



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE GRAU

ESTUDI PROSPECTIU DE L'EFECTE D'INGESTA DIÀRIA DE FITAT SOBRE LA NEURODEGENERACIÓ ASSOCIADA A L'ACUMUL DE FERRO I L'ENVELLIMENT: DETERMINACIÓ D'ANALITS D'INTERÈS A MOSTRES D'ORINA DE RATA

Paula Ruiz Montes

Grau de: Química

Facultat de: Ciències

Any acadèmic 2022-23

ESTUDI PROSPECTIU DE L'EFECTE D'INGESTA DIÀRIA DE FITAT SOBRE LA NEURODEGENERACIÓ ASSOCIADA A L'ACUMUL DE FERRO I L'ENVELLIMENT: DETERMINACIÓ D'ANALITS D'INTERÈS A MOSTRES D'ORINA DE RATA

Paula Ruiz Montes

Treball de Fi de Grau

Facultat de: Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any acadèmic 2022-23

Paraules clau del treball:

Inositol hexafosfat (IP6) (Fitat), acumulació de ferro, productes finals de la glicació avançada (AGEs), neurodegeneració.

Nom del tutor / la tutora del treball: Maria del Pilar Sanchís Cortés

Nom del tutor / la tutora (si escau)

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resum

Abstract: Several studies have demonstrated the role of iron in neurodegenerative processes since iron can contribute to the formation of advanced glycation end products (AGEs) and consequently to an increase in oxidative stress. For this reason, the development and study of iron chelating molecules is of great importance. One of the substances whose chelating capacity has been demonstrated is phytate (inositol hexaphosphate), a natural molecule present in many seeds, nuts, and cereals. In this work, a prospective study is conducted on an animal model of the effect of daily phytate intake on urinary excretion of different elements by ICP - AES, as well as the amounts of urinary phytate excreted, using a colorimetric method. The results obtained show no significant differences between the different diet groups, although differences can be observed within the same group for different ages.

Resumen: Numerosos estudios han demostrado la relación del hierro con los procesos neurodegenerativos debido a que este puede contribuir a la formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs) y con ello a un aumento del estrés oxidativo. Debido a esto, el desarrollo y estudio de moléculas quelantes del hierro resulta de gran importancia. Una de las sustancias cuya capacidad quelante ha sido demostrada es el fitato (inositol hexafosfato), una molécula natural presente en un gran número de semillas, frutos secos y cereales. En este trabajo se lleva a cabo un estudio prospectivo sobre un modelo animal del efecto de la ingesta diaria de fitato sobre la excreción urinaria de distintos elementos mediante ICP-AES, así como también las cantidades de fitato urinario excretadas, empleando un método colorimétrico. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos de dieta, aunque sí se pueden observar diferencias dentro de un mismo grupo para diferentes edades.

Resum: Nombrosos estudis han demostrat la relació del ferro amb els processos neurodegeneratius degut a que pot contribuir a la formació de productes finals de la glicació avançada (AGEs) i, amb això, a un augment de l'estrès oxidatiu. A causa d'això, el desenvolupament i estudi de substàncies quelants del ferro resulta de gran importància. Una de les substàncies la capacitat quelant de la qual ha estat demostrada és el fitat (inositol hexafosfat), una molècula natural present en un gran nombre de llavors, fruits secs i cereals. En aquest treball es duu a terme un estudi prospectiu sobre un model animal de l'efecte de la ingesta diària de fitat sobre l'excreció urinària de diversos elements mitjançant ICP-AES, així com també les quantitats de fitat urinari excretades, emprant un mètode colorimètric. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives entre els diversos grups de dieta, encara que sí que s'observen diferències dins un mateix grup per diferents edats.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	5
1.1. MALALTIES NEURODEGENERATIVES.....	5
1.1.1. METABOLISME DEL FERRO. RELACIÓ AMB NEURODEGENERACIÓ	6
1.2. QUELANTS DEL FERRO PER TRACTAR LA NEURODEGENERACIÓ.....	6
1.3. FITAT COM A QUELANT DEL FERRO.....	8
1.1.2. EL FITAT A L'ORGANISME	9
1.1.3. QUELACIÓ FITAT – FERRO.....	10
2. OBJECTIUS I HIPÒTESI.....	11
3. MATERIALS I MÈTODES.....	11
3.1. ANIMALS I DISSENY.....	11
4.1.1. RECOLLIDA DE MOSTRES: ORINA I EXCREMENTS.....	13
3.2. DETERMINACIÓ DE METALLS EN ORINA PER ICP-AES	14
4.1.2. PREPARACIÓ DE LA RECTA DE CALIBRATGE	14
4.1.3. TRACTAMENT DE LES MOSTRES.....	15
3.3. DETERMINACIÓ DE MIOINOSITOLS FOSFATS EN ORINA.....	16
4. RESULTATS.....	18
4.1. DETERMINACIÓ DE METALLS EN ORINA.....	18
4.2. DETERMINACIÓ DE MIOINOSITOLS FOSFATS EN ORINA.....	27
5. CONCLUSIONS.....	28
6. BIBLIOGRAFIA	30

1. INTRODUCCIÓ

1.1. MALALTIES NEURODEGENERATIVES

Actualment, una de les àrees més complexes d'estudi, pel que fa als organismes vius, és el sistema nerviós, juntament amb l'immunitari. Evidència d'això és el fet de que, malgrat els esforços realitzats en investigació, avui dia no es coneixen amb exactitud quines són les causes de les malalties del tipus neurodegeneratiu. Es coneix que aquestes malalties són provocades per processos que provoquen una pèrdua progressiva de les cèl·lules del sistema nerviós central (SNC) que, segons els estudis realitzats, pot arribar a afectar inclús al sistema nerviós perifèric (SNP) (Albers et al., 2015).

S'ha establert una relació clara entre les malalties neurodegeneratives (NDD: Neurodegenerative Diseases) i l'envelliment (López-Otín et al., 2016), així com també amb altres factors com poden ser el consum d'alcohol i altres drogues (Kamal et al., 2020) o afeccions prèvies com vessament cerebral o tumors (Liu et al., 2021). El fet de les NDD estiguin relacionades amb l'envelliment, resulta en un problema d'escala cada vegada major, tenint en compte que l'esperança de vida global ha augmentat dels 40 anys a mitjans del segle XX fins arribar a 70 anys actualment (Roser et al., 2013). Segons la Organització Mundial de la Salut (OMS), l'Alzheimer (AD) és una de les 10 causes de mort principals a nivell mundial, destacant que a Amèrica i a Europa va ser la tercera a l'any 2019 (World Health Organization: WHO, 2020), aquest fet fa que l'estudi de les NDD i els processos implicats sigui primordial i de gran importància.

Un altre aspecte que s'ha demostrat que està estretament lligat amb les NDD es la formació de productes finals de la glicació avançada (AGEs). La glicació avançada és un procés químic no enzimàtic mitjançant el qual els sucres reductors s'uneixen irreversiblement amb proteïnes, lípids i àcids nucleics, ocorren de manera natural amb l'envelliment. Els AGEs són els productes d'aquest procés de glicació avançada i es poden formar en diferents teixits de l'organisme i està demostrada la seva relació amb les ND (Vicente Miranda et al., 2016)..

Una de les conseqüències principals de la formació de AGEs és l'augment de l'estrès oxidatiu, aquest ve ocasionat per un desequilibri entre la producció de radicals lliures d'oxigen i la neutralització d'aquests per part de l'organisme. Un excés de radicals lliures provoca alteracions al funcionament normal dels teixits, degut a que aquests actuen i oxiden les diferents biomolècules. Pel fet de que el cervell presenta una elevada proporció de lípids, és especialment vulnerable a l'estrès oxidatiu, fet que fa que un estrès oxidatiu acumulat contribueixi al desenvolupament de les NDD.

D'altra banda, s'ha trobat una relació entre els AGEs i diversos metalls com el ferro (Fe), el coure (Cu) o el zinc (Zn), i s'ha pogut observar que aquests metalls poden actuar com a catalitzadors de la formació d'AGEs (Stadtman, 1990).

1.1.1. METABOLISME DEL FERRO. RELACIÓ AMB NEURODEGENERACIÓ

El metabolisme del ferro és un procés extremadament regulat per la hormona hepcidina, encarregada de controlar l'absorció del ferro a l'intestí i la seva alliberació controlada a les zones on es requereix. L'absorció del ferro es produeix principalment a l'intestí prim i l'eficiència d'aquest procés depèn del tipus de ferro:

- Ferro hemo: procedent de l'hemoglobina i la mioglobina dels aliments d'origen animal, la seva biodisponibilitat és elevada, de tal manera que la seva absorció és ràpida i senzilla.

- Ferro no hemo: procedeix dels aliments d'origen vegetal, on es troba en forma de sals de ferro, lo qual redueix la seva biodisponibilitat, presentant una absorció més impedida.

Una vegada el ferro és absorbit, s'uneix a la proteïna transferrina que el transporta a través del torrent sanguini cap als teixits i òrgans que el requereixen. Si no es necessita de forma immediata, s'emmagatzema en forma de ferritina (proteïna intracel·lular present al fetge, la melsa i la medul·la òssia).

Tots aquests processos implicats a la homeòstasis del ferro es poden veure alterats amb l'envelliment, resultant en acumulacions de ferro a diferents teixits i disminucions de la seva biodisponibilitat a uns altres (Anderson, 2007). Els principals òrgans on es produeixen aquestes acumulacions són el fetge, el pàncrees, el cor, el cervell, els ronyons i les articulacions. La principal conseqüència d'aquesta acumulació de ferro als teixits és un augment dels nivells d'estrès oxidatiu degut a que té lloc la reacció de Fenton, generant radicals reactius d'oxhidril. Aquest augment de l'estrès oxidatiu és el que produeix que l'acumulació de ferro al cervell estigui directament relacionada amb les NDD (Zecca et al., 2004).

1.2. QUELANTS DEL FERRO PER TRACTAR LA NEURODEGENERACIÓ

Un dels possibles tractaments per la neurodegeneració és la quelació del ferro, ja sigui per inhibir els seus efectes oxidatius o per excretar el seu excés en forma de complex. Els tractaments de quelació del ferro s'han estudiat principalment per malalties com el Parkinson (PD) o l'Alzheimer (AD). Les principals molècules estudiades són la deferoxamina (DFO), la deferiprona (DFP) i el clioquinol (CQ), les estructures de les quals es pot observar a la figura 1.

