



**Máster en Investigación Biomédica Traslacional**

**Trabajo Fin de Máster**

**Modificaciones ultraestructurales y metabólicas en riñón de ratones de edad avanzada que sobreexpresan citocromo *b<sub>5</sub>* reductasa 3**

**Autor:** Miguel Pérez Rodríguez

**Fecha:** septiembre 2020



# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba,  
Campus Universitario Rabanales, Edificio Severo Ochoa, planta 3ª. Campus de  
Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3).

Grupo BIO-276 “*Biomembranas, antioxidantes y estrés oxidativo*”

Línea de investigación “Sobreexpresión de CYB5R3, dieta y longevidad en un  
modelo transgénico de ratón”

Trabajo Fin de Máster

## **Modificaciones ultraestructurales y metabólicas en riñón de ratones de avanzada edad que sobreexpresan citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa 3**

El director,

El codirector,

El alumno,

José Manuel Villalba Montoro

José Antonio González Reyes

Miguel Pérez Rodríguez



# Índice

Resumen .....	4
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>Adaptación del TFM debido a la situación excepcional provocada por la COVID-19.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. El envejecimiento.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Teorías del envejecimiento. ....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. ¿Es posible hacer frente al envejecimiento? .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. La autofagia y el envejecimiento.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5. La apoptosis y el envejecimiento.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6. CYB5R3: modelo genético del estudio.....</b>	<b>15</b>
<b>1.7. El riñón y el envejecimiento. ....</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Animales.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Procesado de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Observación y toma de imágenes de las muestras.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Estudio planimétrico.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Determinación de marcadores específicos mediante inmunodetección Western Blot.</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5. Análisis estadístico.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Análisis ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1. Análisis planimétrico de las figuras de autofagia de túbulo contorneado proximal.</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1.2. Análisis planimétrico de las mitocondrias de túbulo contorneado proximal.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3. Análisis planimétrico de estructuras glomerulares. ....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Análisis de expresión de proteínas.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>31</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>37</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>44</b>
<b>Declaración de actividades realizadas durante el TFM.....</b>	<b>44</b>
<b>Geles marcadores bioquímicos analizados mediante Western Blot.....</b>	<b>44</b>
<b>Figuras complementarias. ....</b>	<b>46</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura del TCP.....	23
Figura 2. Estructura del glomérulo renal. ....	24
Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de figuras de autofagia.....	25
Figura 4. Análisis planimétrico de las figuras de autofagia. ....	25
Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de las poblaciones mitocondriales.....	26
Figura 6. Análisis planimétrico de las mitocondrias de TCP. ....	26
Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de la barrera de filtración glomerular. 27	
Figura 8. Resultados de análisis planimétrico de las estructuras glomerulares. ....	27
Figura 9. Análisis de LC3. ....	28
Figura 10. Análisis de mTOR.....	29
Figura 11. Análisis de VDAC. ....	29
Figura 12. Análisis de los complejos mitocondriales.....	30
Figura 13. Análisis de Apaf-1.....	31
Figura 14. Gel LC3 AB. ....	44
Figura 15. Gel VDAC.....	44
Figura 16. Gel Complejos mitocondriales.....	45
Figura 17. Gel mTOR. ....	45
Figura 18. Gel Apaf-1.....	45
Figura 19. Irregularidades en la membrana basal glomerular del riñón. ....	46
Figura 20. Rangos de edad representativos para ratones C57BL/6J y comparativa con rangos de edades representativos de humanos. ....	46
Figura 21. Esquema del proceso autofágico en mamíferos. ....	47
Figura 22. Regulación de la autofagia por el complejo mTOR.....	47
Figura 23. Cascada de señalización de la apoptosis.....	47

## Índice de tablas

Tabla 1. Listado de anticuerpos usados en el estudio. ....	46
--	----

## Resumen

El estudio de los mecanismos implicados en el envejecimiento es uno de los objetivos de numerosas investigaciones en todo el mundo. Especialmente, aquellas que se realizan sobre modelos de mamíferos cobran especial relevancia por su posible traslación a humanos en el futuro. Así, muchos de esos estudios se llevan a cabo no solo para intentar aumentar la longevidad de las especies, sino también para conseguir un envejecimiento más saludable. En este sentido, se han desarrollado diversas intervenciones en roedores y otros mamíferos que ayudan a conocer a fondo el proceso de envejecimiento. Entre ellas, las intervenciones genéticas han mostrado ser de gran utilidad para tal fin. Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de la enzima citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa 3 (CYB5R3) previene la aparición de tumores, mejora muchas funciones fisiológicas, promueve un envejecimiento más saludable y aumenta de forma significativa la longevidad en ratones transgénicos.

En el presente Trabajo de Fin de Máster, se han estudiado modificaciones ultraestructurales y funcionales en riñón (órgano que se considera marcador clave de envejecimiento) en ratones de edad avanzada (24 meses) transgénicos que sobreexpresan CYB5R3 en comparación con ratones control no modificados de la misma edad y fondo genético. Así, se han estudiado posibles modificaciones estructurales en diversos componentes de la barrera de filtración glomerular (grosor de la lámina basal glomerular y tamaño de las prolongaciones podocitarias) y de los túbulos contorneados proximales (prestando especial atención a la morfología mitocondrial y a las figuras de autofagia), así como a posibles cambios en los patrones de expresión de proteínas relacionadas con los procesos de autofagia y dinámica mitocondrial. De igual forma, para analizar el efecto del envejecimiento se han realizado estudios de expresión proteica en los que también se incluían animales jóvenes/adultos (7 meses de edad), para así comparar su perfil de expresión con el de los animales de edad avanzada. Nuestros resultados apoyan la existencia de cambios beneficiosos en varios aspectos de la fisiología y estructura renal por sobreexpresión de CYB5R3 en ratones de edad avanzada.

**Palabras clave:** envejecimiento; NADH citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa 3; ratón; riñón; transgénesis.

# 1. Introducción

El presente trabajo ha sido desarrollado en la sección de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, concretamente en el Grupo de Investigación BIO-276 “*Biomembranas, antioxidantes y estrés oxidativo*”. Durante los últimos años, la labor investigadora del grupo se ha centrado en el estudio de diversos aspectos del envejecimiento en modelos animales y celulares. Entre sus principales líneas destacan el estudio de la coenzima Q, el efecto del componente lipídico de la dieta sobre la longevidad y el envejecimiento saludable en condiciones de restricción calórica (RC) y, más recientemente, de la sobreexpresión de la enzima citocromo *b<sub>5</sub>* reductasa 3 (CYB5R3) como posible mimético de algunos de los efectos anti-envejecimiento de la RC. Este Trabajo Fin de Máster contempla estudios centrados en animales de edad avanzada (24 meses), en los que se pretende analizar el efecto que la sobreexpresión de la CYB5R3 provoca en ellos a nivel de riñón. Adicionalmente, en el apartado de análisis de expresión de proteínas, se introducen también animales jóvenes (7 meses), para así estudiar de manera comparativa el efecto que provoca el envejecimiento, tanto en los animales silvestres como en los transgénicos.

## **Adaptación del TFM debido a la situación excepcional provocada por la COVID-19.**

La situación de crisis sanitaria provocada por la COVID-19 durante el curso 2019/2020, en la que actualmente aún nos encontramos, ha supuesto un enorme reto para toda la sociedad, afectando a todos los niveles de la misma, desde el punto de vista del ámbito político, social, económico y, también, educativo. Con relación a este último punto, la educación universitaria ha tenido que realizar una adaptación a contrarreloj de todo su plan de trabajo, afectando, entre otros, tanto al desarrollo de sus clases y actividades como al desarrollo de los Trabajos de Fin de Máster, entre los cuales se incluye el presente.

El diseño inicial de este TFM contemplaba realizar todos los análisis planimétricos ultraestructurales, así como los análisis de expresión de proteína tanto en animales de edad avanzada (24 meses) como en animales jóvenes/adultos (7 meses). Sin embargo, debido a la situación mencionada, el pasado día 13 de marzo de 2020 se tomó la decisión de acabar con las actividades presenciales universitarias, ocasionando también

la paralización de toda actividad de laboratorio planteada para este trabajo. Es por este motivo por el que aquí solo se recoge el análisis ultraestructural de los animales de edad avanzada, el cual había sido llevado a cabo en primer lugar por el interés del proyecto en estudiar los efectos de la sobreexpresión de CYB5R3 en el envejecimiento, no dando tiempo por tanto a realizar un estudio análogo sobre los animales jóvenes. De igual forma, esta situación también ocasionó que no se pudiera profundizar en el análisis de más marcadores proteicos de interés, obligándonos a utilizar solo los resultados obtenidos hasta ese momento. Complementario a este apartado, véase en ANEXO, la sección “Declaración de actividades realizadas durante el TFM”.

### **1.1. El envejecimiento.**

El envejecimiento es un proceso dependiente del tiempo caracterizado por una pérdida progresiva de la funcionalidad de un organismo. Este proceso degenerativo, aunque no considerado en sí mismo una enfermedad, provoca que el organismo sea más susceptible al estrés, a desarrollar enfermedades y a la muerte [1].

Entre los cambios más importantes que experimentan los individuos de avanzada edad encontramos la reducción de la fuerza muscular, provocada principalmente por una reducción de la masa muscular esquelética (fenómeno conocido como sarcopenia del envejecimiento), la pérdida de la función renal, debida al deterioro de las nefronas, la deficiencia en las hormonas sexuales, que conduce al aumento de las tasas de demencia, osteoporosis, síndrome cardiometabólico y aterosclerosis, y las alteraciones del sistema cardiovascular, como una reducción del número de miocitos y un aumento de su masa, provocando hipertrofia cardíaca así como rigidez, dilatación y alargamiento de las arterias. Asimismo, se pueden producir otras muchas situaciones que, en última instancia, desencadenan eventos cardiovasculares, hipoperfusión de órganos como el cerebro (también relacionado con la perforación de pequeños vasos cerebrales) y el aumento de la resistencia vascular, lo que también se relaciona con la demencia. Todo ello, unido a los diferentes hábitos de vida, muy relevantes en humanos (tipo de dieta e ingesta calórica diaria, actividad física, consumo de tabaco y otras drogas), convierten el envejecimiento en un fenómeno de enorme complejidad [2].

### **1.2. Teorías del envejecimiento.**

Dada su complejidad, son muchas las teorías que han surgido alrededor del envejecimiento con el objetivo de explicar sus causas, contabilizando hasta 300 diferentes

[3]. Sin embargo, cada vez hay más consenso en que el envejecimiento es un proceso multifactorial que abarca genes, proteínas, radicales libres, el rendimiento de los sistemas de mantenimiento y reparación, el entorno y el azar [4]. En cualquier caso, el largo número de teorías se puede agrupar en tres categorías: teorías del envejecimiento programado, teorías del envejecimiento por daño y las teorías combinadas del envejecimiento [5, 6].

Las teorías del envejecimiento programado defienden que este fenómeno sigue un calendario biológico, como una continuación del proceso implicado en el crecimiento infantil o el desarrollo de un adulto, en el que intervienen cambios de la expresión génica que afectan a los sistemas involucrados en los sistemas de mantenimiento, reparación y defensa. Así, podemos mencionar la teoría de la longevidad programada, la teoría endocrina del envejecimiento o la teoría inmunológica del envejecimiento.

La “teoría de la longevidad programada” entiende el envejecimiento como un proceso fruto del encendido y apagado secuencial de genes, y que la senescencia coincide con el momento en el que se manifiestan los déficits asociados con la edad [7]. La “teoría endocrina del envejecimiento” defiende que el reloj biológico actúa a través de las hormonas para controlar el ritmo del envejecimiento, y que uno de los factores que pueden ser determinantes en el proceso es la deficiencia de diversas hormonas [8]. Por otra parte, según la “teoría inmunológica”, el sistema inmune está programado para disminuir sus capacidades con el tiempo, lo que desencadena una mayor vulnerabilidad frente a las enfermedades y, en última instancia, una mayor predisposición a la muerte [9].

Las teorías del envejecimiento por daño (también denominadas, “por errores”) mantienen que el envejecimiento no es un evento programado, sino que se produce por la acumulación progresiva de errores y daños producidos durante el funcionamiento, mantenimiento y metabolismo propio del organismo, y es forzado en muchas ocasiones por las condiciones del entorno en el que se vive. Aquí, entre otras, encontramos la teoría del desgaste, la teoría de la tasa de vida, teoría del entrecruzamiento y la teoría de los radicales libres.

La “teoría del desgaste” postula que el envejecimiento es consecuencia del desgaste de partes vitales de las células y tejidos. En términos coloquiales, este fenómeno se puede equiparar al deterioro que puede experimentar una máquina después de su uso repetido, lo cual termina por provocar su inutilidad [10]. Por otra parte, la “teoría de la

tasa de vida” postula que cuanto mayor es la tasa de metabolismo basal de oxígeno menor es la longevidad de un organismo [11]. La “teoría del entrecruzamiento”, por su parte, sostiene que el envejecimiento es provocado por la acumulación de proteínas entrecruzadas que, en último término, desencadena daño celular y tisular, ralentizando procesos orgánicos esenciales [12]. La “teoría de los radicales libres”, por su parte, propone que el superóxido y otros radicales libres (incluyendo los de nitrógeno) son causantes de daños en componentes macromoleculares de las células, y que la acumulación de estos componentes dañados desencadena un mal funcionamiento de las células y órganos, causando su envejecimiento [13]. Esta teoría posiciona el daño en el ADN y lípidos, el daño oxidativo de proteínas, y los productos finales de glicación avanzada (AGEs) como elementos centrales del envejecimiento, mostrando una vez más la complejidad que supone comprender y estudiar este proceso.

En el intento de unificar las teorías surgen otras en las que se combinan muchos de los elementos encontrados en las anteriores, apareciendo así, por ejemplo, la hipótesis de la desdiferenciación, la teoría de la electricidad que se desvanece, la teoría de las membranas o la teoría de los radicales libres mitocondriales del envejecimiento.

