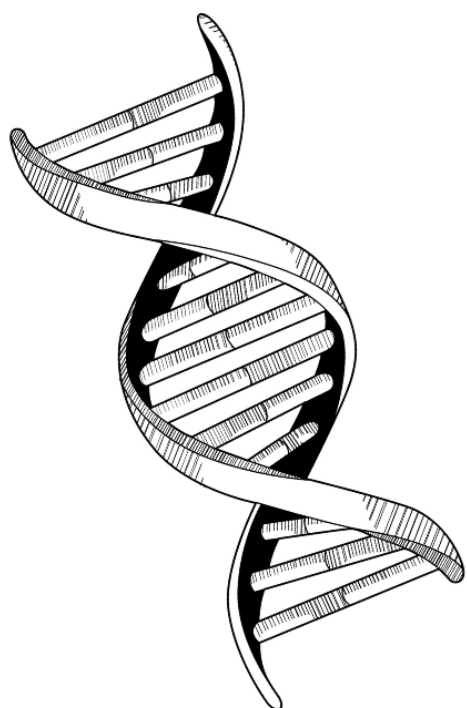


TREBALL DE RECERCA

LLUITA CONTRA L'ENVELLIMENT

PROTEÏNES DE LA
LONGEVITAT





© 2025, Aeternum Vitae, autora d'aquesta edició:

LLUITA CONTRA L'ENVELLIMENT: Proteïnes de la longevitat, que està sota una llicència de Creative Commons Reconeixement-No comercial-Compartir igual 3.0 Espanya
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/deed.ca>).

Les il·lustracions i els diagrames presentats en aquest treball han estat creats per Aeternum Vitae, en alguns casos utilitzant BioRender.

ABSTRACT

This research explores molecular and epigenetic mechanisms associated with extreme longevity, focusing on the unique case of a 116-year-old supercentenarian. The theoretical framework reviews key processes linked to aging, such as DNA damage accumulation, epigenetic alterations, and mitochondrial dysfunction, which are central factors in cellular decline. Particular attention is given to the sirtuins SIRT6 and SIRT7, two NAD⁺-dependent proteins that play crucial roles in DNA repair, epigenetic regulation, and genomic stability maintenance.

The experimental study analyzed PBMC samples from the supercentenarian and a control group of women of different ages using techniques such as flow cytometry and Western Blot. Results revealed a significant overexpression of SIRT6 and SIRT7 in the supercentenarian, indicating their potential role in maintaining genomic stability and cellular functionality. However, the epigenetic marks studied (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, and H4K16ac) did not show a direct correlation with the observed sirtuin overexpression. Instead, these marks provided a deeper understanding of the unique epigenetic landscape in the supercentenarian, suggesting adaptations that may reflect exceptional cellular health rather than directly influencing longevity.

This work combines a robust theoretical review with focused experimental research, highlighting the interplay between molecular mechanisms and epigenetic regulation in aging. By examining an individual with extraordinary longevity, this study emphasizes the importance of sirtuins in maintaining DNA integrity and stress response, while also exploring how epigenetic factors contribute to genomic stability. The findings underscore the value of integrating molecular biology and epigenetics to uncover potential therapeutic targets for combating age-related cellular decline and promoting healthy aging.

RESUMEN

Esta investigación explora los mecanismos moleculares y epigenéticos asociados con la longevidad extrema, centrándose en el caso único de una supercentenaria de 116 años. El marco teórico revisa los procesos clave relacionados con el envejecimiento, como la acumulación de daño en el ADN, las alteraciones epigenéticas y la disfunción mitocondrial, que son factores centrales en el declive celular. Se presta especial atención a las sirtuinas SIRT6 y SIRT7, dos proteínas dependientes de NAD⁺ que desempeñan roles cruciales en la reparación del ADN, la regulación epigenética y el mantenimiento de la estabilidad genómica.

El estudio experimental analizó muestras de PBMC de la supercentenaria y un grupo control de mujeres de diferentes edades utilizando técnicas como citometría de flujo y Western Blot. Los resultados revelaron una sobreexpresión significativa de SIRT6 y SIRT7 en la supercentenaria, lo que indica su posible papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica y la funcionalidad celular. Sin embargo, las marcas epigenéticas estudiadas (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 y H4K16ac) no mostraron una correlación directa con la sobreexpresión de sirtuinas observada. En su lugar, estas marcas proporcionaron una comprensión más profunda del paisaje epigenético único en la supercentenaria, sugiriendo adaptaciones que podrían reflejar una salud celular excepcional en lugar de influir directamente en la longevidad.

Este trabajo combina una revisión teórica sólida con una investigación experimental enfocada, destacando la interacción entre los mecanismos moleculares y la regulación epigenética en el envejecimiento. Al examinar a una persona con una longevidad extraordinaria, este estudio enfatiza la importancia de las sirtuinas en el mantenimiento de la integridad del ADN y la respuesta al estrés, al tiempo que explora cómo los factores epigenéticos contribuyen a la estabilidad genómica. Los hallazgos subrayan el valor de integrar la biología molecular y la epigenética para descubrir posibles objetivos terapéuticos para combatir el declive celular relacionado con la edad y promover un envejecimiento saludable.

ÍNDEX

ABSTRACT.....	3
RESUMEN.....	4
AGRAÏMENTS.....	7
INTRODUCCIÓ.....	8
1. Introducció a la cèl·lula.....	10
1.2 La informació genètica.....	12
1.3 El cicle cel·lular.....	14
1.3.1 La interfase.....	15
1.3.2 La mitosi.....	15
2. Definició d'envelliment.....	17
3. Causes de l'envelliment.....	18
3.1 Causes primàries.....	18
3.1.1 Inestabilitat genòmica.....	18
3.1.2 Esgurçament de telòmers.....	19
3.1.3 Alteracions epigenètiques.....	20
3.1.4 Pèrdua de proteostasis.....	22
3.1.5 Disminució de l'autofàgia.....	23
3.2 Causes antagonístiques.....	24
3.2.1 Desregulació de la detecció de nutrients.....	24
3.2.2 Disfunció mitocondrial.....	24
3.2.2 Senescència cel·lular.....	26
3.3 Causes integratives.....	26
3.3.1 Esgotament de cèl·lules mare.....	27
3.3.2 Disfunció en la comunicació intercel·lular.....	27
3.3.3 Inflamació crònica.....	28
3.3.4 Disbiosis.....	29
4. Conseqüències anatòmiques i fisiològiques.....	30
4.1 Canvis en el sistema musculoesquelètic.....	30
4.2 Transformacions cardiovasculars.....	31
4.3 Alteracions en el sistema nerviós.....	32
4.4 Impacte en els sentits.....	32
4.5 Canvis en el sistema immunitari.....	33
5. Recerca antienvelliment.....	34
6. Càncer i envelliment.....	37
6.1 El càncer.....	37
6.2 Relació envelliment i càncer.....	38
7. Un envelliment saludable.....	41
7.1 L'activitat física i la dieta.....	41
7.2 El cicle del son i la salut mental.....	42
7.3 Les addiccions.....	44
8. Anàlisi epigenètica.....	45
8.1 Introducció:.....	45
8.2 Objectiu i hipòtesi:.....	45

8.3 Fonament teòric:.....	45
8.4 Material:.....	46
8.5 Procediment:.....	46
8.6 Resultats i conclusions:.....	46
9. La supercentenària.....	48
9.1 Introducció:.....	48
9.2 Anàlisi mitocondrial.....	48
9.2.1 Objectiu i hipòtesi:.....	48
9.2.2 Fonament teòric:.....	49
9.2.3 Material:.....	51
9.2.4 Procediment:.....	51
9.2.5 Resultats i conclusions:.....	52
9.3 Anàlisi proteica.....	54
9.3.1 Experiment I	54
9.3.1.1 Objectiu i hipòtesi:.....	54
9.3.1.2 Fonament teòric:.....	54
9.3.1.3 Material:.....	57
9.3.1.4 Procediment:.....	59
9.3.1.5 Resultats i conclusions:.....	59
9.3.2 Experiment II	61
9.3.2.1 Objectiu i hipòtesi:.....	61
9.3.2.2 Fonament teòric:.....	61
9.3.2.3 Material:.....	62
9.3.2.4 Procediment:.....	63
9.3.2.5 Resultats i conclusions:.....	63
9.4 Conclusions de la supercentenària.....	66
10. Conclusions generals.....	67
REFERÈNCIES DOCUMENTALS.....	69
BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA.....	71
ANNEXOS.....	74

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu més profund agraïment a totes les persones i institucions que han fet possible la realització d'aquest Treball de Recerca.

En primer lloc, vull donar les gràcies a l'*Institut de Recerca contra la leucèmia Josep Carreras*, en especial al Dr. Manel Esteller, per haver-me donat l'oportunitat de treballar i desenvolupar la part pràctica amb el seu grup d'investigadors, en els seus laboratoris. Ha estat per mi una experiència única, que ha enriquit la meva formació acadèmica i professional de manera significativa, amb la qual he pogut aprendre molts protocols, tècniques i he pogut veure com és la vida d'un investigador.

És important també, agrair el Martí Badal, per haver-nos donat un cop de mà i haver estat la persona que ens va posar en contacte amb el Dr. Salvador Macip i el grup d'investigadors del Dr. Esteller de l'IJC.

També vull donar les gràcies a l'Eloy Santos, qui ha estat el meu tutor durant l'estada al centre i qui m'ha transmès aquesta passió per la ciència que el fa tan característic. He d'agrair la seva paciència per haver-me explicat, pas a pas, el que hem anat fent, per respondre les meves preguntes, per haver estat sempre disposat a ajudar-me i per haver-me fet sentir com una companya més. Durant aquesta estada hem forjat un vincle còmode i productiu, on el treball en equip i la confiança han estat claus per superar els reptes que ens hem trobat. Hem passat molt de temps junts, compartint converses profundes i moments de riure. Hem viscut moments de frustració, però també de satisfacció, i en cada pas del camí hem après mútuament. El que realment valoro és que, malgrat les dificultats, sempre hem trobat la manera de continuar amb els experiments endavant, reforçant el nostre llaç i compartint la nostra passió per la ciència. Gràcies a ell, he après a veure la ciència amb uns altres ulls i a valorar encara més la importància de la recerca.

En segon lloc, donar-li les gràcies a la meva tutora del Treball de Recerca, M. Dolors Serrano Vargas, per haver-me acompanyat i orientat durant tot el procés, haver-me donat el seu suport i per haver posat tanta iniciativa i esforç pel nostre treball. La seva dedicació per la feina que fa i la seva capacitat per entendre les meves necessitats han sigut factors imprescindibles durant aquests mesos. Gràcies a ella vaig descobrir el llibre que va servir com a punt de partida, em va oferir una base sòlida sobre la qual construir el treball i una ajuda essencial per definir el tema i abordar els aspectes més importants. Gràcies també per haver-me posat en contacte amb el Martí Badal, fet que em va obrir portes per accedir al món de la recerca. Sense ella no hauria estat possible la realització d'aquest treball.

Finalment, voldria agrair a la meva família, a la meva parella, i als meus amics, per haver estat un suport incondicional, haver-me ofert un espai còmode per expressar-me i haver estat pacients i confiant en mi en tot moment.

Aquest procés no només ha estat fonamental per a l'elaboració del meu treball acadèmic, sinó que també ha contribuït enormement al meu creixement personal. Aquest camí m'ha permès adquirir una gran quantitat de coneixements i habilitats que estic segura que em seran útils en el futur. Han estat mesos de molt esforç, de molta recerca, de moltes proves, algunes que han sortit i d'altres que no, moltes incubacions, moltes converses mentrestant... Cada obstacle m'ha ensenyat la importància de la paciència, la perseverança i he après a veure els errors com una oportunitat per millorar.

Aquest treball porta el meu nom, però és fruit de l'esforç, la recerca i la dedicació de tots els que treballen conjuntament en l'àmbit científic, i sobretot és fruit d'aquestes persones que han contribuït al fet que es materialitzés.

INTRODUCCIÓ

L'envelliment cel·lular és un procés inherent a la vida que ha intrigat científics i investigadors al llarg de la història. En aquest treball de recerca s'aportarà una explicació àmplia i actualitzada de l'envelliment i les seves possibles vies de manipulació.

Els objectius principals d'aquest projecte són, en primer lloc, aprofundir en els mecanismes de l'envelliment cel·lular i les seves causes, analitzant factors moleculars, genètics, epigenètics i ambientals que influeixen en aquest procés. En segon lloc, es pretén explorar els efectes anatòmics, fisiològics i les estratègies per endarrerir l'envelliment, estudiant els avenços científics més recents per prevenir o revertir aquests efectes. Finalment, es busca identificar els mecanismes i factors que han permès que una supercentenària de 116 anys arribi a aquesta edat extremadament avançada, investigant els factors biològics i epigenètics implicats en la seva longevitat.

El meu interès en l'envelliment cel·lular es deu a múltiples factors. Des d'una edat primerenca, la ciència i la medicina han estat temes apassionants per a mi, em fascina la idea de comprendre i manipular els processos biològics subjacents a l'envelliment, que podria potencialment millorar la qualitat de vida de milions de persones a tot el món. A més a més, aquest treball és una oportunitat de contribuir en el camp de la ciència i la medicina, promovent una major consciència pública sobre l'envelliment i les seves implicacions. Testimonis de familiars i amics que han lluitat contra malalties associades a l'edat, com l'Alzheimer, la malaltia de Parkinson i el càncer, han enfortit encara més la meva motivació per a endinsar-me en aquest camp.

Aquest treball de recerca és una oportunitat única per abordar un dels grans reptes científics i socials del nostre temps. L'envelliment, tot i ser un procés natural, podria ser considerat una malaltia que la ciència i la tecnologia podrien retardar o, fins i tot, revertir. Amb el coneixement actual, ja no sembla utòpic pensar en la possibilitat d'augmentar significativament la longevitat humana i millorar la qualitat de vida. Tot i que assolir la immortalitat queda lluny, aquest projecte és una contribució per avançar cap a una vida més llarga i saludable.

Aquesta memòria es divideix en diversos capítols que aborden de manera exhaustiva els aspectes fonamentals i pràctics de l'envelliment cel·lular, així com la seva investigació experimental.

El primer capítol desenvolupa els conceptes bàsics sobre la cèl·lula, incloent-hi la informació genètica i el cicle cel·lular, oferint el context necessari per entendre els processos moleculars que es tractaran més endavant.

En els capítols centrals, s'analitzen les causes de l'envelliment, que es classifiquen en causes primàries, antagonístiques i integratives. Aquestes seccions aborden temes com la inestabilitat genòmica, l'escurçament dels telòmers, les alteracions epigenètiques, la disfunció mitocondrial i la senescència cel·lular, entre d'altres. També s'examinen les conseqüències anatòmiques i fisiològiques de l'envelliment, com els canvis en el sistema musculoesquelètic, cardiovascular, nerviós i immunitari.

El treball inclou una revisió de la recerca antienvelliment, amb un enfocament especial en les estratègies per aconseguir un envelliment saludable. Això abasta factors com l'activitat física, la dieta, el cicle del son i la salut mental.

En la part pràctica, es presenta l'anàlisi epigenètica i l'estudi detallat del cas d'una supercentenària de 116 anys. Aquesta secció ha estat possible gràcies a la col·laboració amb l'Institut de Recerca Josep Carreras, que ha proporcionat les instal·lacions i el suport necessari per dur a terme els experiments. L'estudi inclou una anàlisi mitocondrial i proteica, detallant els objectius, la metodologia i els fonaments teòrics de cada experiment.

Es van aplicar tècniques com l'extracció d'ADN de la saliva, el control quantitatiu i qualitatiu de l'ADN, així com tècniques d'amplificació genètica com la PCR i la qPCR per identificar i quantificar gens relacionats amb l'envelliment. Per a l'anàlisi de la salut cel·lular, es va dur a terme la citometria de flux (FACS) per examinar la funció mitocondrial, l'extracció de leucòcits i l'anàlisi proteica (Western Blot) per identificar canvis en les proteïnes associades a l'envelliment. També es va realitzar la bisulfitació de l'ADN per estudiar la metilació genètica, així com el cultiu cel·lular per a dur a terme proves prèvies al projecte experimental real, etc.

Finalment, el treball es completa amb un apartat de conclusions, referències documentals i un annex que recopila informació addicional.

1. Introducció a la cèl·lula

La cèl·lula és la unitat bàsica de tots els organismes vius i és considerada la base de la vida, ja que conté tota la informació necessària per dur a terme les tres funcions vitals: la nutrició, la relació i la reproducció.

Poden variar en funció i organització, depenent del tipus de teixit o òrgan en què es trobin. Així, en el cos humà es poden distingir una gran varietat de cèl·lules, com les cèl·lules sanguínies, musculars, nervioses i d'altres, cadascuna especialitzada en funcions concretes que permeten el correcte funcionament de l'organisme.

Les cèl·lules estan delimitades per una bicapa lipídica, coneguda com a membrana cel·lular o membrana plasmàtica, que separa el medi intern del medi extern i regula l'intercanvi de substàncies entre tots dos. A més, aquesta membrana compta amb receptors que permeten a la cèl·lula identificar i respondre a senyals externs, la qual cosa altera i controla les funcions cel·lulars internes. Aquesta capacitat de resposta a l'entorn és fonamental per mantenir l'equilibri i l'homeòstasi de la cèl·lula.

Dins de la cèl·lula, trobem diversos orgànuls que executen tasques fonamentals per a la seva funció i supervivència. Un dels orgànuls més importants és el nucli, que regula l'entrada i sortida de materials a través dels porus de la membrana nuclear i envolta l'ADN, la informació genètica necessària per a la síntesi de proteïnes i la seva regulació. A l'interior de la cèl·lula també es troba el citoplasma, una substància viscosa composta d'aigua i biomolècules orgàniques, que serveix com a medi per a tots els orgànuls cel·lulars. Aquests orgànuls són responsables de funcions vitals com la respiració cel·lular, la síntesi de proteïnes i la divisió cel·lular.

Els mitocondris són els responsables de la respiració cel·lular, un procés que converteix els nutrients en ATP, l'energia necessària per a les activitats cel·lulars. Aquest procés no només és fonamental per la producció d'energia, sinó que també està implicat en la regulació de la mort cel·lular programada, coneguda com a apoptosi.

Els ribosomes, per la seva banda, realitzen la síntesi de proteïnes, llegint l'ARN missatger que porta la informació genètica del nucli per fabricar proteïnes, que són crucials per a la funció, l'estructura i la regulació de la cèl·lula.

Per estudiar les cèl·lules en un entorn controlat, s'utilitzen tècniques com el cultiu cel·lular, que permet mantenir cèl·lules fora del cos i observar-les en resposta a diferents tractaments. A través de tècniques moleculars com la PCR i la qPCR, és possible analitzar l'expressió de gens específics en aquestes cèl·lules. Aquestes tècniques permeten estudiar com les cèl·lules responen a factors com l'estrès, la senescència o l'exposició a determinats compostos, especialment en el context de l'envelliment cel·lular.

A més de les cèl·lules pròpies del cos, dins del nostre organisme també habiten una gran quantitat de microorganismes, com bacteris i fongs, que constitueixen el microbioma. Aquest conjunt de microorganismes té un paper fonamental en diversos processos biològics.

Per exemple, els bacteris del tracte digestiu ajuden en la descomposició d'aliments i en la producció de vitamines, mentre que altres microorganismes actuen com a barreres de protecció contra patògens, evitant que aquests causin infeccions o desequilibris en el sistema. Aquest sistema simbiòtic de cèl·lules humanes i microorganismes contribueix de manera essencial a la salut general del cos.

La comprensió detallada de la cèl·lula i dels processos que es duen a terme en el seu interior és fonamental per entendre els mecanismes de l'envelliment i les malalties associades, ja que ens permet explorar i desenvolupar estratègies per retardar aquest procés natural. A més, aquesta comprensió és essencial no només per al diagnòstic i tractament de les malalties relacionades amb l'edat, sinó també per obrir noves vies per al desenvolupament de possibles tractaments que millorin la salut cel·lular i, per tant, la salut general de l'individu a mesura que envella.

En conseqüència, per a una comprensió completa d'aquest treball, és recomanable disposar d'una base sòlida en biologia, ja que això permet entendre els processos cel·lulars i moleculars clau implicats en l'envelliment i les seves implicacions per a la salut.

1.2 La informació genètica

El cos humà està compost per cèl·lules eucariotes, les quals comparteixen la mateixa informació genètica emmagatzemada al nucli, que és la característica distintiva d'aquest tipus de cèl·lules: la seva estructura amb nucli.

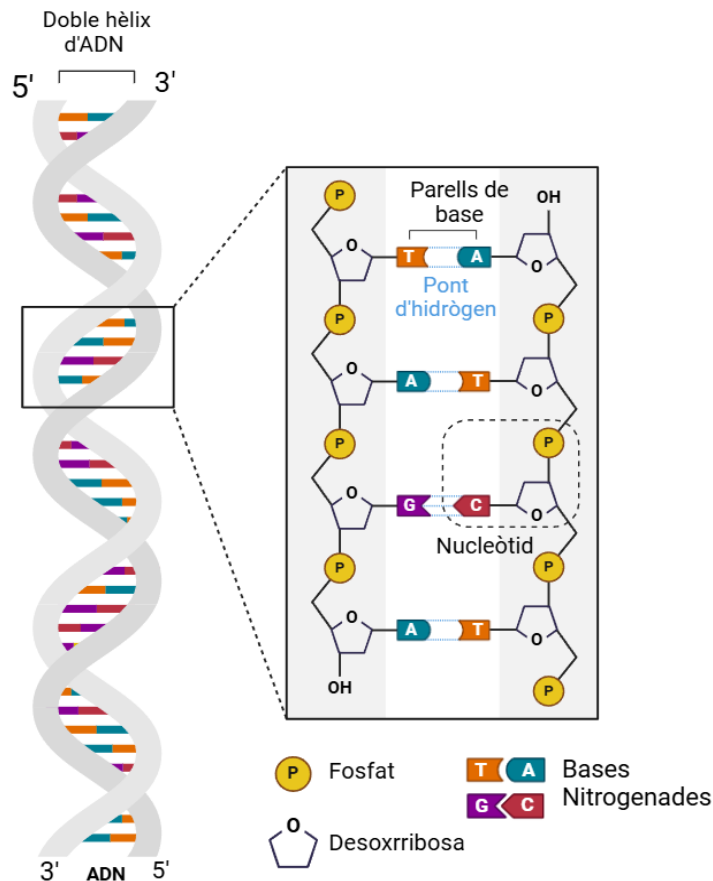


Figura 1: Estructura de l'ADN

L'ADN o àcid desoxiribonucleic és una biomolècula de dues cadenes enrotllades entre si, formant una doble hèlix, constituïda per una seqüència de nucleòtids.