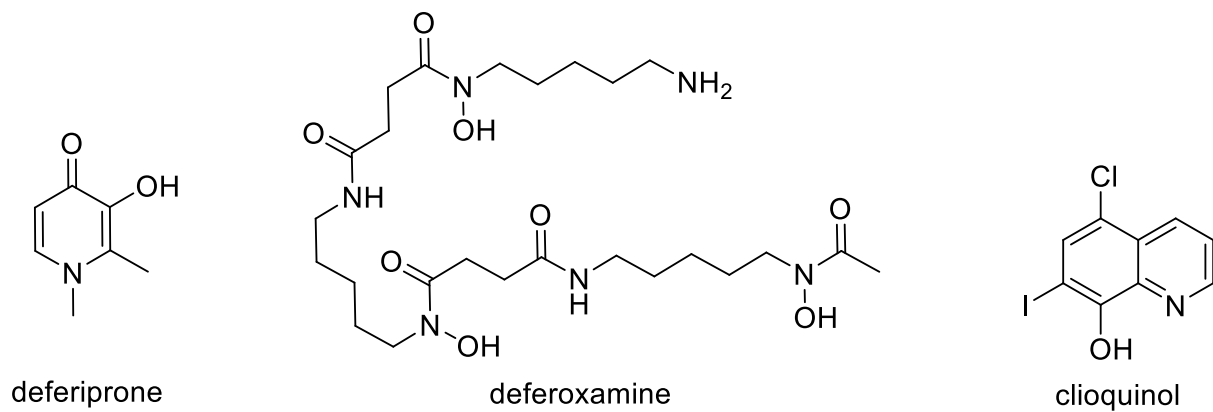


Figura 1: Estructura de les principals molècules estudiades com a quelants del ferro

La DFO és un compost natural produït per microorganismes que s'uneix al Fe^{3+} com a lligand bidentat, evitant que aquest estigui en forma lliure i inhibint la seva participació als processos oxidatius perjudicials. Un aspecte important d'aquest quelant és la seva capacitat per travessar la barrera hematoencefàlica podent accedir als cúmuls de ferro del cervell. Alguns dels seus estudis crítics mostren millores dels sistemes motors i cognitius a pacients amb PD (Devos et al., 2014), encara que d'altres no han trobat cap millora.

En quant a la DFP, és un lligand monodentat que forma un complex estable amb el Fe^{3+} que també inhibeix l'activitat pro-oxidant d'aquest i, per la seva capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica, permet la disminució dels nivells de ferro lliure al cervell. De la mateixa manera que amb la DFO, els estudis clínics de la DFP presenten resultats diversos: alguns d'ells informen de millores a pacients amb PD (Devos et al., 2014) i d'altres no han trobat diferències significatives. Els principals efectes secundaris d'aquesta són problemes gastrointestinals.

D'altra banda, el CQ és també un lligand bidentat que actua tant pel grup hidroxil com pel grup clorur per unir-se al ferro. Els estudis clínics amb CQ són molt limitats i encara es necessari realitzar més, però s'han trobat algunes millores cognitives a un estudi de fase II amb pacients de AD, els quals van mostrar disminucions als nivells plasmàtics de beta-amiloide (Ritchie et al., 2003).

De forma general, per tant, s'han observat certes millores als nivells de neurodegeneració amb aquests tres quelants, però també s'han realitzat estudis que no han trobat efectes significatius. A més, alguns d'ells presenten efectes secundaris negatius. Per aquests motius és necessària la investigació d'altres molècules o substàncies que puguin actuar com a quelants del ferro per tractar les NDD.

1.3. FITAT COM A QUELANT DEL FERRO

El fitat (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrogenfosfat) (IP6) també conegut com àcid fític, és la forma hexafosforilada del inositol i, encara que la seva estructura va ser descrita per Anderson a l'any 1914 (Figura 2), la seva existència va ser reportada per Pfeffer a l'any 1872 (Erdman, 1979).

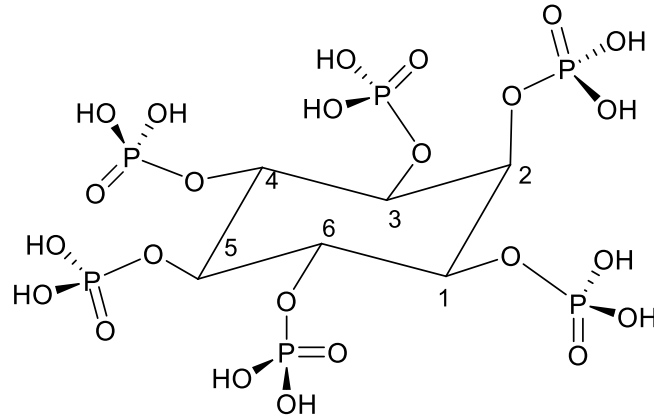


Figura 2: Estructura química del myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrogenfosfat

Com es pot observar a la figura 2, la seva estructura està formada per un anell de inositol al qual es troben units sis grups fosfats. El IP6 es troba de forma abundant a llegums, cereals i fruits secs, on actua com a magatzem de fòsfor i d'altres metalls que es poden unir a ell mitjançant els grups fosfat, de tal manera que es pot trobar el fitat en forma de sals de calci, magnesi, ferro, zinc o altres formes de fitat metàl·lic. Altres funcions que exerceix el fitat als vegetals són la regulació del creixement, amb la germinació de les llavors i la formació de fruits i flors i el control de l'absorció de metalls pesants del sòl, formant complexos amb aquests i reduint la seva toxicitat (Pandey et al., 2017).

Entre els anys 30 i 40, Edward Mellanby va realitzar una sèrie d'estudis (Mellanby, 1949) i investigacions nutricionals sobre el fitat, amb l'objectiu d'avaluar els seus efectes. Els resultats que va obtenir mostraven que l'administració de fitat sòdic a cans dificultava (inhibia) la seva absorció de calci, arribant a provocar raquitisme. Aquest fet va provocar que el fitat es considerés com a anti-nutrient i que es recomanés la reducció o eliminació de la ingesta de fitat dietètic. No va ser fins que es realitzaren uns segons estudis on, substituint el fitat sòdic per una sal de fitat càlcic – magnèsic (forma predominant a les llavors) i variant les seves concentracions, es van observar efectes positius en l'eliminació del raquitisme i un manteniment del balanç mineral. Actualment, s'ha demostrat que l'adherència a una dieta sana i equilibrada amb consums de fitat d'entre 1 – 2 g no té cap efecte perjudicial sobre la biodisponibilitat i, a més, presenta nombrosos efectes positius sobre la salut en relació a

malalties com la litiasi renal càlcica, calcificació patològica, sialolitiasi, osteoporosi i diversos tipus de càncer i NDD (Pujol et al., 2023) ; (Grases et al., 2019).

De forma natural, el fitat es troba en múltiples aliments com poden ser llavors, fruits secs, llegums o cereals, en diferents proporcions en tots ells. A nivell dels mamífers, també s'han trobat diverses concentracions de fitat a diferents teixits i fluids, en aquest sentit es pot distingir entre dos tipus de fitat: *fitat intracel·lular* i *fitat extracel·lular* (Schlemmer et al., 2009).

El *fitat intracel·lular* és troba principalment associat a orgànuls com els lisosomes, on s'emmagatzema, el seu origen és la pròpia síntesi a l'interior de la cèl·lula i pot dur a terme funcions metabòliques. Les rutes sintètiques d'aquest fitat no s'ha pogut establir a dia d'avui.

El *fitat extracel·lular*, en canvi, procedeix de fonts exògenes (principalment de la dieta) i es troba a fluids corporals com la sang o el líquid extracel·lular.

1.1.2. EL FITAT A L'ORGANISME

El fitat dietètic es troba, normalment, en forma de sals complexes que han de ser hidrolitzades per poder ser digerides. Aquesta hidròlisi es duu a terme per les fitases, uns enzims produïts per bacteris intestinals, les quals hidrolitzen el IP6 i alliberen el inositol i els grups fosfat, els quals sí que poden ser i són absorbits per l'intestí prim. La hidròlisi del IP6 genera un conjunt de productes que es denominen IP5, IP4, IP3, IP2 i IP1, on el número estableix la quantitat de grups fosfats que presenta l'anell inositol. Les estructures d'aquests es troben representades a la figura 3.

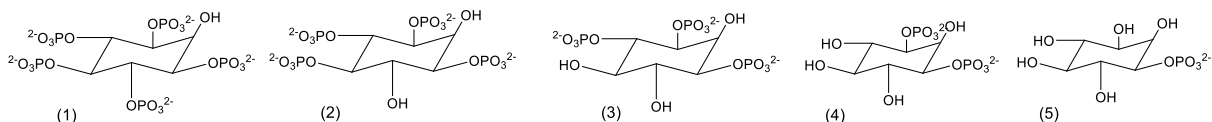


Figura 3: Estructures químiques de les diferents formes hidrolitzades del IP6. (1) IP5, (2) IP4, (3) IP3, (4) IP2, (5) IP1

S'ha de tenir en compte també que, en condicions fisiològiques, el fitat es troba forma aniònica, que impedeix que travessi la bicapa lipídica de les cèl·lules, per lo qual la quantitat de fitat que s'absorbeix de forma intacta és menor a un 2 % del total de fitat ingerit (Grases et al., 2000).

En quant a l'excreció del fitat, la major part es realitza a través de les femtes, encara que també s'elimina per l'orina. Un aspecte a destacar és que el fitat no digerit se sol unir als minerals i metalls presents a l'organisme, formant complexos insolubles, que són els que s'excreten a través de les femtes.

S'han realitzat dos estudis in vivo a models animals de rates Wistar, un d'ells amb administració tòpica de IP6 en forma de gel (Grases et al., 2018) i un altre amb administració oral de sals de IP6 sòdiques o de calci – magnesi (Grases et al., 2019). D'aquests dos estudis es pot concloure que l'administració tòpica condueix a una absorció major de IP6 que l'administració oral; que, per una administració oral, el tipus de sal de fitat influeix en l'absorció i en el tipus de IP que s'excreti; i que l'IP6 adquirit sofreix hidròlisi en la majoria dels casos, provocant que l'excreció sigui acompanyada dels altres IPs.