Según la “teoría de la desdiferenciación del envejecimiento”, la pérdida de la capacidad de diferenciación de las células provoca una cascada de cambios metabólicos y/o funcionales que conllevan al deterioro de los organismos [14]. La “teoría de la electricidad que se desvanece” contempla una visión biofísica del envejecimiento y defiende que, a medida que las células pierden la capacidad de producir su propia electricidad, surgen procesos bioquímicos que son los impulsores de la senescencia [15]. La “teoría de membranas del envejecimiento”, por su parte, está basada en el hecho de que las membranas celulares se vuelven más rígidas durante el envejecimiento y que este efecto podría estar relacionado con cambios en la capacidad de las células para transferir productos químicos, calor o electricidad [16]. Finalmente, la “teoría de los radicales libres mitocondriales del envejecimiento”, supone una actualización de la teoría de los radicales libres, una de las teorías más aceptadas, en la que se destaca nuevamente a los radicales libres y se identifica a la mitocondria como el principal centro productor de esos mediadores del envejecimiento y, por tanto, como orgánulo clave en dicho proceso [17].

### 1.3. ¿Es posible hacer frente al envejecimiento?

El cambio de visión de un proceso programado hacia un nuevo paradigma en el que el envejecimiento está provocado por la acumulación de errores o daños, así como la identificación de agentes o eventos que pueden estar involucrados en su progresión, abre la posibilidad de buscar vías que permitan hacer frente a este proceso. Así, surge un gran interés en el diseño de diferentes aproximaciones o intervenciones que permitan paliar, detener o incluso revertir la progresión del envejecimiento. Estas intervenciones pueden ser clasificadas en tres categorías: farmacológicas, genéticas y nutricionales.

La intervención farmacológica es una de las primeras y más esenciales vías de estudio del envejecimiento. Ésta busca, a través de la administración de fármacos o compuestos químicos, retrasar o reducir la tasa de envejecimiento de un organismo. Entre ellos y por citar algunos ejemplos, podemos mencionar la rapamicina, aprobado para humanos por la Administración de fármacos y alimentos (U.S. Food and Drug Administration), agencia del gobierno de los Estados Unidos, y que fue el primer compuesto en demostrar que aumentaba la esperanza de vida máxima en ambos sexos de ratón [18]. Otro compuesto digno de mención es la coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>), una molécula ubicua en los organismos eucarióticos cuyo papel principal está relacionado con la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este compuesto juega un papel importante en el control de estado redox regulando la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por esta razón, numerosos informes y ensayos clínicos mencionan a la CoQ<sub>10</sub> como agente antienvjecimiento cuando se suministra como complemento dietético [19]. También el resveratrol, un polifenol antioxidante presente esencialmente en uvas, arándanos, frambuesas y moras, entre otros vegetales, merece ser mencionado aquí. El resveratrol cuenta con una gran gama de propiedades antienvjecimiento, que incluyen protección cardiovascular, posibles beneficios contra la enfermedad de Alzheimer, propiedades anticancerígenas y la activación de sirtuinas, proteínas involucradas en el efecto de aumento de la longevidad de la RC [20]. La metformina, un fármaco usado para tratar la diabetes y el síndrome metabólico, presenta efectos anticancerígenos, inmunoreguladores y antienvjecimiento, según se ha podido demostrar en diversos modelos experimentales [21]. Los agentes senolíticos son compuestos que inducen selectivamente la muerte de células senescentes, que han dejado de dividirse y se acumulan en tejidos envejecidos potenciando así los procesos ligados al envejecimiento [22]. Por último, los potenciadores del NAD<sup>+</sup> conocidos como “boosters” son compuestos

que, actuando como sustratos biosintéticos, pueden aumentar los niveles de  $\text{NAD}^+$  cuando estos son suministrados a través de la dieta, reportando beneficios similares a los desencadenados por la RC[23].

Las intervenciones genéticas consisten en la modificación del material genético del individuo, sobreexpresando, inactivando o introduciendo genes que permitan retrasar el envejecimiento. Incluso se han propuesto aproximaciones que no implican modificaciones en la secuencia del material hereditario. Mediante estos procedimientos experimentales se ha obtenido una amplia variedad de organismos modificados en genes implicados en la extensión de la esperanza de vida [24, 25], lo que abre una vía en la comprensión de los mecanismos del envejecimiento, la identificación de dianas moleculares y el desarrollo de terapias en mamíferos y, potencialmente, en humanos.

Así, como ejemplo, se puede mencionar la obtención de ratones con telómeros de gran longitud a través de modificaciones epigenéticas, reportándole a estos individuos menores signos de envejecimiento y una menor incidencia de cáncer [26]. Otro ejemplo lo constituyen ratones transgénicos que sobreexpresan SIRT1 y presentan fenotipos con aspectos similares a los sometidos a RC [27, 28]. Diversos estudios llevados a cabo previamente han demostrado que las sirtuinas, desacetilasas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , desempeñan un papel central en la mediación del aumento de la longevidad. Es más, muchos de los aspectos beneficiosos de la RC (ver más adelante) parecen estar mediados por la activación de diversas sirtuinas [27, 28].

La participación de estas proteínas en la extensión de la esperanza de vida puede estar relacionada con la regulación de los niveles de  $\text{NAD}^+$ , indicador del estado de energía celular. Así, como se ha comprobado en diferentes modelos animales, cada vez más evidencias indican que la sirtuina SIRT1, también juega un importante papel en la respuesta a la RC, la cual se ha comprobado que eleva la expresión de esta proteína en una serie de tejidos [28-30].

De igual forma, la sobreexpresión de la NADH deshidrogenasa CYB5R3 ha demostrado aumentar la esperanza de vida en ratones, así como modular muchos de los factores relativos al proceso de envejecimiento [31], asignando su mecanismo de acción a la capacidad de aumentar la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y a la activación de las sirtuinas [30, 31]. Estudios previos en este modelo de ratón indican que la sobreexpresión de CYB5R3 extiende la longevidad, aumenta la sensibilidad a insulina, mejorando la homeostasis de

la glucosa, disminuye la inflamación y el estrés oxidativo, disminuye el potencial de membrana mitocondrial, y protege a los ratones frente a la inducción del cáncer. Por todo ello, las estrategias basadas en potenciar el efecto de esta enzima pueden constituir una intervención viable para conferir protección frente a enfermedades metabólicas y mejorar la salud de los individuos a largo plazo [31, 32].

Las intervenciones dietéticas o nutricionales son otro de los procedimientos estudiados que permiten modular el envejecimiento y sus enfermedades relacionadas. Entre ellas, podemos destacar, la dieta mediterránea, la dieta cetogénica, el ayuno intermitente y la RC.

Numerosos estudios han demostrado que la dieta mediterránea está asociada a una menor mortalidad y a la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, cáncer, síndrome metabólico y depresión, así como a una reducción de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [33–35]. Posiblemente, parte de estos efectos vienen dados por las propiedades que se atribuyen a algunos de los componentes clásicos de esta dieta: elementos antioxidantes, fibra, grasas monoinsaturadas, ácidos grasos omega 3, polifenoles, flavonoides, fitosteroles, vitaminas, minerales y micronutrientes [36].

La dieta cetogénica, por su parte, caracterizada por ser pobre en carbohidratos y rica en grasas, es otro tipo de intervención que ha demostrado una gran plasticidad en parámetros clave del envejecimiento a través de la nutrición de los individuos [37]. Induce un cambio del metabolismo hacia la oxidación de ácidos grasos, lo que promueve un estado metabólico antiinflamatorio, el aumento de los niveles de cuerpos cetónicos, disminución del estrés oxidativo, incremento de los niveles de antioxidantes y eliminación de radicales libres [38], favoreciendo así la aparición de un estado similar al inducido por la RC, intervención mejor caracterizada capaz de disminuir la velocidad del envejecimiento, y que, como se describe más adelante, claramente ha reportado efectos beneficiosos en una gran cantidad de especies.

El ayuno intermitente es una intervención nutricional que consiste en alternar periodos de ingesta de comida y periodos de ayuno [39]. Los periodos de ayuno característicos provocan un cambio desde el metabolismo de glucosa al consumo de cuerpos cetónicos, provocando un entorno metabólico similar al de la RC o la dieta cetogénica y desencadena efectos beneficiosos similares a las de éstas. Estudios llevados a cabo tanto en animales como en humanos han demostrado que durante los periodos de

ayuno se reduce la producción de radicales libres, se induce la pérdida de peso, se desencadenan respuestas celulares evolutivamente conservadas que mejoran la regulación de la glucosa, aumenta la resistencia al estrés y se reduce la inflamación; mientras que, durante los periodos de ingesta, las células participan en procesos de crecimiento y plasticidad en tejidos específicos. Además, se ha comprobado que el ayuno intermitente reduce de forma consistente la incidencia de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. [40]

La RC consiste en una reducción de la ingesta calórica diaria de lo que es típico o habitual, pero sin que se produzca una malnutrición o privación de nutrientes esenciales. Esta intervención nutricional, típicamente de un 40% en animales de experimentación, es la intervención no genética ni farmacológica que de manera más consistente retrasa los procesos asociados al envejecimiento y extiende la longevidad. Estos beneficios han sido descritos para una amplia variedad de especies, incluyendo ratas, ratones, peces, moscas, gusanos y levaduras [41, 42], así como en primates [43], en los que, además, actúa disminuyendo la aparición de una gran cantidad de enfermedades relacionadas con el envejecimiento: cáncer, nefropatías, diabetes, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas, entre otras enfermedades crónicas. De hecho, en un estudio llevado a cabo por la Universidad de Wisconsin y el Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA, USA) en macacos, se concluyó que los efectos beneficiosos para la salud descritos en otros animales se conservan también en primates sugiriéndose que podrían ser asimismo aplicables para la salud humana” [43]. Precisamente, datos provenientes de ensayos clínicos observacionales y aleatorizados indican que la RC en humanos desencadena algunas de las adaptaciones metabólicas y moleculares que se ha demostrado que mejoran la salud y retrasan la acumulación de daño ligado al envejecimiento en modelos animales de longevidad. La RC en humanos mejora múltiples factores implicados en la patogénesis del tipo 2 diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer [44].

A pesar del amplio conocimiento que se tiene sobre los beneficios de la RC, los mecanismos moleculares subyacentes aún no están clarificados. Esta intervención promueve un fenotipo de envejecimiento saludable a través de una gran cantidad de mecanismos, uno de los cuales se cree que es su capacidad para aumentar la eficiencia y la biogénesis mitocondrial, dando lugar a una disminución en la producción de EROs sin una reducción neta de la biosíntesis de ATP, indicando un mejor estado bioenergético

[45]. También desencadena una activación de las sirtuinas, involucradas en el aumento de la estabilidad y supervivencia celular [46]. Además, la conversión de NADH a su forma oxidada  $\text{NAD}^+$  en las mitocondrias, reacción apoyada por la coenzima Q, también se cree que protege a las mitocondrias durante el envejecimiento [45]. Por tanto, los mecanismos que afectan a la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , y por tanto modulan a las sirtuinas, así como otras enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , son clave en el desarrollo del proceso de envejecimiento.

La RC parece interactuar también con otros procesos celulares tales como las rutas de señalización mediadas por insulina, la metilación del DNA, la acetilación de histonas y la adiponectina y con los genes relacionados con el metabolismo mitocondrial. La adiponectina, cuyos niveles aumentan por la RC, promueve la oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo, reduciendo así su acumulación en otros tejidos y regulando la producción de energía mitocondrial. Por otro lado, la RC suprime la formación de factores inflamatorios, como el  $\text{TNF-}\alpha$ , e inhibe la síntesis de moléculas de adhesión en las células endoteliales que favorecen la aparición de aterosclerosis, regula los factores de transcripción FOXO, que controlan varias funciones celulares tales como apoptosis, diferenciación del ciclo celular, expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, resistencia al estrés oxidativo y la deposición de amiloides en la enfermedad de Alzheimer [2, 48].

#### **1.4. Autofagia y envejecimiento.**

La autofagia es un proceso conservado por el que se encapsulan componentes intracelulares para su posterior degradación, contribuyendo al correcto mantenimiento celular. Este proceso es crucial para la eliminación de moléculas y estructuras dañadas y disfuncionales que se acumulan en el proceso de envejecimiento, de ahí su importancia en este proceso. Así, se ha demostrado que la inducción de la autofagia se relaciona con un mejor estado celular, e incluso con la extensión de la vida, mientras que, por el contrario, una desregularización y menor actividad de la autofagia se relaciona con el envejecimiento y sus consecuencias negativas. [49]

En líneas generales, el proceso autofágico comienza cuando una porción del citoplasma es encerrada por una doble membrana (denominada fagóforo) para formar el denominado autofagosoma. A esta estructura se une el lisosoma formando así el autolisosoma, estructura encargada de la degradación de los componentes celulares

(véase ANEXO, Figura 21). Entre los agentes encargados en la formación del autofagosoma, encontramos el conjugado Atg5-Atg12 y LC3, los cuales se localizan en la membrana de aislamiento durante el proceso de alargamiento de la doble membrana. LC3 se escinde en el citosol dando lugar a LC3I, que es entonces conjugada con una fosfatidiletanolamina, originando la forma LC3II, que la ancla a la membrana del fagóforo durante el inicio de la formación de las vesículas autofágicas en un proceso dependiente de Atg5. [50]

Uno de los principales factores que regulan la autofagia es el nivel de nutrientes disponibles en la célula que, en gran medida, está a su vez “monitorizado” por la ruta de mTOR (del inglés mammalian Target Of Rapamycin, a veces también referido como mechanistic Target Of Rapamycin). mTOR actúa sobre el proceso en condiciones de elevado nivel de nutrientes, reprimiendo la autofagia. Sin embargo, en condiciones de escasez de nutrientes mTOR está inactivado y el proceso autofágico se activa, siendo este uno de los mecanismos de interacción entre RC y autofagia que resulta en una serie de efectos beneficiosos para el organismo [51] (véase ANEXO, Figura 22).