Cada nucleòtid està format per tres components: una de les quatre bases nitrogenades: adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T), una pentosa (desoxirribosa) i un grup fosfat. L'adenina (A) sempre s'aparellarà amb una timina (T), mentre que la guanina (G) ho farà amb una citosina (C), formant així l'estructura de doble hèlix.

Cada conjunt de tres nucleòtids, quan es transcriu a ARN missatger, rep el nom de codó, i pot codificar un aminoàcid o interrompre el procés de síntesi d'un pèptid o proteïna; entre ells hi poden haver fins a 64 combinacions, que són més que suficients per codificar els 21 aminoàcids, necessaris per a la construcció d'una proteïna.

L'ADN mesura aproximadament dos metres de llargada i normalment el trobem enrotllat sobre unes proteïnes anomenades **histones**, que formen una espècie de collaret de perles, però en el procés de divisió cel·lular aquest collaret de perles es replega sobre si mateix i es condensa per tal de formar cromosomes.

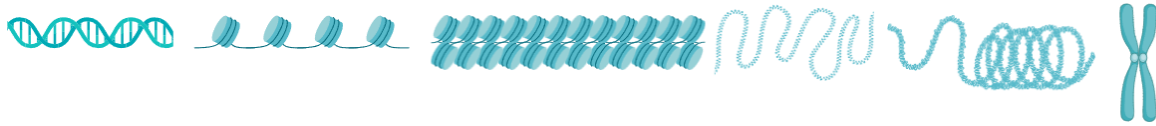


Figura 2: Formació d'un cromosoma

Els cromosomes tenen diverses regions funcionals:

1. **El centròmer:** Aquesta regió especialitzada d'ADN se situa generalment a prop del centre del cromosoma i té un paper crític durant la divisió cel·lular. El centròmer serveix com a punt d'ancoratge per als microtúbuls del fus mitòtic, garantint que els cromosomes se segreguin de manera precisa entre les cèl·lules filles. Una funció defectuosa del centròmer pot donar lloc a anomalies cromosòmiques, com la pèrdua o duplicació de cromosomes, amb conseqüències potencialment greus per a la salut cel·lular i l'organisme.
2. **Els braços curts i llargs del cromosoma:** Aquests segments d'ADN, contenen una gran varietat de seqüències genètiques. Aquestes seqüències codifiquen proteïnes essencials per a processos cel·lulars, ARN i altres productes funcionals necessaris per al manteniment i la regulació de les funcions biològiques. Els braços cromosòmics també són responsables de mantenir l'organització i l'accés adequat als gens durant la replicació i la transcripció de l'ADN.
3. **Els telòmers:** Aquestes estructures es troben en els extrems dels cromosomes i estan formades per seqüències repetitives d'ADN. Els telòmers actuen com a "capes protectores", evitant que els extrems dels cromosomes es deteriorin o es fusionin amb altres cromosomes. Amb cada divisió cel·lular, els telòmers es van escurçant, un procés que s'associa amb l'envelliment cel·lular i l'aparició de malalties relacionades amb l'edat. En determinades cèl·lules, com les cèl·lules mare i les cèl·lules canceroses, l'enzim telomerasa ajuda a mantenir la longitud dels telòmers, assegurant la seva funcionalitat.

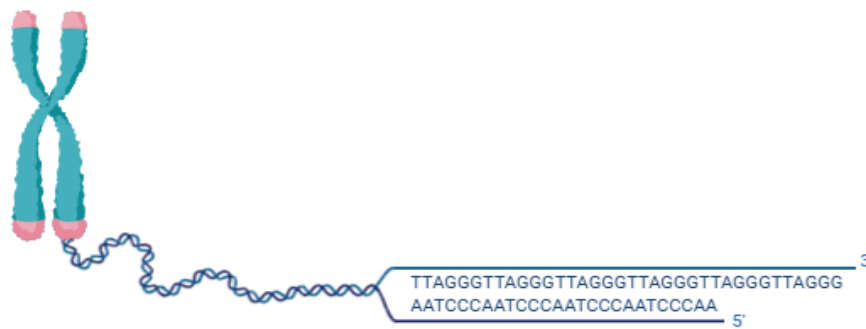


Figura 3: Telòmer d'un cromosoma

1.3 El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és un procés pel qual la cèl·lula passa, per aconseguir dividir-se i produir-ne de noves, aquest està compost per diverses fases molt ben definides, que asseguren una replicació i una distribució del material genètic de manera correcta.

Les cèl·lules del fetge (hepatòcits) es divideixen lentament (una o dues vegades a l'any) i poden accelerar la seva divisió en resposta a lesions.

A continuació podem veure representades les fases del cicle cel·lular:

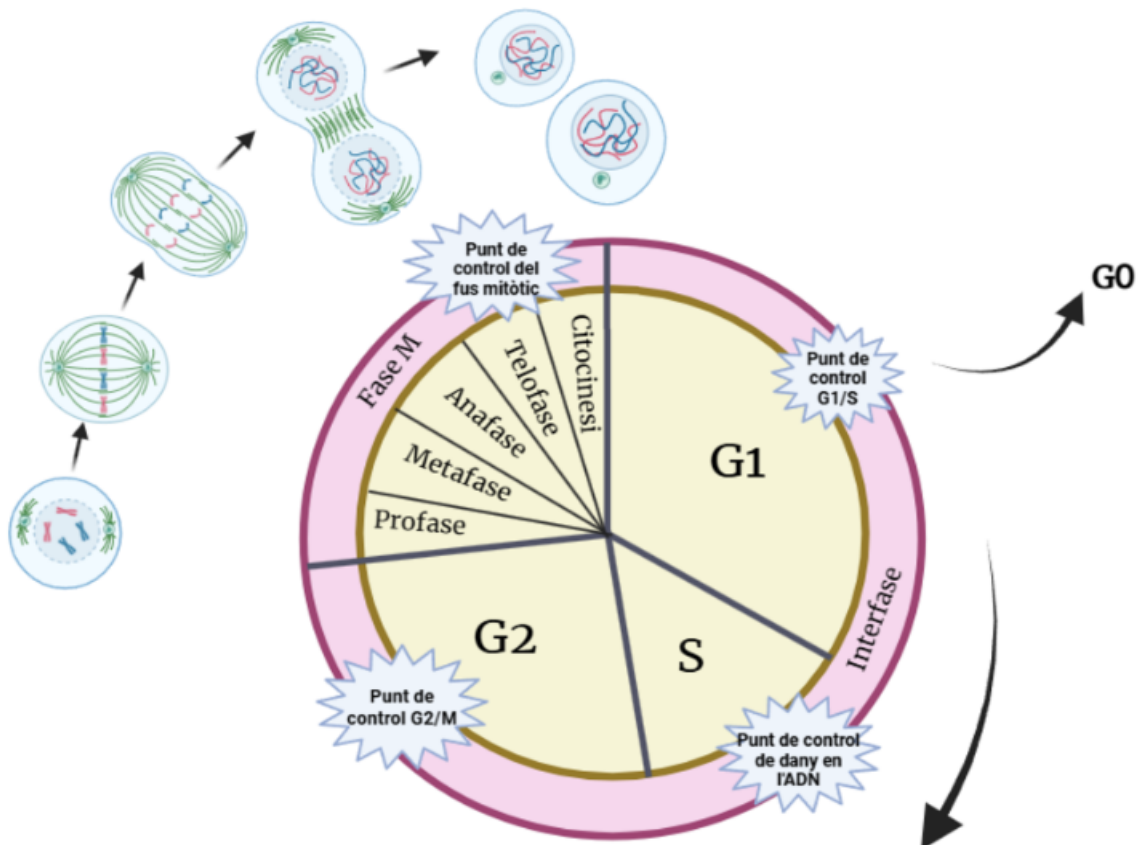


Figura 4: El cicle cel·lular

1.3.1 La interfase

Durant la G1, la cèl·lula creix i realitza la seva funció normal mentre es prepara per a la replicació de l'ADN. Després, pot seguir dos itineraris diferents, la fase G0 o la Fase S.

La fase G0 (també coneguda com a fase de quiescència) és un estat en el qual les cèl·lules es troben en repòs, continuen realitzant les seves funcions normals, però no repliquen el seu ADN, ni es preparen per a la divisió cel·lular. Algunes cèl·lules entren en la fase de quiescència temporalment a causa de diferents factors, com la falta de nutrients, la senescència o la diferenciació terminal. No obstant això, algunes cèl·lules poden sortir de la fase de quiescència i reprendre el cicle cel·lular si es reben els senyals apropiats i les condicions són favorables per a la divisió cel·lular.

En la fase S, l'ADN es duplica, gràcies a uns enzims (Helicasa, ADN polimerasa, telomerasa...), preparant-se per a la divisió cel·lular.

En la fase G2, la cèl·lula continua creixent i es prepara per a la mitosi, un procés important d'aquesta fase és la **reparació dels danys de l'ADN**.

1.3.2 La mitosi

La fase M, també coneguda com a mitosi, és l'etapa del cicle cel·lular en la qual la cèl·lula es divideix en dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. La mitosi es compon de diverses etapes:

- **Profase:** La cromatina es condensa en cromosomes i l'embolcall nuclear es desintegra. Els centrosomes es mouen cap als pols oposats de la cèl·lula i comencen a formar el fus mitòtic, que s'uneix als cromosomes a través del centròmer, gràcies al cinetocor (conjunt de proteïnes que uneixen cada cromosoma a filaments de microtúbuls).
- **Metafase:** Els cromosomes s'alineen en la placa equatorial.
- **Anafase:** Les cromàtides germanes se separen i es mouen cap als pols oposats de la cèl·lula, gràcies a l'acció del fus mitòtic.
- **Telofase:** Els cromosomes arriben als pols oposats i la membrana nuclear es reconstrueix al voltant de cada joc de cromosomes.

- **Citocinesi:** La divisió del citoplasma es produeix i finalment separa la cèl·lula en dues cèl·lules filles.

El control estricte en cada etapa del cicle cel·lular és crucial per a evitar errors que poden portar a mutacions o inestabilitat cromosòmica. Durant les fases, hi ha diversos punts de control.

- **Punt de control G1/S:** Verifica la grandària, nutrients, factors de creixement i danys en l'ADN abans de la replicació. Les cèl·lules no aptes poden entrar en repòs (G0), reparar els danys o, rarament, continuar el cicle.
- **Punt de control G2/M:** Assegura la replicació correcta de l'ADN abans de la mitosi. Si hi ha algun error o la replicació és incompleta, la cèl·lula atura el seu procés per a permetre la reparació.
- **Punt de control del fus mitòtic:** Controla l'alineació i unió dels cromosomes en la mitosi. Si hi ha problemes, la cèl·lula atura el seu procés per a solucionar-los.
- **Punt de control de dany en l'ADN:** Detecta i respon al dany en l'ADN en diverses fases del cicle cel·lular. Si es detecten errors, el cicle s'atura per a permetre la reparació o induir la mort cel·lular programada (apoptosi).

2. Definició d'envelliment

Entenem com “envelliment” l'acumulació d'una gran varietat de deterioraments fisiològics que tenen lloc en un organisme a mesura que van passant els anys, cosa que a poc a poc, contribueix a un descens de les capacitats físiques i mentals, sovint major vulnerabilitat davant de malalties, i en última instància, la mort.

Hi ha diverses teories que intenten explicar els motius de l'envelliment. Una d'elles és la teoria de la programació genètica, que fa referència al concepte del rellotge biològic. Segons aquesta teoria, l'envelliment estaria programat genèticament, i es basa en l'observació que individus de la mateixa espècie experimenten processos d'envelliment molt similars. Això suggereix que l'envelliment podria ser influït per factors genètics i l'herència.

Una altra teoria destacada és la teoria de l'envelliment immunitari, que sosté que el sistema immunitari, que és el principal mecanisme de defensa del cos contra agents externs nocius, es debilita amb l'edat. A mesura que envellim, la capacitat del cos per combatre patògens disminueix i la producció d'anticossos en les quantitats adequades es redueix. Això pot portar a una pèrdua d'eficàcia en les respostes immunitàries. A més, en alguns casos, el sistema immunitari pot començar a atacar teixits del propi cos, com si fossin agents externs, causant malalties autoimmunes.

Com podem veure, la longevitat humana ha augmentat significativament al llarg de la història i s'espera que continuï augmentant ^{1 2}. Al segle XX, l'esperança de vida s'ha més que duplicat en moltes parts del món gràcies a les millores en la sanitat, la nutrició i les condicions de vida en general.

¹ Dattani, S., Rodés-Guirao, L., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E., & Roser, M. (2023, 28 diciembre). *Life expectancy*. Our World In Data. <https://ourworldindata.org/life-expectancy>

² *Global life expectancy to increase by nearly 5 years by 2050 despite geopolitical, metabolic, and environmental threats, reports new global study*. (s. d.-b). Institute For Health Metrics And Evaluation. <https://www.healthdata.org/news-events/newsroom/news-releases/global-life-expectancy-increase-nearly-5-years-2050-despite>

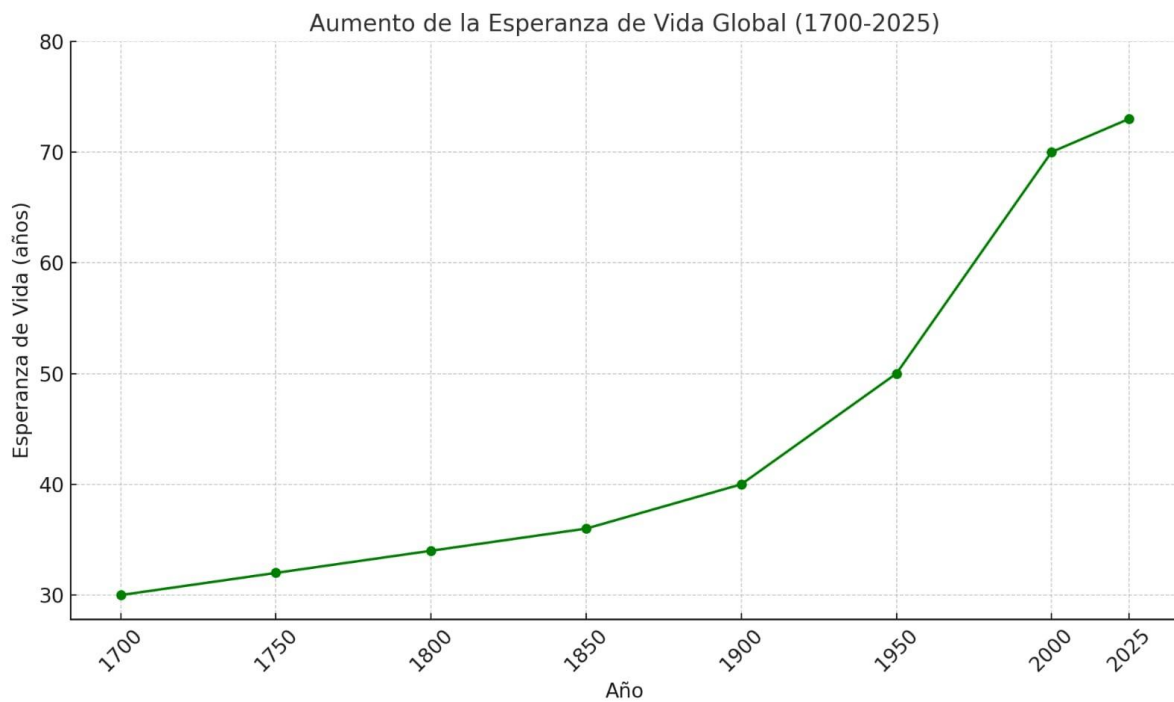


Figura 5: Evolució de l'esperança de vida global

El gràfic mostra que l'esperança de vida s'ha duplicat des del segle XVIII, passant de 30-40 anys a més de 70 anys actualment, a nivell mundial. A Europa, ha crescut prop d'un 129%, i a Àfrica s'ha més que duplicat. Aquest augment es deu als avenços mèdics i socials, i gràcies a la recerca sobre l'envelliment, s'espera que continuï creixent, millorant la longevitat i la qualitat de vida.

3. Causes de l'envelliment

L'envelliment és una malaltia molt complexa, que no només s'origina per un factor en concret, sinó que els investigadors han trobat fins i tot 12 factors o causes biològiques implicades directament en l'envelliment, moltes d'aquestes causes són també conseqüències, ja que estan estretament relacionades. Són les que trobem a continuació:

3.1 Causes primàries

Les causes primàries són els mecanismes responsables de l'acumulació de dany en les cèl·lules i molècules, i els que impulsen l'envelliment. Entre elles trobem:

3.1.1 Inestabilitat genòmica

La inestabilitat genòmica és deguda a l'alteració en l'estructura o funció del material genètic. És un factor clau en l'envelliment a causa de l'acumulació de danys en el genoma (ADN) que poden estar efectuats per agents externs, com la radiació UV, radiacions ionitzants com els rajos x, virus que introdueixen gens a la cèl·lula. També els poden efectuar agents interns, com una mala replicació del material genètic, una mala regulació de l'estrès cel·lular...

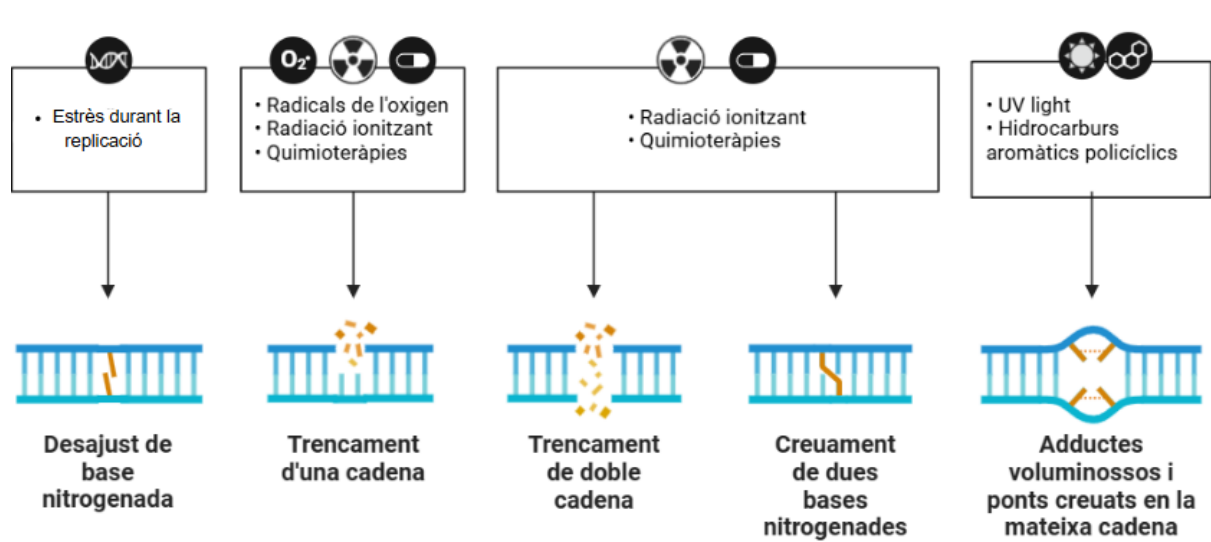


Figura 6: Factors nocius per a l'ADN

Aquests danys poden ser; mutacions puntuals (canvis en una sola base de l'ADN), delecions (pèrdua de segments d'ADN), translocacions (intercanvi de segments entre cromosomes no homòlegs), oxidació de l'ADN a causa dels radicals lliures de l'oxigen, etc.

És cert que l'organisme té mecanismes de reparació de l'ADN. Però a mesura que va passant el temps aquests mecanismes deixen de ser tan efectius, aleshores es produeix aquesta acumulació de danys, la qual cosa augmenta el risc de patir problemes, com una taxa de mort cel·lular molt alta, càncer, necessitat de cèl·lules mare per la reparació de teixit i una llarga llista de malalties associades a l'envelliment.

Això mostra que tenir cura de no exposar-nos al sol sense protecció, de mantenir-se lluny de substàncies com el tabac i de mantenir un nivell d'estrès saludable, és imprescindible per intentar mantenir, en la mesura del que està a les nostres mans, una bona estabilitat genòmica.

3.1.2 Eскурçament de telòmers

Anteriorment, hem definit què és un telòmer, són aquestes regions d'ADN repetitives que es troben als extrems dels cromosomes. La seva funció principal és protegir als cromosomes del dany que poden patir durant la replicació de l'ADN.

En la divisió cel·lular, els telòmers es van escurçant gradualment degut a la incapacitat de l'enzim **telomerasa** per replicar completament els extrems dels cromosomes. Aquest escurçament està associat a l'edat i la suma de moltes divisions. Arriba un punt que els telòmers són tan curts que en la divisió es pot fer malbé l'ADN, aleshores, la cèl·lula deixa de dividir-se i entra en un estat de senescència, que com a conseqüència, disminueix la capacitat de renovació i reparació de teixits, cosa que contribueix a l'envelliment.

Per tant, mantenir la longitud dels telòmers podria ser una estratègia per alentir l'envelliment i reduir el risc d'afeccions relacionades amb l'edat.

És interessant veure, com hi ha cèl·lules que no pateixen un escurçament dels telòmers, tenim les cèl·lules mare i les cèl·lules tumorals/cancerígenes. Aquestes tenen la telomerasa molt activa, cosa que permet una replicació completa de l'ADN. Amb aquesta informació tenim pistes de com podem aconseguir que les nostres cèl·lules tampoc pateixin l'escurçament, això sí, evitant la proliferació de cèl·lules tumorals i d'altres malalties associades a danys a l'ADN, que encara hem d'aconseguir combatre.