1.1.3. QUELACIÓ FITAT – FERRO

Com ja s'ha anat comentant anteriorment, el fitat presenta una característica molt important com és la capacitat de formar complexos amb ions metàl·lics, entre els quals es troba el ferro, pel qual presenta una afinitat inclús major que el DFO o la DFP (Vasca et al., 2002). Degut a aquesta característica, la quelació del ferro amb fitat és una possible via per disminuir la biodisponibilitat i l'absorció d'aquest metall a l'organisme.

Aquest fet pot resultar beneficiós en relació amb l'estrès oxidatiu i les NDD. Com ja s'ha indicat, un excés de ferro lliure a l'organisme pot reaccionar amb peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i formar el complex de Fenton, el qual es pot descompondre i generar així radicals hidroxils, que són altament reactius i poden atacar les biomolècules com lípids i proteïnes, causant malbé oxidatiu a nivell cel·lular (estrès oxidatiu).

Mitjançant la quelació del ferro amb el fitat, es redueixen els nivells de ferro lliure i la formació de radicals reactius d'oxigen es disminueix. A més, un assaig clínic amb pacients diabètics de tipus II han demostrat que la ingesta diària de fitat durant 3 mesos redueix els nivells de AGEs (Sanchis et al., 2018), lo qual també contribueix a la disminució de l'estrès oxidatiu.

D'altra banda, un altre estudi realitzat amb un model animal de rates, va emprar 3 dietes controlades per avaluar quins efectes exerceix el fitat ingerit sobre el ferro (Grases et al., 2004). D'aquest estudi es va concloure que aquelles rates que havien rebut una dieta rica en fitat presentaven quantitats significativament inferiors de ferro al cervell, en comparació amb aquelles rates que no consumien fitat a la dieta.

És per aquest motiu pel qual es pot deduir que la ingesta de fitat pot contribuir a la prevenció o disminució de l'acumulació de ferro a teixits com el nierviós, a més d'altres teixits com el fetge, el pàncrees o el cor.

2. OBJECTIUS I HIPÒTESI

L'objectiu principal d'aquest estudi és determinar els efectes quelants del fitat sobre l'excreció urinària de diversos analits d'interès com són el calci, magnesi, fòsfor, ferro, zinc, coure i manganés, amb especial interès damunt el ferro, ja que és l'acumulació d'aquest metall la que està estretament relacionada amb les NDD.

Aquest objectiu en particular forma part d'una contribució als objectius del Laboratori d'Investigació de Litiasi Renal de la Universitat de les Illes Balears, per tal d'avaluar quins efectes presenta la ingesta diària d'una dieta rica en fitat sobre el ferro, en un model animal de rata on es comparen quatre grups sotmesos a quatre dietes diferents: una dieta enriquida en ferro, una dieta enriquida en ferro i fitat, una dieta enriquida en fitat i una dieta control.

La hipòtesi inicial amb la qual es realitza l'estudi és que la ingesta de fitat millorarà les capacitats cognitives de les rates (encara que aquest tema no forma part de la tesi que es presenta en aquesta memòria) i que no s'observarà una major excreció de ferro (disminució dels dipòsits de ferro) al grup de dieta rica en fitat o ferro i fitat, en comparació amb aquells dos grups que no ingereixen fitat. S'avaluarà també l'excreció de mioinositols fosfats pels diferents grups.

3. MATERIALS I MÈTODES

Per tal d'avaluar quin és l'efecte de la ingesta diària de fitat sobre els processos neurodegeneratius associats a l'envelliment i els dipòsits de ferro, s'ha dissenyat un estudi prospectiu amb un model animal, sobre el qual es realitzen les determinacions detallades a continuació.

3.1. ANIMALS I DISSENY

S'ha disposat d'un total de 40 rates mascles de la rasa Wistar, les quals van començar l'estudi amb 10 setmanes d'edat (2 mesos i 2 setmanes). En arribar, se'ls va realitzar una recollida de mostres d'orina per poder tenir un blanc en referència a les concentracions dels diferents metalls d'interès.

Aquestes 40 rates es divideixen en quatre grups (cada un de 10 rates) amb diferents dietes:

- **Grup 1 (Fe):** alimentat amb dieta EF AIN93M enriquida amb 1'2 g/kg de sulfat de ferro heptahidratat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), que equival a uns 240 mg/kg de Fe.
- **Grup 2 (Fe + Phy):** alimentat amb dieta EF AIN93M enriquida amb 1'2 g/kg de sulfat de ferro heptahidratat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (= 240 mg/kg de Fe) i 10 g/kg de fitat.

- **Grup 3 (CONTROL):** alimentat amb dieta EF AIN93M sense cap afegit.
- **Grup 4 (Phy):** alimentat amb dieta EF AIN93M enriquida amb 10 g/kg de fitat.

Destacar, a més, que totes les dietes aporten 10 mg/kg de coure.

Durant els primers 6 mesos (en tenir 8 mesos d'edat), les rates es van distribuir en parelles en diferents gàbies, ambdues rates de la parella pertanyent al mateix grup de dieta. Després del mes 6 es van col·locar a cada gàbia individualment per evitar comportaments agressius. La disposició de les gàbies es va realitzar en dos racks, tal i com es pot observar a la figura 4, on cada rack compta amb 20 gàbies.



Figura 4: Un dels racks amb les gàbies individuals

Les rates han estat alimentades des de la seva arribada (2 mesos) fins els 18 mesos d'edat amb les dietes indicades, segons el grup al qual pertanyen. Als 2, 5, 10 i 15 mesos s'han realitzat recollides d'orines i excrements i als 2, 5, 8, 11 i 18 mesos se'ls han realitzat proves de comportament, memòria i reconeixement d'objectes (Test de Barnes).

D'altra banda, s'han realitzat també pesades de totes les rates cada mes, per avaluar les possibles diferències ocasionades pel consum de les diferents dietes.

4.1.1. RECOLLIDA DE MOSTRES: ORINA I EXCREMENTS

Per realitzar les recollides d'orina i excrements de les diferents rates, es disposa de dos tipus de gàbies metabòliques, unes amb la base plana y les altres amb la base cònica, tal i com es mostra a les figures 5 i 6. Aquestes gàbies permeten la separació de l'orina i els excrements per la seva posterior recollida.



Figura 5. Gàbia metabòlica amb base plana



Figura 6. Gàbia metabòlica amb base cònica

La recollida de les mostres es realitzà per la part inferior de les gàbies, retirant el tub col·lector inferior, el qual es pot observar a la figura 7.



Figura 7. Gàbia metabòlica amb la rata al seu interior i orina al tub col·lector marcat amb blau

Pel fet de que, fins l'edat de 8 mesos, les rates estaven disposades en parelles, les mostres obtingudes tant d'orina com d'excrement procedien d'ambdues rates. En separar les rates i distribuir-les de forma individual, les mostres recollides de cada una es mesclen amb les de la seva parella inicial, per poder seguir comparant els valors obtinguts.

Cal destacar que per la realització d'aquesta investigació els excrements no han estat emprats, s'ha treballat únicament amb les mostres d'orines.

3.2. DETERMINACIÓ DE METALLS EN ORINA PER ICP-AES

De les mostres d'orina recollides es vol determinar el seu contingut en calci (Ca), fòsfor (P), magnesi (Mg), ferro (Fe), zinc (Zn), coure (Cu) i manganès (Mn). Per realitzar aquesta determinació es fa servir la tècnica d'espectrometria d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció (ICP-AES), degut a la seva rapidesa d'anàlisi i la seva elevada sensibilitat.

4.1.2. PREPARACIÓ DE LA RECTA DE CALIBRATGE

Com a dissolvent s'utilitza una dissolució d'àcid nítric (HNO_3) al 2% en volum, preparada a partir de HNO_3 al 65% diluït amb H_2O miliQ; tot el material implicat en la seva preparació ha estat durant 24 hores dins un bany d' HNO_3 concentrat per eliminar qualsevol impuresa o partícula que pugui interferir a la determinació per ICP-AES. Es preparen també les dues dissolucions mare detallades a continuació:

- **Dissolució mare 1 (DM1)**. Aquesta dissolució conté 2000 mg/l de P, 400 mg/l de Ca i 400 mg/l de Mg i té un volum total de 250 ml. Per realitzar-la, es pesen 2'195 g de KH_2PO_4 , 0'250 g de CaCO_3 i 1'014 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i es dissolen en l' HNO_3 2%. La dissolució es guarda en un flascó prèviament etiquetat.

- **Dissolució mare 2 (DM2)**. Aquesta dissolució conté 40 mg/l de Fe, 20 mg/l de Zn, 20 mg/l de Cu i 20 mg/l de Mn i el seu volum total és de 250 ml. Per la seva preparació es pesen 0'0724 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0'0220 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0'0190 g de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 0'0154 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Es dissolen aquests reactius en l' HNO_3 2% i es guarden a un flascó etiquetat.

Tots els reactius emprats com a patrons primaris van ser col·locats al dessecador el dia previ a la pesada i a la preparació de les dissolucions.

El motiu pel qual es realitzen dues dissolucions mare diferents es facilitar les pesades de cada un dels patrons i augmentar així la precisió en aquestes. A partir d'aquestes dues dissolucions mare, es preparen 10 patrons de diferents concentracions de cada metall, per tal de tenir una recta de calibratge que permeti obtenir les concentracions dels metalls a les mostres.

Tant les concentracions de cada metall als patrons com el volum emprat de dissolució mare per preparar-los, es troben recollides a la taula 1.

Taula 1: Concentracions de cada metall als diferents patrons de calibratge

Patr6	Volum DM1 (ml)	Volum DM2 (ml)	[P] (ppm)	[Ca] (ppm)	[Mg] (ppm)	[Fe] (ppm)	[Zn] (ppm)	[Cu] (ppm)	[Mn] (ppm)
P0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P1	0'25	0'25	5	1	1	0'01	0'005	0'005	0'005
P2	0'50	0'50	10	2	2	0'02	0'010	0'010	0'010
P3	1'00	1'00	20	4	4	0'04	0'020	0'020	0'020
P4	2'50	2'50	50	10	10	0'10	0'050	0'050	0'050
P5	5'00	5'00	100	20	20	0'20	0'100	0'100	0'100
P6	7'50	7'50	150	30	30	0'30	0'150	0'150	0'150
P7	10	10	200	40	40	0'40	0'200	0'200	0'200
P8	20	20	400	80	80	0'80	0'400	0'400	0'400
P9	30	30	600	120	120	1'20	0'600	0'600	0'600

4.1.3. TRACTAMENT DE LES MOSTRES

En quant a les mostres, aquestes també han de ser sotmeses a un tractament previ al seu anàlisi per ICP. El primer que es fa es reservar 5 ml del total de la mostra recollida, aquest són necessaris per la determinació de mioinositols fosfats en l'orina, la qual s'explica posteriorment.