### **1.5. Apoptosis y envejecimiento.**

La apoptosis, como proceso implicado en la muerte celular programada, es otro de los mecanismos celulares relacionado con el envejecimiento. La apoptosis y su correcta regulación es importante para el mantenimiento correcto de la homeostasis celular y tisular, principalmente por su contribución en el recambio celular. Así, una desregulación del proceso está implicada en el envejecimiento y en sus enfermedades asociadas. El aumento de la apoptosis durante el envejecimiento se ha relacionado con el deterioro del sistema inmunológico, el desgaste del músculo esquelético (sarcopenia), la pérdida de células en el corazón y la enfermedad neurodegenerativa. Por el contrario, las células cancerosas y las células senescentes son resistentes a la apoptosis, lo que les permite aumentar en abundancia durante el envejecimiento [52].

La apoptosis puede iniciarse tanto por factores extrínsecos como intrínsecos, siendo un proceso altamente regulado. La vía de activación extrínseca involucra a receptores de membrana como son los de los factores de necrosis tumoral (TNF) y está mediada por la señalización proveniente de otras células y de su ambiente. Por el contrario, la vía intrínseca está promovida por una situación de estrés celular, incluyendo daño en el ADN, la activación de oncogenes, hipoxia, estrés oxidativo o radiaciones. En

esta vía, los estímulos alteran el equilibrio de las actividades citoplasmáticas para favorecer los factores proapoptóticos al alterar la expresión y/o estabilidad de las proteínas, lo que da como resultado la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales en el citoplasma. Estos factores mitocondriales incluyen, por ejemplo, al citocromo *c*, el cual se une y activa las proteínas citoplasmáticas Apaf-1 y procaspasa-9. Juntas, estas proteínas forman una estructura llamada apoptosoma que desencadena el proceso final de la apoptosis [53] (véase ANEXO, Figura 23).

### **1.6. CYB5R3: modelo genético del estudio.**

La identificación de enzimas con capacidad para promover un envejecimiento saludable está comenzando a emerger en los últimos años. La citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa 3 (CYB5R3) es una de las cuatro reductasas del citocromo *b*<sub>5</sub> en mamíferos, y pertenece a una familia de flavoproteínas que catalizan la reducción de la coenzima Q y el citocromo *b*<sub>5</sub> usando NADH como donador de electrones, obteniéndose así NAD<sup>+</sup>. Se conoce que la inducción de CYB5R3 está regulada por la acción coordinada de Nrf2 y FOXO3 en respuesta a factores de estrés ambiental y nutricional [54]. Se trata de una enzima que se encuentra altamente expresada en diversos tejidos en condiciones de RC y muestra propiedades antioxidantes. Su expresión se produce en varios compartimentos subcelulares, incluidos el retículo endoplasmático, la membrana mitocondrial externa y la membrana plasmática, sitios donde contribuye al control del estado redox. Además, esta enzima participa en una amplia variedad de procesos metabólicos que incluyen elongación y desaturación de ácidos grasos, biosíntesis de colesterol y monooxigenación mediada por citocromo P450 [31]. Además, como ya se ha mencionado anteriormente, el aumento de los niveles de NAD<sup>+</sup> por la actividad de las distintas enzimas pertenecientes a la familia de las CYB5R se ha relacionado con la activación de sirtuinas [54, 55].

Estudios previos en ratón indican que la sobreexpresión de CYB5R3 extiende la longevidad, aumenta la sensibilidad a insulina mejorando la homeostasis de la glucosa, disminuye la inflamación y el estrés oxidativo, disminuye el potencial de membrana mitocondrial, y protege a los animales frente a la inducción del cáncer. Por todo ello, las estrategias basadas en potenciar el efecto de esta enzima pueden constituir una intervención viable para conferir protección frente a enfermedades metabólicas y mejorar la salud de los individuos a largo plazo [31].

Aunque el efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 se ha estudiado con detalle en algunos tejidos u órganos, como es el caso del hígado y del músculo esquelético [31, 56], los estudios son prácticamente inexistentes en otros casos. Este es el caso del riñón, órgano que, a pesar de considerarse marcador del envejecimiento (ver más abajo), apenas ha sido objeto de estudio en este sentido.

### **1.7. El riñón y el envejecimiento.**

Debido a su papel como regulador de la homeostasis sistémica, el riñón ocupa un papel central en el estudio del envejecimiento, siendo considerado como órgano “marcador” de este proceso. Con la edad, el riñón experimenta una lenta, pero progresiva pérdida de funciones tales como reabsorción y secreción de iones, disminución de la tasa de filtración glomerular, síntesis de vitamina D3 y capacidad de respuesta a diversas hormonas [57]. En el desempeño de su función el tejido renal consume grandes cantidades de oxígeno y es muy dependiente de la producción de ATP. Esto lo convierte en un órgano especialmente susceptible al envejecimiento, ya que en él se produce una alta cantidad de EROs, que pueden resultar en la acumulación de daño oxidativo.

En el córtex renal, concretamente en los glomérulos, que son parte esencial de la nefrona (unidad anatómica funcional del riñón), se lleva a cabo la filtración del plasma sanguíneo. Una de las estructuras clave en este proceso, denominado “ultrafiltración”, es la denominada “barrera de filtración glomerular”, formada por el endotelio capilar, por donde circula la sangre a filtrar, la membrana basal glomerular y los pies de los podocitos, otro tipo celular característico del tejido renal. Dicha estructura da lugar a un primer filtrado del plasma sanguíneo que, posteriormente, a través del paso de éste por los túbulos, formará la orina [58].

Otras estructuras de interés dentro del tejido renal son los túbulos contorneados proximales. Éstos consumen grandes cantidades de energía en el proceso de reabsorción de electrolitos y pequeñas moléculas para la formación de la orina. Esta energía es suministrada a través de la gran población mitocondrial presente en las células epiteliales de estos túbulos, por lo que se requiere de un buen estado de esas poblaciones para que el proceso se lleve a cabo en un estado fisiológico óptimo [58, 59]. En este estado fisiológico influyen procesos como la autofagia, por la cual se reciclan los constituyentes celulares, siendo un agente esencial en el mantenimiento de la homeostasis del túbulo contorneado proximal (TCP) y el buen estado de su población mitocondrial [60].

## 2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo global determinar si los animales de edad avanzada (24 meses) que sobreexpresan citocromo *b<sub>5</sub>* reductasa 3 presentan cambios estructurales y de expresión proteica en su tejido renal, que puedan interpretarse como “positivos”, frente a animales sin manipulación genética (silvestres o control). Adicionalmente, para el estudio mediante Western Blot, se incluyen animales jóvenes (7 meses), transgénicos y silvestres, para, así, estudiar el efecto del envejecimiento.

El alcance de este objetivo está condicionado por el cumplimiento de los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar marcadores relacionados con la masa mitocondrial y la autofagia, así como otros relacionados con la apoptosis y la regulación de la autofagia, en riñón de ratones de edad avanzada silvestres y transgénicos CYB5R3 en comparación con los correspondientes grupos de animales jóvenes/adultos.
2. Estudiar posibles cambios ultraestructurales de las poblaciones mitocondriales y las figuras de autofagia de los túbulos contorneados proximales de riñón de ratones de edad avanzada que sobreexpresan la enzima CYB5R3 en comparación con los controles.
3. Estudiar posibles variaciones en marcadores reconocidos de envejecimiento renal (grosor de los procesos podocitarios y de la lámina basal glomerular) en animales de edad avanzada que sobreexpresan la enzima CYB5R3 en comparación con los controles.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Animales.

Este trabajo se ha llevado a cabo en ratones de la cepa C57BL/6 que sobreexpresan la enzima NADH citocromo *b<sub>5</sub>* reductasa 3 obtenidos mediante transgénesis [31] gracias a la estrecha colaboración con el grupo de investigación del Dr. Rafael de Cabo (Translational Gerontology Branch, NIA, Baltimore, MD. USA), que facilitó a nuestro laboratorio varios machos del modelo genético mencionado.

A partir de dichos ejemplares se estableció una colonia de ratones en el Servicio de Animales de Experimentación (SAEx) de la Universidad de Córdoba en el Campus de Rabanales. Para ello se realizaron múltiples cruces entre dichos machos transgénicos y hembras silvestres (obtenidas del Charles River Laboratories) y las camadas resultantes

fueron genotipadas mediante PCR. Para el presente estudio fue apartada una cohorte de 12 animales, formada por 6 de cada genotipo de 24 meses de edad. Para el estudio mediante Western Blot, se incluyeron, además, 12 animales jóvenes, de 7 meses de edad, de los cuales 6 eran control y 6 transgénicos.

Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad (de 8:00 am a 8:00 pm) y en condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad. La cohorte fue mantenida en condiciones *ad libitum* bajo una alimentación estándar con pienso para roedores, hasta los 3 meses de edad. Posteriormente, fueron alimentados durante 4 meses (los animales de la cohorte joven) y 21 meses (los animales de la cohorte de edad avanzada) con una dieta AIN-93M. Finalmente, con 7 meses de edad (los animales jóvenes) y con 24 meses de edad (los animales de edad avanzada) fueron sacrificados mediante dislocación cervical después de un ayuno de 12 horas. Los riñones fueron diseccionados y procesados para el análisis bioquímico y ultraestructural. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba y la correspondiente autorización de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía (número de autorización: 20/04/2016/053).

### **3.2. Procesado de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.**

Los riñones fueron extraídos y lavados con tampón cacodilato de sodio 0,1 M y pH 7,2. Posteriormente fueron troceados en pequeños fragmentos de 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente. Por cada animal se procesaron varios fragmentos de la corteza renal. Las muestras fueron fijadas en una mezcla glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) durante 24 horas. Posteriormente, tras varios lavados de 15 minutos en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2), las muestras fueron postfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C en el mismo tampón. Seguidamente, los especímenes se deshidrataron en una serie de alcoholes (etanol) de graduación ascendentes (50°, 70°, 90° y 100°) en pases de 15-20 minutos. El etanol 100° fue aplicado tres veces en pases de la duración mencionada. Tras la deshidratación, las muestras fueron transferidas a óxido de propileno, que actúa como agente vehículo para posibilitar la infiltración de las resinas epoxi Embed 812 (EMS, USA). Dicha infiltración se llevó a cabo a lo largo de 24 horas con mezclas de la resina y óxido de propileno en proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 con concentraciones ascendentes de resina hasta la incubación final con resina pura durante 24 horas más. Por último, los bloques se obtuvieron con

resina fresca y empleando moldes de silicona. Su polimerización se llevó a cabo en estufa durante 48 horas a 65°C. Los bloques fueron liberados de los moldes quedando listos para su tallado y corte. Esta metodología de fijación e inclusión es la llevada a cabo habitualmente en el Grupo donde se ha realizado este TFM.

Una vez tallados los bloques, se cortaron en un ultramicrotomo (Ultracut-Reicher) empleando cuchillas de vidrio para obtener cortes semifinos (0,5-1 µm de grosor) y una cuchilla de diamante (Diatome, Suiza) para cortes ultrafinos (40-80 nm de grosor). Los semifinos se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en una solución de bórax al 1% durante un minuto. Estos cortes fueron empleados para evaluar el contenido de la sección donde se comprobaba, por ejemplo, si contenía las estructuras de interés: túbulos contorneados proximales y glomérulos. En caso afirmativo, se procedió a la obtención de cortes ultrafinos, que se montaron en rejillas de níquel y fueron contrastadas con Uranyl Less (EMS, USA) y citrato de plomo de Reynolds.

### **3.3. Observación y toma de imágenes de las muestras.**

Las rejillas contrastadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1400 del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Por cada animal se tomaron de forma aleatoria imágenes de células de TCPs a 8.000 aumentos e imágenes de glomérulos donde se podían identificar pies de podocitos y la lámina basal glomerular, a 30.000 aumentos, así como imágenes de poblaciones mitocondriales de células de TCPs a 20.000 aumentos. Además, se obtuvieron imágenes panorámicas (a baja magnificación) para obtener una visión de conjunto del material utilizado.

### **3.4. Estudio planimétrico.**

Para el estudio planimétrico de las mitocondrias del TCP, así como de la membrana basal glomerular y de los procesos podocitarios, se empleó el software ImageJ (N.I.H.; USA). Las imágenes fueron analizadas de forma individual previo ajuste de la escala incluida para cada una de las mismas. Los parámetros medidos en imágenes de células de TCP fueron: área celular, área nuclear y área y número de figuras de autofagia, diferenciando entre figuras tempranas y tardías (ver más adelante los criterios de identificación). A su vez, los parámetros evaluados en las poblaciones mitocondriales fueron área y circularidad. Por último, para las imágenes de glomérulos, se obtuvieron como parámetros el grosor de la lámina basal glomerular y el tamaño de los procesos

podocitarios en su zona de contacto con la lámina basal. En cada imagen, el grosor de la membrana basal fue medido a intervalos regulares de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ .

### **3.5. Determinación de marcadores específicos mediante inmunodetección Western Blot.**

En primer lugar, se obtuvieron extractos totales de riñón mediante un protocolo de extracción de proteína con tampón de radio inmuno precipitación (RIPA buffer: Tris-HCl 50mM, pH 8, NaCl 150 mM, deoxicolato al 0,5%, SDS al 0,1%, Tritón X-100 al 1%, DTT 1mM, PMSF a 10  $\mu\text{l/ml}$ , CLAP 2  $\mu\text{l/ml}$ , inhibidores de fosfatasa: cóctel 2 1/100 y cóctel 3 1/100). Así, aproximadamente 1/3 del riñón del ratón fue añadido a 0,5 ml de RIPA buffer y se procedió entonces a la dispersión del tejido mediante el instrumento Ultra-Turrax (IKA, Alemania). Posteriormente, se centrifugó la dispersión a 10.000g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se obtuvo el extracto proteico total a partir del sobrenadante de la centrifugación anterior.