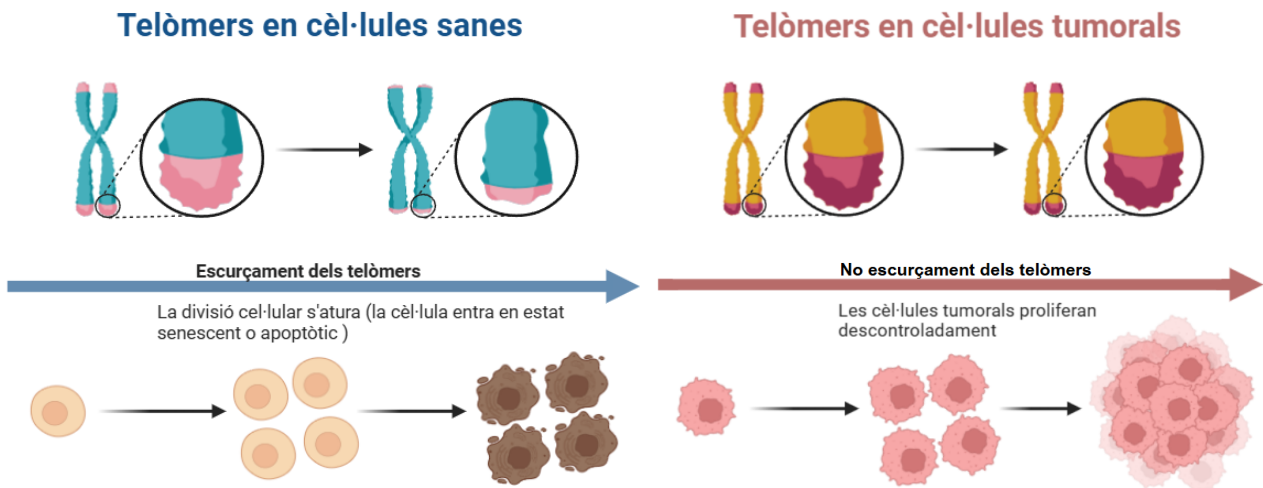


Figura 7: Comparació entre telòmers en cèl·lules sanes i tumorals.

3.1.3 Alteracions epigenètiques

Coneixem l'epigenètica com els canvis que presenta el genoma d'una cèl·lula, causats per compostos químics, grups metil ($-\text{CH}_3$) o grups acetil ($-\text{COCH}_3$) que modifiquen l'expressió de gens, sense modificar la seva seqüència de nucleòtids, això permet la diferenciació de les cèl·lules i l'adaptació d'aquestes a l'entorn.

El conjunt de tots els canvis epigenètics és conegut com a epigenoma.

Metilació

Les marques poden ser, per una banda, **metilacions del DNA o d'histones**, addició de grups metil en les citocines en regions específiques de l'ADN com les illes CpG³, les quals condensen la cromatina i fa que els gens quedin bloquejats.

Figura 8: Metilació de l'ADN

Acetilació

D'altra banda, aquestes modificacions poden ser **acetilacions d'histones**, addició de grups acetil a histones de l'ADN, les quals relaxen la condensació, fent que l'ADN sigui més accessible per l'ARN-polimerasa i facilitant la transcripció de determinats gens.

Figura 9: Acetilació de l'ADN

³ Les **illes CpG** són regions del genoma caracteritzades per una alta concentració de nucleòtids citosina-guanina (CpG), on la citosina està unida amb una guanina. Aquestes illes solen trobar-se a prop dels promotors de molts gens, especialment gens essencials, i tenen un paper crucial en la regulació de l'expressió gènica.

Les modificacions epigenètiques, com els canvis en els patrons de metilació de l'ADN, tenen un paper fonamental en l'envelliment perquè influeixen en l'expressió gènica, sense alterar la seqüència genètica. Amb l'edat, aquests patrons es desregulen, fet que té conseqüències clares en la funcionalitat cel·lular:

1. **Hipometilació:** Es caracteritza per una pèrdua global de metilació, que pot provocar l'activació de gens relacionats amb l'envelliment i processos inflamatoris. Això inclou gens que poden promoure el càncer o altres alteracions relacionades amb una replicació cel·lular descontrolada.
2. **Hipermetilació:** Aquesta condició pot afectar gens protectors específics, com els supressors de tumors (p16, p53, p21), desactivant-los. La desactivació d'aquests gens pot facilitar l'acumulació de danys en el genoma, alterar el control del cicle cel·lular i augmentar el risc de malalties associades a l'edat, com el càncer.

L'article de Dominic Saul i Robyn Laura Kosinsky⁴ destaca la importància de les modificacions epigenètiques en els processos relacionats amb l'envelliment i les implicacions en diverses patologies. Entre les conclusions, els autors subratllen que les alteracions epigenètiques, com la metilació de l'ADN i les modificacions d'histones, són factors crucials que afecten l'expressió gènica i regulen processos cel·lulars fonamentals com la senescència, l'apoptosi i la inflamació crònica. Alhora estan implicats en les malalties relacionades amb l'edat.

Els gens com p16, p21 i p53 són esmentats com a actors principals en la regulació de la senescència cel·lular, la disfunció de la qual a causa d'alteracions epigenètiques, podria contribuir al desenvolupament de malalties associades amb l'envelliment, com ara el càncer, malalties neurodegeneratives i malalties cardiovasculars. L'article conclou que la modulació d'aquests mecanismes epigenètics podria oferir oportunitats terapèutiques noves per tractar o prevenir malalties relacionades amb l'envelliment.

Per tant, el camp de l'epigenètica és una diana amb moltes oportunitats per al desenvolupament de teràpies epigenètiques, per preveure o revertir els processos de l'envelliment.

⁴ Saul, D., & Kosinsky, R. L. (2021). Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(1), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms22010401>

3.1.4 Pèrdua de proteostasis

Les proteïnes són essencials per a la majoria de les funcions cel·lulars i orgàniques.

Amb el pas del temps, les proteïnes poden experimentar alteracions causades per diversos factors, com ara l'estrès oxidatiu, la disminució de la capacitat cel·lular per mantenir i reparar correctament les proteïnes, i l'acumulació de proteïnes mal plegades. A mesura que l'envelliment avança, la capacitat cel·lular per reparar les proteïnes es veu reduïda. Això es deu a la disminució de l'activitat dels sistemes de reparació de proteïnes, que ajuden a identificar i degradar les proteïnes danyades o mal plegades. Aquesta acumulació de proteïnes mal plegades pot desencadenar respostes d'estrès cel·lular, com l'estrès del reticle endoplasmàtic i estrès oxidatiu, que poden activar vies de senyalització, com la via de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK) o la via de proteïnes quinases dependents de l'estrès (JNK). Si aquestes vies no es resolen adequadament, poden induir processos de senescència cel·lular o apoptosi, contribuint a l'envelliment cel·lular i orgànic.

Hi ha moltes proteïnes que estan associades a l'envelliment alguns exemples són: la **SIRT1** (Sirtuina 1), que regula el plegament proteic i la reparació de danys cel·lulars, a més de ser una proteïna implicada en la regulació de la resposta a l'estrès. **FOXO** és un factor de transcripció clau que pot activar gens implicats en la protecció contra l'estrès oxidatiu i la degradació de proteïnes danyades. **P53**, conegut com a "guardià del genoma", té un paper fonamental en la senescència cel·lular i en la resposta a l'estrès, controlant la proliferació cel·lular en condicions de dany.

Actualment, les proteïnes són un camp molt estudiat en relació amb l'envelliment. Un exemple dels estudis que s'han portat a terme és l'estudi "*Proteostasis y el proteoma del envejecimiento en la salud y la enfermedad*"⁵ de Richard I. Morimoto i Ana María Cuervo. L'objectiu principal de l'estudi és investigar com la pèrdua de proteostasis⁶ contribueix a l'envelliment cel·lular i les malalties relacionades. La conclusió és que mantenir una bona proteostasis és fonamental per prevenir els efectes de l'envelliment, amb un paper crucial d'algunes proteïnes, les sirtuïnes i les HSP en aquest procés.

⁵ Richard I. Morimoto, Ana Maria Cuervo, Proteostasis y el proteoma del envejecimiento en la salud y la enfermedad, *The Journals of Gerontology: Series A*, Volum 69, Número Suppl_1, junio de 2014, páginas S33–S38, <https://doi.org/10.1093/gerona/glu049>

⁶ **Proteostasis** és el terme que s'ha donat per definir l'homeòstasi proteínica dins de la cèl·lula. Aquest concepte abasta l'estudi de les proteïnes de manera individual, des de la síntesi, ubicació cel·lular i funció, fins a la vida mitjana i degradació.

L'estudi ha demostrat que el manteniment de la proteostasis ajuda a preservar la salut cel·lular, i les alteracions en les vies de senyalització com p53 i IGF-1 poden accelerar el procés d'envelliment.

3.1.5 Disminució de l'autofàgia

La disminució de l'autofàgia és un dels processos clau associats a l'envelliment, que implica una reducció de la capacitat de les cèl·lules per eliminar i reciclar components danyats, com ara proteïnes mal plegades i orgànuls defectuosos. Aquesta és essencial per mantenir l'homeòstasi cel·lular i prevenir el dany acumulat al llarg del temps. Amb el pas dels anys, aquesta capacitat disminueix, fet que contribueix a una major acumulació de productes tòxics i a una disminució de la funcionalitat cel·lular.

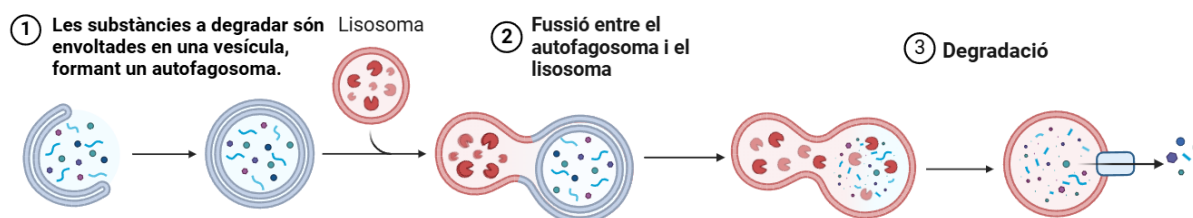


Figura 10: Procés d'autofàgia

Diversos estudis han evidenciat que l'activació de l'autofàgia pot tenir efectes beneficiosos en la salut i la longevitat. Un exemple és l'estudi *Autophagy in Aging* de He et al. (2013)⁷ que demostra que l'estimulació de l'autofàgia en models animals pot millorar la funció mitocondrial i reduir l'acumulació de proteïnes mal plegades, cosa que, alhora, pot endarrerir l'envelliment i millorar la salut general.

Aleshores, podem concloure que restaurar o estimular l'autofàgia podria ser una estratègia terapèutica clau per tractar les malalties associades a l'envelliment i millorar la qualitat de vida en la vellesa.

3.2 Causes antagonístiques

Les causes antagonístiques engloben tots aquells factors que actuen com a resposta d'un problema inicial en l'organisme, però que si es mantenen en el temps, poden ser perjudicials. A continuació es mostren algunes:

⁷ Stead, E. R., Castillo-Quan, J. I., Miguel, V. E. M., Lujan, C., Ketteler, R., Kinghorn, K. J., & Bjedov, I. (2019). Agephagy – Adapting Autophagy for Health During Aging. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00308>

3.2.1 Desregulació de la detecció de nutrients

La desregulació de la detecció de nutrients és un factor clau en el procés d'envelliment, ja que els mecanismes cel·lulars encarregats de detectar i respondre a la disponibilitat de nutrients essencials com la glucosa, els aminoàcids i l'oxigen són vitals per mantenir l'equilibri del cos. A mesura que envellim, aquests mecanismes comencen a perdre eficiència, la qual cosa té efectes perjudicials per a la salut cel·lular i el funcionament dels òrgans i els teixits. La desregulació de la detecció de nutrients està relacionada amb una sèrie de vies metabòliques importants, com mTOR, AMPK i la senyalització de la insulina, que juguen un paper fonamental en la regulació de processos com el creixement cel·lular, el metabolisme de l'energia i la resposta a canvis en la dieta.

Un dels mecanismes més importants en aquest procés és la via **mTOR**, que regula el creixement cel·lular i la síntesi de proteïnes en resposta a la disponibilitat de nutrients. Quan els nutrients estan disponibles, mTOR s'activa per permetre el creixement cel·lular i la reparació dels teixits. No obstant això, si aquesta via s'activa excessivament, pot provocar un envelliment prematur de les cèl·lules i s'ha relacionat amb malalties com el càncer i les neurodegeneratives. A mesura que l'edat avança, l'activació de mTOR es torna menys controlada, contribuint al deteriorament cel·lular i afavorint el desenvolupament de patologies relacionades amb l'edat.

A més de mTOR, la via **AMPK** és una altra via crucial per al metabolisme cel·lular. AMPK actua com un "sensor d'energia" que ajuda les cèl·lules a mantenir l'equilibri energètic. Quan els nivells d'energia dins de les cèl·lules són baixos, AMPK s'activa per ajudar a utilitzar de manera més eficient els recursos disponibles, afavorint la conservació d'energia i la reparació dels danys. Tanmateix, amb l'envelliment, l'activitat d'AMPK disminueix, la qual cosa pot conduir a un augment de la inflamació crònica i a un major dany cel·lular. Aquesta pèrdua d'eficàcia d'AMPK és un dels factors que accelera el procés d'envelliment i contribueix a la degeneració de les cèl·lules i teixits.

Finalment, la senyalització de la **insulina**, un mecanisme que regula el metabolisme de la glucosa, també es veu afectada pel pas del temps. La insulina és una hormona clau per al transport de la glucosa a les cèl·lules, on s'utilitza com a font d'energia. Amb l'edat, la capacitat del cos per fer servir la insulina disminueix, la qual cosa pot causar resistència a la insulina. Aquesta condició és una de les principals causes de la diabetis tipus 2 i augmenta el risc de desenvolupar altres malalties metabòliques i cardiovasculars. La desregulació de la senyalització de la insulina contribueix a la pèrdua d'eficiència metabòlica, la qual cosa

afavoreix l'acumulació de danys i la inflamació, factors que acceleren el procés d'envelliment.

En conjunt, la desregulació de la captació de nutrients té un impacte directe en la salut cel·lular i metabòlica. Quan els mecanismes que regulen el creixement cel·lular, l'ús de l'energia i el metabolisme de la glucosa no funcionen de manera òptima, es perd la capacitat del cos per mantenir-se en bon estat. Això no només accelera l'envelliment, sinó que també pot contribuir al desenvolupament de malalties cròniques com la diabetis, malalties cardiovasculars, neurodegeneratives i altres trastorns relacionats amb l'edat. Per tant, entendre com aquestes alteracions en la captació de nutrients influeixen en l'envelliment és fonamental per desenvolupar estratègies que puguin millorar la salut a mesura que envellim.

3.2.2 Disfunció mitocondrial

El **metabolisme** és un conjunt de reaccions químiques que es donen a terme per sintetitzar (anabolisme) o degradar (catabolisme) molècules, consumint o sintetitzant ATP, molècula de la qual parlarem més endavant.

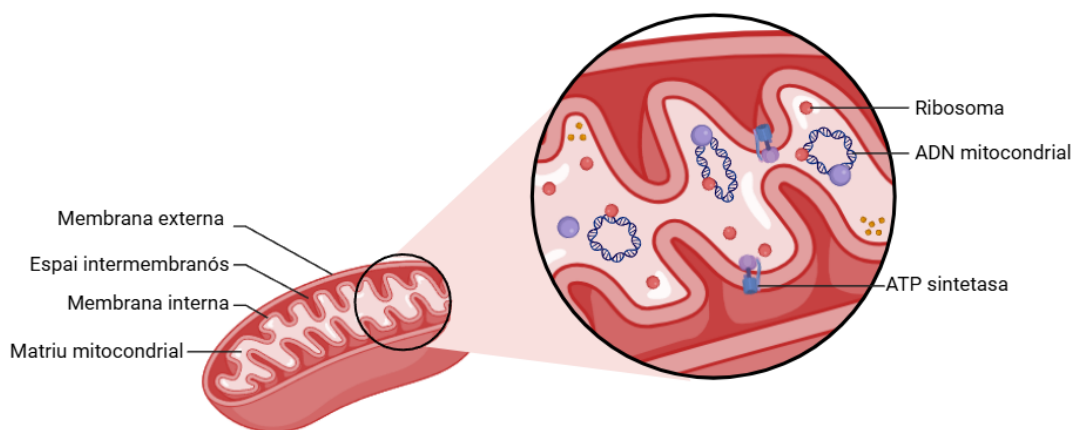


Figura 11: Estructura del mitocondri

Els mitocondris són un orgànul cel·lular relacionat amb el metabolisme, ja que en aquest, durant la respiració aeròbica (quan l'oxigen està involucrat) té lloc el **Cicle de Krebs** i la **cadena de transport d'electrons**.

El Cicle de Krebs es duu a terme en la matriu mitocondrial, consisteix en la degradació de molècules, com la glucosa i els àcids grassos. Aquestes molècules són sotmeses a un procés, **glucòlisi** en el cas de la glucosa, o bé **β -oxidació dels àcids grassos**, que les transforma en Acetilcoenzim A, i aquesta molècula entra al cicle de Krebs. Durant aquesta ruta, s'alliberen coenzims reduïts **NADH** i **FADH₂** que són portats a la cadena respiratòria.

La cadena de transport d'electrons, també coneguda com cadena respiratòria, s'encarrega, mitjançant un procés anomenat transport d'electrons, de tornar a oxidar els coenzims anteriors transformant-los en **NAD⁺** i **FAD** per retornar-los als processos anteriors. Aquesta ruta té lloc a la membrana interna del mitocondri.

Un bon manteniment de la salut dels mitocondris és imprescindible per una bona producció d'ATP i una producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), molècules que tractarem més endavant.

L'envelliment està estretament relacionat amb la disfunció mitocondrial, a mesura que passa el temps l'ADN mitocondrial acumula danys, perdent així l'eficiència en la producció d'energia i generen moltes més ROS, les quals perjudiquen la cèl·lula. Els coenzims que hem esmentat amb anterioritat són imprescindibles per la producció d'ATP.

Com hem vist, els mitocondris són una diana per tractar l'envelliment en la qual actualment hi ha molta investigació.

3.2.2 Senescència cel·lular

Les cèl·lules senescentes són cèl·lules que han perdut la capacitat de dividir-se i proliferar de manera eficient. La senescència cel·lular és el resultat d'una combinació de danys acumulatius i respostes cel·lulars defensives. Les principals causes són: el dany a l'ADN, l'estrès oxidatiu, l'escurçament dels telòmers, l'activació d'oncogens, la disfunció mitocondrial i l'activació de vies de senyalització específiques com p53/p21. Aquestes vies i mecanismes actuen en conjunt per aturar la proliferació de cèl·lules fetes malbé i protegir l'organisme.

L'acumulació de cèl·lules senescentes està relacionada estretament amb l'envelliment. Aquestes cèl·lules alliberen una varietat de factors proinflamatoris, citocines inflamatòries, moduladors immunològics, factors de creixement i proteases, formant el **fenotip secretor associat a la senescència (SASP)**. SASP provoca una degradació crònica de baix grau i

un deteriorament dels teixits, cosa que promou l'envelliment i les malalties relacionades amb l'edat, com l'osteoartritis, la fibrosi i certs tipus de càncer.

Les investigacions sobre cèl·lules senescentes estan centrades principalment a eliminar aquestes cèl·lules per mitigar els seus efectes negatius sobre la salut i l'envelliment. A través de l'ús de senolítics i altres teràpies, els científics estan explorant maneres de reduir la inflamació crònica, millorar la funció tissular i perllongar la vida saludable. Els estudis preclínic i clínic actuals són prometedors i podrien conduir a noves teràpies efectives per a diverses malalties relacionades amb l'edat.

3.3 Causes integratives

Les causes integratives són la representació del deteriorament funcional que va acumulant l'envelliment.

3.3.1 Esgotament de cèl·lules mare

Les cèl·lules mare són cèl·lules especials que poden renovar-se mitjançant divisió cel·lular i diferenciar-se en diferents tipus de cèl·lules especialitzades al cos. A causa d'aquestes propietats, les cèl·lules mare són essencials per al desenvolupament embrionari, la regeneració de teixits i la reparació de cèl·lules i teixits danyats al llarg de la vida d'un organisme.

Segons l'article de López-Otín⁸ i col·laboradors, l'esgotament de les cèl·lules mare és una de les dotze característiques principals del procés d'envelliment. Aquest esgotament contribueix al deteriorament funcional associat a l'edat, perquè amb el temps, les cèl·lules mare acumulen danys deguts a factors com l'estrès oxidatiu, la inflamació crònica i les alteracions en l'ADN. Aquests processos redueixen la capacitat de les cèl·lules mare per mantenir la regeneració dels teixits i l'homeòstasi cel·lular.

Quan això passa, es veu afectada la reparació i regeneració dels teixits, manifestant-se en una disminució de la funcionalitat dels òrgans, la pèrdua d'integritat dels teixits i un augment del risc de malalties relacionades amb l'edat.

⁸ López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023 Jan 19;186(2):243-278. doi: 10.1016/j.cell.2022.11.001. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36599349.

Aquest fenomen està connectat amb altres mecanismes d'envelliment, com la senescència cel·lular i la disfunció mitocondrial. Així doncs, preservar o restaurar la funció de les cèl·lules mare pot ser una estratègia prometedora per retardar el procés d'envelliment i millorar la salut en la vellesa.

3.3.2 Disfunció en la comunicació intercel·lular

La disfunció en la comunicació intercel·lular es refereix a la pèrdua d'eficàcia en els mecanismes que utilitzen les cèl·lules per comunicar-se entre elles i coordinar-se. Aquesta comunicació és fonamental per a processos vitals com el creixement, la resposta a l'estrès i la regulació de la inflamació. Quan aquestes comunicacions es veuen alterades, el cos té més dificultats per mantenir-se en equilibri, el que provoca un desgast general de teixits i un augment de malalties relacionades amb l'edat.