El volum restant de mostra es tracta primer ajustant el seu pH fins a 2 amb HCl 2 M, això per evitar la formació de precipitat al fons del tub. Una vegada s'ajusta el pH, s'agita la mostra amb l'ajuda d'un vòrtex per homogeneïtzar tot el contingut, seguidament es filtra a un nou tub amb un filtre de 45 µm. Una vegada filtrades, es realitzen dues dilucions de cada una de les mostres: una dilució amb factor 1:5 i una dilució amb factor 1:20.

El volum mínim de mostra per treballar amb l'ICP es d'uns 3 ml, per aquest motiu la dilució ha de permetre que el volum final sigui superior a aquest. La dilució es realitza amb HNO₃ 2%.

La col·locació de les mostres al ICP es mostren en la figura 8 i es tracta de fer passar primer els patrons i després les dilucions de les diferents mostres.

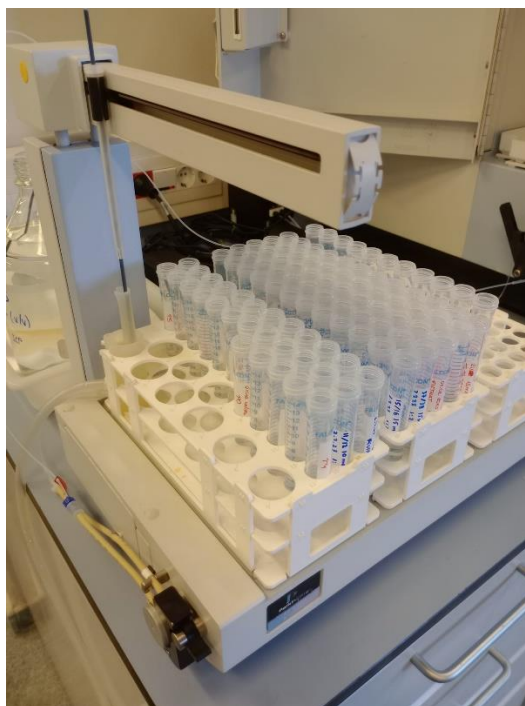


Figura 8. Mostres col·locades a les gradetes del ICP per ser analitzades

A més, s'ha de destacar que cada 10 mostres es col·loca un control, corresponent al patró P5, per poder controlar si hi ha contaminació entre mostres o si, pel contrari, el rentat es suficient i no hi ha contaminació.

3.3. DETERMINACIÓ DE MIOINOSITOLS FOSFATS EN ORINA

L'altra determinació realitzada en referència a les mostres d'orina és la de IPs. Aquesta determinació es realitza seguint les següents passes:

A) Pretractament de la mostra.

El volum de mostra que es requereix per la determinació de IPs és de 5 ml. Aquests es fiquen dins un tub de plàstic i se'ls afegeixen 5 ml d'EDTA 10 mM i 10 ml de H₂O miliQ. Després s'ajusta el pH a 6 amb HCl 0'1 M, es tapa el tub i es centrifuga a 3000 rpm durant 10 minuts. Finalment, el sobrenedant es traspassa a un altre tub i el precipitat es rebutja.

B) Adsorció amb resina.

El sobrenedant obtingut a l'etapa anterior s'ajusta fins pH = 3 i es transfereix a un vas de precipitats de 150 ml amb 0'125 g de resina aniònica AG1-X8. Aquest vas es col·loca a un agitador orbital i s'agita a 160 rpm durant 15 minuts, d'aquesta manera el fitat queda absorbit a la resina. Després dels 15 minuts, es transfereix tot el contingut del vas, amb cura, a una columna d'extracció en fase sòlida de 20 ml amb una frita.

C) Elució i rentat.

Es deixa que l'orina elueixi per gravetat i, una vegada ha eluït, es renta la resina amb 25 ml de HCl 100 mM durant 6 vegades, emprant un volum total de 150 ml. Aquest HCl s'afegeix amb una botella amb dispensador per així que la resina s'agiti amb l'addició. Després es renta la resina amb 2'5 ml d'H₂O miliQ dues vegades per rebutjar l'excés d'àcid.

Es tanquen les claus de les columnes d'extracció i es realitza l'elució del fitat mitjançant 5 extraccions amb 0'25 ml de NaCl 2 M cada una. Cada vegada que es fa una extracció s'ha d'agitar la columna durant 5 minuts a 180 rpm en l'agitador orbital.

D) Determinació colorimètrica de mioinositols fosfats pel mètode Al-XO

Per realitzar aquesta determinació colorimètrica es necessària la preparació d'una sèrie de dissolucions i patrons:

- **Xilenol Orange 4 mM:** es pesen 0'076 g i es dissolen en 25 ml d'H₂O miliQ.
- **Nitrat d'alumini nonahidrat 4 mM:** es pesen 0'0375 g i dissolen en 25 ml d'H₂O miliQ.
- **Tampó acètic/acetat 1,5 M a pH 5,2:** es pesen 12,3 g d'acetat sòdic anhidre i es dissolen en 90 ml d'H₂O miliQ. S'ajusta el pH i s'enrasa a 100 ml.
- **NaCl 2 M:** es pesen 118,88 g de NaCl i es dissolen a 1 l d'H₂O miliQ.
- **Fitat sòdic 1 mM en H₂O miliQ:** 0'06 g de fitat sòdic es dissolen en 50 ml d'H₂O miliQ.
- **Fitat sòdic 100 µM en NaCl 2 M:** 5 ml de la dissolució de fitat sòdic anterior es pipetegen i s'enrasen a 50 ml amb NaCl 2 M. A més, a partir d'aquesta dissolució es preparen 8 patrons amb concentracions de fitat creixents, els quals es mostren a la següent taula 2.

Taula 2: Patrons per la determinació de fitat urinari. Concentracions de fitat a cadascun

Patró	[Fitat] (µM)	V fitat 100 mM (µl)	V NaCl 2 M (ml)
P0	0	0	5
P1	2	100	4'90
P2	4	200	4'80
P3	7	350	4'65
P4	10	500	4'50
P5	12	600	4'40
P6	15	750	4'25
P7	18	900	4'10

D'altra banda, també es preparen els reactius R1 i R2 just abans de realitzar la determinació. Per preparar-los:

- **R1:** 1'2 ml de la dissolució de nitrat d'alumini nonahidrat 4 mM es mesclen amb 8'8 ml del tampó acètic/acetat.

- **R2:** 1'2 ml del xilenol orange 4 mM es mesclen amb 8'8 ml del tampó acètic/acetat.

Una vegada tot preparat, a una placa de 96 pouets, es mesclen 50 µl de R1 amb 250 µl de bé l'eluat o bé el patró. S'utilitza durant aquesta part una pipeta multicanal de 8 canals. S'espera 30 segons i s'afegeixen 50 µl de R2, s'agita el contingut dels pouets amb el pipeteig de la pipeta multicanal. Una vegada s'han omplert tots els pouets, tenint a les primeres files els patrons i a la resta els eluats, i ja agitats, es llegeix la placa després de 45 minuts a una longitud d'ona de 550 nm.

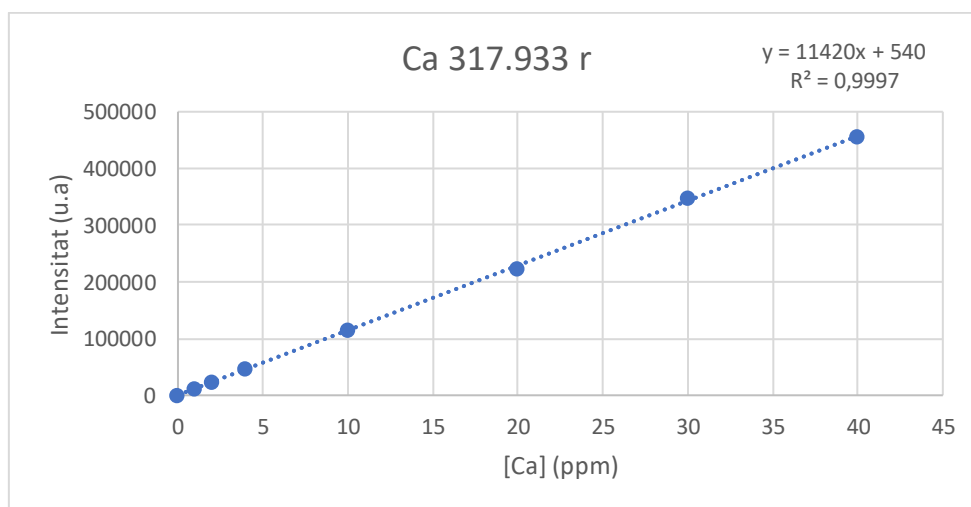
E) Càlcul de la concentració de mioinositols fosfats.

Per calcular la concentració de IPs a cada mostra es necessari dividir el valor de concentració que s'ha obtingut a la placa entre 4, ja que la mostra ha estat reconcentrada x4 durant l'elució.

4. RESULTATS

4.1. DETERMINACIÓ DE METALLS EN ORINA

Després de realitzar l'anàlisi de les diferents mostres per ICP-AES, es poden calcular les concentracions de cada metall per cada parella de rata i a cada temps (2, 5, 10 o 15 mesos). Primer de tot el que es fa es construir una recta de calibratge amb les lectures dels diferents patrons, com a exemple es mostra la gràfica 1 referent al calci per 2 mesos.



Gràfica 1: Recta de calibratge per la concentració de Calci (ppm) als 2 mesos

Amb aquesta recta de calibratge i els valors d'intensitat per les diferents mostres, interpolant aquests dins la recta, s'obtenen les concentracions de calci a les mostres diluïdes. Aplicant el factor de dilució, es coneixen les concentracions reals de calci en orina per les diferents parelles de rates. Aquest mateix procediment s'ha realitzat per tots els metalls, amb les mostres de tots els mesos i totes les parelles de rates.

Les concentracions es determinen fent servir la dilució 1:5 pel Fe, Cu, Zn i Mn i la dilució 1:20 per Ca, Mg i P.