A partir de los extractos proteicos totales de riñón se estudió la expresión de diferentes proteínas: complejos mitocondriales (I, II, III, IV, V) y VDAC, la porina mitocondrial (como marcadores de función y masa mitocondrial, respectivamente) y de LC3-I y LC3-II, como marcadores específicos de flujo autofágico. Adicionalmente, se determinaron los niveles de expresión de mTOR, la diana de rapamicina en células de mamífero (como marcador involucrado en la regulación de la autofagia) y de Apaf-1, el factor 1 de activación de la apoptosis (como marcador específico de apoptosis).

La concentración de proteína de los extractos fue determinada mediante la técnica de Bradford. Posteriormente, se mezclaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína con tampón de carga (LB5X) hasta obtener una concentración final de 10% de sacarosa, 2mM EDTA, 1,5% (w/v) de SDS, ditiotretitol 20mM, azul de bromofenol al 0,01% (w/v) y Tris-HCl 60 mM, pH 6,8. Para finalizar con la preparación de muestras para cargar, se añadieron los inhibidores de proteasas CLAP y PMSF y se calentaron las muestras a 45°C durante 15 minutos. Los componentes LB(5X)/CLAP/PMSF se incluyeron a proporciones 18:1:1.

Con un total de 6 muestras por condición, las 24 muestras se cargaron en geles de poliacrilamida en gradiente 4-20% (Geles Criterion TGX Stain-Free, Bio-Rad) de 26 pocillos, separándose las proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS PAGE) a 200 V y 1,5 A en una cubeta Criterion (Bio-Rad).

Una vez finalizó la separación electroforética, se llevó a cabo la transferencia semiseca de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), programado a 25V y 2,5 A durante 7 minutos. Para ello, en el casete de Bio-Rad se colocó la membrana de nitrocelulosa junto al gel, situados entre dos papeles Whatman humedecidos en tampón de transferencia.

Tras la transferencia se comprobó la homogeneidad de la carga proteica en las distintas calles mediante la tinción de la membrana de nitrocelulosa con colorante Rojo Ponceau (0,1% en ácido acético al 1%). Posteriormente se obtuvo una imagen (ChemiDoc Touch, Bio-Rad) de la membrana teñida con la que posteriormente normalizar los resultados de las bandas en los inmunoblots.

Previo a la incubación de las membranas, éstas fueron recortadas y, posteriormente bloqueadas durante 1 hora en una disolución de leche en polvo al 5% en TTBS (TBS + Tween-20 al 0,05%). La incubación con el anticuerpo primario se realizó a concentraciones de anticuerpo variables según el marcador (1:500 – 1:1000), el cual estaba diluido en la disolución de leche en polvo y TTBS (véase Tabla 1, ANEXO). Este proceso se llevó a cabo durante toda una noche en agitación a 4°C. Tras la incubación primaria, las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS (unos 5 minutos cada lavado) y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario en TTBS a una concentración 1:5000 (véase Tabla 1, ANEXO) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras esta segunda incubación se lavaron de nuevo las membranas con TTBS (3 lavados de 5 minutos) y se finalizó con un lavado de 10 minutos en TBS (para 1 litro: 100 ml de Tris-HCl 0,5M pH7,6; 8,5g NaCl y 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada).

Tras los lavados se procedió al revelado de la membrana por quimioluminiscencia empleando el kit Clarity™ ECL Substrate (Bio-Rad) y se tomaron imágenes de la membrana (ChemiDoc Touch, Bio-Rad). Dichas imágenes fueron analizadas empleando el software ImageLab (Bio-Rad), mediante el cual se cuantificaron las correspondientes intensidades de reacción en las distintas bandas obtenidas para cada marcador y se normalizaron con su correspondiente carrera de la tinción con rojo Ponceau, corrigiéndose las pequeñas variaciones que podrían haber sido introducidas por una carga desigual de proteína en los geles.

### **3.5. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Los datos se sometían en primer lugar al test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinar si era necesaria la realización de un test paramétrico o no paramétrico. Según el resultado obtenido, se llevó a cabo una prueba paramétrica (*t* de Student) o no paramétrica (U de Mann-Whitney). Se consideraron diferencias significativas para valores  $p < 0,05$  (\*), encontrándose diversos niveles de significación dependiendo del parámetro analizado ( $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*)). Además, se consideró una tendencia (*t*) cuando el valor “*p*” era  $< 0,05$  en *one-tailed test*, pero no se obtenía significancia en un *two-tailed test*.

## **4. Resultados**

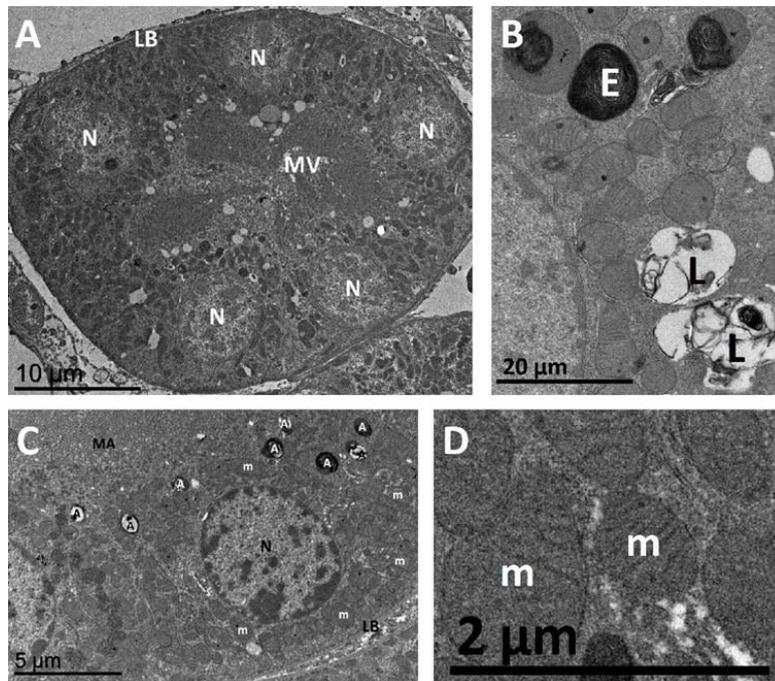
### **4.1. Análisis ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión.**

Los cortes semifinos de riñón fueron observados con el microscopio óptico y se comprobó que el aspecto estructural en ambos genotipos era similar y con las características típicas de este órgano, lo que nos indicó que el proceso de inclusión de las muestras se había realizado correctamente. Los cortes ultrafinos obtenidos de la corteza renal, visualizados al microscopio electrónico de transmisión, también mostraron una ultraestructura en concordancia con las descripciones canónicas de este tejido en ratones [61] y entre las que podemos observar los TCPs y túbulos contorneados distales (TCD) cortados en diferentes niveles, así como los glomérulos renales con una estructura muy característica.

Los TCPs fueron distinguidos de los distales por la presencia de numerosas microvellosidades en la membrana apical en los primeros, que tienden a ocluir parcialmente la luz del túbulo. Este denominado “ribete o borde en cepillo” no aparece en los túbulos distales. Otras características típicas de las células epiteliales que forman el TCP (lámina basal, núcleo en posición basal, mitocondrias perinucleares y apicales, vesículas de diversos tipos, etc.) fueron también encontradas en nuestras muestras (véase la Figura 1A).

Las figuras relacionadas con procesos de autofagia (véanse Figuras 1B y 1C) aparecen como estructuras circulares u ovaladas, fuertemente teñidas cuando son tempranas y van tornándose cada vez más claras a los electrones conforme avanzan a hacia estadios tardíos [60]. Las mitocondrias presentaban morfología elipsoidal, con la

matriz densa a los electrones y las crestas dispuestas perpendicularmente al eje mayor de este orgánulo (véase Figura 1D).

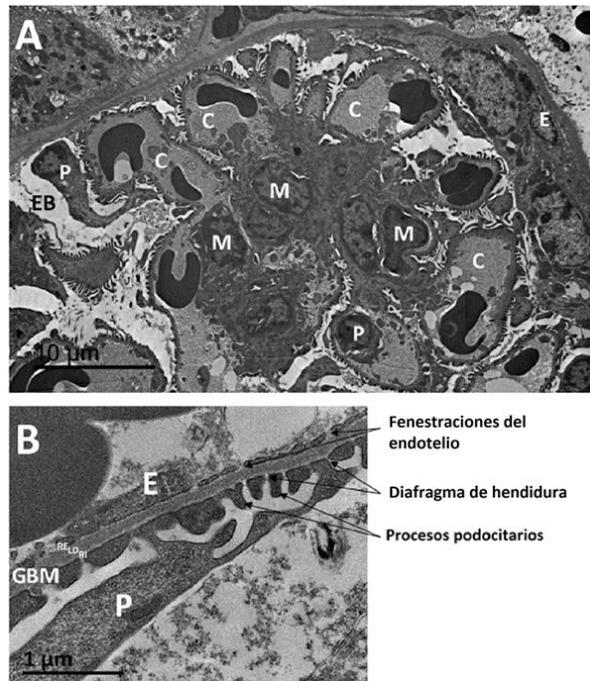


**Figura 1. Estructura del TCP.** Se detallan a distintos aumentos las diferentes estructuras del TCP. En la imagen A se muestra una imagen panorámica del TCP en la que se observan la lámina basal (LB) y el borde apical que delimita la luz del túbulo con numerosas microvellosidades (MV), además de los núcleos de sus células (N). En B se muestran, a grandes aumentos, figuras de autofagia. Las figuras de autofagia se etiquetan según sean tempranas (E, del inglés “early”) o tardías (L, del inglés “late”). En la imagen C se muestra una célula de TCP en la que se señalan figuras de autofagia (A) y mitocondrias (m). En la imagen D se muestra mitocondrias (m) a mayores aumentos.

En cuanto a los glomérulos, su distinción con respecto al resto de ultraestructuras se hizo de manera sencilla, ya que presentaba una histología típica, la cual destacaba fácilmente del resto de estructuras del tejido (véase Figura 2A). En ellos es fácil diferenciar una cápsula de Bowman en forma de epitelio plano simple recubriendo la estructura central, dejando una luz entre ambas, el espacio de Bowman. Además, en la zona central se observaban las células mesangiales, los podocitos y los capilares glomerulares. El estudio se centró en la barrera de filtración glomerular, estructura formada por los procesos podocitarios, la membrana basal glomerular (GBM, del inglés “glomerular basement membrane”) y el endotelio capilar (véase Figura 2B).

La membrana basal glomerular se encuentra formada por una estructura trilaminar, una zona central denominada lámina densa (LD), rodeada de dos capas menos densas, la lámina rara interna (RI) limitando con el endotelio del capilar, y la lámina rara externa (RE) que interactúa con los procesos podocitarios. Los procesos podocitarios, o pedicelos, interaccionan con la lámina basal glomerular a través de las estructuras también

denominada “pies” de los podocitos, y dejando entre ellos las denominadas “hendiduras de filtración”. En ocasiones, es posible distinguir los diafragmas de las hendiduras como tenues líneas entre dos pedicelos contiguos. Finalmente, encontramos el endotelio capilar, que es de tipo fenestrado (véase Figura 2B).

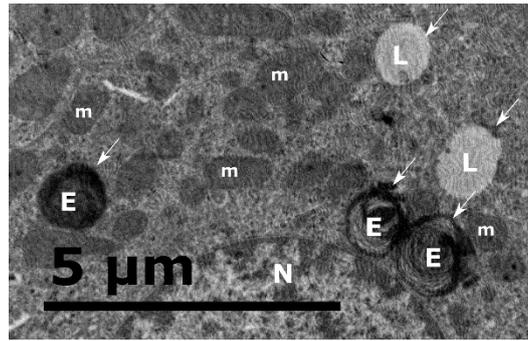


**Figura 2. Estructura del glomérulo renal.** Se muestran a distintos aumentos las estructuras presentes en un glomérulo. En la figura A se ilustra una imagen panorámica de un glomérulo donde se etiquetan el epitelio (E) que conforma la hoja parietal de la cápsula de Bowman, el espacio de Bowman (EB), capilares (C), podocitos (P, que conforman la hoja visceral de la cápsula de Bowman) y el mesangio (M). En la imagen B se muestran los elementos que constituyen la barrera de filtración glomerular: el endotelio fenestrado de los capilares glomerulares (E), la membrana basal glomerular (GBM) y las prolongaciones de los podocitos (P), también denominadas “pedicelos” o “procesos podocitarios”.

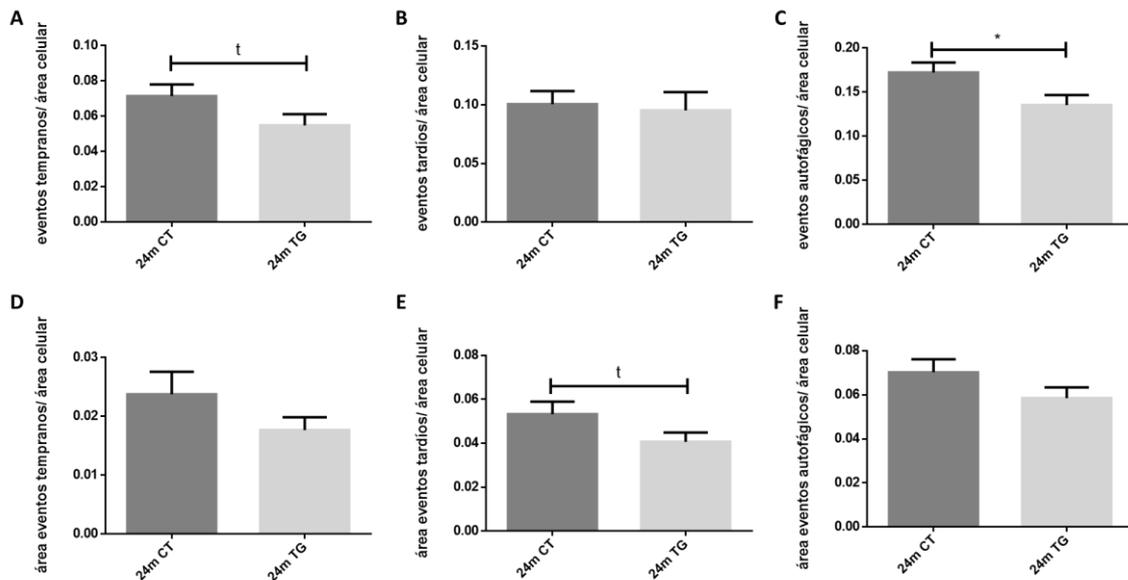
Los eventos de autofagia y las mitocondrias de las células de los TCPs, así como la membrana basal glomerular y los procesos podocitarios, fueron objeto del estudio planimétrico con el objetivo de establecer una comparativa entre los dos grupos experimentales: controles y transgénicos de edad avanzada.

