model (GAM). Significance of the GAM analysis are: for GSA,  $R^2(\text{adj})=0.556$ , Deviance explained=57.7%; for AASA,  $R^2(\text{adj})=0.549$ , Deviance explained=57%; for CEL,  $R^2(\text{adj})=0.305$ , Deviance explained=33.4%; for CML,  $R^2(\text{adj})=0.156$ , Deviance explained=18.7%; for CMC,  $R^2(\text{adj})=0.053$ , Deviance explained=7.51%; and for 2-SC,  $R^2(\text{adj})=0.0393$ , Deviance explained=5.88 %.



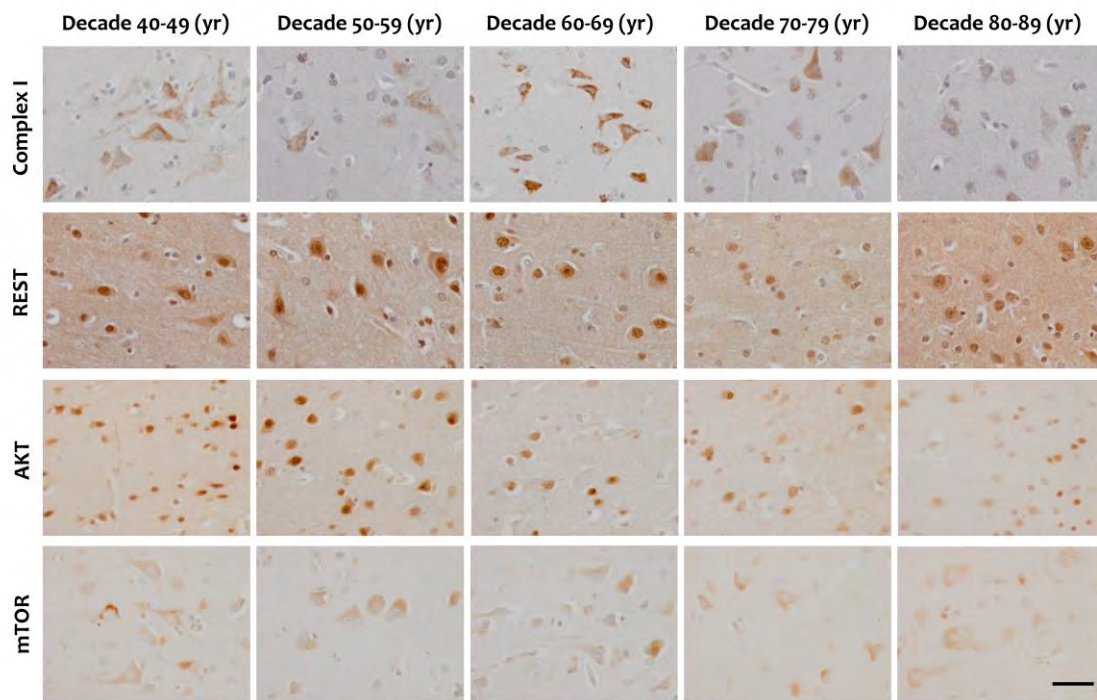
**Figure 2.** Representative immunoblots showing relative levels of the polypeptides measured corresponding to the mitochondrial respiratory complex I, II, III, IV, ATP synthase (Complex V), and AIF. Values are expressed as mean ± SEM from 5 different frontal cortex human samples normalized for porin protein levels as a mitochondrial marker. <sup>a</sup> significantly different from 40-49 group, <sup>b</sup> significantly different from 50-59 group, <sup>c</sup> significantly different from 60-69 group, <sup>d</sup> significantly different from 70-79 group. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.



**Figure 3. Representative immunoblots and mRNA relative expression of REST, Akt and mTOR.** Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from 5 different brain human samples normalized for actin protein levels for REST and ratios of phosphorylated mTOR to total mTOR and phosphorylated Akt to total-Akt. <sup>a</sup>significantly different from 40-49 group, <sup>b</sup> significantly different from 50-59 group, <sup>c</sup> significantly different from 60-69 group, <sup>d</sup> significantly different from 70-79 group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 4.** Relationship between the steady-state levels of specific protein damage markers (GSA and AASA) and the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) expression. These regressions were determined and tested for significance using the mean values for each decade of age.



**Figure 5.** Representative images of Complex I, REST, Akt, and mTOR detection in human frontal cortex samples at each decade of age. Paraffin sections, slightly counterstained with haematoxylin. Bar = 25  $\mu$ m.

## Supplementary Data

Formula:  
 $GSA \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	5154.60	801.08	6.435	1.81e-07 ***
SexeMALE	1366.65	801.67	1.705	0.0968 .
PMdelay	-66.70	86.52	-0.771	0.4458

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.895	2	27.36	4.75e-09 ***

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.573 Deviance explained = 61.4%  
 GCV = 6.962e+06 Scale est. = 6.1307e+06 n = 41

Formula:  
 $AASA \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	198.459	39.304	5.049	1.28e-05 ***
SexeMALE	-44.180	39.333	-1.123	0.269
PMdelay	-1.261	4.245	-0.297	0.768

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.878	2	21.62	1.23e-07 ***

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.541 Deviance explained = 58.5%  
 GCV = 16757 Scale est. = 14763 n = 41

Formula:  
 $CEL \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	335.273	54.138	6.193	3.7e-07 ***
SexeMALE	-31.756	54.175	-0.586	0.561
PMdelay	-2.274	5.851	-0.389	0.700

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.67	2	7.348	0.000722 ***

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.274 Deviance explained = 34.1%  
 GCV = 31750 Scale est. = 28134 n = 41

Formula:  
 $CML \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1059.695	82.675	12.818	4.23e-15 ***
SexeMALE	-8.797	82.714	-0.106	0.916
PMdelay	-4.336	8.941	-0.485	0.631

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	1.401	2	3.177	0.0173 *

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) = 0.115 Deviance explained = 19%  
 GCV = 73912 Scale est. = 65979 n = 41

Formula:  
 $CMC \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	221.637	26.990	8.212	7.23e-10 ***
SexeMALE	0.805	26.979	0.030	0.976
PMdelay	-3.258	2.924	-1.115	0.272

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.9133	2	1.013	0.123

R-sq.(adj) = 0.0345 Deviance explained = 10.5%  
 GCV = 7851.9 Scale est. = 7102.4 n = 41

Formula:  
 $SC \sim s(\text{Age}, k = 3, \text{bs} = "ps", m = 0) + \text{Sexe} + \text{PMdelay}$

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	77.7200	13.3325	5.829	1.06e-06 ***
SexeMALE	-8.5682	13.3261	-0.643	0.524
PMdelay	0.1785	1.4443	0.124	0.902

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value
s(Age)	0.8891	2	0.952	0.132

R-sq.(adj) = 0.00477 Deviance explained = 7.66%  
 GCV = 1915.7 Scale est. = 1734 n = 41