Emprant el programa IBM SPSS Statistics, s'ha realitzat un anàlisi de les dades obtingudes, amb l'objectiu de detectar tant diferències intragrup per les concentracions de cada metall a diferents temps com diferències intergrup per les concentracions de cada metall al mateix temps. Tornant a l'exemple del calci, això seria comprovar si hi ha diferències dins el grup 1 (dieta Fe) a la concentració de calci de 2, 5, 10 i 15 mesos, a més de comprovar si hi ha diferències pel calci de cada mes entre els grups Fe, Fe+Phy, Phy i Ctrl.

Per l'anàlisi de les dades amb SPSS, es realitza la prova ANOVA per mesures repetides i, per aquells metalls en els que s'han detectat algunes diferències, es realitza un test LSD (Least Significant Difference) com a post-hoc per poder conèixer entre quins grups o mesos s'han trobat les diferències. El test LSD realitza comparacions entre parelles de dades, així s'ha pogut detectar entre quins dos conjunts de valors hi ha diferències significatives. D'altra banda, s'ha tingut també en compte el test d'esfericitat de Mauchly on, si $p > 0'05$, s'ha assumit l'esfericitat i el corresponent valor de significació. Si el test d'esfericitat de Mauchly mostra una $p < 0'05$, s'ha considerat la correcció de Greenhouse-Geisser.

Els resultats per cada un dels metalls, als diferents mesos i per cada un dels 4 grups s'han recollit en les taules 3, 4, 5, 6, 7 i 8 que es mostren a continuació.

Taula 3: Concentracions de Ca (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

	CALCI					
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	30 \pm 18	40 \pm 8	80 \pm 50	60 \pm 30	0'102	0'470
Grup 2 (n=5)	31 \pm 8,1	36 \pm 18	34 \pm 23	99 \pm 17 ^{a,b,c}	< 0'001	
Grup 3 (n=5)	30 \pm 13	40 \pm 15	44 \pm 18	80 \pm 30 ^{a,b}	0'031	
Grup 4 (n=5)	33 \pm 3,5	28 \pm 17	51 \pm 23	35 \pm 24	0'266	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos
 b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos
 c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

Taula 4: Concentracions de Mg (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

	MAGNESI					
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	360 \pm 180	130 \pm 120 ^a	320 \pm 100	310 \pm 60 ^b	0'023	0'184
Grup 2 (n=5)	390 \pm 80	375 \pm 170	570 \pm 120 ^{a,b}	550 \pm 90 ^{a,b}	0'002	
Grup 3 (n=5)	360 \pm 110	230 \pm 180	280 \pm 110	270 \pm 40	0'341	
Grup 4 (n=5)	340 \pm 90	290 \pm 240	430 \pm 280	420 \pm 110	0'445	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos
 b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos
 c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

Taula 5: Concentracions de P (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

FÒSFOR						
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	2780 \pm 580	2310 \pm 420	1400 \pm 400 ^{a,b}	1560 \pm 390 ^a	0'002	0'919
Grup 2 (n=5)	2630 \pm 590	2445 \pm 1190	2070 \pm 440	2240 \pm 240	0'584	
Grup 3 (n=5)	2600 \pm 730	2330 \pm 1080	1460 \pm 550	1670 \pm 610	0'084	
Grup 4 (n=5)	2620 \pm 700	2620 \pm 770	1890 \pm 840 ^b	2080 \pm 680	0'331	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos

b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos

c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

Taula 6: Concentracions de Fe (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

FERRO						
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	0'131 \pm 0'021	0'33 \pm 0'21	0'45 \pm 0'16 ^a	0'58 \pm 0'24 ^{a,c}	0'008	0'727
Grup 2 (n=5)	0'16 \pm 0'11	0'27 \pm 0'12 ^a	0'48 \pm 0'11 ^a	0'78 \pm 0'41 ^a	0'004	
Grup 3 (n=5)	0'12 \pm 0'13	0'20 \pm 0'06	0'41 \pm 0'04 ^{a,b}	0'62 \pm 0'31 ^{a,b}	0'003	
Grup 4 (n=5)	0'10 \pm 0'07	0'20 \pm 0'09	0'48 \pm 0'15 ^{a,b}	0'50 \pm 0'10 ^{a,b}	< 0'001	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos

b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos

c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

Taula 7: Concentracions de Zn (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

	ZINC					
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	0'26 \pm 0'26	0'24 \pm 0'10	0'11 \pm 0'04 ^b	0'20 \pm 0'19	0'333	0'333
Grup 2 (n=5)	0'22 \pm 0'13	0'23 \pm 0'07	0'11 \pm 0'03	0'44 \pm 0'30	0'370	
Grup 3 (n=5)	0'20 \pm 0'06	0'16 \pm 0'12	0'20 \pm 0'23	0'22 \pm 0'17	0'746	
Grup 4 (n=5)	0'23 \pm 0'11	0'13 \pm 0'04	0'26 \pm 0'24	0'17 \pm 0'12	0'367	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos
 b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos
 c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

Taula 8: Concentracions de Cu (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) pels diferents grups i mesos, amb els p-valor ANOVA intragrup i intergrup per mesures repetides. Fent servir el test LSD com a test post-hoc per comparacions múltiples.

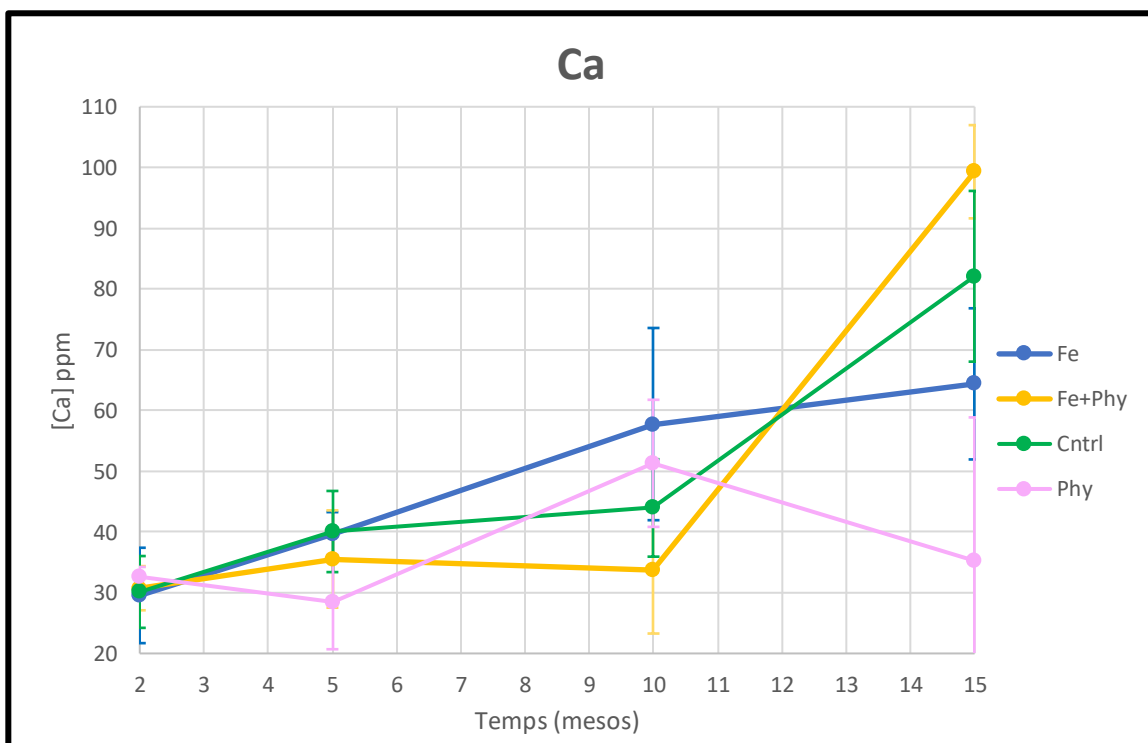
	COURE					
	2m	5m	10m	15m	p-valor intragrup	p-valor intergrup
Grup 1 (n=5)	0'36 \pm 0'17	0'55 \pm 0'19 ^a	0'41 \pm 0'10	0'50 \pm 0'20	0'085	0'127
Grup 2 (n=5)	0'30 \pm 0'06	0'40 \pm 0'11	0'55 \pm 0'09 ^{a,b}	0'53 \pm 0'17	0'025	
Grup 3 (n=5)	0'30 \pm 0'09	0'42 \pm 0'13	0'39 \pm 0'17	0'39 \pm 0'14	0'534	
Grup 4 (n=5)	0'30 \pm 0'04	0'40 \pm 0'09	0'36 \pm 0'19	0'30 \pm 0'08	0'655	

a: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos
 b: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 5 mesos
 c: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 10 mesos

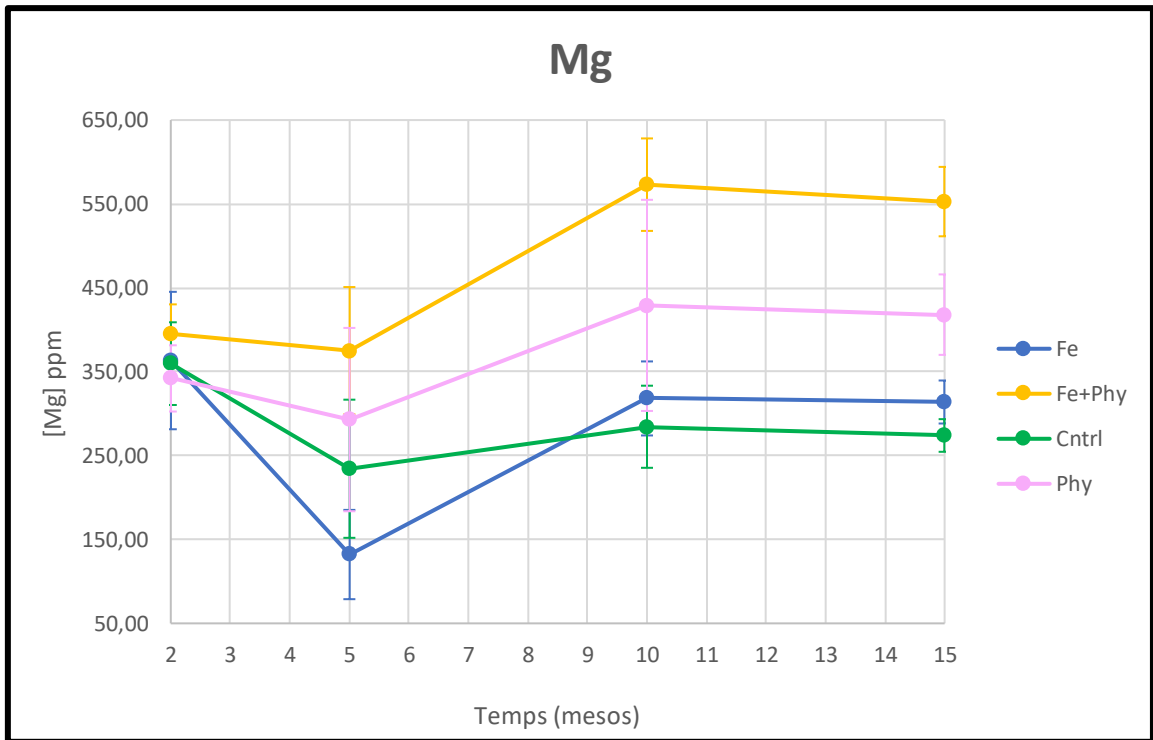
Com es pot observar a les taules 3 – 8, no s'han trobat diferències entre els 4 grups per cap dels metalls. Sí que s'han trobat diferències intragrup en alguns casos, les quals es troben indicades amb el superíndex a, b i/o c, segons entre quins dels mesos siguin les diferències trobades. D'aquesta manera, s'ha observat com l'excreció urinària d'alguns dels elements analitzats ha augmentat significativament amb el temps.