#### **4.1.1. Análisis planimétrico de las figuras de autofagia de TCP.**

El estudio de las figuras de autofagia se centró en determinar el número de figuras y el área de éstas en relación con área celular total. Dicho análisis se realizó diferenciando si se trataba de eventos tempranos de autofagia, tardíos o totales [62] (véase Figura 3 y Figura 4).



**Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de figuras de autofagia.** La imagen muestra una porción de una célula de TCP en la que hay presentes varias figuras de autofagia en distintos estadios. Flechas: figura de autofagia; E: figuras de autofagia temprana; L: figura de autofagia tardía; N: núcleo; m: mitocondria.



**Figura 4. Análisis planimétrico de las figuras de autofagia.** En la figura 4A se observa el número de eventos tempranos de autofagia con relación al área celular. La figura 4B muestra el número de eventos tardíos de autofagia con relación al área celular. En la figura 4C se observa el número de eventos totales (tempranos + tardíos) con relación al área celular. En la figura 4D se observa se observa el área que suponen los eventos tempranos con relación al área celular. En la figura 4E se observa el área que suponen los eventos tardíos con relación al área celular. En la figura 4F se observa el área que suponen los eventos totales (tempranos + tardíos) con relación al área celular. 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. \*:  $p < 0,05$ ; t: tendencia,  $p < 0,05$  en *one-tailed test*.

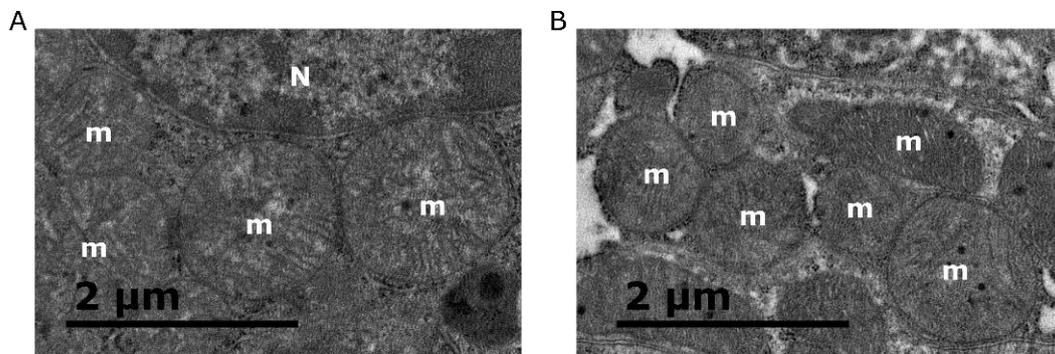
Con respecto a las figuras de autofagia, se observó una tendencia en el número de eventos tempranos con relación al área celular total, siendo este número menor en los animales de edad avanzada que sobreexpresan CYB5R3 (Figura 4A). Sin embargo, no se encontraron cambios en cuanto al área de estas estructuras (Figura 4D). Por su parte, el número de eventos autofágicos tardíos tampoco varió (Figura 4B), aunque se detectó una tendencia a disminuir su ratio área/área celular en los animales transgénicos (Figura 4E).

Finalizando el análisis de las figuras de autofagia, nos centramos en el estudio de los eventos totales, obtenidos a partir de la suma de los eventos tempranos y tardíos, para tener una visión global, tanto del número total de eventos como del área total de éstos,

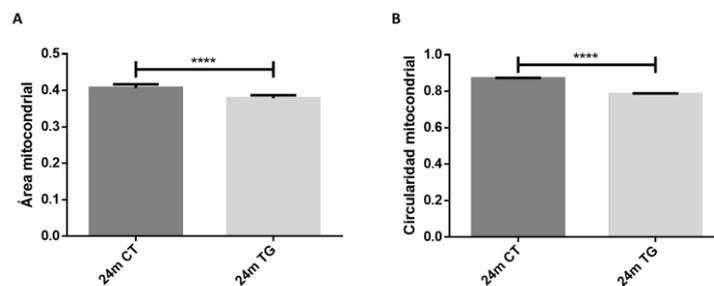
todo ello, nuevamente, referenciado al área celular total. Se observó una diferencia significativa en el número de eventos totales de autofagia, siendo menor en ratones transgénicos de edad avanzada que en los correspondientes ratones silvestres (figura 4C). Por el contrario, esta diferencia no se observó cuando se analizó el área total de las figuras de autofagia (véase figura 4F).

#### 4.1.2. Análisis planimétrico de las mitocondrias de TCP.

El análisis planimétrico de las poblaciones mitocondriales de los TCPs (véase Figura 5) consistió en la determinación del área y la circularidad de estos orgánulos. Como se observa en la Figura 6, los resultados mostraron una disminución de ambos parámetros al comparar animales viejos, controles y transgénicos.



**Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de las poblaciones mitocondriales.** Imágenes que muestran la ultraestructura de las mitocondrias en células de TCPs de animales de edad avanzada de ambos genotipos. A: silvestres; B: transgénicos N: núcleo; m: mitocondria.



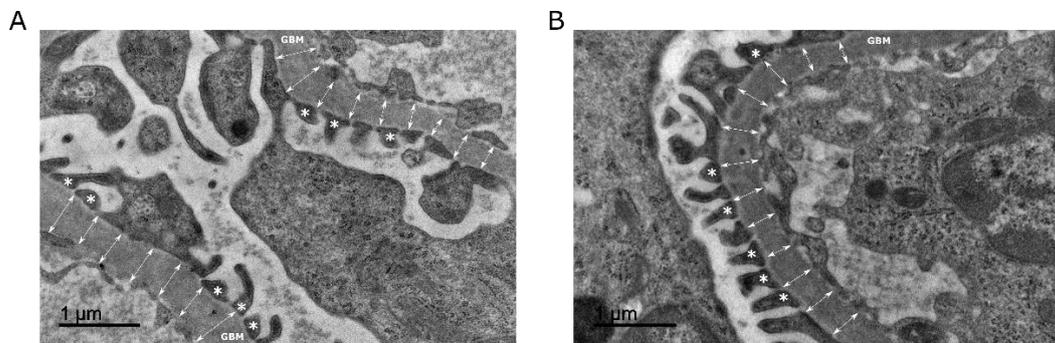
**Figura 6. Análisis planimétrico de las mitocondrias de TCP.** En la figura 6A se muestra el resultado del área mitocondrial y en la 6B el de circularidad. 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

Como se puede apreciar, el área media de las mitocondrias de los ratones transgénicos de edad avanzada es menor que el de las mitocondrias de los ratones

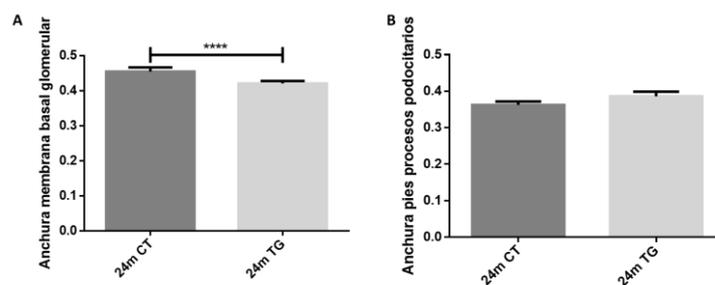
silvestres (véase Figura 6A). Un patrón altamente similar se pudo observar en cuanto a la circularidad de las mitocondrias (véase Figura 6B).

#### 4.1.3. Análisis planimétrico de estructuras glomerulares.

El análisis de las estructuras glomerulares se centró en el grosor de la membrana basal glomerular (GBM) y en la anchura de los procesos podocitarios en la zona de contacto con la lámina basal glomerular (véase Figura 7). En el primer caso, los resultados mostraron que el grosor de la membrana basal glomerular fue menor en los ratones transgénicos que en los controles, mostrando diferencias significativas (Figura 8A). Sin embargo, el genotipo no indujo cambios en cuanto al grosor de los procesos podocitarios (véase figura 8B).



**Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de la barrera de filtración glomerular.** Los asteriscos (\*) destacan ejemplos de procesos podocitarios, mientras que las flechas de doble punta acotan la membrana basal glomerular y marcan los puntos donde se tomaron las medidas de su grosor. A: ratón viejo silvestre; B: ratón viejo transgénico; GBM: membrana basal glomerular.

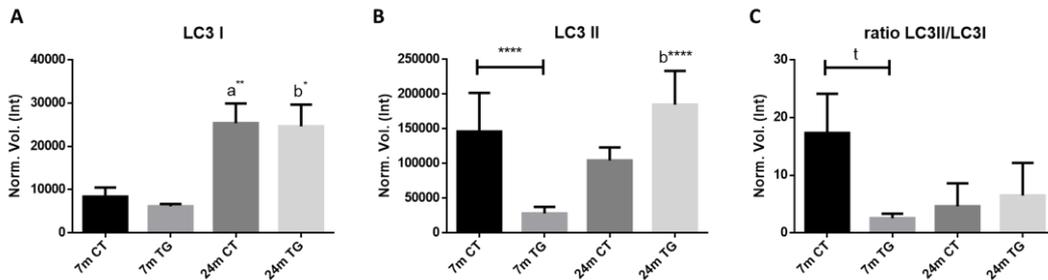


**Figura 8. Resultados de análisis planimétrico de las estructuras glomerulares.** En A se observa el resultado del análisis del grosor de la membrana basal glomerular. En la figura B se muestra el resultado del análisis del grosor de los procesos podocitarios. 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 4.2. Análisis de expresión de proteínas.

Además del estudio planimétrico, se llevó a cabo un análisis de expresión de determinadas proteínas relacionadas con procesos de autofagia y masa mitocondrial. Adicionalmente, se determinaron los niveles de expresión de mTOR, y Apaf-1, como marcadores de regulación de autofagia y de apoptosis, respectivamente.

Los marcadores analizados para el estudio de la autofagia fueron LC3I y LC3II. Los resultados se exponen en la Figura 9.



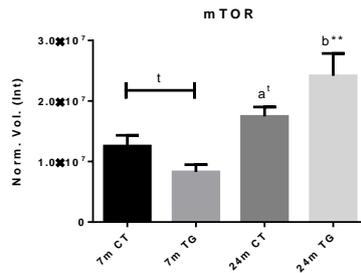
**Figura 9. Análisis de LC3.** En panel 9A se muestran los niveles de LC3I; en el 9B los de LC3II y en la 9C la ratio LC3II/LC3I. 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. a<sup>\*\*</sup>: p<0,01 vs 7m CT; b<sup>\*</sup>: p<0,05 vs 7m TG; \*\*\*\*: p<0,0001; b<sup>\*\*\*\*</sup>: p<0,0001 vs 7m TG; t: tendencia, p<0,05 en *one-tailed test*.

Los resultados mostraron que la transgénesis no provocó cambios en lo que se refiere a LC3I ni en los animales jóvenes ni en los viejos. Sin embargo, el envejecimiento *per se* indujo un aumento significativo para este parámetro en ambos genotipos (Figura 9A).

En cuanto a los niveles de LC3II, los resultados obtenidos mostraron que únicamente en los individuos jóvenes la transgénesis provocó un cambio significativo. En este caso, el nivel de LC3II fue menor en los ratones transgénicos jóvenes que en los silvestres de la misma edad (figura 9B). Con respecto al efecto de la edad, solo se observaron cambios significativos en los ratones transgénicos, donde se observó un aumento significativo en los animales de edad avanzada frente a los jóvenes (Figura 9B).

Con respecto al ratio LC3II/LC3I únicamente se encontró una tendencia en los animales de 7 meses, para los que la ratio observada fue menor en los ratones transgénicos que en los silvestres (véase Figura 9C). No se observaron cambios significativos con el envejecimiento en ninguno de los genotipos (Figura 9C).

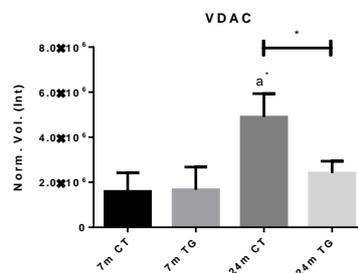
Adicionalmente, se analizaron los niveles de mTOR como marcador involucrado en la regulación de la autofagia. Los resultados mostraron que el envejecimiento provocó un efecto notable en su expresión. Así, en ratones control, el envejecimiento provocó una tendencia a aumentar estos niveles, efecto que fue mucho más pronunciado y estadísticamente significativo en los transgénicos (Figura 10). El genotipo, por su parte, sólo tuvo efecto en los ratones jóvenes, donde se detectó una tendencia a la disminución de los niveles de mTOR en los transgénicos (véase Figura 10).



**Figura 10. Análisis de mTOR.** La figura muestra los niveles de expresión de mTOR, la diana de rapamicina en células de mamífero. 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. t, tendencia:  $p < 0,05$  en *one-tailed test*; a': tendencia,  $p < 0,05$  en *one-tailed test* vs 7m CT; b\*\*':  $p < 0,01$  vs 7m TG

La masa y función mitocondrial fueron determinadas a través de la expresión de VDAC y de los complejos mitocondriales, cuyos resultados se muestran a continuación.

VDAC no mostró cambios en los animales jóvenes, donde la transgénesis no provocó ningún efecto (Figura 11). Por el contrario, la transgénesis sí provocó un cambio significativo en los ratones de 24 meses, donde los niveles de VDAC fueron significativamente menores en los transgénicos en comparación con los controles (véase Figura 11). En cuanto al efecto de la edad, únicamente en los ratones silvestres se observó un cambio, siendo mayores los niveles de esta proteína en los animales de edad avanzada (véase Figura 11).