Un dels mecanismes més importants en aquesta comunicació intercel·lular són els factors de creixement, com el PDGF (factor de creixement derivat de plaquetes), l'EGF (factor de creixement epidèrmic) i l'IGF (factor de creixement similar a la insulina). Aquests factors ajuden les cèl·lules a respondre a situacions de creixement i reparació, i també influeixen en la capacitat de les cèl·lules per regenerar-se. Amb l'edat, les cèl·lules perden la capacitat de respondre de manera eficaç a aquests factors, la qual cosa afecta la seva capacitat de reparar els danys. Aquest deteriorament pot accelerar l'envelliment de les cèl·lules i provocar la formació de cèl·lules inflamatòries cròniques, que contribueixen a la inflamació persistent, un dels signes més visibles de l'envelliment.

A més d'aquests factors de creixement, les cèl·lules també es comuniquen mitjançant connexions directes anomenades unions **GAP**. Aquestes unions permeten el pas d'ions, i altres molècules petites entre cèl·lules, facilitant la coordinació de funcions internes. Amb l'envelliment, aquestes connexions es tornen menys permeables, el que dificulta la capacitat de les cèl·lules per mantenir-se sincronitzades. Aquesta disfunció afecta processos com el metabolisme cel·lular, la resposta a l'estrès i la reparació de danys, cosa que contribueix al deteriorament dels teixits i a l'aparició de malalties relacionades amb l'edat, com les neurodegeneratives (l'Alzheimer), l'arterioesclerosi (deteriorament de les artèries) i altres malalties inflamatòries cròniques.

En resum, la disfunció en la comunicació entre cèl·lules, tant a través de factors de creixement com de connexions directes, és una de les causes principals de l'envelliment i el

desenvolupament de malalties relacionades amb l'edat. Quan les cèl·lules no poden coordinar-se i respondre adequadament als senyals, els processos de reparació i regeneració es veuen alterats, accelerant el deteriorament del cos.

3.3.3 Inflamació crònica

La inflamació crònica és un procés en què el sistema immunitari manté una resposta inflamatòria de manera persistent i a un nivell baix al llarg del temps. Aquesta condició té una gran rellevància en l'envelliment, ja que s'ha vinculat amb l'aparició i el desenvolupament de diverses malalties cròniques, com les cardiovasculars, les neurodegeneratives, la diabetis tipus 2 i certs tipus de càncer. Amb el pas dels anys, el sistema immunitari experimenta canvis importants que redueixen la seva capacitat de respondre de manera eficient als estímuls externs, fet que genera una activació continuada de les vies inflamatòries, fins i tot quan no hi ha infeccions, ni lesions agudes.

Aquest augment de la inflamació crònica a mesura que envellim és conegut com a *inflammaging* i està relacionat amb diversos factors. Un dels més importants és l'increment de cèl·lules senescentes, que són cèl·lules que han deixat de dividir-se però no moren. Aquestes cèl·lules alliberen una sèrie de molècules, anomenades "factors secretors associats a la senescència" (SASP), de les quals ja hem parlat amb anterioritat, que generen un ambient inflamatori crònic. A més, la disfunció en la comunicació entre les cèl·lules immunitàries contribueix a un augment de la inflamació, que persisteix de manera contínua.

L'increment d'inflamació crònica té efectes negatius sobre l'organisme, ja que afecta la capacitat de les cèl·lules per reparar-se i regenerar-se, facilitant així els danys als teixits i alterant el funcionament dels òrgans. A més, l'acumulació d'inflamació crònica pot comprometre la resposta immunitària, augmentant la vulnerabilitat a infeccions i reduint la capacitat del cos per enfrontar-se a malalties.

Per tant, la inflamació crònica altera els mecanismes de reparació cel·lular, afavoreix la degeneració dels teixits i òrgans, cosa que contribueix al deteriorament general de la salut a mesura que l'individu envelleix.

3.3.4 Disbiosis

La disbiosis fa referència a un desequilibri o alteració en la composició i funcionament del microbioma, és a dir, de les comunitats de microorganismes (com bacteris, fongs, virus i altres) que viuen en el nostre cos, especialment en els intestins. Un microbioma saludable és essencial per al manteniment de la salut, ja que ajuda a regular diverses funcions, com la digestió, el sistema immunitari, la síntesi de vitamines i la protecció contra patògens. No obstant això, en la disbiosis, la diversitat microbiana disminueix i es produeix un augment de microorganismes potencialment patògens o una reducció dels beneficis, el que pot interferir amb els processos fisiològics normals.

Amb el pas dels anys, les persones tendeixen a experimentar canvis en la composició del seu microbioma, com una disminució de la diversitat bacteriana i un augment de microorganismes associats a la inflor o la inflamació. Aquesta alteració pot contribuir a diversos processos vinculats a l'envelliment, com la inflamació crònica de baix grau, el deteriorament de la funció immunitària i fins i tot trastorns metabòlics com la diabetis o l'obesitat. La disbiosis també pot afectar la salut intestinal, contribuint a la permeabilitat intestinal, una condició en què la barrera intestinal es torna més permeable i permet el pas de substàncies nocives a la sang, la qual cosa pot desencadenar reaccions inflamatòries.

A més, el desequilibri en el microbioma pot afectar el sistema nerviós i estar implicat en trastorns neurodegeneratius associats a l'envelliment, com l'Alzheimer. En resum, la disbiosis és un factor clau en l'envelliment, ja que altera la salut intestinal i la funció immunitària, augmentant la inflamació i contribuint al desenvolupament de malalties relacionades amb l'edat.

4. Conseqüències anatòmiques i fisiològiques

L'envelliment és un procés biològic complex que comporta canvis anatòmics i fisiològics progressius que afecten tots els sistemes del cos humà.⁹¹⁰ Aquestes modificacions varien segons factors com la genètica, l'entorn i el tipus d'estil de vida.

4.1 Canvis en el sistema musculoesquelètic

Amb l'edat, els músculs i els ossos pateixen una sèrie de canvis. La sarcopènia és el terme que s'utilitza per descriure la pèrdua de massa i força muscular que es produeix amb l'envelliment. Aquesta condició és causada principalment per una disminució de les fibres de contracció ràpida (les fibres musculars que permeten realitzar esforços ràpids i intensos) i una reducció de la capacitat del cos per sintetitzar proteïnes musculars. Aquesta pèrdua de massa muscular redueix la força física i la resistència, afectant la capacitat d'executar activitats diàries com caminar o aixecar objectes, i pot portar a una pèrdua d'autonomia funcional. La disminució de la massa muscular també es veu acompanyada d'un augment de greix, especialment al voltant de l'abdomen, fet que contribueix a l'augment de pes.

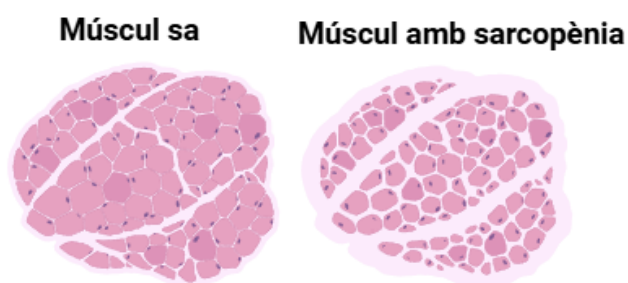


Figura 12: Comparació entre un múscul sa i un amb sarcopènia

⁹ Stefanacci, R. G. (2024b, abril 10). *Cambios corporales relacionados con el envejecimiento*. Manual MSD Versión Para Público General. https://www.msmanuals.com/es/hogar/salud-de-las-personas-de-edad-avanzada/envejecimiento-del-organismo/cambios-corporales-relacionados-con-el-envejecimiento#Aparato-digestivo_v8968012_es

¹⁰ Saul, D., & Kosinsky, R. L. (2021b). Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(1), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms22010401>

Els ossos també es tornen més fràgils amb el temps. Amb l'edat, disminueix la densitat mineral òssia, fet que augmenta el risc de fractures, que es curen més lentament, i porta a l'osteoporosi. Aquesta reducció en la densitat es deu a la reducció de l'activitat dels osteoblasts (cèl·lules encarregades de formar os) i a l'augment de l'activitat dels osteoclasts (cèl·lules que descomponen el teixit òssi). Això fa que els ossos siguin menys resistents a les fractures, especialment en zones com el colze, el canell i la columna vertebral. A més, les articulacions pateixen un desgast del cartílag, el teixit que protegeix les articulacions de l'impacte, la qual cosa pot provocar artrosi, una malaltia degenerativa que causa rigidesa i dolor en les articulacions.

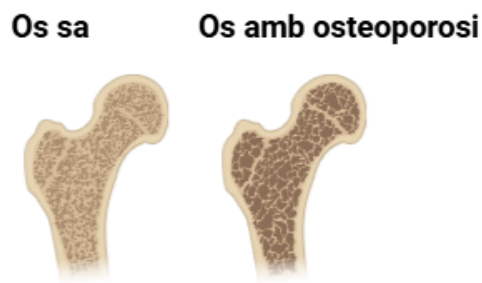


Figura 13: Comparació entre un os sa i un amb osteoporosi

4.2 Transformacions cardiovasculars

A mesura que envellim, el sistema cardiovascular experimenta canvis importants. Un dels canvis més destacats és la pèrdua d'elasticitat de les artèries. Les artèries són els vasos sanguinis que transporten la sang des del cor fins a la resta del cos. Amb l'edat, les parets d'aquestes artèries es tornen més rígides, un fenomen conegut com a arterioesclerosi.

Això provoca una major resistència vascular, que fa que el cor hagi de treballar més per mantenir la mateixa quantitat de sang circulant pel cos, per tant, incrementa la pressió arterial (hipertensió), un factor de risc per a malalties com la insuficiència cardíaca, els accidents cerebrovasculars (ictus) i la malaltia arterial coronària.

És rellevant destacar que el cor experimenta una reducció de la seva capacitat de relaxació durant la diàstole (la fase en què el cor es relaxa i es torna a omplir de sang), això pot

comprometre la seva eficàcia i dificultar la capacitat del cor per bombar sang de manera eficient, especialment durant exercicis intensos. La disfunció diastòlica és una condició en què el cor no es relaxa de manera adequada, reduint la seva capacitat per emplenar-se de sang i augmentant el risc d'insuficiència cardíaca.

4.3 Alteracions en el sistema nerviós

El sistema nerviós també experimenta transformacions amb l'edat, especialment al cervell. Una de les primeres àrees afectades és l'hipocamp, una regió cerebral clau per a la memòria i l'aprenentatge. Amb l'envelliment, el volum del cervell disminueix, i el cervell perd neurones, especialment en les àrees associades amb la memòria a curt termini i la capacitat de resoldre problemes. Aquesta pèrdua de volum cerebral pot provocar dificultats cognitives, com problemes de memòria i una reducció en la capacitat de processar informació de manera ràpida.

A més de la pèrdua de volum cerebral, el sistema nerviós perifèric també pateix canvis. Les fibres nervioses es desmielinitzen, és a dir, perden la capa de mielina que les envolta i les protegeix, la qual cosa redueix la velocitat de transmissió dels senyals nerviosos. Aquesta desmielinització pot dificultar la coordinació motriu i la resposta a estímuls, augmentant el risc de caigudes. També es redueix la capacitat de resposta del sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic, responsables de regular funcions automàtiques com la freqüència cardíaca i la pressió arterial, fet que pot contribuir a una major susceptibilitat a episodis de síncope o desmai.

4.4 Impacte en els sentits

L'envelliment afecta també els òrgans sensorials. Un dels canvis més comuns és la presbícia, que es refereix a la dificultat per enfocar objectes propers, una condició que es produeix quan el cristal·lí (la lent dins de l'ull) es torna menys flexible. Això fa que sigui més difícil enfocar objectes que estan a prop, com el text d'un llibre. D'altra banda, les degeneracions maculars (una malaltia ocular relacionada amb l'edat) poden causar pèrdua de visió central, i les cataractes, una opacitat del cristal·lí, poden reduir la visió en condicions de baixa llum.

Pel que fa a l'oïda, amb l'edat és comú desenvolupar presbiacusia, que és una pèrdua auditiva relacionada amb l'edat. Això afecta sobretot la percepció dels sons d'alta freqüència. En relació amb el gust i l'olfacte, els receptors sensorials es deterioren, el que redueix la capacitat de gaudir dels aliments i pot contribuir a una disminució de la gana.

4.5 Canvis en el sistema immunitari

Amb l'edat, el sistema immunitari experimenta canvis importants que el fan menys eficaç, un procés conegut com a *immunosenescència*. Aquest fenomen implica una disminució en la capacitat del cos per produir limfòcits T i B, que són les cèl·lules clau per a la resposta immune adaptativa. Aquest tipus de resposta és la que permet al sistema immunitari "recordar" infeccions anteriors i generar defenses específiques per combatre-les si es tornen a presentar. Quan la producció d'aquestes cèl·lules disminueix, el cos perd la seva capacitat per combatre eficaçment noves infeccions i malalties.

A mesura que el sistema immune es debilita, les persones grans es tornen més vulnerables a infeccions, incloses les respiratòries (com la grip i la pneumònia), que en persones més joves poden ser més fàcilment combatudes pel sistema immunitari. A més, aquesta pèrdua de capacitat de resposta també pot augmentar el risc de patir malalties autoimmunes. En aquestes condicions, el sistema immune ataca per error els mateixos teixits del cos, la qual cosa pot causar danys en òrgans o teixits.

Un altre aspecte important és que la capacitat de les persones grans per respondre a les vacunes disminueix. Això significa que, tot i rebre vacunes, com la de la grip o la de la pneumònia, aquestes no sempre tenen el mateix efecte protector que en les persones més joves. Això passa perquè el sistema immunitari en les persones grans no produeix tantes cèl·lules de memòria, limfòcits B, fet que redueix l'eficàcia de les vacunes.

En resum, la immunosenescència no només fa que el cos sigui més vulnerable a infeccions, sinó que també altera la capacitat per prevenir malalties mitjançant una resposta immune més feble, augmentant el risc de complicacions de salut en la vellesa.

5. Recerca antienvelliment

Algunes línies d'investigació que s'estan donant a terme relacionades amb tots els factors esmentats anteriorment es mostren a continuació:

#	Tema	Investigació	Grup d'investigació	Director	Fase d'investigació	Objectiu	Mecanisme d'acció	Model Experimental
1	Oxidació	Reducció de l'Estrès Oxidatiu	University of Southern California	Valter Longo, Ph.D.	Preclínica	Reduir l'estrès oxidatiu i millorar la longevitat	Dieta de restricció calòrica cíclica	Ratolins de laboratori
2	Residus Tòxics	Eliminació de Productes Avançats de Glicació (AGEs)	University of Utah	Scott Summers, Ph.D.	Preclínica	Reduir els productes avançats de glicació	Desenvolupament de compostos que degraden AGEs	Ratolins de laboratori
3		Detoxificació Cel·lular	Scripps Research Institute	Jeanne F. Loring, Ph.D.	Preclínica	Millorar la capacitat de les cèl·lules per eliminar toxines	Ús de compostos per augmentar la detoxificació	Ratolins de laboratori
4	Alteració de proteïnes i pèrdua de proteòstasi	Estudi de l'Agregació de Proteïnes	University of Cambridge	David C. Rubinsztein, M.D., Ph.D.	Disseny experimental	Prevenir l'agregació de proteïnes associada a l'envelliment	Estudi de l'autofàgia i compostos que promouen la degradació de proteïnes mal plegades	Cèl·lules humanes in vitro
5		Proteostasi i Envel·liment	University of California, San Francisco (UCSF)	Cynthia Kenyon, Ph.D.	Preclínica	Mantenir l'homeòstasi de proteïnes per millorar la longevitat	Estudi de vies de senyalització que regulen la proteostasi	C. elegans (nemàtodes)
6	Genètica	Reparació de Danys Oxidatius en l'ADN	National Institute on Aging (NIA)	Vilhelm A. Bohr, Ph.D.	Disseny experimental	Reparar danys oxidatius en l'ADN	Estudi de la proteïna de reparació de l'ADN, CSB	Cèl·lules humanes in vitro
7		Reparació de Trencaments de Doble Cadena en l'ADN	University of Southern California	Amy S. Lee, Ph.D.	Preclínica	Millorar la capacitat de les cèl·lules per reparar trencaments de doble cadena	Ús de teràpies gèniques per augmentar l'expressió de factors de reparació	Ratolins de laboratori
8		Protecció contra Danys en l'ADN per Radiació	Massachusetts General Hospital	David E. Fisher, M.D., Ph.D.	Disseny experimental	Desenvolupar estratègies per protegir l'ADN contra danys per radiació	Administració d'antioxidants i agents protectors de l'ADN	Cèl·lules humanes in vitro, ratolins

9		Reparació d'ADN i Envel·liment	Mayo Clinic	Jan van Deursen, Ph.D.	Preclínica	Comprendre la relació entre reparació d'ADN i envel·liment	Estudi de mutacions en gens de reparació de l'ADN	Ratolins de laboratori
10		Reparació de l'ADN en Malalties Neurològiques	University of California, San Francisco	William Weiss, M.D., Ph.D.	Disseny experimental	Millorar la reparació de l'ADN en malalties neurològiques	Teràpies per a incrementar la reparació de l'ADN en neurones	Cèl·lules neuronals in vitro
11	Epigenètica	Augment de la Longitud dels Telòmers	Stanford University	Helen Blau, Ph.D.	Disseny experimental	Restaurar la longitud dels telòmers per retardar l'envel·liment	Ús d'ARNm per codificar la telomerasa	Cèl·lules humanes in vitro
12		Activació de la Telomerasa	Harvard Medical School	Ronald DePinho, M.D.	Preclínica	Reactivar la telomerasa per prevenir l'escurçament dels telòmers	Desenvolupament de compostos activadors de la telomerasa	Ratolins transgènics
13	Cèl·lules senescent	Manteniment de l'Homeòstasi dels Telòmers	University of California, Berkeley	Kathleen Collins, Ph.D.	Preclínica	Comprendre i mantenir la integritat dels telòmers	Estudi de l'ARN de telomerasa i proteïnes associades per prevenir l'escurçament dels telòmers	C. elegans (nemàtode)
14		Reprogramació cel·lular	Salk Institute	Juan Carlos Izpisua Belmonte, Ph.D.	Preclínica	Reprogramar cel·lules per revertir l'envel·liment	Ús de factors Yamanaka per reprogramar cel·lules	Ratolins transgènics
15		Modificació d'Histones	Harvard Medical School	David Sinclair, Ph.D.	Preclínica	Estudiar les modificacions d'histones per retardar l'envel·liment	Desenvolupament de compostos que modifiquen histones	Ratolins de laboratori
16		Eliminació de Cèl·lules Senescent	Mayo Clinic	Jan van Deursen, Ph.D.	Clínica (Fase I/II)	Reduir la inflamació i millorar la salut general	Ús de senolítics per induir la mort de cel·lules senescent	Ratolins de laboratori i humans
17	Telòmers	Senolítiques per a Malalties Relacionades amb l'Edat	Mayo Clinic	Dr. James Kirkland	Preclínica i Clínica	Tractar malalties relacionades amb l'edat	Desenvolupament i ús de senolítics	Ratolins de laboratori i humans
18		Regulació de la Senescència Cel·lular a través de p16 ^{INK4a}	University of North Carolina at Chapel Hill	Norman Sharpless, M.D.	Preclínica	Comprendre el paper de p16 ^{INK4a} en la senescència cel·lular	Estudi de la regulació del gen p16 ^{INK4a}	Ratolins knockout

19		Inhibició de la Proteïna PAR2 en Ronyons Envel·lits	University of Texas Southwestern Medical Center	James K. Chen, Ph.D.	Preclínica	Reduir la senescència i la inflamació en ronyons envellits	Inhibició de la proteïna PAR2	Ratolins de laboratori
20	Mitocondri	Restauració de la Funció Mitocondrial	University of Washington	Matt Kaeberlein, Ph.D.	Preclínica	Millorar la funció mitocondrial per augmentar la longevitat	Ús de compostos que promouen la biogènesi mitocondrial	Ratolins de laboratori
21		Teràpia amb Coenzim Q10	University of California, Los Angeles (UCLA)	Dr. Arnold Brenner	Disseny experimental	Reduir l'estrès oxidatiu i millorar la funció mitocondrial	Administració de suplementos de Coenzim Q10	Cèl·lules humanes in vitro
22		Investigació sobre Mitofagia	Harvard Medical School	Dr. David Sinclair	Preclínica	Augmentar l'eliminació de mitocondris disfuncionals	Estudi de vies de senyalització per promoure la mitofagia	Ratolins de laboratori
23		Augment de la Biogènesi Mitocondrial	Salk Institute for Biological Studies	Juan Carlos Izpisua Belmonte, Ph.D.	Preclínica	Incrementar el nombre de mitocondris funcionals	Ús de factors de transcripció per activar la biogènesi	Ratolins de laboratori

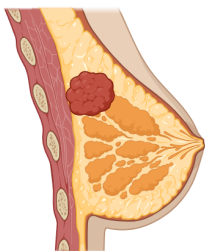
Figura 14: Taula; Panoràmica en la recerca antienvelliment

6. Càncer i envelliment

6.1 El càncer

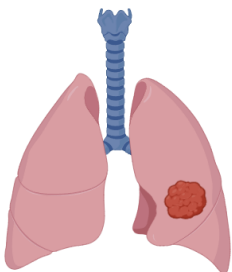
El càncer és una malaltia complexa caracteritzada pel creixement descontrolat de cèl·lules a causa d'alteracions en l'ADN. Aquestes alteracions poden sorgir per mutacions espontànies, exposició a agents carcinògens com la radiació o substàncies químiques, o per factors genètics hereditaris.

Quan els mecanismes de control cel·lular fallen, les cèl·lules afectades continuen dividint-se de manera descontrolada, escapant dels processos naturals com l'apoptosi (mort cel·lular programada) i promovent la formació de tumors. Els tumors poden ser benignes o malignes. Els tumors benignes no es dispersen a altres teixits i solen ser menys perillosos, mentre que els malignes poden envair altres òrgans mitjançant la metàstasi, fent-los més difícils de tractar i sovint més mortals.



El càncer de mama és un exemple comú, sovint associat amb mutacions en certs gens que normalment reparen l'ADN danyat. Quan aquests gens no funcionen correctament, augmenta el risc de desenvolupar aquesta malaltia.