S'ha de destacar que, encara que s'ha realitzat l'anàlisi pel manganès, la seva detecció no ha estat possible degut a que les concentracions eren molt baixes, inclús inferiors als límits de quantificació per la majoria de mostres recollides. S'ha decidit, per tant, que les dades referents al manganès s'havien de rebutjar.

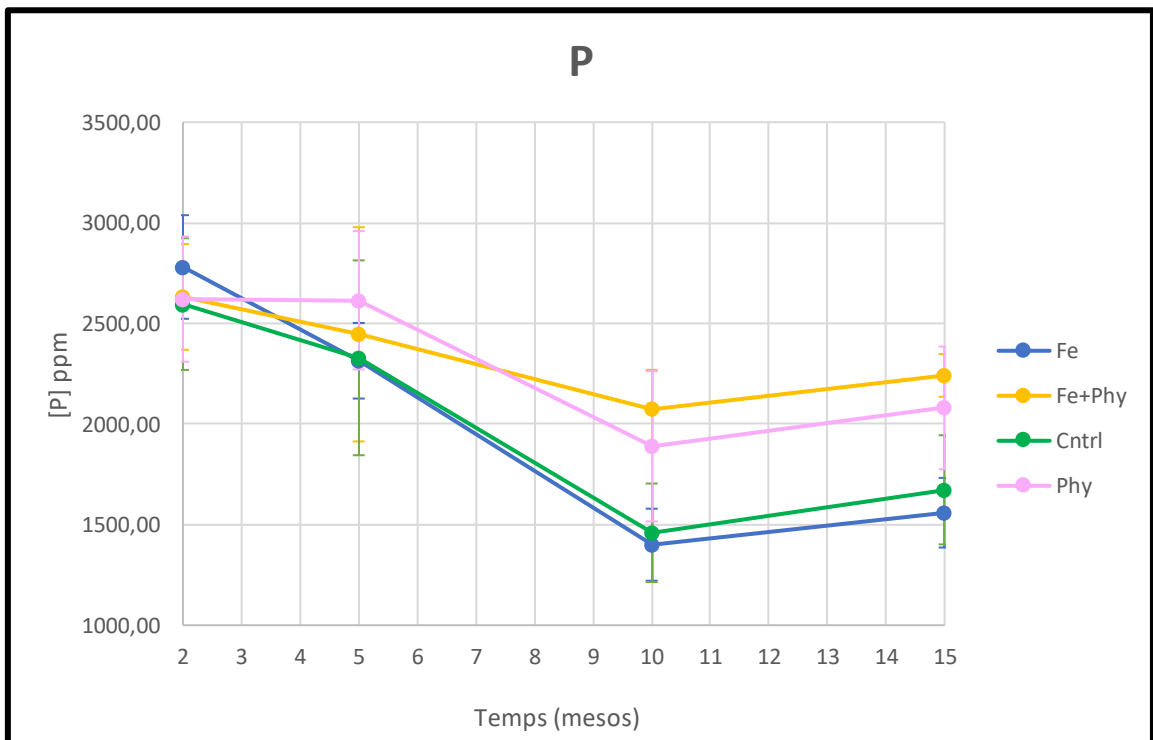
S'ha considerat necessari representar gràficament els valors anteriorment mostrats per tal d'interpretar visualment les tendències de les concentracions de cada analit amb el temps, segons cada un dels grups de dieta.



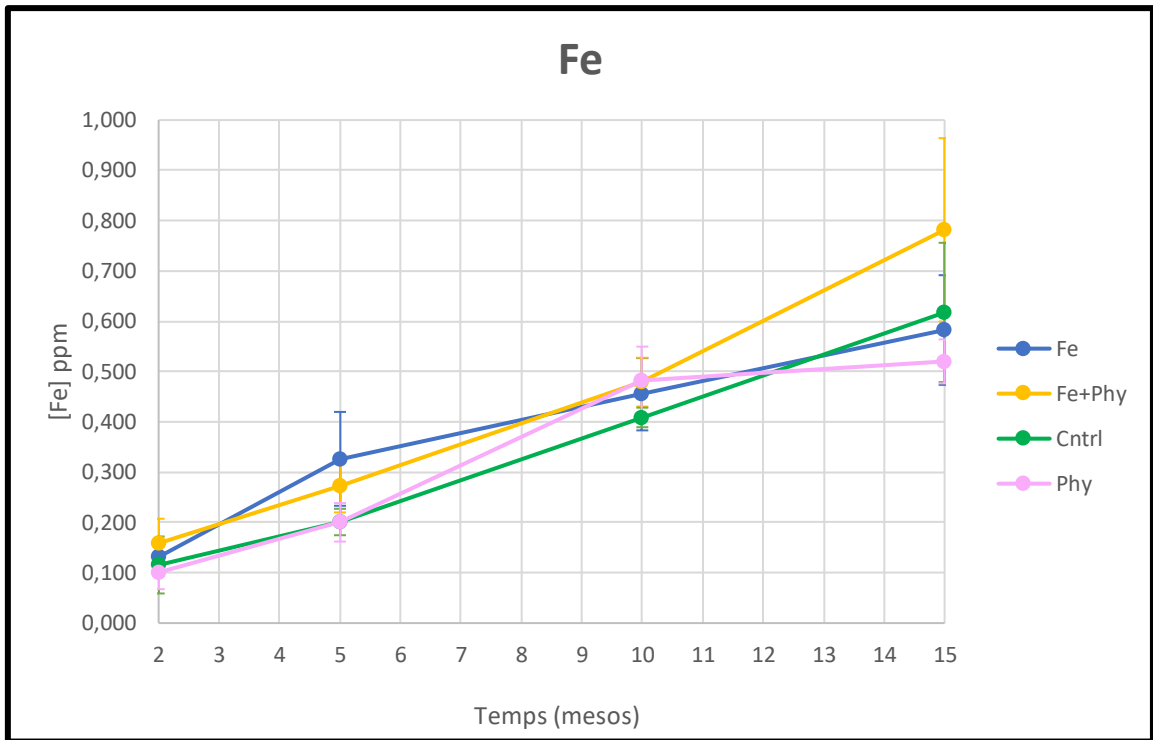
Gràfica 2: Concentracions de Ca (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.



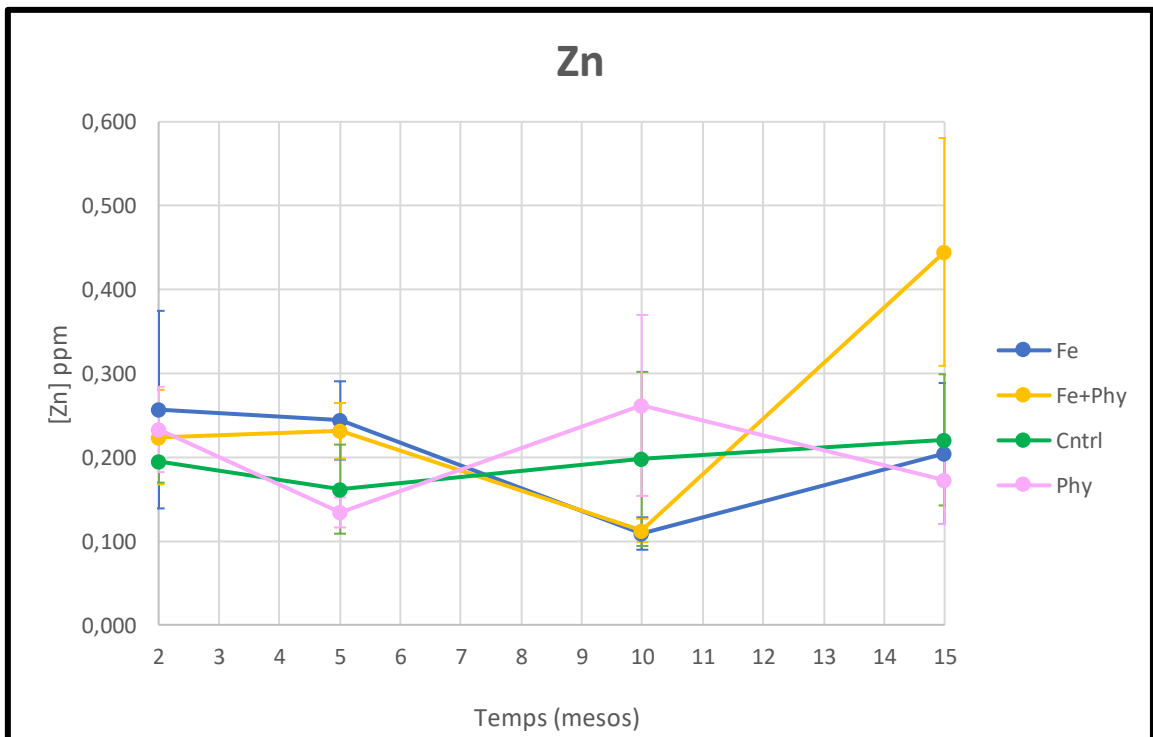
Gràfica 3: Concentracions de Mg (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.