**Figura 11. Análisis de VDAC.** La figura muestra los niveles de expresión de VDAC, la porina de la membrana externa mitocondrial. 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. \*:  $p < 0,05$ ; a\*,  $p < 0,05$  vs 7m CT.

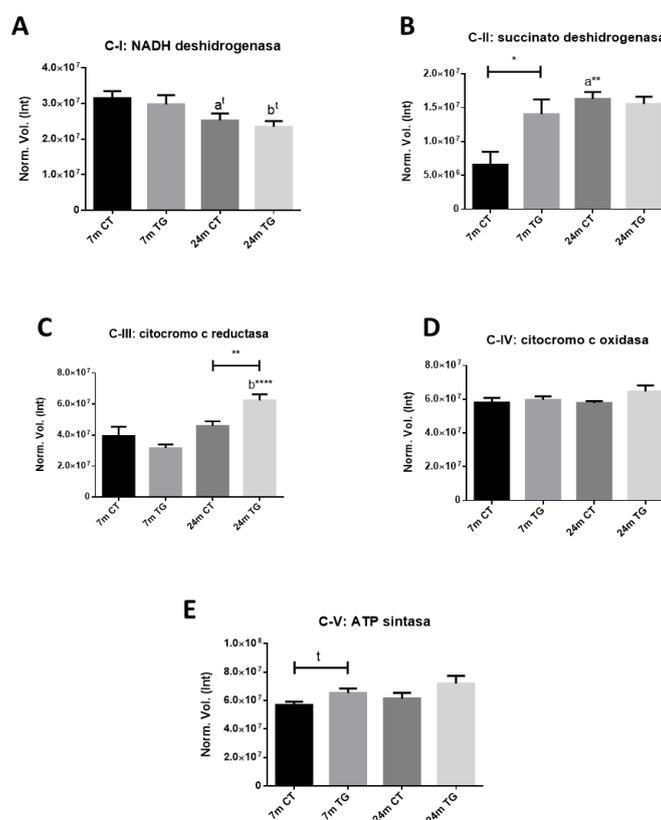
Los complejos mitocondriales mostraron diferentes patrones de expresión. Así, el complejo I - NADH deshidrogenasa - no experimentó cambios debidos al genotipo. Sin embargo, se encontró una tendencia a disminuir en los ratones de edad avanzada con independencia del genotipo (Figura 12A).

Por su parte, los niveles de complejo II - succinato deshidrogenasa - aumentaron en los ratones jóvenes transgénicos con respecto a los silvestres de la misma edad, no detectándose cambios entre los animales silvestres y transgénicos de 24 meses (Figura

12B). Sin embargo, los ratones control de 24 meses sí mostraron una diferencia significativa en comparación con los controles jóvenes, alteración que no se encontró en los transgénicos (véase Figura 12B).

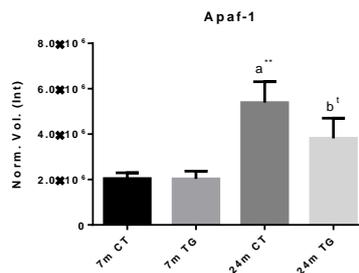
En animales de 24 meses, la sobreexpresión de CYB5R3 tuvo un efecto claro sobre los niveles de Complejo III - ubiquinol citocromo *c* reductasa -. Así, en el grupo de ratones transgénicos, dichos niveles fueron significativamente mayores en comparación no sólo con los controles de la misma edad sino también frente a los transgénicos jóvenes (Figura 12C). No se detectaron cambios al comparar entre sí los grupos de ratones control de diferentes edades, ni al comparar los ratones control y transgénicos de 7 meses (véase Figura 12C).

Para el complejo IV - citocromo *c* oxidasa - no se observaron cambios algunos (véase Figura 12D). Finalmente, para el complejo V - ATP sintasa - únicamente se detectó una tendencia de cambio en los ratones jóvenes, siendo sus niveles mayores en el grupo de ratones transgénicos (Figura 12E).



**Figura 12. Análisis de los complejos mitocondriales.** A, complejo I (NADH deshidrogenasa); B, complejo II (succinato deshidrogenasa); C, complejo III (citocromo *c* reductasa); D, complejo IV (citocromo *c* oxidasa) y E, complejo V (ATP sintasa). 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; t: tendencia,  $p < 0,05$  en *one-tailed test*.

Finalmente, se muestran los resultados para el análisis de Apaf-1, como marcador específico de apoptosis. En este caso, la transgénesis no provocó cambios ni en los ratones jóvenes ni en los de más avanzada edad cuando se compararon con los correspondientes controles (Figura 13). Por el contrario, con el envejecimiento sí que se encontraron algunas alteraciones estadísticamente significativas. Así, los niveles de Apaf-1 fueron mayores en los animales de edad avanzada del grupo control en comparación con los jóvenes del mismo genotipo, aunque en el caso de los ratones transgénicos sólo se encontró una tendencia a dicho aumento (véase Figura 13)



**Figura 13. Análisis de Apaf-1.** La figura muestra los niveles de expresión de Apaf-1, el factor 1 de activación de la apoptosis. 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses. a\*\*:  $p < 0,001$  vs 7m CT; b<sup>1</sup>: tendencia,  $p < 0,05$  en *one-tailed test* vs 7m TG.

Las Figuras 14 a 18, mostradas en el ANEXO de este trabajo, muestran los resultados de todos los Western Blot realizados, así como las membranas teñidas con Ponceau, usadas para normalizar la cuantificación de las bandas obtenidas con los diferentes anticuerpos.

## 5. Discusión

En la actualidad, el 9% de población mundial tiene más de 65 años y se espera que en 10 años aumente al 20%. De estas personas, muchas de ellas serán incluso mayores de 80 años. Esto es el resultado del avance de la sociedad, de la mejora en la medicina y de las infraestructuras, entre otros muchos factores, que redundan en una mayor esperanza de vida. Sin embargo, esto supone un enorme reto para todos los ámbitos de la sociedad, principalmente para la economía y la salud pública. [63]

El envejecimiento es un proceso irreversible y sus efectos en la pérdida de la funcionalidad pueden observarse a todos los niveles. Debido a este impacto y a sus implicaciones, este proceso se ha convertido en el punto de mira de muchas investigaciones que buscan comprender su mecanismo, frenar su avance o incluso propiciar su reversión [1, 24, 25, 31, 41, 44].

Fruto de muchas investigaciones han surgido multitud de teorías [3] que tratan de explicar el envejecimiento y todo lo que le rodea, siendo la mayor contribución de todas ellas la identificación de posibles elementos esenciales en el proceso, aspecto que ha permitido la focalización de las investigaciones y el diseño de estrategias para hacer frente a los procesos degenerativos relacionados con la edad. Según la “Teoría Mitocondrial de los Radicales Libres en el Envejecimiento”, una de las más aceptadas actualmente, las mitocondrias son los orgánulos de mayor importancia para entender el envejecimiento [17]. Según esta teoría, y sin descartar las modificaciones que puedan producirse en otros compartimentos celulares, se expone que la acumulación de EROs en las mitocondrias deriva en una pérdida de funcionalidad de estos orgánulos, afectando a la producción de ATP, la mitofagia, la biogénesis mitocondrial y su dinámica de fusión y fisión, mecanismos que aseguran la presencia de una población mitocondrial eficiente en la célula. Esta disfunción de la mitocondria termina por afectar a toda la célula en su conjunto y a los tejidos que conforma [64]. Debido a esto, numerosas investigaciones centran el estudio del proceso del envejecimiento a nivel mitocondrial [65].

De entre todas las aproximaciones experimentales diseñadas para el estudio y tratamiento del envejecimiento, muchas de las cuales han sido mencionadas anteriormente, la RC ha mostrado ser la intervención no genética ni farmacológica más robusta en cuanto a la reducción de la aparición de los efectos propios del envejecimiento, entre los cuales también se encuentran su efecto beneficioso frente al control de estrés oxidativo desencadenado por la edad y el envejecimiento [41, 42]. Cómo produce estos efectos beneficiosos sigue siendo objeto de debate, aunque en los últimos años una serie de estudios otorgan a las sirtuinas un rol central en este proceso [28 - 30]. Debido a esto, se plantea una nueva concepción del estudio del envejecimiento a través del análisis de los mecanismos que afectan a la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , que afecta, a su vez, a la actividad de las sirtuinas entre otras enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$  [31]. Entre las distintas estrategias planteadas encontramos el modelo genético de nuestro trabajo, el de ratones transgénicos que sobreexpresan CYB5R3, modelo que provoca efectos miméticos al de la RC y cuyo mecanismo está previsiblemente ligado al aumento de la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , la regulación de las sirtuinas y a una mayor producción de ácidos grasos insaturados de cadena larga en las membranas biológicas [31]. Este trabajo se centra en el estudio de los efectos que la sobreexpresión de CYB5R3 tiene en ratones de edad

avanzada, a nivel del riñón, tanto desde el punto de vista ultraestructural como desde el punto de vista de marcadores proteicos específicos.

Los estudios planimétricos de las estructuras renales mostraron una tendencia y una variación similar en todos los parámetros analizados. En líneas generales, los marcadores de las figuras de autofagia, el área y circularidad mitocondrial, así como del grosor de la membrana de filtración glomerular presentaban en animales de edad avanzada unos valores menores en condiciones de sobreexpresión de CYB5R3 que en las condiciones control, resultados que pueden entenderse todos ellos como beneficiosos para el individuo.

La disminución del grosor de la lámina basal glomerular es un claro efecto positivo de la transgénesis. Diversos estudios han mostrado que el envejecimiento provoca un aumento del grosor de esta estructura, la cual está relacionada con una disminución de su funcionalidad [57-59]. Sin embargo, análisis observacionales realizados sobre las imágenes de estas estructuras permitieron descubrir que en cualquier condición, fuera cual fuese el genotipo, en los animales de 24 meses aparecían irregularidades y protuberancias, así como acúmulos en las estructuras de la lámina basal glomerular, las cuales no son características de las mismas y suponen un claro signo de deterioro (véase ANEXO, figura 19), lo que indica que, aunque a un ritmo inferior en los transgénicos, el envejecimiento sigue operando en esta estructura.

Se ha descrito que el paso del tiempo conlleva la aparición de mitocondrias de tamaño y morfología anormales, denominadas “megamitocondrias” [66], caracterizadas por un gran tamaño y aparente hinchazón, las cuales son eliminadas por autofagia [67]. Por otra parte, en este mismo tipo de ratón se pudo comprobar que el envejecimiento producía un aumento en el volumen mitocondrial, efecto que es parcialmente atenuado con la RC [68]. Los resultados del presente estudio indican que la sobreexpresión de CYB5R3 parece provocar un efecto atenuante sobre los cambios de tamaño y morfología mitocondrial, lo cual puede ser también interpretado como un efecto positivo. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos para el marcador bioquímico de masa mitocondrial usado, VDAC, cuyos niveles aumentan significativamente con el envejecimiento en la condición control y que la sobreexpresión de CYB5R3 parece disminuir hasta niveles similares a los obtenidos en los ratones jóvenes/adultos de ambos genotipos. No obstante, no es posible establecer una correlación directa entre los datos estructurales y los de expresión mediante Western Blot, ya que los primeros fueron

obtenidos a partir de células de TCP mientras que los segundos se obtuvieron a partir del análisis de extractos proteicos totales de tejido renal, donde además de las células de los TCPs se incluyen otras con alto contenido en mitocondrias (como las de los TCDs). Por ello, estos resultados deben interpretarse en su conjunto de forma muy cautelosa.

De manera cautelosa se deben interpretar también los resultados del análisis de los complejos mitocondriales, donde el patrón de los marcadores no muestra un comportamiento similar en todos ellos y donde los cambios observados pueden interpretarse como beneficiosos en unos marcadores y como negativos en otros. En cuanto a los niveles del complejo I mitocondrial, los resultados muestran que el envejecimiento provoca una disminución de dicho marcador, algo que puede ser interpretado como un efecto perjudicial y que concuerda con lo descrito para el envejecimiento [69, 70]. Sin embargo, lo contrario ocurre con el complejo II, para el que la sobreexpresión de CYB5R3 provocó un aumento de sus niveles en animales jóvenes/adultos, manteniéndose a niveles similares a los observados en animales de edad avanzada, siendo los niveles del complejo en ratones control de edad avanzada significativamente mayores a los de los controles jóvenes. La sobreexpresión de CYB5R3 también tiende a aumentar los niveles de ATP sintasa (complejo V) en los ratones jóvenes, aunque aquí ni el envejecimiento *per se* ni la sobreexpresión en los animales de edad avanzada parecen provocar cambio alguno. Este mismo aumento con la sobreexpresión de CYB5R3 se observa en el complejo III, donde, esta vez, los ratones transgénicos de edad avanzada presentan niveles mayores tanto en comparación tanto con sus controles, como con los transgénicos jóvenes. Estos aumentos de los niveles de los complejos mitocondriales son los observados con la RC, siendo comúnmente interpretados como un efecto beneficioso de la intervención [71]. En cualquier caso, como se ha indicado anteriormente, estos resultados deben complementarse con nuevos estudios.