Figura 15: Càncer de mama



Un altre exemple seria el càncer de pulmó, el qual està fortament relacionat amb el consum de tabac, i el melanoma, que es vincula a l'exposició prolongada a la radiació ultraviolada del sol.

Figura 16: Càncer de pulmó

Els avenços en les tècniques de diagnòstic i tractament, com la immunoteràpia i les teràpies dirigides, han permès tractar les cèl·lules tumorals amb més precisió. Malgrat aquests avenços, el càncer continua essent una de les principals causes de mortalitat a nivell mundial, amb milions de casos diagnosticats cada any. Aquestes dades subratllen la importància de la prevenció, com deixar de fumar o fer revisions periòdiques, la detecció precoç i la recerca en noves teràpies per millorar les taxes de supervivència i la qualitat de vida dels pacients.

6.2 Relació envelliment i càncer

L'envelliment i el càncer estan estretament relacionats. Amb l'edat, les cèl·lules acumulen més danys en l'ADN i la capacitat de reparar-los disminueix. Aquestes alteracions genètiques augmenten la probabilitat de desenvolupar càncer. Un mecanisme clau és la senescència cel·lular, fet que contribueix a la inflamació crònica i al deteriorament de l'entorn cel·lular, el qual pot facilitar el creixement de tumors. A mesura que l'edat avança, aquestes cèl·lules senescent s'acumulen i poden augmentar el risc de càncer.

A més, l'envelliment està vinculat a l'alteració dels telòmers, les estructures que protegeixen els cromosomes. Quan els telòmers s'escurcen amb el temps, les cèl·lules es fan més propenses a patir mutacions. La telomerasa té un paper clau en la formació de càncer, ja que en moltes cèl·lules tumorals aquest enzim està sobreexpressat, i això permet que els telòmers no s'escurcin i que les cèl·lules canceroses mantinguin la seva capacitat de dividir-se indefinidament, característica del càncer.

En l'envelliment, els telòmers es fan més curts progressivament en cada divisió cel·lular, i quan els telòmers arriben a un límit crític, la cèl·lula entra en senescència o mor. Això és part del mecanisme de protecció contra el càncer, ja que limita la capacitat de les cèl·lules d'acumular mutacions a mesura que envelleixen. Així, l'escurçament de telòmers és un fre natural del cicle cel·lular que ajuda a prevenir el desenvolupament de càncer.

Però malgrat els avantatges de mantenir els telòmers curts com a mecanisme de protecció, algunes investigacions han suggerit que allargar els telòmers podria ser útil per a la medicina regenerativa i l'envelliment saludable. El problema és que allargar els telòmers en cèl·lules sanes pot crear riscos greus.

En primer lloc, l'allargament artificial dels telòmers pot permetre a les cèl·lules continuar dividint-se sense restriccions, el que podria incrementar el risc de càncer, ja que aquestes cèl·lules poden acumular mutacions i transformar-se en cancerígenes. Aquest fet ha estat documentat en diversos estudis, Blasco, M. A. (2005)¹¹, que van mostrar que l'activació de l'enzim telomerasa en cèl·lules normals pot portar a la transformació maligna en condicions concretes.

En segon lloc, algunes teràpies de telomerasa han mostrat efectes indesitjats en animals, augmentant el risc de tumors i altres trastorns. Així, mentre que el concepte de restaurar la funció de telomerasa per combatre l'envelliment resulta atractiu, els riscos associats amb el càncer fan que aquesta estratègia no sigui viable a llarg termini sense un control rigorós.

A més a més, el sistema immune també pateix un deteriorament amb l'edat, un fenomen conegut com immunosenescència, el qual afecta la capacitat de l'organisme per identificar i eliminar cèl·lules canceroses. Amb l'edat, els limfòcits T, responsables de la resposta immunitària adaptativa, perden la seva eficàcia, cosa que permet que les cèl·lules tumorals creixin més lliurement. Aquesta disminució de la resposta immune augmenta la susceptibilitat a diversos tipus de càncer, ja que el sistema immune ja no pot actuar amb tanta eficàcia.

Les dades epidemiològiques indiquen que el risc de càncer augmenta amb l'edat. L'article Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2020)¹² proporciona una visió detallada sobre la mortalitat per càncer en grups d'edat, destacant que aproximadament el 60% dels casos de càncer ocorren en persones de 65 anys o més. A mesura que les persones envelleixen, les mutacions genètiques s'acumulen i el sistema immune es torna menys eficaç, fet que explica l'augment de la incidència de càncer a mesura que avança l'edat. Els tipus de càncer més comuns en les persones grans inclouen el càncer de mama, pròstata, pulmó i còlon, sent aquest últim especialment freqüent en homes i dones d'edat avançada.

En termes de tractaments, la recerca sobre com aplicar les propietats del càncer per a la medicina regenerativa ha guanyat força en els últims anys. Els investigadors estan estudiant com restaurar la funció de la telomerasa en cèl·lules sanes per combatre l'envelliment cel·lular i, potencialment, reduir el risc de càncer. A més, l'ús de la immunoteràpia està

¹¹ Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nat Rev Genet. 2005 Aug;6(8):611-22. doi: 10.1038/nrg1656. PMID: 16136653.

¹² Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902.

demostrant un gran potencial per enfortir el sistema immune de les persones grans, millorant la seva capacitat per lluitar contra cèl·lules tumorals.

Així, la relació entre envelliment i càncer es pot considerar una via de doble sentit: per una banda, l'envelliment augmenta el risc de càncer a través de mecanismes com la senescència cel·lular, la disfunció immune i l'acumulació de danys en l'ADN; per l'altra, les teràpies basades en la comprensió d'aquests processos poden obrir noves vies per tractar l'envelliment i prevenir el càncer. Aquestes investigacions podrien permetre no només millorar la supervivència dels pacients amb càncer, sinó també millorar la salut general de les persones grans, oferint noves oportunitats per reduir l'impacte d'aquestes malalties en la població.

7. Un envelliment saludable

Hi ha molts factors que influeixen en un envelliment saludable. Alguns no els podem controlar, com la inestabilitat genètica, però d'altres sí. S'han identificat accions que podem realitzar per ajudar a millorar la nostra salut, viure tan independentment com sigui possible i mantenir la nostra qualitat de vida a mesura que envellim.

7.1 L'activitat física i la dieta

L'activitat física regular és un component essencial per mantenir una bona salut a mesura que envellim. Aquesta pràctica no només millora la salut cardiovascular, sinó que també reforça la força muscular, la flexibilitat i la salut òssia, prevenint així malalties com l'osteoporosi i la sarcopènia. Segons un estudi publicat a *The Lancet*, les persones grans que mantenen una rutina d'exercici físic regular gaudeixen d'una esperança de vida més llarga i d'una qualitat de vida millorada, amb una reducció significativa del risc de mortalitat per malalties cròniques (Lee et al., 2012)¹³. Aquest estudi destaca que fins i tot nivells moderats d'activitat física poden tenir un impacte positiu en la salut general i el benestar.

L'exercici també juga un paper fonamental en la regulació del sistema immunitari a mesura que envellim. Weyh, Krüger i Strasser (2020)¹⁴ expliquen com la manca d'activitat física i una mala nutrició poden accelerar els processos d'envelliment a través d'alteracions en les respostes del sistema immunitari. Aquest estudi revela que la combinació d'exercici i una alimentació equilibrada pot ajudar a reduir la inflamació crònica i mantenir una millor salut immunitària, alentint així el procés d'envelliment.

Pel que fa a la dieta, una alimentació equilibrada rica en antioxidants i nutrients essencials, com els àcids grassos omega-3, té un efecte protector sobre el cervell i el cos. Yo (2024)¹⁵

¹³ Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT; Lancet Physical Activity Series Working Group. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):219-29. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61031-9. PMID: 22818936; PMCID: PMC3645500.

¹⁴ Weyh, C., Krüger, K., & Strasser, B. (2020). Physical activity and diet shape the immune system during aging. *Nutrients*, 12(3), 622. doi: 10.3390/nu12030622

¹⁵ Yo, F. B. (2024). Estrategias dietéticas para promover el envejecimiento saludable y la longevidad: Una perspectiva epidemiológica. *Journal of Internal Medicine*, 295(4), 508–531. doi: 10.1111/joim.13728

subratlla els beneficis de les dietes tradicionals, com la Mediterrània, la nòrdica i la d'Okinawa, així com d'altres patrons contemporanis com la dieta DASH¹⁶, en la prevenció de malalties cròniques associades a l'edat i en la millora de la salut cognitiva. Aquest treball indica que seguir aquestes dietes pot millorar la qualitat de vida i promoure un envelliment saludable.

La restricció calòrica és un altre element que ha demostrat tenir un efecte positiu en l'envelliment. Flanagan et al. (2020)¹⁷ van explorar com aquest enfocament pot influir en els mecanismes cel·lulars i metabòlics de l'envelliment. Els resultats suggereixen que la reducció moderada de la ingesta calòrica pot retardar el desenvolupament de malalties cardiometabòliques i altres problemes associats a l'edat.

Finalment, Longo i Anderson (2022)¹⁸ integren evidències científiques sobre l'impacte de la nutrició en l'envelliment. El seu treball mostra com diferents mecanismes moleculars i metabòlics vinculats a la dieta poden influir en la longevitat i reduir la incidència de malalties cròniques relacionades amb l'edat. Aquesta investigació proposa estratègies nutricionals dirigides a prolongar la vida activa i saludable.

En conjunt, l'exercici regular i una alimentació saludable són pilars essencials per fer front als efectes de l'envelliment i mantenir una bona qualitat de vida.

7.2 El cicle del son i la salut mental

El son és un element essencial per mantenir la salut física i mental, especialment en l'envelliment saludable. Durant el son, el cos duu a terme processos de reparació, mentre que el cervell consolida la memòria i reorganitza la informació adquirida durant el dia. Tanmateix, la manca de son o una qualitat insuficient d'aquest pot tenir conseqüències greus per a la salut, augmentant el risc de malalties cròniques com la diabetis tipus 2, les malalties cardiovasculars i la hipertensió.

¹⁶ DASH és la sigla de Dietary Approaches to Stop Hypertension (Enfocaments dietètics per aturar la hipertensió)

¹⁷ Flanagan, E. W., Most, J., Mey, J. T., & Redman, L. M. (2020). Restriction calòrica y envejecimiento en humanos. *Annual Review of Nutrition*, 40, 105–133. doi: 10.1146/annurev-nutr-122319-034601

¹⁸ Longo, V. D., & Anderson, R. M. (2022). Nutrition, longevity, and disease: From molecular mechanisms to interventions. *Cell*, 185(9), 1455–1470. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.002

Segons el *National Institute on Aging*, la privació de son està associada amb un increment de la inflamació sistèmica, un factor que accelera el desenvolupament de malalties neurodegeneratives i deteriorament cognitiu. Aquesta inflamació afecta negativament les neurones, dificultant la seva regeneració i funció adequada (Irwin, 2015)¹⁹. Aquest estudi subratlla la importància d'un descans adequat per prevenir aquests efectes adversos, especialment en persones grans.

La salut mental és clau en l'envelliment saludable i està estretament vinculada a la qualitat del son. Un estudi publicat a *JAMA Psychiatry* mostra que afeccions com la depressió, l'estrès crònic i l'aïllament social incrementen significativament el risc de demència i deteriorament cognitiu (López et al., 2018)²⁰. Aquest treball analitza com els factors psicosocials poden desencadenar canvis neurobiològics, incloent-hi alteracions en l'hipocamp i els nivells de cortisol, contribuint al deteriorament cerebral. A més, la manca de suport social pot amplificar aquests efectes negatius, remarcant la necessitat de desenvolupar estratègies d'intervenció efectives.

Diverses estratègies han demostrat ser efectives per millorar la qualitat del son i mantenir una salut mental positiva. La pràctica de *mindfulness*, per exemple, s'ha associat amb una reducció de l'estrès i una millor qualitat del son. Aquest enfocament promou una regulació emocional més efectiva, disminuint l'ansietat i protegint contra el deteriorament cognitiu. També es recomana seguir rutines regulars de son, evitar la cafeïna i limitar l'ús de dispositius electrònics abans d'anar a dormir.

A banda d'això, tenir una actitud mental activa i positiva també és fonamental. Les intervencions psicològiques i conductuals, juntament amb el suport social i comunitari, poden proporcionar un marc integral per a un envelliment més saludable.

Un son saludable, combinat amb una bona salut mental, són elements crucials per a un envelliment sa i de qualitat. Els estudis indiquen que millorar la qualitat del son i reduir l'estrès mental a través d'intervencions integrals té un impacte significatiu en la qualitat de vida i la prevenció de malalties relacionades amb l'envelliment.

¹⁹ Irwin, M. R. (2015). Why sleep matters to health: A psychoneuroimmunology perspective. *Annual Review of Psychology*, 66, 143–172. doi:10.1146/annurev-psych-010213-115205

²⁰ López, M., Torrico, F., & González, R. (2018). Stress, depression, and dementia: Mechanisms and prevention. *JAMA Psychiatry*, 75(8), 849-857. doi:10.1001/jamapsychiatry.2018.1515

7.3 Les addiccions

Les addiccions, com el tabaquisme i el consum excessiu d'alcohol, tenen un impacte directe sobre l'envelliment i la salut general, accelerant processos de deteriorament a nivell cutani i cognitiu. El tabaquisme, per exemple, afecta la salut de la pell, ja que els productes químics del fum de les cigarretes danyen la producció de col·lagen i elastina, components fonamentals per mantenir la flexibilitat i elasticitat de la pell. L'estudi de Morita, A. (2007)²¹ explica com el tabaquisme redueix aquesta flexibilitat i afavoreix la formació prematura d'arrugues i altres signes d'envelliment cutani. El consum continuat de tabac provoca una pèrdua de les capacitats regeneratives de la pell, fet que accelera l'envelliment cutani i afegeix anys a l'aspecte físic de la persona.

Pel que fa a l'alcohol, aquest també té efectes greus sobre la salut cerebral, augmentant el risc de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer. Segons l'estudi de Kim et al. (2012)²², l'abús d'alcohol contribueix a l'estrès oxidatiu, la inflamació crònica i la mort de cèl·lules neuronals, accelerant així el deteriorament cognitiu. Els autors remarquen com l'alcohol pot afectar negativament la capacitat cognitiva en les persones grans, augmentant el risc de trastorns mentals degeneratius. A més, l'alcohol interacciona amb altres factors, com l'edat avançada i altres malalties, i pot accelerar els efectes negatius en el cervell.

La reducció o eliminació d'aquestes addiccions no només millora la salut física i mental, sinó que també pot augmentar considerablement l'esperança de vida i reduir els efectes de l'envelliment. Evitar l'ús excessiu de substàncies com el tabac i l'alcohol pot contribuir a mantenir una millor qualitat de vida, retardant els efectes negatius de l'envelliment cutani i cerebral.

²¹ Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. *J Dermatol Sci*. 2007 Dec;48(3):169-75. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.06.015. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17951030.

²² Kim JW, Lee DY, Lee BC, Jung MH, Kim H, Choi YS, Choi IG. Alcohol and cognition in the elderly: a review. *Psychiatry Investig*. 2012 Mar;9(1):8-16. doi: 10.4306/pi.2012.9.1.8. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22396679; PMCID: PMC3285745.

8. Anàlisi epigenètica

8.1 Introducció:

En aquesta anàlisi estudiarem a un pacient de la tercera edat, concretament vuitanta-cinc anys. És atleta, fa esport sovint i té una dieta variada.

8.2 Objectiu i hipòtesi:

L'objectiu d'aquesta anàlisi és saber quina és la seva edat epigenètica.

Com a hipòtesi, partim de la relació que hi ha entre una bona activitat física, una bona dieta i un envelliment més lent i saludable, per tant, pensem que *el pacient ha de tenir una edat epigenètica menor a la seva edat cronològica*.

8.3 Fonament teòric:

Per dur a terme aquesta anàlisi, es realitzarà una extracció d'ADN a partir de la saliva del pacient, que posteriorment se sotmetrà a un array de metilació.

Aquesta tècnica avançada permet mesurar els patrons de metilació de l'ADN en milers de llocs específics del genoma, incloent-hi els llocs CpG, on una citosina (C) va seguida d'una guanina (G). Aquests llocs són essencials en la regulació de l'expressió gènica, especialment en les regions promotores, que es troben al principi dels gens i que controlen la seva activació o inhibició. Quan un promotor està metilat, pot inhibir l'expressió del gen associat, la qual cosa pot influir en el procés d'envelliment.

L'array de metilació es fa servir per identificar i quantificar aquests patrons de metilació, proporcionant un mapa detallat del perfil epigenètic d'un individu. Després d'extreure l'ADN, es tracta amb bisulfit sòdic, que converteix les citosines no metilades en uracils, mentre que les metilades romanen intactes. Posteriorment, l'ADN tractat s'hibrida en l'array, i això permet mesurar els nivells de metilació de cada lloc CpG, que es representen com un valor entre 0 (sense metilació) i 1 (metilació completa).

Els canvis en els patrons de metilació estan associats a l'envelliment biològic i poden ser influïts per factors com l'activitat física i una dieta variada, els quals ajuden a mantenir un perfil epigenètic saludable. L'anàlisi del paisatge epigenètic del pacient permet comparar els seus patrons de metilació amb els de bases de dades de referència, que inclouen mostres

d'individus de diferents edats. Això permet estimar la seva edat epigenètica, la qual pot diferir de l'edat cronològica i proporcionar una visió més precisa del seu envelliment biològic.

8.4 Material:

Materials de Reacció i Reactius

- Kit d'extracció de saliva Genotek
- Reactiu PT-L2T
- Gel
- ETOH (*Etanol*) 100% i 70%
- TE (*Buffer*)
- Kit EZ DNA Methylation-Gold de Zymo pel bisulfitat d'ADN.

Equips i Material de Laboratori

- Incubadora
- Centrifuga (15 ml)
- Vòrtex
- 2 Tubets de centrifugació de 15 ml
- Tub *Eppendorf* d'1,5 ml

8.5 Procediment:

1. Extreure la saliva amb l'ajuda d'un Kit d'extracció de saliva i extreure l'ADN.²³
2. Fer un control quantitatiu amb un Nanodrop per comprovar la concentració d'ADN.²⁴
3. Fer un control qualitatiu amb un gel d'agarosa per comprovar la seva integritat.²⁵
4. Fer un bisulfitat d'ADN.²⁶

8.6 Resultats i conclusions:

Com podem veure en la figura a continuació, aquests són els rellotges epigenètics del nostre pacient:

ID	Horvath	Hannum	Levine	skinHorvath	PedBE	Wu	TL	BLUP	EN
PACIENT ANÒNIM	96,52812	82,12545	85,14461	85,65708	25,83758	13,6888	6,213062	87,12814	84,98258

Figura 17: Rellotges epigenètics del pacient.

²³ Veure ANNEXOS Protocol 1.1

²⁴ Veure ANNEXOS Protocol 1.2

²⁵ Veure ANNEXOS Protocol 1.3

²⁶ Veure ANNEXOS Protocol 1.12

Cada columna correspon a un model o estimador d'edat biològica basat en diferents mètodes o autors. En el nostre cas, la nostra mostra va ser presa de la saliva del pacient, cosa que hem de tenir en compte per fer servir un rellotge epigenètic que s'adapti a les nostres necessitats. L'*Elastic Net*²⁷ (EN) seria el més adient, ja que va ser entrenat en mostres de sang i de saliva i, aleshores, proporciona una estimació més precisa en aquest context.

Recordem que l'edat cronològica del pacient en el moment de la recollida de la mostra era de **85 anys, 7 mesos i 6 dies**. Segons els resultats mostrats a la figura, l'edat epigenètica estimada és de **84 anys, 11 mesos i 24 dies**, indicant una diferència de **8 mesos i 12 dies més jove** que l'edat cronològica. Aquesta petita discrepància suggereix que el pacient podria tenir un envelliment lleugerament més lent o una millor salut biològica.

Tot i això, és important destacar que els rellotges epigenètics són només un dels indicadors d'edat biològica, que no tenen en compte altres factors importants com l'expressió proteica, la longitud dels telòmers o les alteracions en la funció mitocondrial, que també contribueixen a l'envelliment global. Malgrat aquestes limitacions, els rellotges epigenètics són eines molt precises, i obtenir un resultat que indiqui una edat epigenètica més jove no és fàcil, cosa que reforça el valor dels resultats obtinguts.

Per tant, com a conclusió preliminar, podem dir que:

L'edat epigenètica és lleugerament més jove que l'edat cronològica: 8 mesos i 12 dies més jove. Cosa que suggereix que la hipòtesi inicial és certa, el pacient té un envelliment més lent o una millor salut biològica, encara que caldria estudiar el pacient amb més precisió per obtenir una avaluació més completa de la seva salut.

Per verificar que aquesta disminució de l'edat és deguda a l'esport realitzat, hauríem de fer estudis d'una població més gran i comparar grups que practiquin diferents nivells d'activitat física. A més, caldria incloure una anàlisi de l'impacte d'una dieta variada i equilibrada, ja que s'ha demostrat que l'alimentació juga un paper fonamental en l'envelliment epigenètic. Això permetria determinar amb més precisió com l'esport i la dieta interactuen per influir en l'edat biològica.

²⁷ Zhang, Q., Vallerga, C. L., Walker, R. M., Lin, T., Henders, A. K., Montgomery, G. W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., Pitcher, T., Pearson, J., Halliday, G., Kwok, J. B., Hickie, I., Lewis, S., Anderson, T., Silburn, P. A., Mellick, G. D., . . . Visscher, P. M. (2019). Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0667-1>

9. La supercentenària

9.1 Introducció:

Des de l'**Institut d'Investigació contra la Leucèmia Josep Carreras**, en col·laboració amb altres institucions, s'està realitzant un estudi exhaustiu sobre el cas d'una pacient supercentenària que ha arribat a l'edat excepcional de 117 anys. En el moment de les anàlisis, aquesta persona era considerada la més longeva del món.