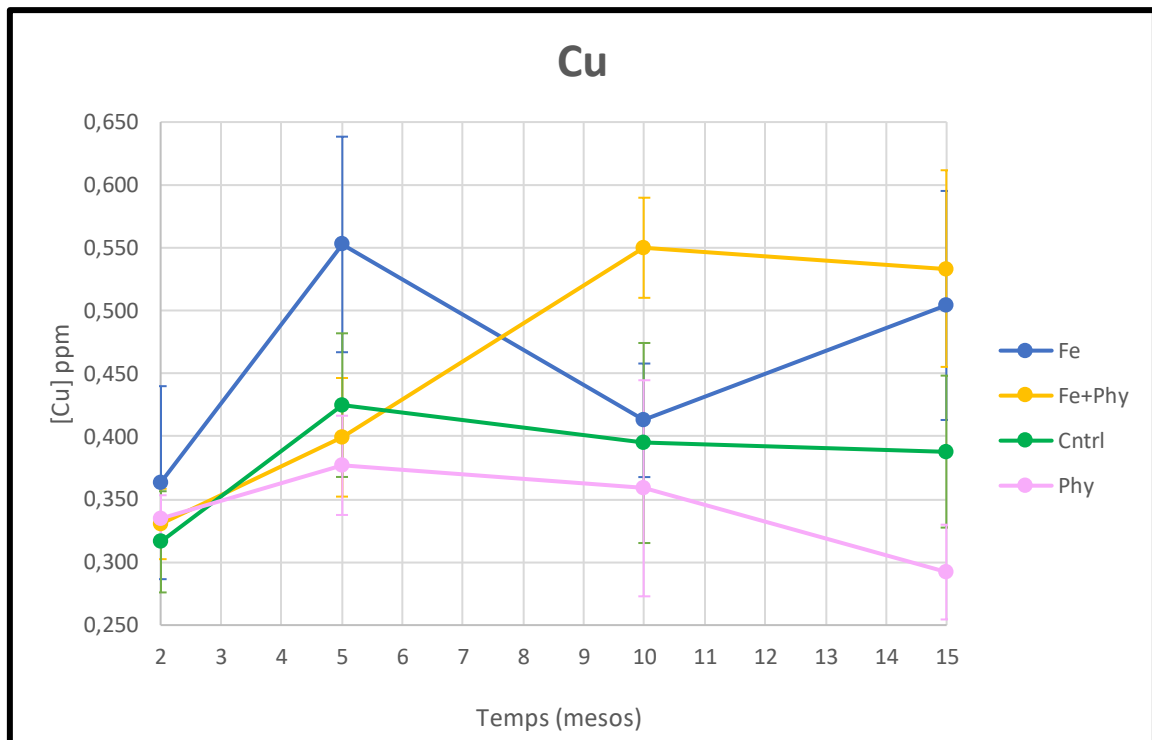
Gràfica 4: Concentracions de P (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.



Gràfica 5: Concentracions de Fe (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.



Gràfica 6: Concentracions de Zn (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.



Gràfica 7: Concentracions de Cu (ppm) (mitjana \pm desviació estàndard) per cada un dels grups de dieta als diferents mesos.

Analitzat tant les dades mostrades a les taules 3 – 8 com les gràfiques 2 – 7, es pot establir que:

- **Calci** \rightarrow en general la tendència és creixent, a excepció del grup 4 als 15 mesos, on es pot observar una disminució de la concentració. D'altra banda, tant el grup 2 com el 3 mostren un augment molt pronunciat als 15 mesos. De fet, per aquests dos grups s'han trobat diferències significatives entre la concentració de 15 mesos i les de 2, 5 i 10 mesos pel cas del grup 2 i amb les de 2 i 5 mesos al cas del grup 3.

- **Magnesi** \rightarrow inicialment les concentracions disminueixen respecte a les presentades abans del canvi de dieta, als 10 mesos tornen a augmentar i es mantenen gairebé constants als 15 mesos. El grup del Fe (grup 1) és el que presenta una disminució més pronunciada. S'han trobat, a més, diferències significatives en diversos casos, destacant les del grup 3 entre les concentracions de 10 i 15 mesos amb les de 2 i 5 mesos.

- **Fòsfor** \rightarrow al cas del fòsfor les concentracions han disminuït entre els 2 i 10 mesos, mentre que als 15 mesos es mostra una lleu pujada. També s'han detectat certes diferències significatives indicades a la taula 5.

- **Ferro** \rightarrow la tendència general és un augment progressiu durant tots els mesos i per tots els grups, essent el grup 2 (Fe+Phy) el que més ferro ha excretat als 15 mesos. De fet, el ferro és el metall que més diferències significatives intragrup ha mostrat.

- **Zinc** → pel cas del zinc no es troba una tendència igual per tots els grups. El grup 1 mostra una gran disminució als 10 mesos, que és compensada lleugerament als 15 mesos; pel grup 2 el zinc també disminueix als 10 mesos i als 15 mesos s'observa un gran augment; el grup 3 (control) és l'únic que es manté pràcticament constant per tot l'interval d'estudi; i el grup 4 ha mostrat pujades i davallades dels nivells de zinc excretats.

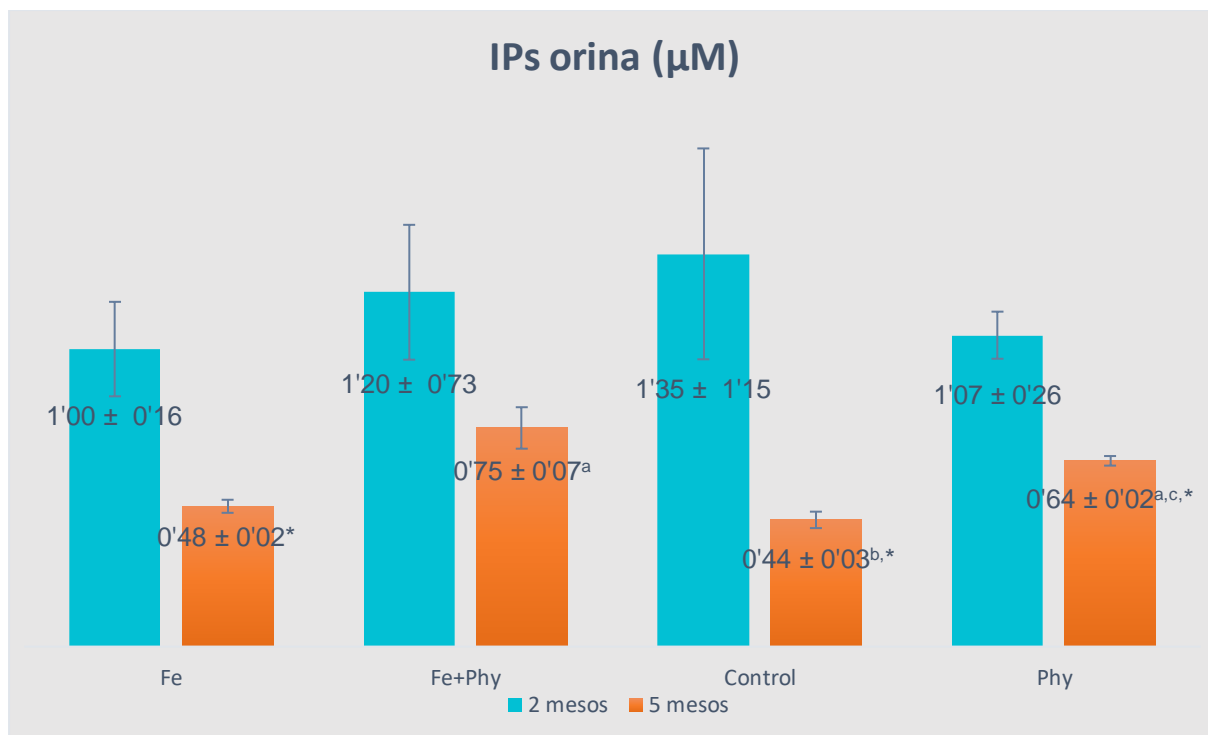
- **Coure** → en aquest cas es fa evident que les dietes presenten una contribució de 10 mg/kg de coure, ja que entre els 5 mesos i els 2 mesos es mostra una pujada molt considerable del coure excretat. Pel grup 1 aquesta pujada ve seguida d'una disminució als 10 mesos i als 15 mesos es torna a recuperar parcialment la concentració excretada; al grup 2, el la concentració de coure mostra un augment també als 10 mesos, que es manté constant als 15 mesos; el grup 3 presenta una lleugera disminució dels nivells de 5 mesos mentre que al grup 4 aquesta disminució dels nivells de coure excretat es fan més evidents i pronunciats.

4.2. DETERMINACIÓ DE MIOINOSITOLS FOSFATS EN ORINA

En quant a la determinació de IPs en orina, aquesta s'ha realitzat per mostres de 2 i 5 mesos, essent les mostres de 2 mesos les agafades abans del canvi de dieta.

Amb els valors obtinguts de concentracions de IPs, s'han realitzat els càlculs de les seves desviacions estàndard i la prova t-Student per determinar si hi ha o no diferències significatives tant intra com intergrup. Amb això es vol comprovar si la concentració de fitat excretat entre els 2 i 5 mesos es igual dins cada grup i si, pel mateix període de temps (2 o 5 mesos), hi ha diferències en l'excreció de fitat entre els diferents grups de dietes.

Així, s'ha comprovat que el grup 2 (Fe+Phy) és l'únic que no presenta diferències significatives entre els valors de fitat excretat als 2 i als 5 mesos, mentre que la resta de grups sí que en presenten. Dins de cada grup: el grup 2 (Fe+Phy) presenta diferències significatives amb el grup 1 (Fe), el grup 3 (Control) mostra diferències significatives amb el grup 2 i, d'altra banda, el grup 4 (Phy) en presenta diferències significatives amb els grups 1 i 3.



Gràfica 8: Concentració de IPs (µM) (mitjana ± desviacions estàndard) per les mostres de 2 i 5 mesos. S'ha realitzat la prova t-Student per a mostres relacionades per comprovar si hi ha diferències entre les mostres de 2 i 5 mesos on *: $p < 0'05$ vs valor corresponent als 2 mesos. També s'ha comprovat la presència de diferències significatives entre els diferents grups amb la prova ANOVA fent servir LSD com a test post-hoc, de tal manera que a: $p < 0'05$ vs valor corresponent al grup 1 (Fe); b: $p < 0'05$ vs valor corresponent al grup 2 (Fe+Phy); i c: $p < 0'05$ vs valor corresponent al grup 3 (Control).