En cuanto al efecto sobre los marcadores ultraestructurales de las figuras de autofagia, aunque no de manera consistente en todos los aspectos analizados, los resultados muestran una clara tendencia a presentar un área y número de figuras de autofagia, tanto tempranas como tardías y totales, mayor en los ratones silvestres que en los transgénicos. Estudios previos señalan que con la edad la actividad autofágica decae, lo que contribuye a una mayor acumulación de moléculas y orgánulos dañados y, por tanto, a agravar aún más los efectos del envejecimiento y la aparición de enfermedades asociadas [72]. Teniendo en cuenta estos datos, nuestros resultados podrían indicar un

menor proceso autofágico en animales transgénicos y, por consiguiente, la observación de una situación entendida como desfavorable. Sin embargo, existe también la posibilidad de que en estos animales el entorno favorable generado por la sobreexpresión de CYB5R3 esté ligado a la necesidad de un flujo autofágico menor y a un menor acúmulo de figuras autofágicas que en los animales controles. Esta posibilidad es compatible con el menor número de figuras de autofagia encontrado en los transgénicos. De hecho, esto puede concordar con los resultados obtenidos para el marcador de autofagia LC3I, el cual muestra un claro aumento con la edad. Como se ha mencionado, la proforma de LC3 se escinde en el citosol dando lugar a LC3I, que es entonces conjugada con una fosfatidiletanolamina, produciendo la forma LC3II, que la ancla a la membrana del fagóforo durante el inicio de la formación de las vesículas autofágicas [73]. Por tanto, un aumento de LC3I no acompañado por un aumento de LC3II, podría relacionarse con una disminución del flujo autofágico. En nuestro caso, los resultados muestran que LC3I experimenta un aumento significativo con la edad, algo que no se observa en LC3II, únicamente en los ratones transgénicos, lo que puede explicar lo anteriormente mencionado. La instantánea que nos permite observar la microscopía electrónica puede estar mostrando una situación de flujo autofágico ralentizado, acompañado por la acumulación de eventos de autofagia y una mejor situación para los animales transgénicos. No obstante, estos resultados tendrían también que confirmarse con nuevos estudios en los cuales se amplíe el número de marcadores a analizar.

Los efectos descritos del envejecimiento también se observan en los resultados obtenidos para mTOR, dónde la edad provoca un aumento de sus niveles tanto en los ratones silvestres como en los transgénicos, en lo que parece ser un efecto general del envejecimiento sobre este parámetro [51]. Respecto a los animales de edad avanzada, la transgénesis no provoca cambios significativos. A pesar de ello, estos resultados en animales de edad avanzada, se pueden correlacionar los resultados descritos arriba para el estudio planimétrico de las figuras de autofagia y del marcador LC3, pues el aumento que sufre los animales transgénicos con la edad es más significativo que el que sufren los animales controles, pudiéndose esto relacionar con el menor flujo autofágico observado anteriormente con los marcadores planimétricos y de Western Blot. En cuanto a los efectos de la transgénesis en los ratones jóvenes, aquí sí se observa una tendencia clara a presentar menores niveles de mTOR en los transgénicos que en los controles, demostrándose el claro efecto de la sobreexpresión de CYB5R3, el cual, desde el punto

de vista de la regulación de la autofagia, puede entenderse como un efecto positivo para el organismo.

Para el marcador de apoptosis estudiado, Apaf-1, los resultados obtenidos nuevamente concuerdan con el aumento de la apoptosis descrita con el envejecimiento, que se relacionan con el deterioro y las enfermedades asociadas al mismo [52, 53]. El perfil del marcador mostró que la transgénesis no provocaba cambios significativos, tanto si se analizan animales jóvenes como de edad avanzada. Sin embargo, y aunque la edad provocaba un aumento del marcado tanto en ratones silvestres como en los transgénicos, este aumento era más consistente y significativo en los controles. En principio, estos resultados pueden interpretarse como un efecto positivo de la sobreexpresión de la CYB5R3. En cualquier caso, al igual que con los marcadores de autofagia, estos resultados deberán completarse con nuevos estudios y con el análisis de más marcadores.

Como se ha mostrado, el envejecimiento es un proceso de gran complejidad y está ligado a multitud de cambios metabólicos y funcionales, entre ellos la pérdida de la proteostasis, el acúmulo de proteínas dañadas, pérdida de la funcionalidad de las mismas, disfunción mitocondrial o desregulación de los mecanismos de detección de nutrientes [1]. Todos estos factores pueden influir en la cantidad y funcionalidad de los componentes moleculares del sistema, generando los perfiles de aumento de expresión de los marcadores proteicos observados en los resultados de Western Blot, posiblemente consecuencia del acúmulo de proteínas disfuncionales, y del incremento de los niveles de dichas proteínas como mecanismo de regulación para tratar de compensar el efecto de dicha falta de funcionalidad. De esta forma se generaría, en última instancia, una situación de desregularización que retroalimentaría positivamente todos los efectos devastadores del envejecimiento.

A pesar de las limitaciones señaladas, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de CYB5R3 resulta en cambios estructurales y funcionales en riñón que, de forma global, pueden considerarse como positivos. Los animales de más avanzada edad estudiados en este trabajo fueron de 24 meses que equivaldría a una persona de, aproximadamente, 70 años (véase Figura 20 en el ANEXO) [74]. Aunque a dicha edad es posible detectar muchos de los cambios que el envejecimiento produce en los organismos, sería de gran interés ampliar estos estudios en modelos de edad más avanzada aún, para, de esta forma, determinar con mayor exactitud los cambios moleculares y fisiológicos que el envejecimiento produce en los diversos tejidos y órganos. En este

sentido, el uso de animales transgénicos será de gran utilidad a la hora de detectar los procesos bioquímicos subyacentes.

## **6. Conclusiones**

1. La sobreexpresión de la enzima CYB5R3 provoca en ratones de edad avanzada una disminución del grosor de la lámina basal glomerular sin que induzca cambios en el grosor de los procesos podocitarios. Este doble efecto es compatible con una mejora en el proceso de ultrafiltrado glomerular.

2. La sobreexpresión de la enzima CYB5R3 provoca una disminución en el tamaño y circularidad mitocondrial, efecto compatible con una mejor disponibilidad de estos orgánulos a su eliminación por autofagia sin que disminuya la masa mitocondrial, como se desprende de los resultados de los marcadores analizados.

3. El estudio planimétrico de las figuras de autofagia muestra una clara tendencia de los ratones transgénicos de edad avanzada a presentar menor número y tamaño de figuras de autofagia, tanto tempranas, tardías, como totales. Estos resultados, junto a los obtenidos acerca del marcador proteico específico analizado, son compatibles con un mejor flujo autofágico en los ratones transgénicos CYB5R3.

4. En su conjunto, los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones de edad avanzada provoca una serie de cambios sobre varios aspectos de la fisiología y estructura renal que pueden entenderse como beneficiosos.

## Bibliografía

1. López-otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., *et al.* The Hallmarks of Aging Longevity. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
2. Chrysohoou, C. & Stefanadis, C. Longevity and Diet. Myth or pragmatism? *Maturitas* **76**, 303–307 (2013).
3. Medvedev, Z. A. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **65**, 375–398 (1990).
4. Rattan, S. I. S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* **40**, 1230–1238 (2006).
5. Robert Cronin, Nicholas Dias & Yung Peng, R. K. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
6. Jin, K. Modern biological theories of aging. *Aging Dis.* **1**, 72–74 (2010).
7. Davidovic, M., Goran, S., Svorcan, P. *et al.* Old age as a privilege of the ‘selfish ones’. *Aging Dis.* **1**, 139–146 (2010).
8. Hertoghe, T. The ‘multiple hormone deficiency’ theory of aging: Is human senescence caused mainly by multiple hormone deficiencies? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1057**, 448–465 (2005).
9. Fulop, T., Witkowski, J. M., Pawelec, G., Alan, C. *et al.* On the immunological theory of aging. *Aging Facts Theor.* **39**, 163–176 (2014).
10. Weismann, A. Ueber die Dauer des Lebens. *G. Fischer* (1882).
11. Brys, K., Vanfleteren, J. R. & Braeckman, B. P. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **42**, 845–851 (2007).
12. Bjorksten, J. & Tenhu, H. The crosslinking theory of aging - Added evidence. *Exp. Gerontol.* **25**, 91–95 (1990).
13. Harman, D. Aging: A Theory on Free Radical Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
14. Cutler, R. G. The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity. *The aging brain* **20**, 25–114 (1982).
15. De Loof, A., De Haes, W., Boerjan, B. *et al.* The Fading Electricity Theory of Ageing: The missing biophysical principle? *Ageing Res. Rev.* **12**, 58–66 (2013).
16. Zs.-Nagy, I. A membrane hypothesis of aging. *J. Theor. Biol.* **75**, 189–195 (1978).
17. Miquel, J., Economos, A. C., Fleming, J. *et al.* Mitochondrial role in cell aging.

- Exp. Gerontol.* **15**, 575–591 (1980).
18. Ehninger, D., Neff, F. & Xie, K. Longevity, aging and rapamycin. *Cell. Mol. life Sci.* **71**, 4325–4346 (2014).
  19. Gutierrez-Mariscal, F. M., Yubero-Serrano, E. M., Villalba, J. M. *et al.* Coenzyme Q10: From bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 2240–2257 (2019).
  20. Baxter, R. A. Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J. Cosmet. Dermatol.* **7**, 2–7 (2008).
  21. Podhorecka, M., Ibanez, B. & Dmoszyńska, A. Metformin - its potential anti-cancer and anti-aging effects. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **71**, 170–175 (2017).
  22. Amaya-Montoya, M., Pérez-Londoño, A., Guatibonza-García, V. *et al.* Cellular Senescence as a Therapeutic Target for Age-Related Disease: A Review. *Advances in Therapy.* 1-18 (2020).
  23. Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D. *et al.* NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease. *Nature Metabolism.* 1-23 (2020).
  24. Selman, C. & Withers, D. J. Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**, 99–107 (2011).
  25. Ladiges, W., Van Remmen, H., Strong, R. *et al.* Lifespan extension in genetically modified mice. *Aging Cell* **8**, 346–352 (2009).
  26. Varela, E., Munoz-Lorente, M. A., Tejera, A. M., Ortega, S. *et al.* Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat. Commun.* **7**, 1–16 (2016).
  27. Lin, S.J., Defossez, P.A. & Guarente, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (80)*. **289**, 2126–2128 (2000).
  28. Bordone, L. & Guarente, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **6**, 298–305 (2005).
  29. Rogina, B. & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15998–16003 (2004).
  30. Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K. *et al.* Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science (80)*. **305**, 390–392 (2004).
  31. Martin-Montalvo, A., Sun, Y., Diaz-Ruiz, A. *et al.* Cytochrome b5 reductase and the control of lipid metabolism and healthspan. *npj Aging Mech. Dis.* **2**, 1–12

- (2016).
32. De Cabo, R., Siendones, E., Minor, R. *et al.* CYB5R3: a key player in aerobic metabolism and aging? *Aging (Albany NY)* **2**, 63 (2010).
  33. Chrysohoou, C., Panagiotakos, D., Pitsavos, C. *et al.* Adherence to the Mediterranean diet is associated with renal function among healthy adults: the ATTICA study. *J. Ren. Nutr.* **20**, 176–184 (2010).
  34. Chrysohoou, C., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., *et al.* Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 152–158 (2004).
  35. Chrysohoou, C., Tsitsinakis, G., Siassos, G. *et al.* Fish consumption moderates depressive symptomatology in elderly men and women from the IKARIA study. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, (2011).
  36. Di Daniele, N., Noce, A., Vidiri, M. *et al.* Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget* **8**, 8947 (2017).
  37. Veech, R.L., Bradshaw, P., Clarke, K. *et al.* Ketone bodies mimic the life span extending properties of caloric restriction. *IUBMB Life* **69**, 305–314 (2017).
  38. Greco, T., Glenn, T. C., Hovda, D. A. *et al.* Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 1603–1613 (2016).
  39. Anton, S. D., Moehl, K., Donahoo, W. *et al.* Flipping the metabolic switch: understanding and applying the health benefits of fasting. *Obesity* **26**, 254–268 (2018).
  40. de Cabo, R. & Mattson, M. P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2541–2551 (2019).
  41. Heilbronn, L. K. & Ravussin, E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 361–369 (2003).
  42. Mitchell, S. J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M *et al.* Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab.* **23**, 1093–1112 (2016).
  43. Mattison, J. A., Colman, R., Beasley, T. *et al.* Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat. Commun.* **8**, 1–12 (2017).
  44. Most, J., Tosti, V., Redman, L.m. & Fontana, L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing research review*, 39, 36-45 (2017).

45. López-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B. *et al.* Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1768–1773 (2006).
46. Vaquero, A. & Reinberg, D. Calorie restriction and the exercise of chromatin. *Genes Dev.* **23**, 1849–1869 (2009).
47. Olgun, A. Converting NADH to NAD<sup>+</sup> by nicotinamide nucleotide transhydrogenase as a novel strategy against mitochondrial pathologies during aging. *Biogerontology* **10**, 531–534 (2009).
48. Nakagawa, S., Lagisz, M., Hector, K. L. *et al.* Comparative and meta-analytic insights into life extension via dietary restriction. *Aging Cell* **11**, 401–409 (2012).
49. Galluzzi, L., Baehrecke, E., Ballabio, A. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
50. Ohmuraya, M., Sugano, A., Hirota, M. *et al.* Role of intrapancreatic SPINK1/Spink3 expression in the development of pancreatitis. *Front. Physiol.* **3**, 126 (2012).
51. Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J. *et al.* The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851–865 (2008).
52. Tower, J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res. Rev.* **23**, 90–100 (2015).
53. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
54. De Cabo, R., Cabello, R., Rios, M. *et al.* Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. *Exp. Gerontol.* **39**, 297–304 (2004).
55. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **13**, 225–238 (2012).
56. Rodríguez-López, S., López-Bellón, J. González-Reyes, J. *et al.* Mitochondrial adaptations in liver and skeletal muscle to pro-longevity nutritional and genetic interventions: the crosstalk between calorie restriction and CYB5R3 overexpression in transgenic mice. *GeroScience* 1–18 (2020).
57. Weinstein, J. R. & Anderson, S. The aging kidney: physiological changes. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **17**, 302–307 (2010).
58. Arif, E. & Nihalani, D. Glomerular filtration barrier assembly: an insight. *Postdoc J. a J. Postdr. Res. Postdr. Aff.* **1**, 33 (2013).