Aquest cas representa un exemple notable de la capacitat del cos humà per assolir una longevitat extrema, mantenint una salut global robusta i un alt nivell de funcionalitat física i cognitiva. L'estudi explora diversos aspectes científicament rellevants, com l'estat de conservació dels telòmers, la diversitat i composició del microbioma, i altres marcadors moleculars associats amb el procés d'envelliment. Tot i això, aquest treball focalitza l'anàlisi en dos aspectes específics:

L'objectiu principal de la investigació és l'estudi de la proteòmica i l'activitat mitocondrial per identificar els mecanismes biològics que permeten una longevitat excepcional amb una salut i funcionalitat òptimes. A través d'aquesta anàlisi, es busca generar coneixements que contribueixin a promoure la salut i el benestar en la gent gran, així com a explorar noves estratègies per ampliar els límits de l'esperança de vida humana.

Per aquelles persones interessades en aquest àmbit, es recomana la lectura de l'article complet, que serà publicat pròximament i inclourà una anàlisi detallada i les conclusions de l'estudi, amb possibles aplicacions en l'àmbit científic i mèdic.

9.2 Anàlisi mitocondrial

9.2.1 Objectiu i hipòtesi:

L'objectiu d'aquesta anàlisi és comparar l'activitat mitocondrial, que sabem que és un factor clau de l'envelliment, que presenta aquesta pacient amb la d'altres dones de rangs d'edat diferents.

La hipòtesi principal d'aquest estudi es pot plantejar de la següent manera: *La supercentenària probablement presenta un millor funcionament mitocondrial en comparació amb altres dones de rangs d'edats diferents.*

9.2.2 Fonament teòric:

Per fer aquesta anàlisi, farem una citometria de flux amb una mostra de **PBMCs**²⁸ de la supercentenària i de sis dones sanes, per poder veure si els mitocondris tenen una activitat semblant.

La citometria de flux és una tècnica que permet mesurar característiques específiques de cèl·lules, es fa a partir d'un citòmetre, una màquina que fa passar les cèl·lules individualment, tenyides amb unes tincions, a través d'un làser que les excita a longituds d'ona específiques, i aquestes emeten una llum.

Per a cada pacient, prepararem 5 mostres de cèl·lules. Una d'elles actuarà com a control, sense cap tinció, per tal de corregir possibles inespecificacions degudes a fluorescències de fons o a reaccions inespecífiques de les tincions utilitzades. Aquesta mostra de control ens permetrà garantir que els resultats obtinguts siguin atribuïbles únicament a les tincions aplicades i no a altres factors espuris.

Les altres quatre mostres es marcaran amb Mitotracker, una tinció fluorescent que identifica els mitocondris. De les quatre mostres marcades, una es mantindrà només amb el Mitotracker com a referència per als resultats generals, mentre que a les altres tres s'aplicaran marcadors addicionals per mesurar característiques específiques dels mitocondris:

- El potencial de membrana mitocondrial, per això fem servir el TMRE (*Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate*).
- La producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), concretament l'ió superòxid identificat amb el *MitoSOX*.
- La producció d'ATP, per la qual farem servir l'*ATP-Tracker*.

Per garantir una incubació òptima i evitar interferències entre les tincions, cada marcador s'incubarà en plaques diferents, ja que cadascuna requereix temps i condicions específiques per aconseguir una fluorescència adequada i precisa, la distribució de les plaques es mostra a continuació, a la figura:

²⁸ Una Cèl·lula mononuclear de sang perifèrica (PBMC) és una cèl·lula sanguínia caracteritzada per posseir un únic nucli rodó, com els limfòcits o els monòcits.

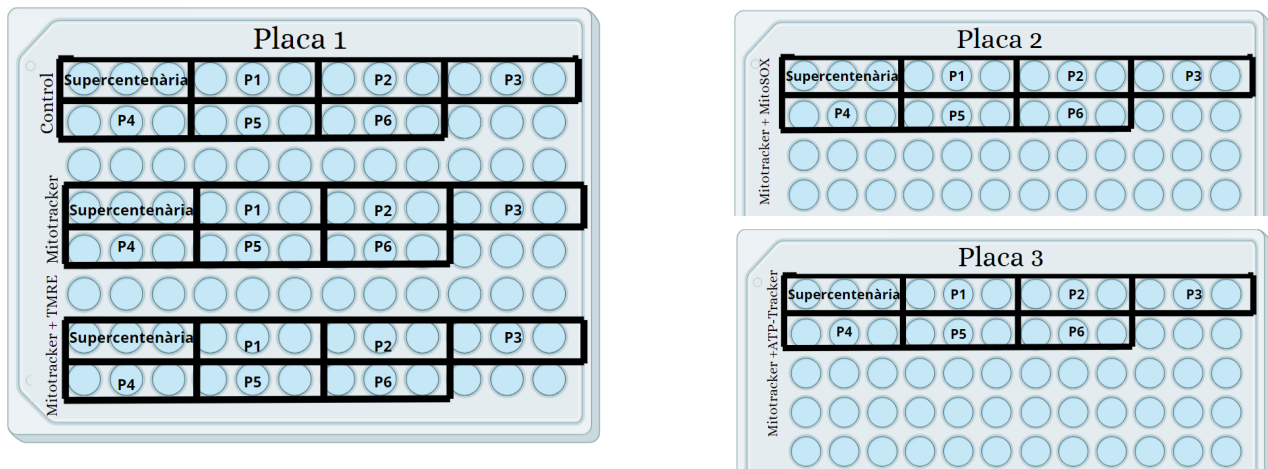


Figura 18: Plaques citometria de flux

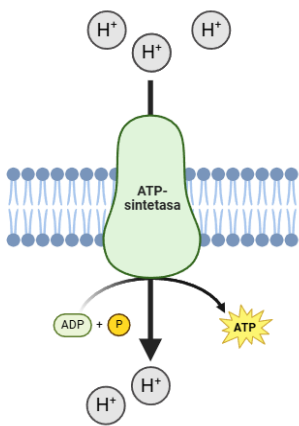


Figura 19: ATP-Sintetasa

El potencial de membrana, és una propietat bioelèctrica de les cèl·lules. Consisteix en la diferència de càrregues entre l'interior i l'exterior de les membranes. En el cas dels mitocondris, aquesta diferència de càrregues és deguda a l'ió H^+ , que entra i s'acumula a l'espai intermembranós del mitocondri durant el transport d'electrons que es dona a terme en la membrana interna mitocondrial. És crucial, perquè a causa de la diferència de concentració, els protons (H^+) flueixen a través de l'ATP-sintetasa, fan rotar la part mòbil, fet que fa que s'uneixi l'ADP amb un Pi i acabi formant ATP.



Figura 20: ROS en el mitocondri

Les espècies reactives de l'oxigen, com per exemple el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) són subproductes de les reaccions químiques que tenen lloc als mitocondris, la respiració cel·lular. Tot i que les ROS siguin tòxiques pel nostre organisme, el cos les neutralitza amb els mecanismes antioxidants. Un nivell determinat de ROS pot actuar com a molècula senyalitzadora regulant la diferenciació cel·lular, la resposta immune, i activant vies apoptòtiques, provocant la mort cel·lular programada, un procés important per eliminar cèl·lules danyades o no desitjades.



L'ATP, adenosina trifosfat, considerada la “moneda energètica”, és una molècula que proporciona energia a les cèl·lules per poder fer la majoria de les reaccions biològiques. Aquesta actua donant energia a les bombes de membrana, per poder moure substàncies a contra gradient, proporciona energia a les cèl·lules musculars per portar a terme la contracció muscular, i proporciona l'energia necessària perquè les cèl·lules puguin realitzar les seves funcions, com sintetitzar ADN, ARN, proteïnes i altres molècules essencials.

Figura 20: ATP

9.2.3 Material:

Materials de Reacció i Reactius

- *MitoTracker* liofilitzat
- TMRE liofilitzat
- *ATP-Tracker* liofilitzat
- *MitoSOX* liofilitzat
- RPMI (medi de cultiu cel·lular)
- DMSO (agent crio preservador)
- PBS (solució salina tamponada amb fosfat)

Equips i Material de Laboratori

- *Eppendorf* d'1,5 ml (12 per mostra)
- Centrífuga (300 x g)
- Pipetes d'1 µl, 10 µl, 50 µl, 200 µl i 1 ml
- Incubadora (37 °C)
- Tubs de citometria
- Citòmetre de flux

9.2.4 Procediment:²⁹

1. Preparar les dilucions de les tincions resuspenent el *MitoTracker*, el TMRE, l'*ATP-Tracker* i el *MitoSOX* liofilitzats en DMSO per aconseguir les concentracions específiques.

²⁹ Veure ANNEXOS Protocol 1.7

2. Tractar les cèl·lules amb MitoTracker, TMRE, ATP-Tracker i MitoSOX
3. Incubar les mostres amb els diferents marcadors.
4. Centrifugar, rentar amb PBS i resuspendre les cèl·lules en PBS.
5. Transferir les cèl·lules a tubs de citometria i llegir en el citòmetre.

9.2.5 Resultats i conclusions:

Els gràfics obtinguts³⁰ presenten les dades obtingudes a partir de la citometria de flux, però els resultats són difícils de comprendre a causa de la disposició dels gràfics i la superposició dels diversos replicats. Per tal de facilitar la interpretació i visualitzar les tendències de manera clara, aquestes dades s'han resumit en la següent imatge, la qual presenta els valors mitjans d'intensitat de fluorescència per als paràmetres clau (TMRE, SOX i ATP), que permet veure més fàcilment les diferències i tendències entre els grups d'edat.

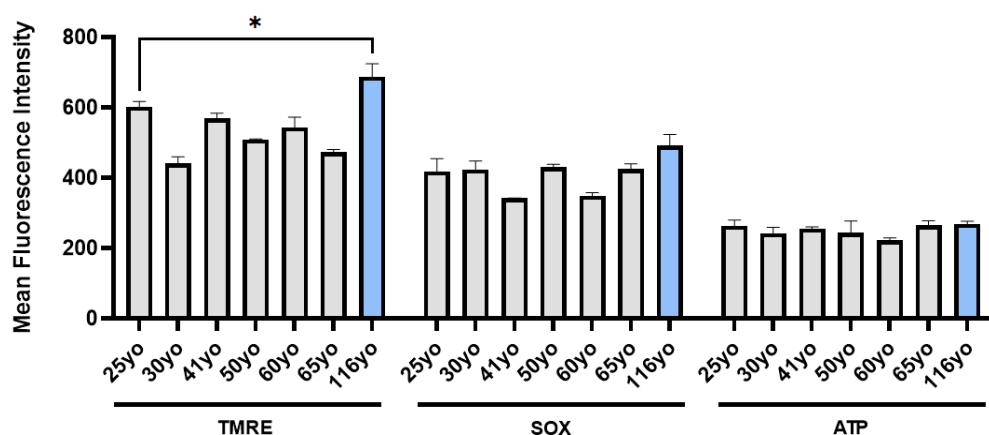


Figura 21: Gràfiques citometries de flux

Les dones joves (de 25 a 41 anys) mostren valors alts i consistents en el potencial de membrana mitocondrial (TMRE), mentre que en les dones d'edats més avançades, a partir dels 60 anys, els valors disminueixen lleugerament. Aquesta disminució és característica del procés d'envelliment, on els mitocondris perden la seva capacitat de mantenir un potencial de membrana elevat.

Tanmateix, el gràfic de la dona de 116 anys destaca per un valor inusualment alt en aquest paràmetre, la qual cosa suggereix que presenta una hiperpolarització mitocondrial, una

³⁰ Veure ANNEXOS 2.1 Gràfiques citometries de flux

possible adaptació per mantenir la funció mitocondrial malgrat l'estrès associat a l'edat avançada.

En aquest cas, el TMRE es torna de color vermell quan reacciona amb els ions dins dels mitocondris. Com més TMRE, més potencial de membrana hi ha, i això demostra que els mitocondris de la supercentenària estan molt ben conservats. Si la membrana estigués danyada, els ions escaparien cap al citoplasma i veuríem menys senyal procedent del TMRE. Fins i tot es pot observar que els mitocondris de la supercentenària mostren un potencial de membrana més alt que els de dones de 25 anys, la qual cosa és estadísticament significatiu.

Pel que fa a l'estrès oxidatiu (SOX), que mesura els nivells de l'ió superòxid dins dels mitocondris, els resultats mostren que no hi ha diferències significatives entre les dones joves i les de més edat. Els nivells de SOX es mantenen similars en la majoria d'individus, sense un augment consistent amb l'edat.

No obstant això, la supercentenària de 116 anys destaca clarament, ja que presenta nivells de SOX lleugerament més alts en comparació amb la resta de participants. Tot i que aquesta diferència no és estadísticament significativa, sí que indica una "tendència" que la diferencia de la resta.

Aquest resultat suggereix que els seus mitocondris es mantenen excepcionalment ben conservats, amb membranes funcionals que eviten la fuga de radicals lliures cap al citoplasma. Aquest estat mitocondrial podria ser un factor rellevant per explicar la seva longevitat i la seva salut excepcional a una edat tan avançada.

Respecte a la producció d'ATP, els resultats revelen que aquesta es manté similar en totes les dones participants, independentment de l'edat. Això és especialment rellevant en el cas de la supercentenària de 116 anys, ja que, tot i la seva edat extremadament avançada, els seus mitocondris continuen generant ATP de manera molt eficient, comparable a la de les altres dones grans del grup.

Aquest fet és especialment destacable, pel fet que, amb l'edat, és habitual observar una disminució en la capacitat dels mitocondris per produir energia, degut al desgast i a la disfunció progressiva de les cèl·lules. Tanmateix, en el cas de la supercentenària, els seus mitocondris mostren una capacitat de manteniment funcional que sembla excepcional. Aquesta preservació de l'eficiència energètica podria estar relacionada amb mecanismes

cel·lulars adaptatius que protegeixen els seus mitocondris del deteriorament associat a l'envelliment.

La hipòtesi principal d'aquest estudi, que suggereix que la supercentenària presenta un millor funcionament mitocondrial en comparació amb altres dones de la seva mateixa edat, es veu sostinguda pels resultats obtinguts. Els seus mitocondris mostren un alt potencial de membrana, un control adequat de l'estrès oxidatiu i una producció d'ATP similar a la de dones més joves, tot i l'edat extrema. Aquests resultats indiquen que els mitocondris de la supercentenària estan millor conservats i funcionen eficaçment, cosa que podria contribuir a la seva longevitat.

9.3 Anàlisi proteica

9.3.1 Experiment I

A partir d'aquests resultats, es fa evident la relació entre una funció mitocondrial ben conservada i la longevitat extrema observada en la supercentenària. Això ens porta a plantejar la següent qüestió: existeixen proteïnes relacionades amb l'envelliment que depenen d'una bona activitat mitocondrial i que podrien estar involucrades en aquesta preservació mitocondrial?

Les sirtuïnes, en particular la SIRT6 i la SIRT7, són conegudes per la seva implicació en processos com la regulació del metabolisme, la reparació de DNA i la resposta a l'estrès oxidatiu, processos clau en la salut mitocondrial.

9.3.1.1 Objectiu i hipòtesi:

Tenint en compte que els mitocondris de la supercentenària es presenten en un estat òptim, la nostra hipòtesi és que *la supercentenària podria tenir una sobreexpressió de les proteïnes SIRT6 i SIRT7, que són dependents d'una bona funció mitocondrial.*

Aquestes proteïnes podrien estar contribuint a la conservació de la funció mitocondrial, la qual cosa, jugaria un paper essencial en la seva longevitat. Aquest estudi proposa avaluar l'expressió d'aquestes proteïnes en comparació amb altres pacients de diferents rangs d'edat, per determinar si la sobreexpressió de SIRT6 i SIRT7 podria estar relacionada amb l'eficiència mitocondrial i la resistència a l'envelliment.

9.3.1.2 Fonament teòric:

La sirtuina 6 (SIRT6) és una proteïna essencial en la regulació del metabolisme cel·lular, la protecció de l'ADN i la longevitat. Com a part de la família de les sirtuïnes, la seva activitat depèn del NAD⁺, un coenzim clau per al seu funcionament. SIRT6 participa activament en la reparació de l'ADN, especialment en la correcció de danys induïts per l'estrès oxidatiu i la radiació, i la seva activitat ha estat associada amb l'augment de la longevitat en models animals. A més, SIRT6 juga un paper fonamental en la preservació de la integritat del genoma, ajudant a remodelar la cromatina i a regular l'expressió de gens implicats en la senescència cel·lular i els danys genètics (Korotkov et al., 2021³¹; Mostoslavsky et al., 2006³²).

Aquesta proteïna també regula processos metabòlics importants, incloent-hi la glucòlisi i el metabolisme lipídic, contribuint així a la producció d'energia cel·lular. La protecció que SIRT6 proporciona davant l'estrès metabòlic ajuda les cèl·lules a mantenir la seva funció i capacitat de reparació a mesura que envelleixen, millorant la salut metabòlica i allargant la vida en models experimentals (Korotkov et al., 2021). A més, SIRT6 exerceix un efecte protector contra la inflamació mitjançant la reducció de l'activació de la via NF-κB, essencial per a la resposta inflamatòria (Korotkov et al., 2021).

D'altra banda, la sirtuina 7 (SIRT7), tot i ser menys coneguda, també exerceix un paper crucial en el manteniment de l'estabilitat del genoma, la regulació de la transcripció i la resposta a l'estrès. Com SIRT6, SIRT7 depèn del NAD⁺ per a la seva activitat, i es localitza principalment al nucli cel·lular. La seva funció es relaciona amb la reparació de l'ADN i l'estabilització de les estructures cromatídiques, prevenint la senescència (Lagunas-Rangel, 2022³³; Shijia et al., 2020³⁴). A més, SIRT7 regula la producció de proteïnes ribosomals mitocondrials, essent essencial per a la funció mitocondrial i la producció d'energia cel·lular. Mitjançant la desacetilació de H3, SIRT7 estabilitza la cromatina i la funció del genoma, inhibint la senescència i millorant la regeneració cel·lular (Lagunas-Rangel, 2022; Shijia et al., 2020).

³¹ Korotkov A, Seluanov A, Gorbunova V. Sirtuin 6: linking longevity with genome and epigenome stability. *Trends Cell Biol.* 2021 Dec;31(12):994-1006. doi: 10.1016/j.tcb.2021.06.009. Epub 2021 Jul 17. PMID: 34281779; PMCID: PMC8903056.

³² Mostoslavsky R, Chua K, Lombard D, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006 Jan 13;124(2):315-29. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.038.

³³ Lagunas-Rangel FA. SIRT7 in the aging process. *Cell Mol Life Sci.* 2022 May 18;79(6):297. doi: 10.1007/s00018-022-04342-x. PMID: 35585284; PMCID: PMC9117384.

³⁴ Shijia Bi, Zunpeng Liu, Zeming Wu, Zehua Wang, Xiaoqian Liu, Si Wang, Jie Ren, Yan Yao, Weiqi Zhang, Moshi Song, Guang-Hui Liu, Jing Qu. SIRT7 antagonizes human stem cell aging as a heterochromatin stabilizer. *Protein & Cell*, Volume 11, Issue 7, July 2020, Pages 483–504. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00728-4>.

Els estudis també han demostrat que la sobreexpressió de SIRT7 en models animals millora la resistència de les cèl·lules a l'estrès oxidatiu, protegint-les de la mort prematura i millorant la salut general i longevitat dels animals (Lagunas-Rangel, 2022; Shijia et al., 2020). Així, SIRT7 no només preserva l'ADN, sinó que també és fonamental per al manteniment de la salut mitocondrial i la funció energètica, factors essencials per a la longevitat cel·lular.

En resum, tant SIRT6 com SIRT7 són proteïnes vitals per al manteniment de la salut cel·lular, la protecció de l'ADN i la funció mitocondrial. Totes dues actuen de manera coordinada per prevenir la senescència, millorar la resposta a l'estrès i regular els processos metabòlics. Les seves activitats dependents del NAD⁺ les vinculen a processos metabòlics clau per a la regulació de l'envelliment. La modulació de l'activitat d'aquestes sirtuïnes presenta un gran potencial terapèutic en l'envelliment i les malalties degeneratives, i podrien esdevenir candidates prometedores per a la millora de la longevitat humana.

Per poder comprovar la presència d'aquestes proteïnes, hem d'extreure sang de les pacients, realitzar un protocol per separar les PMBC de la resta de components i fer una extracció de proteïnes per tenir-les purificades. Una vegada tenim les proteïnes, hem de fer servir un *Western Blot*, una tècnica que ens permet separar i identificar, amb l'ajuda d'anticossos monoclonals, proteïnes específiques.

El Western Blot consisteix a fer córrer les proteïnes mitjançant un procés d'electroforesis, provocant un camp elèctric que fa que les proteïnes, molècules negatives, es desplacin a través del gel cap al pol positiu.

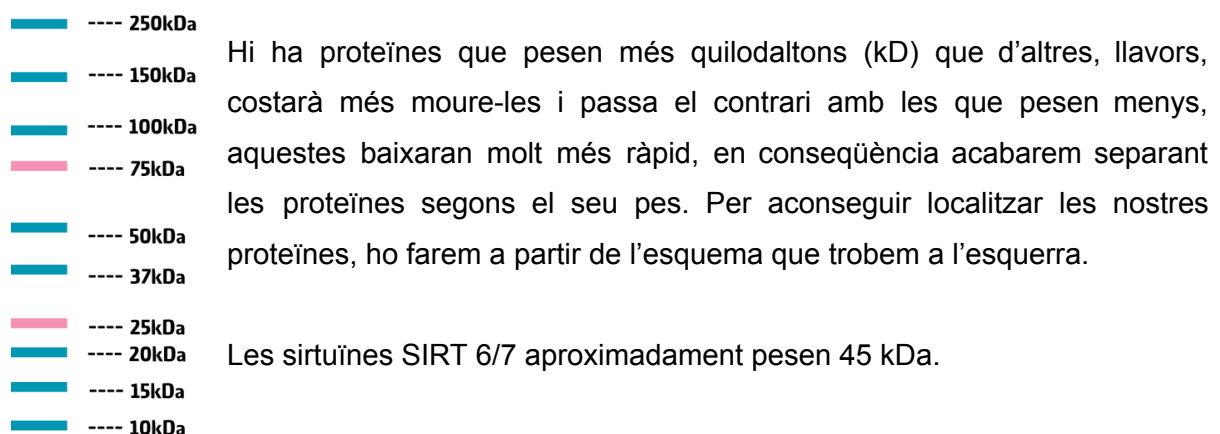


Figura 22: Patró de bandes de proteïnes en un gel (Western Blot)

Un cop les proteïnes estan separades, són transferides a una membrana i aquesta és incubada amb anticossos monoclonals. Els anticossos, coneguts també com

immunoglobulines, són proteïnes que es produeixen en el sistema immunitari per reconèixer i atacar substàncies estranyes, com ara bacteris, virus, substàncies al·lèrgiques... els anticossos monoclonals són produïts artificialment per reconèixer i unir-se a un antigen específic, com una proteïna.