5. CONCLUSIONS

Des del moment en que es va descobrir el paper del ferro en el desenvolupament o l'aparició de les NDD, s'ha establert com a objectiu o com a mètode d'actuació sobre la neurodegeneració el desenvolupament d'un quelant del ferro que sigui específic, efectiu, amb una fàcil administració i sense causar efectes secundaris. Encara que diverses substàncies com la DFO o la DFP han demostrat la seva utilitat en la quelació del ferro, els estudis realitzats en referència a la seva eficàcia front malalties com la AD o el PD, no han mostrat encara resultats determinants. És per aquest motiu pel qual hi ha grans esforços en l'estudi d'altres substàncies que puguin actuar com a quelants, com és el cas del fitat (IP6).

Tal i com ja s'ha comentat amb anterioritat, hi ha diverses evidències i estudis que mostren la capacitat del IP6 per formar complexos metàl·lics amb el ferro i disminuir així tant la seva biodisponibilitat per participar en reaccions de Fenton com la possibilitat de que es formin acumulacions d'aquest en teixits com el cor, fetge o cervell. Aquests dos fets són els aspectes claus en l'actuació del fitat com a protector davant els processos de neurodegeneració.

Arrel dels resultats obtinguts a l'estudi realitzat per Grases et al. (2004), els quals mostraven diferències significatives en les quantitats de ferro cerebral entre les rates alimentades amb una dieta rica en fitat i aquelles alimentades amb una dieta sense fitat, es pogué comprovar que l'efecte del fitat damunt l'acumulació de ferro al cervell és evident.

Amb l'elaboració d'aquesta tesi de final de grau s'ha volgut realitzar un estudi prospectiu en un model de rata envellida, basat en els resultats mencionats de l'estudi de Grases et al. (2004). En aquest cas, els grups de treball han estat 4, cadascun amb una dieta diferent (Fe, Fe+Phy, Phy i Control) per tal d'avaluar diversos aspectes: l'efecte de la ingesta d'una dieta rica en ferro, si aquesta provoca acumulacions de ferro als teixits o no; l'efecte de la ingesta de fitat (IP6) en absència de ferro, comprovar si aquest fitat s'acumula a l'organisme o si s'excreta per l'orina; i avaluar també l'efecte d'una dieta combinada de ferro i fitat, comprovar si realment el fitat es capaç de quelar el ferro i excretar-lo per via urinària, tot això comparant amb un grup control que manté una dieta equilibrada basada en la dieta mediterrània.

A partir dels resultats obtinguts per l'anàlisi de les mostres d'orina amb la tècnica ICP-AES, recollits a les taules 3 – 8 i representats a les gràfiques 2 – 7, es pot concloure que no s'han observat diferències significatives entre els diferents grups de dieta durant els diferents períodes d'anàlisi. Observant la gràfica 5 sí que es pot veure una tendència clara en l'augment de l'excreció del ferro, sobretot al grup que ingeria la dieta rica en ferro i fitat, encara que aquesta diferència amb la resta de grups no ha resultat lo suficientment elevada com per arribar a ser significativa. El fet de no haver trobat diferències significatives en orina realment no és sorprenent ja que, com s'ha comentat amb anterioritat, la via d'excreció principal de l'excés de ferro realment no és la urinària sinó que és a través de les femtes. De fet, com que l'excreció per via fecal és la que s'esperava que fos la principal, les femtes dels diferents grups també s'han recollit, encara que no ha estat matèria d'aquest treball el seu anàlisi i tractament. D'altra banda, diversos òrgans de les rates seran també examinats i tractats per quantificar la possible presència dels diferents analits (Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn) en ells, degut a que s'han pogut format acumulacions en aquests òrgans dels diferents metalls. Cal destacar, a més, que aquests resultats obtinguts es troben en concordança amb els estudis previs que indiquen que una dieta rica en fitat no té cap efecte negatiu sobre la biodisponibilitat mineral sempre i quan es segueixi una dieta sana i equilibrada amb un consum mineral adequat.

En quant a la determinació dels mioinositols fosfats en orina, tots els grups exceptuant el 2 (Fe+Phy) han mostrat diferències significatives entre els IPs excretats als 2 mesos i els excretats als 5 mesos. Això és degut a que la dieta que les rates ingerien prèvia a l'inici de l'estudi era molt rica en fitat, en començar l'estudi i eliminar el fitat de les seves dietes, els grups 1 i 3 han mostrat disminucions molt significatives en els nivells de fitat excretat, mentre que el grup 4 no ha mostrat unes diferències tan grans (encara que sí que han estat

significatives) degut a que la seva nova dieta sí que contenia fitat, encara que en quantitats menors que la dieta preestudi. És necessari destacar també que el mètode colorimètric pel qual s'ha determinat el IP6 en l'orina mostra dificultats per la determinació de les mostres hidrolitzades del IP6 (IP5, IP4, IP3, IP2 i IP1).

Com a conclusió general, es pot afirmar que no s'han pogut observar diferències significatives en els metalls excretats entre les diferents dietes. Encara i així, sí que s'han pogut observar diferències dins els propis grups entre l'excreció als diferents mesos, degudes principalment a l'envelliment de les rates. En quant als mioinositols fosfats, es pot afirmar que s'han observat diferències significatives entre les excrecions urinàries de IPs de 2 i 5 mesos pel grup amb una dieta enriquida en fitat i ferro, mentre que pels altres grups les diferències no són significatives.

S'ha de tenir en compte també que aquest estudi realment forma part d'un estudi més gran que compren l'anàlisi dels òrgans de les rates, del seu comportament i de les restes fecals. Amb l'estudi complet dels resultats de determinacions urinàries, fecals i amb les quantificacions als òrgans i els estudis de comportament, es podrà avaluar de forma completa i total l'efecte de la ingesta diària de fitat pel que fa a la formació de AGEs i la NDD.

6. BIBLIOGRAFIA

Albers, M. W., Gilmore, G. C., Kaye, J., Murphy, C., Wingfield, A., Bennett, D. A., Boxer, A. L., Buchman, A. S., Cruickshanks, K. J., Devanand, D. P., Duffy, C. J., Gall, C. M., Gates, G. A., Granholm, A. C., Hensch, T., Holtzer, R., Hyman, B. T., Lin, F. R., McKee, A. C., ... Zhang, L. I. (2015). At the interface of sensory and motor dysfunctions and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(1), 70–98. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2014.04.514>

Anderson, G. J. (2007). Mechanisms of iron loading and toxicity. *American Journal of Hematology*, 82(12 Suppl), 1128–1131. <https://doi.org/10.1002/AJH.21075>

Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., ... Bordet, R. (2014). Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 195. <https://doi.org/10.1089/ARS.2013.5593>

Erdman, J. W. (1979). Oilseed phytates: Nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(8), 736–741. <https://doi.org/10.1007/BF02663052/METRICS>

- Grases, F., Costa-Bauzá, A., Berga, F., Gomila, R. M., Martorell, G., & Martínez-Cignoni, M. R. (2019). Intake of myo-inositol hexaphosphate and urinary excretion of inositol phosphates in Wistar rats: Gavage vs. oral administration with sugar. *PloS One*, *14*(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0223959>
- Grases, F., Costa-Bauzá, A., Berga, F., Rodríguez, A., Gomila, R. M., Martorell, G., & Martínez-Cignoni, M. R. (2018). Evaluation of inositol phosphates in urine after topical administration of myo-inositol hexaphosphate to female Wistar rats. *Life Sciences*, *192*, 33–37. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.11.023>
- Grases, F., Simonet, B. M., March, J. G., & Prieto, R. M. (2000). Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU International*, *85*(1), 138–142. <https://doi.org/10.1046/J.1464-410X.2000.00324.X>
- Grases, F., Simonet, B. M., Perelló, J., Costa-Bauzá, A., & Prieto, R. M. (2004). Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, *17*(4), 229–234. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(04\)80023-3](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(04)80023-3)
- Kamal, H., Tan, G. C., Ibrahim, S. F., Shaikh, M. F., Mohamed, I. N., Mohamed, R. M. P., Hamid, A. A., Ugasman, A., & Kumar, J. (2020). Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 282. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00282/BIBTEX>
- Liu, G., Ou, S., Cui, H., Li, X., Yin, Z., Gu, D., & Wang, Z. (2021). Head Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, *55*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1159/000510987>
- López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J. M. P., Madeo, F., & Kroemer, G. (2016). Metabolic Control of Longevity. *Cell*, *166*(4), 802–821. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.07.031>
- Mellanby, E. (1949). The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate. *The Journal of Physiology*, *109*(3–4), 488–533. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1949.SP004411>
- Pujol, A., Sanchis, P., Grases, F., & Masmiquel, L. (2023). Phytate Intake, Health and Disease: “Let Thy Food Be Thy Medicine and Medicine Be Thy Food.” *Antioxidants*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12010146>

- Ritchie, C. W., Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Kiers, L., Cherny, R., Li, Q. X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E., & Masters, C. L. (2003). Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Archives of Neurology*, *60*(12), 1685–1691. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.60.12.1685>
- Sanchis, P., Rivera, R., Berga, F., Fortuny, R., Adrover, M., Costa-Bauza, A., Grases, F., & Masmiquel, L. (2018). Phytate Decreases Formation of Advanced Glycation End-Products in Patients with Type II Diabetes: Randomized Crossover Trial. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-27853-9>
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53* Suppl 2(SUPPL. 2), S330–S375. <https://doi.org/10.1002/MNFR.200900099>
- Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, *9*(4), 315–325. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90006-5)
- Vasca, E., Materazzi, S., Caruso, T., Milano, O., Fontanella, C., & Manfredi, C. (2002). Complex formation between phytic acid and divalent metal ions: a solution equilibria and solid state investigation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *374*(1), 173–178. <https://doi.org/10.1007/S00216-002-1469-6>
- Vicente Miranda, H., El-Agnaf, O. M. A., & Outeiro, T. F. (2016). Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *31*(6), 782–790. <https://doi.org/10.1002/MDS.26566>
- Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., & Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(11), 863–873. <https://doi.org/10.1038/NRN1537>