59. Jassal, S. V & Oreopoulos, D. G. The aging kidney. *Geriatr. Nephrol. Urol.* **8**, 141–147 (1998).
60. Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A. *et al.* Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 902–913 (2011).
61. Ross, M. H. & Pawlina, W. H. Texto y atlas color con biología celular y molecular. *Médica Panam.* (2007).
62. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **12**, 1–222 (2016).
63. Valencia, M. I. B. Aging population: a challenge for public health. *Colomb. J. Anesthesiol.* **40**, 192–194 (2012).
64. Sun, N., Youle, R. J. & Finkel, T. The mitochondrial basis of aging. *Mol. Cell* **61**, 654–666 (2016).
65. Gonzalez-Freire, M., de Cabe, R., Bernier, M. *et al.* Reconsidering the role of mitochondria in aging. *Journals Gerontol. Ser. A Biomed. Sci. Med. Sci.* **70**, 1334–1342 (2015).
66. Tandler, B. & Hoppel, C. L. Giant mitochondria (megamitochondria). Elsevier, Encyclopedia of Biological Chemistry, volume 2, pp. 186–188 (2004).
67. Lenoir, O., Tharaux, P.L. & Huber, T. B. Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models. *Kidney Int.* **90**, 950–964 (2016).
68. Calvo-Rubio, M., Burón, M.I., López-Lluch, G., *et al.* Dietary fat composition influences glomerular and proximal convoluted tubule cell structure and autophagic processes in kidneys from calorie-restricted mice. *Aging Cell*, **15**(3), 477–487. (2016)
69. Lenaz, G., Bovina, C., Catelluccio, C. *et al.* Mitochondrial complex I defects in aging in *Detection of Mitochondrial Diseases* 329–333 (Springer, 1997).
70. Tatarkova, Z., Kika, S., Racay, P. *et al.* Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart. *Physiol. Res.* **60**, 281 (2011).
71. Lanza, I. R., Zabielski, P., Klaus, K. *et al.* Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis. *Cell Metab.* **16**, 777–788 (2012).
72. Barbosa, M. C., Grosso, R. A. & Fader, C. M. Hallmarks of aging: an autophagic perspective. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **9**, 790 (2019).

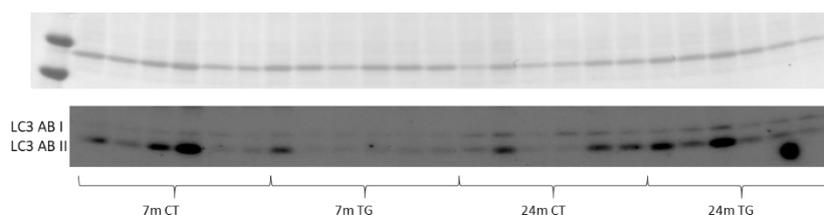
73. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 and Autophagy in Autophagosome and phagosome 77–88. *Springer*, (2008).
74. Flurkey, K., Curren, J. M. & Harrison, D. E. The mouse in biomedical research 637–672. *Elsevier*, (2007).

## ANEXO

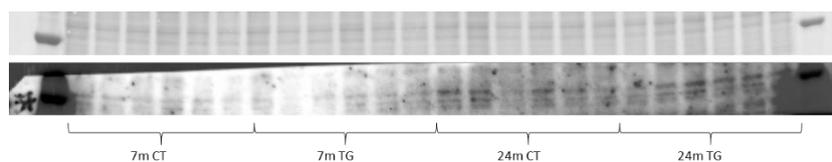
### Declaración de actividades realizadas durante el TFM.

En el momento de iniciar este trabajo, la cohorte de ratones había sido sacrificada y sus órganos recolectados, los bloques de muestras para microscopía ya habían sido incluidos y las muestras de tejido de riñón para los estudios de expresión proteica habían sido almacenados en una solución estabilizadora para, posteriormente, realizar los homogeneizados. Por tanto, la parte experimental de este TFM consistió en: A) la obtención de cortes mediante ultramicrotomía de cada uno de los animales de la cohorte y su posterior contraste. B) Observación, fotografiado y análisis mediante ImageJ de todas las micrografías para los diversos parámetros considerados y C) Obtención de homogeneizados totales de riñón y análisis de expresión proteica mediante técnicas de Western Blot.

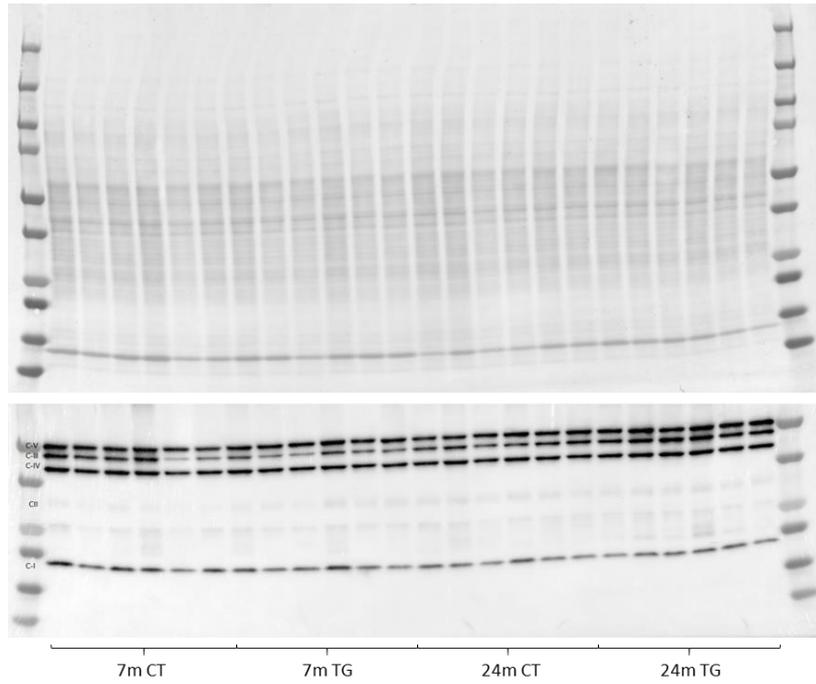
### Geles marcadores bioquímicos analizados mediante Western Blot.



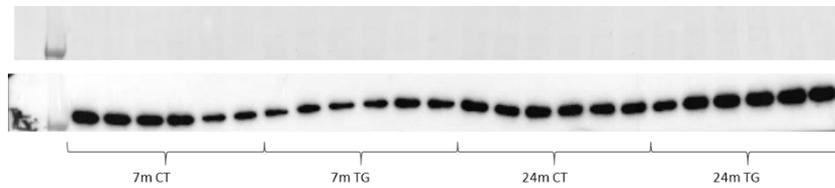
**Figura 14. Gel LC3 AB.** 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses.



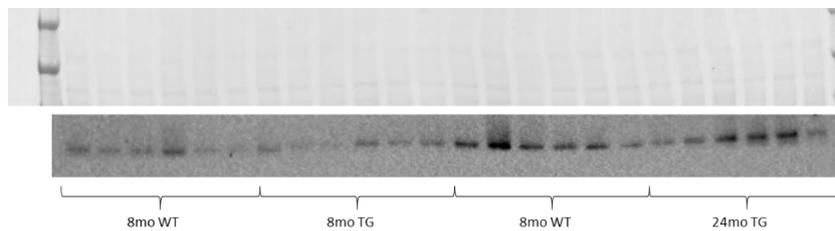
**Figura 15. Gel VDAC.** 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses.



**Figura 16. Gel Complejos mitocondriales.** C-I: complejo I mitocondrial; C-II: complejo II mitocondrial; C-III: complejo III mitocondrial; C-IV: complejo IV mitocondrial; C-V: complejo V mitocondrial. 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses.



**Figura 17. Gel mTOR.** 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses.

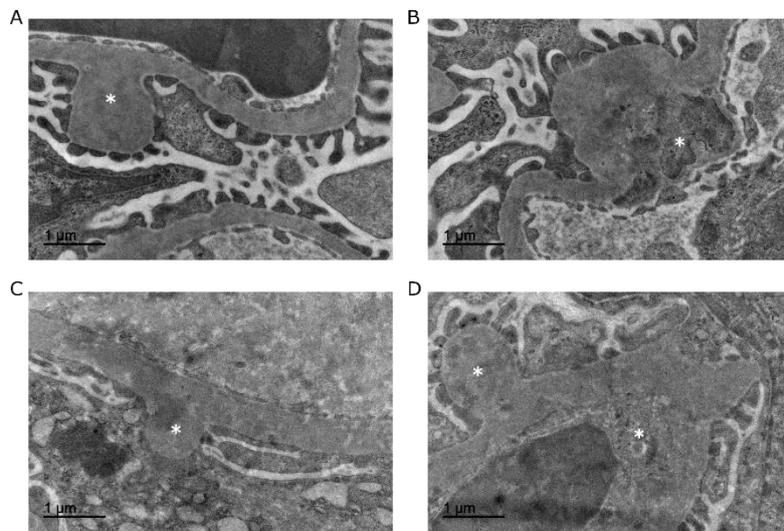


**Figura 18. Gel Apaf-1.** 7m CT: silvestres 7 meses; 7m TG: transgénicos 7 meses; 24m CT: silvestres 24 meses; 24m TG: transgénicos 24 meses.

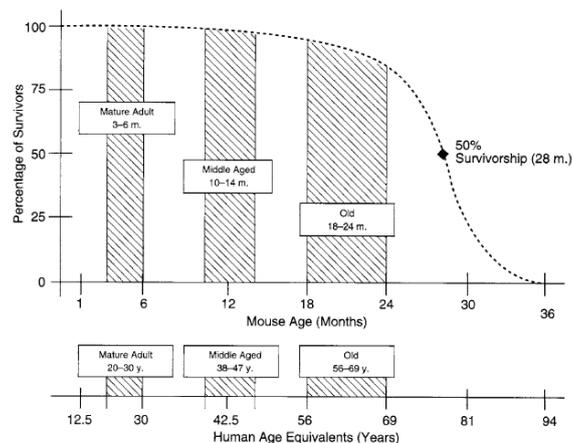
Anticuerpo primario	Dilución	Ref.	Anticuerpo secundario	Dilución	Ref.
LC3 AB	1:1000	CS#4108	Anti-conejo	1:5000	sc-2370
VDAC	1:1000	sc-98708	Anti-conejo	1:5000	sc-2370
Complejos mitocondriales	1:1000	#458099	Anti-ratón	1:5000	sc-2371
mTOR	1:500	CS#29835	Anti-conejo	1:5000	sc-2370
Apaf-1	1:1000	sc-33870	Anti-cabra	1:5000	sc-2350

**Tabla 1. Listado de anticuerpos usados en el estudio.** La tabla incluye concentraciones y las referencias comerciales.

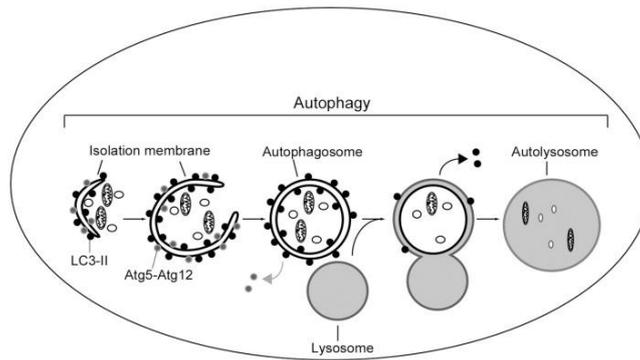
## Figuras complementarias.



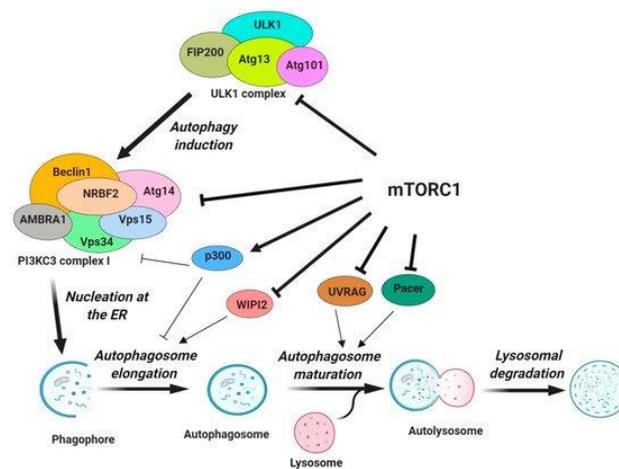
**Figura 19. Irregularidades en la membrana basal glomerular del riñón.** La imagen muestra las alteraciones de la membrana basal glomerular observada en los animales objeto del estudio planimétrico. Entre las alteraciones podemos observar, tanto inflamaciones, en forma de protuberancias, como acúmulo de sustancias sin identificar a nivel de la lámina rara externa de la lámina basal glomerular. A: silvestre 24 meses; B: silvestre 24 meses; C: transgénico 24 meses; D: transgénico 24 meses; \*: irregularidades.



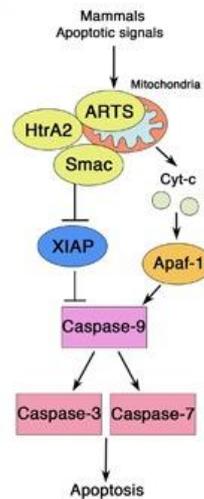
**Figura 20. Rangos de edad representativos para ratones C57BL/6J y comparativa con rangos de edades representativos de humanos.** Fuente: K. Flurkey, J. M. Curren, and D. E. Harrison, "Mouse models in aging research," in the mouse in biomedical research, Elsevier, 2007, pp. 637–672.



**Figura 21. Esquema del proceso autofágico en mamíferos.** Referencia: M. Ohmuraya, A. Sugano, M. Hirota, Y. Takaoka, K. Yamamura, "Role of intrapancreatic SPINK1/Spink3 expression in the development of pancreatitis," *Front. Physiol.*, vol. 3, p. 126, 2012.



**Figura 22. Regulación de la autofagia por el complejo mTOR.** Referencia: Dossou, A. S. & Basu, A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy. *Cancers*, 11(10), 1422 (2019).



**Figura 23. Cascada de señalización de la apoptosis.** Referencia: Nakajima, Y. I. & Kuranaga, E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1422-1430 (2017).