Els anticossos primaris que farem servir són els que podem veure a continuació.

Referència	Diana	Animal	Banda (kDa)	Dilució	Dissolvent
ab62739	SIRT6	<i>Rabbit</i>	40	1/1000	BSA 5%
Sc-365344	SIRT7	<i>Mouse</i>	45-50	1/1000	BSA 5%

Figura 23: Taula d'anticossos utilitzats en el Western blot Experiment

I

Els anticossos secundaris seran simplement qualsevol anticòs *Anti-Rabbit* o *Anti-Mouse*, depenent de l'anticòs primari que hàgim incubat.

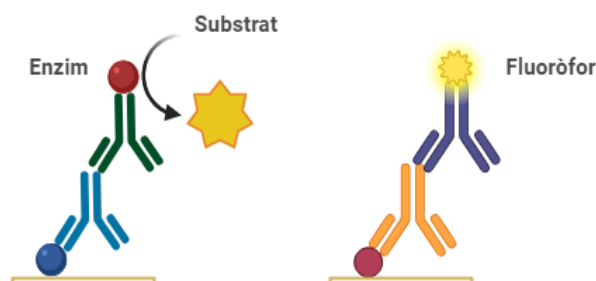


Figura 24: Esquema de la unió d'un anticòs primari a un secundari

Els anticossos primaris s'uneixen a una proteïna específica i els secundaris a un anticòs primari específic, formant una mena de "sandvitx".

Per poder veure'l hem d'unir els secundaris a un fluoròfor, que excitarem a una longitud d'ona específica (680 nm / 800 nm) , o lligar-los a un enzim, que en afegir un substrat, catalitzarà una reacció química. Tots dos els escanejarem i el podrem veure en forma de banda.

9.3.1.3 Material:

Materials de Reacció i Reactius

- PBS + EDTA 2 mM
- Ficoll
- ACK (*Ammonium Chloride Potassium*)
- Medi crio preservador (90% FBS Sèrum Fetal Boví, 10% DMSO (Dimetilsulfòxid))
- Mostres de sang fresca
- Reactiu *Laemmli* 100 µL / mostra
- Reactiu B-Mercaptoetanol 3 µL / mostra
- *Running Buffer* 1X
- *Transfer Buffer* 1X
- PBS 1X (solució salina tampó fosfat).
- Tween 20 (per preparar PBS-Tween 20 al 0,01%).
- *Ponceau*
- Llet desnatada en pols (per a la solució de bloqueig al 5% en PBS).
- Anticòs primari específic per a la proteïna d'interès.
- Anticòs primari per al control de càrrega (per exemple, anti-β-actina, anti-tubulina o anti-laminina).
- Anticòs secundari lligat a fluoròfor o enzim

Equips i Material de Laboratori

- Tubs de centrifugat de 50 ml
- Tubs de centrifugat de 2 ml
- Tubs de centrifugat de 15 ml
- Tubs *ependorf* d'1,5 ml
- Filtres de 0,22 µm
- Centrífuga
- Gel sec
- Pipetes graduades
- Escalfador, incubadora o bany termostàtic
- Nanodrop
- Cubeta d'electroforesi
- Cubeta de transferència
- Font d'alimentació capaç de subministrar voltatges ajustables (60 V i 100 V).

- Gels d'acrilamida
- Membrana de nitrocel·lulosa
- Esponges (mínim 6)
- Papers de filtre (mínim 6)
- Micropipeta i puntes per carregar les mostres
- Caixes d'incubació per a la incubació d'anticossos
- Agitador per a les incubacions
- Sistema de revelatge *Odyssey Scanner*
- Sistema de revelatge *iBright Scanner*

9.3.1.4 Procediment:

1. Extreure leucòcits de la sang de les pacients, neutròfils i PBMCs.³⁵
2. Extreure les proteïnes.³⁶
3. Quantificació de les proteïnes en un Nanodrop, a una longitud d'ona A 260 nm. La concentració que volem és 5 µg / µL en cada mostra.
4. Fer un *Western Blot*:³⁷
 - Fer córrer les proteïnes en un gel
 - Transferir-les a una membrana
 - Fer un *ponceau*
 - Incubar dels anticossos primaris
 - Fer rentats
 - Incubació dels anticossos secundaris
 - Fer rentats i revelar les mostres

9.3.1.5 Resultats i conclusions:

Com en tots els experiments científics, hem fet tres rèpliques d'aquest per comprovar que els nostres resultats són veritables i no han estat producte de l'atzar o de petits errors en la pràctica manipulativa.

³⁵ Veure ANNEXOS Protocol 1.4

³⁶ Veure ANNEXOS Protocol 1.5

³⁷ Veure ANNEXOS Protocol 1.6

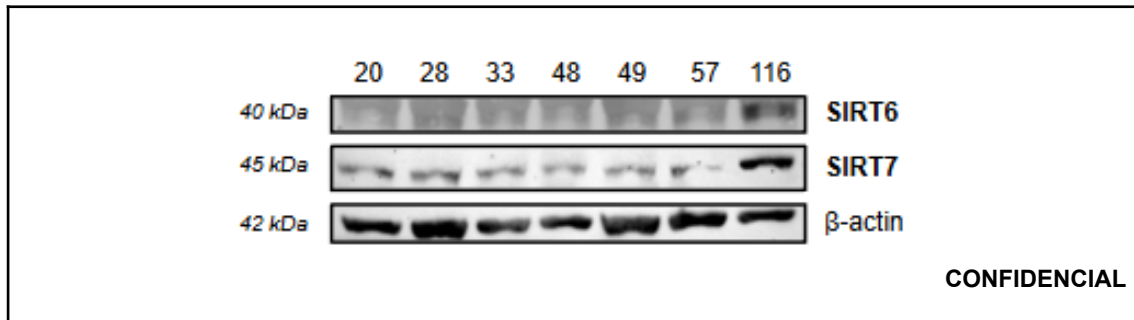


Figura 25: Resultats Western Blot Experiment I

Podem observar un dels tres *Western Blot* que vam realitzar on les mostres de les dones estan ordenades segons la seva edat, ascendentment.

En la banda dels 42 kDa, trobem la proteïna β -actina, la qual ens serveix com a control de càrrega positiu, per comprovar que, efectivament, hem carregat el gel amb la mateixa quantitat de proteïna de cada mostra en cada un dels pouets.

A la banda de 40 kDa del Western Blot, podem veure que l'expressió de la proteïna SIRT6 augmenta en el cas de la pacient supercentenària de 116 anys, que presenta una intensitat molt elevada respecte a la resta, la qual cosa suggereix una possible relació entre la sobreexpressió de SIRT6 i els mecanismes de longevitat.

A la banda de 45 kDa del Western Blot, s'observa que la banda de la pacient de 116 anys presenta un nivell d'intensitat major al de les altres dones, cosa que significa que té una sobreexpressió d'aquesta proteïna, la SIRT7, en comparació amb les altres mostres. Això suggereix que la SIRT7 podria jugar un paper important en la protecció cel·lular i en els processos relacionats amb un envelliment saludable.

En conclusió, sí que és certa la hipòtesi principal. *La supercentenària té una sobreexpressió de proteïnes dependents de la funció mitocondrial associades a l'envelliment.* Aquestes són la SIRT7 i la SIRT6.

9.3.2 Experiment II

Com hem pogut veure a l'experiment I, les proteïnes SIRT6 i SIRT7 estan sobreexpressades i sabem que aquestes proteïnes regulen l'epigenètica de les histones.

Per tant, estudiar algunes de les histones podria oferir-nos pistes sobre la longevitat de la supercentenària. Aquestes seran la histona H4, marca H4K16ac i la histona H3, marques H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3.

9.3.2.1 Objectiu i hipòtesi:

L'objectiu d'aquesta anàlisi és comprovar si la nostra pacient, presenta diferències en proteïnes i marques epigenètiques relacionades amb l'envelliment a comparació amb altres pacients de rangs d'edats diferents.

En aquest experiment estudiarem l'expressió d'algunes marques epigenètiques comparant-les amb les marques de les mateixes dones de rangs d'edat diferents.

A partir de les dades obtingudes anteriorment, proposem la hipòtesi que *la sobreexpressió de les SIRT 6 i SIRT 7 podrien anar acompanyades d'un increment de les marques epigenètiques H4K16ac, H3K4me3, H3K9me3 i H3K27me3.*

9.3.2.2 Fonament teòric:

En el següent estudi estudiarem dues proteïnes del grup de les histones, les quals tenen un paper rellevant en l'envelliment, estan implicades en la regulació epigenètica.

Les histones H3 i H4 pesen aproximadament 15 kDa i es caracteritzen per ajudar a empaquetar l'ADN dins del nucli cel·lular, formant estructures anomenades nucleosomes. Aquestes histones tenen cues N-terminals que poden ser modificades per marques epigenètiques com: acetilació, metilació o fosforilació, que regulen l'activitat genètica. La funció principal de les histones H3 i H4 és controlar l'accés al material genètic i la seva expressió, a través de la modificació de la cromatina.

Les marques epigenètiques de les histones H3 i H4 inclouen H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 i H4K16ac. H3K4me3 està relacionada amb l'activació gènica, mentre que H3K9me3 i H3K27me3 estan associades a la repressió gènica i la senescència. D'altra banda, la marca H4K16ac és fonamental per a la reparació de l'ADN. La pèrdua d'aquesta marca pot dificultar la reparació del genoma, augmentant els danys cel·lulars. Aquestes marques influeixen directament en processos clau per a la funció cel·lular, com la resposta a l'estrès i la capacitat de les cèl·lules per reparar els danys, factors que ajuden a mantenir la salut cel·lular amb l'envelliment.

Els anticossos primaris que farem servir en aquest cas són els següents:

Referència	Diana	Animal	Banda (kDa)	Dilució	Dissolvent
39167	H4K16ac	<i>Rabbit</i>	14	1/1000	BSA 5%
ab12209	H3K4me3	<i>Mouse</i>	17	1/2000	BSA 5%
ab8898	H3K9me3	<i>Rabbit</i>	17	1/1000	BSA 5%
pAb-069-050	H3K27me3	<i>Rabbit</i>	17	1/1000	BSA 5%
ab1791	H3 total	<i>Rabbit</i>	17	1/1000	BSA 5%
ab10799	H3 total	<i>Mouse</i>	17	1/1000	BSA 5%
ab31827	H4 total	<i>Mouse</i>	14	1/1000	BSA 5%

Figura 26: Taula; Anticossos utilitzats en el Western blot Experiment

I I

Els anticossos secundaris seran qualsevol anticòs *Anti-Rabbit* o *Anti-Mouse*, depenent de l'anticòs primari que hàgim incubat.

9.3.2.3 Material:

Materials de Reacció i Reactius

- *Ladder*
- *Running Buffer* 1X
- *Transfer Buffer* 1X
- PBS 1X (solució salina tampó fosfat).
- Tween 20 (per preparar PBS-Tween 20 al 0,01%).
- *Ponceau*
- Llet desnatada en pols (per a la solució de bloqueig al 5% en PBS).
- Anticòs primari específic per a la proteïna d'interès.
- Anticòs primari per al control de càrrega (per exemple, anti- β -actina, anti-tubulina o anti-laminina).
- Anticòs secundari lligat a fluoròfor o enzim

Equips i Material de Laboratori

- Gel sec
- Cubeta d'electroforesi
- Cubeta de transferència
- Font d'alimentació capaç de subministrar voltatges ajustables (60 V i 100 V).
- Gels d'acrilamida

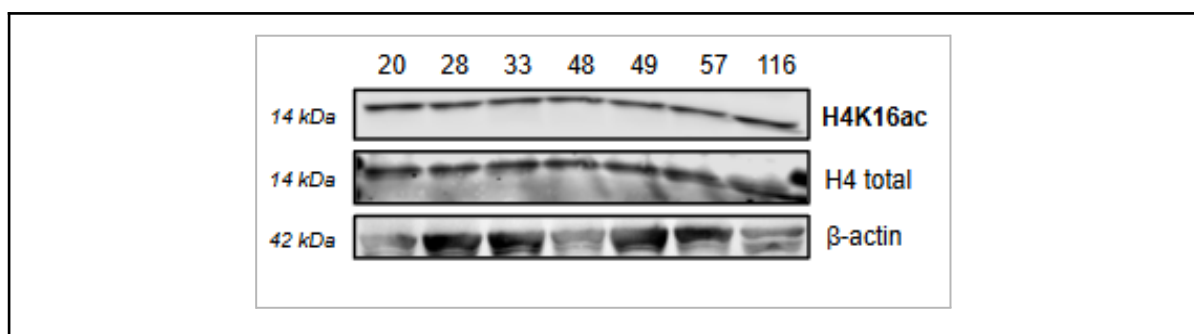
- Membrana de nitrocel·lulosa
- Esponges (mínim 6)
- Papers de filtre (mínim 6)
- Micropipeta i puntes per carregar les mostres
- Caixes d'incubació per a la incubació d'anticossos
- Agitador per a les incubacions
- Sistema de revelatge *Odyssey Scanner*
- Sistema de revelatge *iBright Scanner*

9.3.2.4 Procediment:

1. Fer un *Western Blot*: *³⁸
 - Fer córrer les proteïnes en un gel
 - Transferir-les a una membrana
 - Fer un *pounceau*
 - Incubar dels anticossos primaris
 - Fer rentats
 - Incubació dels anticossos secundaris
 - Fer rentats i revelar les mostres

9.3.2.5 Resultats i conclusions:

Aquests són els resultats que hem obtingut en l'experiment II :



³⁸ Veure ANNEXOS Protocol 1.6

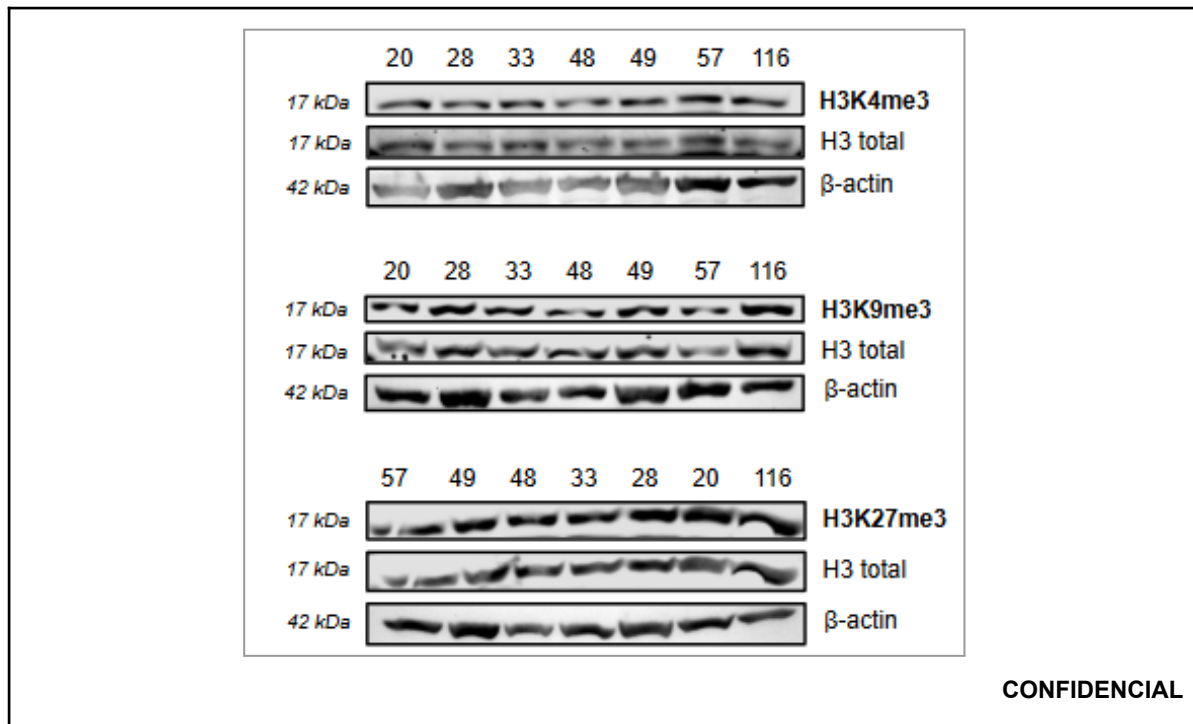


Figura 27: Resultats Western Blot Experiment I I

Com podem veure, en aquest experiment també hem incubat la β -actina, la banda dels 42 kDa, per confirmar que hem carregat la mateixa quantitat de la mostra de cada dona en cada pouet.

Les modificacions H4K16ac es localitzen a la banda dels 14 kDa, mentre que les marques H3K4me3, H3K9me3 i H3K27me3 es troben a la banda dels 17 kDa corresponent a la histona H3. Les variacions d'intensitat són mínimes i no segueixen un patró coherent. Això es veu clarament en la pacient supercentenària de 116 anys, ja que no es detecta una diferència significativa en l'expressió d'aquestes marques en comparació amb la resta de les mostres.

Per tant, en conclusió, no és certa la hipòtesi principal; *la sobreexpressió de les SIRT 6 i SIRT 7 NO va acompanyada d'un increment de les marques epigenètiques H4K16ac, H3K4me3, H3K9me3 i H3K27me3*. Com a resultat, les diferents marques epigenètiques a les histones estudiades no són factors que, en aquest cas, estiguin involucrats en la longevitat de la supercentenària.

9.4 Conclusions de la supercentenària

L'anàlisi de la supercentenària ha proporcionat informació important sobre els mecanismes que poden explicar la seva longevitat extrema.

En primer lloc, s'ha observat que la supercentenària presenta un alt potencial de membrana mitocondrial, un bon control de l'estrès oxidatiu i una producció d'ATP comparable a la de dones més joves. Aquests resultats suggereixen que els seus mitocondris es mantenen molt ben conservats, la qual cosa podria ser indicativa que el bon funcionament mitocondrial és un factor determinant en la seva longevitat.

A més, s'ha detectat una sobreexpressió de les sirtuïnes SIRT6 i SIRT7, que són proteïnes importants per a la reparació del DNA i l'estabilitat genòmica. Aquestes proteïnes depenen de la salut mitocondrial per regular l'estrès oxidatiu i protegir les cèl·lules de danys genètics. La relació entre les sirtuïnes i la funció mitocondrial crea un cicle de retroalimentació positiva que afavoreix la salut genètica i cel·lular, essencial per a la longevitat. No obstant això, no s'ha trobat una relació directa entre aquestes proteïnes i les marques epigenètiques analitzades, cosa que implica que la longevitat és probablement el resultat d'una interacció complexa entre factors moleculars, genètics i ambientals.

Finalment, s'espera que l'article complet, que es publicarà aviat, ofereixi una anàlisi més detallada sobre la salut de la supercentenària i permeti establir connexions més profundes entre els diferents descobriments.

10. Conclusions generals

Aquest treball ha abordat l'estudi dels mecanismes moleculars i epigenètics implicats en el procés d'envelliment, centrant-se especialment en les proteïnes SIRT6 i SIRT7 i la seva relació amb la longevitat extrema. Mitjançant una combinació d'investigació teòrica i experimental, s'han aportat nous coneixements per promoure un envelliment saludable. Aquesta recerca és especialment rellevant pel seu potencial impacte en la qualitat de vida, la prevenció del declivi cel·lular i la seva contribució al coneixement científic.

A escala teòrica, s'han analitzat mecanismes clau de l'envelliment, com la disfunció mitocondrial, la pèrdua de proteostasis, la senescència cel·lular i la inestabilitat genòmica. També s'han explorat estratègies per promoure un envelliment saludable, destacant la importància de l'activitat física i una vida equilibrada. Addicionalment, s'han descrit les manifestacions anatòmiques i fisiològiques de l'envelliment per entendre com aquests processos es reflecteixen en el cos.

En l'àmbit experimental, els resultats han confirmat algunes hipòtesis. En el cas de l'atleta estudiat, s'ha observat una disminució de l'edat epigenètica respecte a la cronològica, tot i que no s'ha pogut determinar si aquest fet està influenciat més per l'esport o per la dieta, subratllant la necessitat de futurs estudis per aïllar aquestes variables.

D'altra banda, l'anàlisi d'una supercentenària de 116 anys ha revelat una sobreexpressió significativa de les proteïnes SIRT6 i SIRT7, clau en la protecció cel·lular i l'estabilitat genètica. Tot i això, no s'ha trobat una correlació directa amb les marques epigenètiques estudiades, fet que apunta a una interacció complexa de factors moleculars, genètics i ambientals en la longevitat extrema.

Aquests resultats reforcen el paper de les sirtuïnes en la integritat cel·lular, però suggereixen que altres mecanismes, com la regulació mitocondrial o l'entorn, podrien ser determinants. Això subratlla la complexitat de l'envelliment i la necessitat d'ampliar la investigació amb mostres més grans i tècniques avançades.

Malgrat les aportacions significatives d'aquest treball, s'han identificat algunes limitacions. La mida reduïda de la mostra, limitada a un únic cas de supercentenària i un d'atleta, dificulta la generalització de les conclusions. A més, algunes tècniques podrien perfeccionar-se per obtenir dades més precises en futurs estudis.

En síntesi, aquest projecte ha complert els objectius plantejats, contribuint a una millor comprensió de la longevitat extrema i oferint evidències sòlides sobre el paper central de les sirtuïnes. També obre la porta al desenvolupament d'estratègies antienvelliment basades en la modulació d'aquestes proteïnes, com la seva sobreexpressió per millorar la reparació del DNA o la seva inhibició per entendre millor el seu paper en el declivi cel·lular.

De cara al futur, serà fonamental ampliar la investigació a una població més gran i diversificada, dissenyar estudis longitudinals i incorporar tècniques més avançades. Els coneixements adquirits podrien traduir-se en teràpies personalitzades per retardar l'envelliment i millorar la salut cel·lular, promovent una vida més llarga i saludable.

Finalment, és fonamental reflexionar sobre les implicacions ètiques de manipular els mecanismes de l'envelliment. La sobreexpressió o inhibició de les sirtuïnes podria provocar desigualtats socials si els tractaments no estan disponibles per a tota la població, creant una divisió entre aquells que poden accedir a aquestes tecnologies i els qui no. A més, allargar la vida humana a través de la ciència obre nous debats sobre fins a quin punt es poden establir límits en la intervenció humana sobre els processos naturals i com aquestes innovacions impactaran en la sostenibilitat global, com els recursos naturals i els sistemes de salut.

No es tracta d'allargar la vida a qualsevol cost, sinó de garantir que aquest temps extra estigui marcat per una salut òptima i una vida plena. Per això, és crucial establir un equilibri entre els beneficis que aquestes tecnologies poden aportar a la salut i els reptes socials i ètics que podrien derivar-se de la seva implementació a gran escala.

El veritable interès no és només viure més temps, sinó viure amb una bona qualitat de vida durant el màxim temps possible.

REFERÈNCIES DOCUMENTALS

Taula: Panoràmica en la recerca antienvelliment

1. **Longo, V. D.** (2018). Caloric restriction cycles reduce oxidative stress and extend lifespan in mice. *Journal of Aging Research*, 10(3), 78-88. <https://doi.org/10.1155/2018/1075859>
2. **Summers, S. A.** (2017). Therapeutic approaches to reducing advanced glycation end-products in aging. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 7890485. <https://doi.org/10.1155/2017/7890485>
3. **Loring, J. F.** (2015). Enhancing cellular detoxification pathways in aging models. *Aging Cell*, 14(5), 731-741. <https://doi.org/10.1111/accel.12338>
4. **Rubinsztein, D. C.** (2016). Autophagy and the degradation of misfolded proteins in aging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 451-465. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.110>
5. **Kenyon, C.** (2010). The regulation of protein homeostasis in aging. *Cell*, 142(6), 837-848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.022>
6. **Bohr, V. A.** (2016). DNA repair mechanisms and oxidative damage in aging. *Nature Communications*, 7, 10894. <https://doi.org/10.1038/ncomms10894>
7. **Lee, A. S.** (2014). Enhancing DNA double-strand break repair in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 14169-14174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414757111>
8. **Fisher, D. E.** (2015). Protective mechanisms against DNA damage from radiation in aging. *Radiation Research*, 183(4), 407-419. <https://doi.org/10.1667/RR13959.1>
9. **Van Deursen, J. M.** (2019). DNA repair and the biology of aging. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 101-126. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011918>
10. **Weiss, W. A.** (2017). DNA repair mechanisms in neurological diseases of aging. *Nature Reviews Neurology*, 13(2), 102-116. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.191>
11. **Izpisúa Belmonte, J. C.** (2016). Cell reprogramming in aging and rejuvenation. *Nature*, 540(7634), 230-234. <https://doi.org/10.1038/nature20567>
12. **DePinho, R. A.** (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328), 102-106. <https://doi.org/10.1038/nature09603>

13. **Collins, K.** (2000). The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(3), 175-185. <https://doi.org/10.1038/35043045>
14. **Kaeberlein, M.** (2015). Mitochondrial function in aging: Restoring mitochondrial capacity in old animals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(6), 387-400. <https://doi.org/10.1038/nrd4577>
15. **Sinclair, D. A.** (2013). Modulation of histone modifications as a therapeutic target for aging. *Cell*, 155(4), 678-690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.014>
16. **Van Deursen, J. M.** (2016). Senescent cells: A therapeutic target for aging. *Nature Medicine*, 22(6), 714-721. <https://doi.org/10.1038/nm.4129>
17. **Kirkland, J. L.** (2017). Senolytic agents for the elimination of senescent cells. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718-735. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>
18. **Sharpless, N. E.** (2004). INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 843-855. <https://doi.org/10.1038/nrc1451>
19. **Chen, J. K.** (2019). Targeting PAR2 in aging kidneys: A therapeutic approach. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(5), 892-902. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018121232>
20. **Blau, H. M.** (2015). Telomerase mRNA treatment in human cells: Extending telomere length and healthspan. *Nature Communications*, 6, 8493. <https://doi.org/10.1038/ncomms9493>
21. **Brenner, A. J.** (2013). Coenzyme Q10 supplementation and mitochondrial function in aging cells. *Aging Cell*, 12(3), 426-435. <https://doi.org/10.1111/acer.12069>
22. **Sinclair, D. A.** (2016). Mitophagy in aging and disease: An emerging therapeutic target. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), 25-40. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.110>
23. **Izpisúa Belmonte, J. C.** (2016). Enhancing mitochondrial biogenesis through transcriptional activation. *Cell Metabolism*, 24(6), 784-797. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.006>

BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

Ann Hum Biol. 2013 novembre-desembre;40(6):471. PMID: 23829164.

Bi, S., Liu, Z., Wu, Z., Wang, Z., Liu, X., Wang, S., Ren, J., Yao, Y., Zhang, W., Song, M., Liu, G., & Qu, J. (2020). SIRT7 antagonizes human stem cell aging as a heterochromatin stabilizer. *Protein & Cell*, 11(7), 483-504. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00728-4>

BMC Public Health. (s.d.). *Consequences of chronic diseases and other limitations associated with old age a scoping review*. <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-019-6687-5>

Cáncer - Síntomas y causas - Mayo Clinic. (2022, 7 diciembre). <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syc-20370588>

Cell Communication and Signaling. (s.d.). *Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies*. Recuperado de <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-019-0443-5>

Challoner, J.(2016) *La Célula: Una Guía Visual Del Componente Esencial de La Vida*. Akal.

De Barcelona, U. A. (s. f.). Una millor nutrició contra l'envelliment. *Divulga UAB - Revista de Difusió de la Recerca de la Universitat*. <https://www.uab.cat/web/detall-de-noticia/una-millor-nutricio-contra-l-envelliment-1345469002000.html?articleId=134564676475>

Dettmer, P. (2022). *Immune: un viaje al misterioso sistema que te mantiene vivo*. Deusto

Desvelant els secrets de l'envelliment i el càncer: Entrevista al Dr. Mate Maus, alumni de l'IRB Barcelona. (2024, 07 Abril). IRB Barcelona. https://www.irbbarcelona.org/ca/news/comunitat/desvelant-els-secrets-de-lenvelliment-i-el-cancer-entrevista-al-dr-mate-maus-alumni?utm_source=pardot&utm_medium=email&utm_campaign=news_april_24

Eppard, M., Passos, J. F., & Vitorcelli, S. (2023). Telomeres, cellular senescence, and aging: past and future. *Biogerontology*, 25(2), 329-339. <https://doi.org/10.1007/s10522-023-10085-4>

Esteller, M., & Macip, S. (2023). *El secret de la vida eterna: Tot el que sabem per viure més i millor* (1a Edició). Rosa dels vents.

Ha, S., Kim, H. W., Kim, K. M., Kim, B. M., Kim, J., Son, M., Kim, D., Kim, M., Yoo, J., Yu, H. S., Jung, Y., Lee, J., Chung, H. Y., & Chung, K. W. (2024). PAR2-mediated cellular senescence promotes inflammation and fibrosis in aging and chronic kidney disease. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/ace.14184>

Llc, I. J. (2023, 18 juliol). Age reversal breakthrough: Harvard/MIT Discovery could enable Whole-Body Rejuvenation. *SciTechDaily*. <https://scitechdaily.com/age-reversal-breakthrough-harvard-mit-discovery-could-enable-whole-body-rejuvenation/>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.00>

New roles for autophagy genes in cellular waste management and aging. (2024, 24 gener). n ScienceDaily. <https://www.sciencedaily.com/releases/2024/01/240104122002.htm>

Puntos de control del ciclo celular (artículo) | Khan Academy. (s. d.). Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cell-cycle-checkpoints-article>

Ros, S. C. (2022, 26 octubre). Per què envellim? - Salut con Ciència. Salut Con Ciència. <https://blogs.uoc.edu/cienciasdelasalud/ca/per-que-envellim/>

Salomone, M. G. (2018, 26 novembre). *Un incremento global de las defensas antioxidantes del organismo podría retrasar el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad*. CNIO. <https://www.cnio.es/noticias/publicaciones/un-incremento-global-de-defensas-antioxidantes-podria-retrasar-envejecimiento-y-sus-enfermedades/>

Senescent cells: Promising anti-aging targets for health span extension and the treatment of osteoporosis - *Mayo Clinic*. (2020, 23 abril). <https://www.mayoclinic.org/medical-professionals/endocrinology/news/senescent-cells-promising-anti-aging-targets-for-health-span-extension-and-the-treatment-of-osteoporosis/mac-20431073>

SpringerLink. (s.d.). *Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies*. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-020-09899-5>

Stefanacci, R. G. (2024b, abril 10). *Cambios corporales relacionados con el envejecimiento*. Manual MSD Versión Para Público General. https://www.msdmanuals.com/es/hogar/salud-de-las-personas-de-edad-avanzada/envejecimiento-del-organismo/cambios-corporales-relacionados-con-el-envejecimiento#Aparato-digestivo_v8968012_es

Telómero. (s. d.). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Telomero>

Villa-Forte, A. (2023, 10 novembre). *Las células*. Manual MSD Versión Para Público General. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/fundamentos/el-cuerpo-humano/las-c%C3%A9lulas>

World Health Organization. (2022). *Ageing and health*. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>

World Health Organization: WHO. (2022, 1 octubre). *Envejecimiento y salud*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>

Wu, D., Li, Y., Zhu, K. S., Wang, H., & Zhu, W. (2018). Advances in Cellular Characterization of the Sirtuin Isoform, SIRT7. *Frontiers In Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00652>

Yamagata, K., Mizumoto, T., & Yoshizawa, T. (2023). The Emerging Role of SIRT7 in Glucose and Lipid Metabolism. *Cells*, 13(1), 48. <https://doi.org/10.3390/cells13010048>

ANNEXOS

1. Protocols

1.1 Extracció d'ADN de la saliva:

- Extreure saliva del pacient amb un Kit d'extraccions de saliva.
- Deixar-la en incubació a 50 °C durant tota la nit.
- Transferir tota la mostra a un tub de centrifugat de 15 ml, amb l'ajuda d'una pipeta per saber quin és el volum exacte de la mostra.
- Afegir la 25a part, del volum total de la mostra, de PT-L2P i homogeneïtzar uns segons amb un agitador de tubs vòrtex.
- Incubar durant 10' en gel.
- Centrifugar 10' a T. ^a (Temperatura Ambient) a una velocitat $\geq 3\,500 \times g$
- Transferir el sobrenedant a un altre tub de 15 ml i llençar la pastilla.
- Afegir 1,2 x de EtOH 95% - 100% a T. ^a i invertir suaument 10 vegades.
- Deixar 10' a T. ^a per permetre la precipitació de l'ADN.
- Centrifugar 10' a T. ^a a una velocitat $\geq 3\,500 g$.
- Retirar el sobrenedant i llençar-ho. (No tocar l'ADN en forma de *pellet*)
- Rentar amb 1 ml de EtOH 70%, deixar 1' a T. ^a, girar suaument i retirar.
- Rehidratar l'ADN amb *TE Buffer* i agitar amb un vòrtex 30''
 - Per una millor rehidratació, incubar a T. ^a tota la nit en agitació en un agitador de tubs vòrtex o incubar a 50 °C durant 1 h amb agitació ocasional.

1.2 Control quantitatiu d'ADN

- Indicar en el Nanodrop que volem mesurar ADN
- Afegir 2 µL d'un blanc, el *buffer* (Dissolució tampó) on està dissolt l'ADN.
- Netejar i afegir 2 µL de la mostra.
- Comprovar la concentració de la mostra segons l'absorbància a diferents longituds d'ones.
 - Repetir aquest pas amb totes les mostres a quantificar.

1.3 Control qualitatiu d'ADN

- Fer un gel d'agarosa 1,5%
- Col·locar-lo en una cubeta per a electroforesi.
- Omplir amb TBE
- Afegir la mateixa quantitat de cada mostra d'ADN

- Afegir un *Ladder*
- Córrer a 100 V durant 30'
- Comprovar la integritat de l'ADN amb rajos UV

1.4 Extracció de leucòcits de la sang

- Filtrar el PBS+EDTA 2 mM amb filtre de 0,22 µm.
- Transferir el volum de cada mostra de sang fresca (5-6 ml aproximadament) a un tub diferent de 50 ml.
- Centrifugar els tubs a 2000 x g durant 10 minuts.
- Transferir el plasma a tubs de 2 ml i deixar-los en gel sec per guardar-los a -80 °C posteriorment.
- Resuspendre els *pellets* en PBS+EDTA 2 mM, enrasant-los fins a 22 ml.
- Per cada mostra, preparar 2 tubs de 15 ml amb 4 ml de Ficoll cadascun.
- Afegir a cada tub amb Ficoll 11 ml de sang diluïda molt a poc a poc per evitar que es barregi amb el Ficoll.
- Centrifugar els tubs a 800 x g durant 30 minuts (4 °C, decantació 4).
- Transferir les PBMCs del Ficoll a un tub diferent de 15 ml, centrifugar-les a 3200 x g durant 1,5 minuts, rentar-les amb PBS i criopreservar-les en medi de congelació (90% FBS + 10% DMSO).
- Centrifugar el que queda als tubs (eritròcits i granulòcits) a 3200 x g durant 1,5 minuts i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre els pellets en 15 ml ACK i deixar els tubs amb ACK a temperatura ambient durant 10-20 minuts per afavorir la lisi dels eritròcits.
- Centrifugar els tubs a 3200 x g durant 1,5 minuts i descartar el sobrenedant (si veiem que el pellet continua vermell realitzar un altre rentat amb ACK).
- Resuspendre els pellets en 3 ml PBS per realitzar un últim rentat i dividir el volum en 3 tubs de 1,5 ml cadascun.
- Centrifugar els tubs a màxima velocitat durant 30 segons, descartar el sobrenedant i deixar els pellets en gel sec per guardar-los a -80 °C posteriorment.

1.5 Extracció de proteïnes

- Tenir les cèl·lules reservades a -80 °C en forma de *pellet*.
- Preparar el reactiu: 100 µL *Laemmli* + 3 µL B-Mercaptoetanol.
- Escalfar a 90 °C durant 5'
- Resuspendre les cèl·lules en el reactiu.
- Deixar les cèl·lules amb el reactiu a 100 °C durant 10'.

- Quantificar les proteïnes en el Nanodrop.

1.6 Western Blot

- Posar un gel d'acrilamida en la cubeta (Retirar plàstic).
- Omplir amb *Running Buffer* 1x
- Afegir 15 µL de cada mostra en els pouets i afegir 3 µL d'un *ladder*.
- Fer córrer el gel a dues velocitats.

Stacking: 60 V durant 20' *Running*: 110 V durant 1 h 30'.

- Transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa

(3 esponges + 3 papers + gel (del revés) + membrana + 3 papers + 3 esponges)

- Afegir el sandvitx a la cubeta (Blanc - vermell / Negre - Negre)
- Omplir la cubeta amb *Transfer Buffer* 1X i un parell de gels,
- Deixar 1 h a 100 V
- Extreure la membrana i fer un *Ponceau* durant 5' en excitació per a tenir una vista preliminar dels resultats.
- Rentar amb PBS 1X *Tween* 20 0,01%
- Fer un bloqueig amb Llet 5% en PBS 1 h a T. ^a i en agitació.
- Retallar la membrana per les parts que interessin.
- Incubem els Ac primaris durant tota la nit en agitació a 4 °C
 - Incubar un anticòs contra una proteïna abundant i present sempre (B-Actina, tubulina, laminina) per a tenir un control de càrrega positiu.
- Fer 3 neteges amb PBS 1X *Tween* 20 0.01%, 5' en excitació entre cadascun.
- Incubar els Ac secundaris lligats a un fluoròfor durant 1 h a T. ^a en agitació i a les fosques.
- Fer 3 neteges amb PBS 1X *Tween* 20 0.01%, 5' en agitació entre cadascun.
- Revelar els resultats en un *scanning Odyssey* o *iBright*.

1.7 Citometria de flux (FACS)

- DILUCIONS DE TINCIONS

- Resuspenem el *MitoTracker* liofilitzat (X µg) (Ref. X) en 75 µl DMSO per a deixar-lo a una concentració d'1 mM. Utilitzarem el *MitoTracker* a una concentració de 100 nM (dilució 1/10.000).
- Resuspenem el TMRE liofilitzat (X µg) (Ref. X) en X µl DMSO per a deixar-lo a una concentració de 5 mM. Farem servir el TMRE a una concentració de 50 nM (dilució 1/100.000).
- Resuspenem l'*ATP-Tracker* liofilitzat (X µg) (Ref. X) en 390 µl DMSO per a deixar-lo a una concentració de X mM. Utilitzarem l'*ATP-Tracker* a una concentració de 7,5 µM (dilució 1/1.184).
- Resuspenem el *MitoSOX* liofilitzat (50 µg) (Ref. X) en 13 µl DMSO per a deixar-lo a una concentració de 5 mM. Farem servir el *MitoSOX* a una concentració de 5 µM (dilució 1/1.000).

- PREPARACIÓ (PER A 2 MOSTRES)
 - Transferim 100.000 cèl·lules de cada mostra a 12 tubs d'1,5 ml, les centrifuguem a 300 x g durant 5' a RT i descartem el sobrenedant.
 - Diluïm 1 µl *MitoTracker* 1 mM en 99 µl RPMI (dilució 1/100).
 - Diluïm 50 µl *MitoTracker* 10 µM en 4,950 ml RPMI (dilució 1/100).

- TMRE
 - Diluïm 1 µl TMRE 5 mM en 999 µl RPMI (dilució 1/1.000).
 - Resuspenem el *pellet* dels 12 tubs d'una mostra i els 12 tubs de l'altra amb 200 µl de *MitoTracker* 100 nM.
 - Afegim a 3 tubs de cada mostra 2 µl TMRE 5 µM (dilució 1/100) i barregem fent *up / down*.
 - Incubem els tubs amb *MitoTracker*-TMRE a RT durant 30 minuts.

- ATP-TRACKER
 - Incubem 3 tubs de cada mostra amb *MitoTracker* a RT durant 15 minuts.
 - De mentre, diluïm 1,2 µl *ATP-Tracker* X mM en 10,8 µl RPMI (dilució 1/10).
 - Passats els 15 minuts, afegim als tubs 1,7 µl *ATP-Tracker* X µM (dilució 1/118,4) i barregem fent *up/down*.
 - Incubem els tubs amb *MitoTracker*-*ATP-Tracker* a 37 °C durant 15 minuts.

- MITOSOX
 - Incubem 3 tubs de cada mostra amb *MitoTracker* a RT durant 20 minuts.
 - De mentre, diluïm 1,5 µl *MitoSOX* 5 mM en 13,5 µl RPMI (dilució 1/10).
 - Passats els 20 minuts, afegim als tubs 2 µl *MitoSOX* 500 µM (dilució 1/100) i barregem fent *up/down*.

- Incubem els tubs amb *MitoTracker-MitoSOX* a 37 °C durant 10 minuts.
- FINALITZACIÓ
 - Centrifuguem tots els tubs a 300 x g durant 5' a *RT* i descartem els sobrenedants.
 - Fem un rentat amb PBS i deixem les cèl·lules en 200 µl PBS.
 - Transferim les cèl·lules a tubs de citometria i les llegim (els tubs amb TMRE els últims). El *MitoTracker* s'excita amb FITC, mentre que la resta ho fa amb PE.

1.8 Preparació de gels d'acrilamida

- *Stacking* 8 ml al 5% (3 gels de 1,5 mm)
 - 5,70 ml ddH₂O (Aigua bidestil·lada)
 - 1,30 ml Acrilamida 30%
 - 1 ml Tris 1,5 M pH 8,8
 - 80 µL SDS 10%
 - 8 µL TEMED
 - 80 µL APS 10% (L'últim)
- *Running* 25 ml (3 Gels de 1,5 mm)
 - 5,70 ml ddH₂O
 - 12,50 ml Acrilamida 30%
 - 6,30 ml Tris 1,5 M pH 8,8
 - 250 µL SDS 10%
 - 20 µL TEMED
 - 250 µL APS 10% (L'últim)

1.9 Preparació de gels d'agarosa

Per a 30 ml gel 1,5%

- 30 ml TBE
- 0,45 g Agarosa (Dissoldre en el TBE calent)
- 1 µL SYBR Safe

1.10 Bisulfitat d'ADN

- Preparar el reactiu *CT conversion* afegint al tub liofilitzat 900 µl d'aigua destil·lada, 300 µl de *Dilution Buffer* i 50 µl de *Dissolving Buffer*.

- Agitar lleugerament i deixar a agitació a 42 °C durant 10 minuts.
- Diluir cada mostra d'ADN en tubs de PCR amb aigua PCR per obtenir 2 µg d'ADN en 20 µl.
- Afegir 130 µl de reactiu *CT conversion* i col·locar al termociclador: 1' a 96 °C, (1 h a 50 °C i 1' a 96 °C) durant 16 cicles, amb *hold* a 4 °C.
- Disposar columnes en tubs col·lectors, afegir 600 µl de *Binding Buffer* i 150 µl de mostra, i barrejar.
- Centrifugar a 10.000 g durant 30 segons i buidar el tub col·lector.
- Afegir 100 µl de *Wash Buffer* a cada columna i centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons.
- Afegir 200 µl de *Desulphonation* i deixar incubar durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons i realitzar dos rentats amb 200 µl de *Wash Buffer*.
- Transferir la columna a un eppendorf, afegir 20 µl d'*Elution Buffer* sobre la membrana sense tocar-la.
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons i conservar els *eppendorfs* a -20 °C o analitzar l'ADN bisulfitat en gel d'agarosa al 1,5%.

2. Figures addicionals

2.1. Gràfiques citometries de flux

